

© 2023 Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, 26: 1-20, 2023.

<https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2023.592>

Diversidad y complejidad estructural del flagelo bacteriano

Clelia Domenzain-Reyna* y Laura Camarena

Depto. de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito, Mario de la Cueva s/n, Ciudad Universitaria, 04510, Alcaldía Coyoacán, Ciudad de México, México. E-mail: *clelia@iibiomedicas.unam.mx

RESUMEN

Esta revisión muestra la estructura y biogénesis del flagelo bacteriano y su diversidad estructural en numerosos modelos bacterianos. Se expone, cómo a partir de un núcleo estructural flagelar conservado (NEFC), se han diversificado las estructuras que modifican su capacidad y función. Esta variabilidad se sabe, participa en la habilidad de adaptación de cada especie a un nicho específico. El motor flagelar bacteriano es una estructura compleja constituida por un rotor y un estator, los cuales se encuentran embebidos en la envoltura celular. La incorporación de nuevos componentes, que contribuyen a su funcionamiento, incluyen la presencia de anillos o discos adicionales a los presentes en el NEFC, cubriendo o interactuando con el cuerpo basal y el estator, lo que permite una mayor eficiencia y velocidad de rotación al favorecer el reclutamiento de un mayor número de estatores, o que permiten la estabilización de estos al rotor. Además, podemos encontrar ganchos más robustos o filamentos con flagelinas modificadas que presentan propiedades enzimáticas. El aumento de los modelos bacterianos estudiados junto con el avance de las técnicas de visualización como la criomicroscopía, han permitido describir la gran riqueza existente en las variaciones de la arquitectura flagelar lo que ha llevado a un cambio de paradigma al lograr entender algunos de los procesos que permiten el ensamblaje y función del motor flagelar. Todo lo mencionado evidencia el momento de rápido progreso que el campo de estudio del flagelo bacteriano muestra recientemente.

Palabras clave: motor flagelar, biogénesis flagelar, estructura flagelar, estator flagelar.

Diversity and structural complexity of the bacterial flagellum

ABSTRACT

This review explores the structure and biogenesis of bacterial flagella, highlighting their structural diversity in various bacterial models. It delves into how these structures, originating from a conserved structural flagellar nucleus (NEFC), have evolved to adapt to different functions and capabilities. This diversity plays a crucial role in each species' ability to thrive in specific ecological niches. The bacterial flagellar motor is a complex apparatus comprising a rotor and a stator embedded in the cell envelope. Recent advancements have revealed the incorporation of new components that enhance its functionality. These components include additional rings or discs beyond those found in the NEFC. These additional elements cover or interact with the basal body and stator, resulting in greater efficiency and rotational speed by facilitating the recruitment of more stators or stabilizing their connection to the rotor. Furthermore, variations are observed in the hooks or filaments, with modified flagellins that possess unique enzymatic properties. The increasing number of bacterial models studied, coupled with advanced visualization techniques such as cryo-microscopy, has unveiled the remarkable diversity in flagellar architecture. This, in turn, has led to a paradigm shift in our understanding of the assembly and operation of the flagellar motor. In conclusion, the field of bacterial flagellum research is experiencing a period of rapid progress, driven by a growing body of evidence and the development of innovative visualization techniques. This progress enhances our understanding of this vital bacterial structure and its role in bacterial adaptation and function.

Keywords: flagellar motor, flagellar biogenesis, flagellar structure, flagellar stator.

INTRODUCCIÓN

Las bacterias poseen la habilidad de moverse para conseguir mejores condiciones de crecimiento o huir de ambientes adversos. Este desplazamiento puede ocurrir en superficies semisólidas o en medios líquidos y es el flagelo la principal estructura que confiere esta capacidad a las bacterias (Figura 1) (Wadhwa & Berg, 2022; Grognot & Taute, 2021).

La estructura y función del flagelo ha sido estudiada extensamente en los modelos bacterianos canónicos como *Escherichia coli* y *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, sin embargo, en los últimos años, se han estudiado una variedad cada vez mayor de modelos bacterianos no convencionales, lo que ha abierto la ventana a la gran diversidad estructural del flagelo bacteriano.

Lo anterior aunado a los avances metodológicos en la resolución de estructuras moleculares mediante técnicas como la criomicroscopía electrónica y sus variantes (cryo-EM) (Shepherd, Dalvi & Ghosal, 2022; Bäuerlein & Baumeister, 2021; Nakane *et al.*, 2020), han contribuido significativamente a la comprensión que tenemos al presente sobre el flagelo.

Parte de la diversidad que muestran los modelos bacterianos no convencionales se refleja en la ubicación, distribución y número de flagelos en las bacterias. Hasta ahora se han descrito bacterias con uno o varios de ellos; de ubicación polar (en uno o ambos polos de la célula) o no polar; laterales (distribuidos a lo largo del cuerpo celular); o localizados por completo en el periplasma de la bacteria. Además, existen los que están cubiertos por una extensión de la membrana externa (ME) (Thormann, Beta & Kühn, 2022; Grognot *et al.*, 2021).

Estructuralmente el flagelo bacteriano se divide en: cuerpo basal, gancho, filamento y estator (Figura 1). Esta estructura funciona como un motor rotatorio embebido en la envoltura celular que transforma a la energía química del potencial de membrana en energía mecánica. El filamento forma una hélice que al rotar impulsa el cuerpo de la bacteria. Este motor, cuenta con un componente estático en contacto con la pared de peptidoglicanos y embebido en la membrana interna, además de componentes rotatorios que giran uno con respecto al otro para conseguir la rotación del flagelo.

El análisis *in silico* de los genomas de diversas especies bacterianas, ha mostrado la presencia de genes que codifican para la formación del flagelo en al menos 9 phyla bacterianos diferentes: *Proteobacteria*, *Spirochaetes*, *Aquificae*, *Thermotogae*, *Firmicutes*, *Planctomycetes*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes-Chlorobus* (Snyder, Loman, Fütterer & Pallen, 2009; Liu & Ochman, 2007; Pallen, Penn & Chaudhuri, 2005). La amplia distribución de estos genes muestra la importancia del flagelo en las bacterias. El

análisis filogenético de genomas bacterianos acompañado del conocimiento generado a partir de los modelos de *Escherichia* y *Salmonella*, han permitido definir a las proteínas flagelares conservadas entre especies. A este conjunto de proteínas se le denominó “núcleo estructural flagelar conservado” (NEFC) y está formado por 24 proteínas (Figura 1, Tabla I). Esta base estructural refleja una historia evolutiva compartida que preserva los mecanismos esenciales para el ensamblaje, la rotación y el cambio de dirección en la rotación flagelar (Liu & Ochman, 2007). La conservación de estas proteínas entre diversos phyla nos muestra cómo, a partir de una estructura común entre especies (NEFC), se han duplicado, añadido y cambiado estructuras que modifican su capacidad y función.

En esta revisión, destacaremos el estado actual en el campo de estudio de la estructura del flagelo bacteriano, ya que, en los últimos años, se han publicado numerosos artículos estructurales que resaltan y ponen de manifiesto la diversidad de los modelos bacterianos no convencionales.

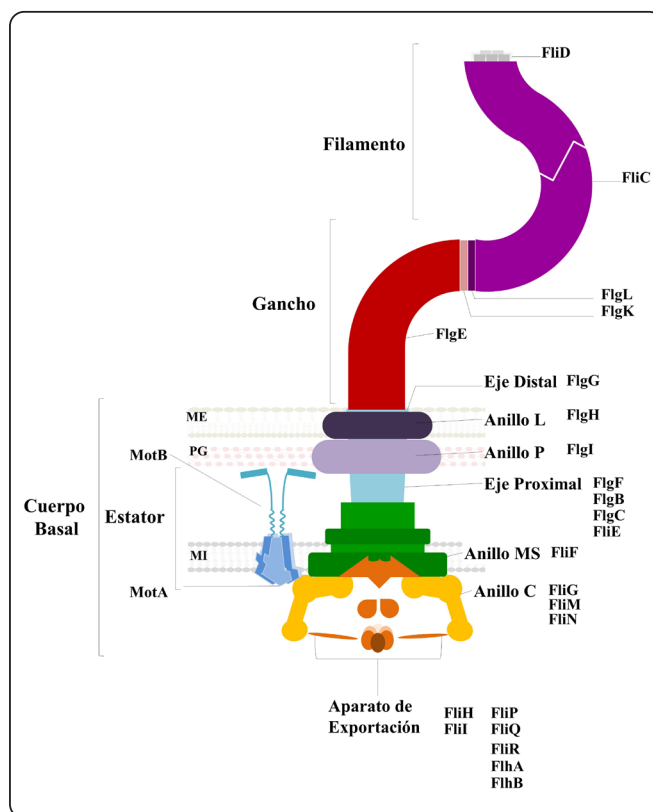


Figura 1. La estructura del motor flagelar en *E. coli* y *Salmonella*: El motor flagelar atraviesa la MI (Membrana Interna), la pared de PG (Pared de Peptidoglicanos) y la ME (Membrana Externa). Se divide en estator y rotor. Este último a su vez se subdivide en: cuerpo basal, gancho y filamento. Se muestran las subestructuras que forman el cuerpo basal: aparato de exportación T3SS, anillo C, anillo MS, anillos P y L y, ejes proximal y distal. Además, se indican todas las proteínas que forman cada estructura y subestructura.

Tabla I. Lista de proteínas que ensamblan el flagelo bacteriano y sus variaciones.

	Subestructura flagelar	Proteína	Forma parte del NEFC*	Especies bacterianas en las que se describe esta proteína	Función	Subunidades presentes en la estructura	Localización en la envoltura celular
Cuerpo Basal	Sistema de secreción flagelar tipo 3 (FT3SS) compuerta de exportación	FliO		<i>E. coli</i> <i>Salmonella</i>	Proteína de andamiaje para la formación del complejo iniciador de la biogénesis flagelar, FliP:FliR		citoplasma
		FliP	NEFC		Componente transmembranal de la puerta de exportación de proteínas dependiente de la fuerza protón motriz	5	MI
		FliR	NEFC			1	MI
		FliQ	NEFC			4	MI
		FlhB	NEFC		Puerta de exportación de proteínas Cambio de especificidad de la exportación de proteínas	1	MI
		FlhA	NEFC		Puerta de exportación de proteínas Cambio de especificidad de la exportación de proteínas Plataforma de anclaje de ATPasa	9	MI
	Anillo MS	FliF	NEFC		Anillo MS	34	MI
	Sistema de secreción flagelar tipo 3 (FT3SS) complejo citoplásmico ATPasa	FliH	NEFC		Anclaje del complejo ATPasa	12	citoplasma
		FliI	NEFC		ATPasa	6	citoplasma
		FliJ		<i>E. coli</i> <i>Salmonella</i>	Complejo ATPasa tallo central	1	citoplasma
		FliY		<i>Bacillus subtilis</i> <i>H. pylori</i> <i>C. jejuni</i>	Anclaje del complejo ATPasa		citoplasma
	Anillo C	FliG	NEFC		Generación del torque interacción con MotA Cambio de dirección en la rotación	34	citoplasma
		FliM	NEFC		Cambio de dirección en la rotación interacción con CheY-P	34	citoplasma
		FliN	NEFC		Cambio de dirección en la rotación interacción con FliH, anclaje de ATPasa	102	citoplasma
	Eje	FliE	NEFC		Interfase entre el anillo MS y el eje. Puerta de exportación de componentes axiales	6	periplasma
		FlgB	NEFC		Eje proximal	5	periplasma
		FlgC	NEFC			6	periplasma
		FlgF	NEFC			5	periplasma
		FlgG	NEFC		Eje distal	24	periplasma
		FlgA		<i>E. coli</i> <i>Salmonella</i>	Chaperona de FlgI (anillo P)		citoplasma
		FlgI		<i>E. coli</i> <i>Salmonella</i>	Anillo P	26	pared de peptidoglicanos
		FlgH		<i>E. coli</i> <i>Salmonella</i>	Anillo L	26	ME
FlgJ			<i>Salmonella</i> <i>E. coli</i>	Cápsula de cierre del eje muramidasa		ME	
		LTasa ^{Bb}		<i>B. burgdorferi</i>	Muramidasa flagelar		periplasma
	SltF		<i>R. sphaeroides</i>	Muramidasa flagelar		periplasma	

Tabla I. Lista de proteínas que ensamblan el flagelo bacteriano y sus variaciones (*continuación*).

	Subestructura flagelar	Proteína	Forma parte del NEFC*	Especies bacterianas en las que se describe esta proteína	Función	Subunidades presentes en la estructura	Localización en la envoltura celular
Gancho	Gancho	FlgD	NEFC		Cápsula de cierre del gancho	5	espacio extracelular
		FlgE	NEFC		Gancho	~120	espacio extracelular
		FliK		<i>Salmonella E. coli</i>	Control de la longitud del gancho		
		FlgN		<i>Salmonella E. coli</i>	Chaperona de exportación específica de FlgK y FlgL		
		FlgK	NEFC		Unión gancho-filamento 1	11	espacio extracelular
		FlgL	NEFC		Unión gancho-filamento 2	11	espacio extracelular
Filamento	Filamento	FliD	NEFC		Cápsula de cierre del filamento	5	espacio extracelular
		FliT		<i>Salmonella E. coli</i>	Chaperona de exportación específica de FliD		citoplasma
		FliC*	NEFC	<i>E. coli</i>	Flagelina	~ 30,000	espacio extracelular
		FliS			Chaperona de exportación específica de FliC		citoplasma
		FlaA		<i>R.sphaeroides</i> Espiroquetas	Flagelina no relacionada con FliC		filamento
		FlaB1-3		Espiroquetas <i>Brachyspira hydrodysenteriae</i>	Flagelinas homólogas de FliC		filamento
		FcpA		<i>Leptospira</i>	Proteína de unión al filamento		filamento
		FcpB		<i>Leptospira</i>	Proteína de unión al filamento		filamento
Estator	Estator	MotA*	NEFC	<i>Salmonella E. coli</i>	Estator de protones	5*	MI
		MotB*	NEFC	<i>Salmonella E. coli</i>	Estator de protones	2*	MI
		PomA		<i>Vibrionaceae</i>	Estator de sodio	5*	MI
		PomB		<i>Vibrionaceae</i>	Estator de sodio	2*	MI
		MotF		<i>R. sphaeroides</i>	Proteína asociada al estator		MI
		FliL		<i>E. coli</i> <i>Vibrionaceae</i> <i>R. sphaeroides</i>	Proteína asociada al estator		MI
		FlgT		<i>Vibrionaceae</i> <i>R. sphaeroides</i>	Anillo H		periplasma
		FlgO		<i>Vibrionaceae</i>	AnilloH		
		FlgP		<i>Vibrionaceae</i> <i>C. jejuni</i> <i>R. sphaeroides</i>	Tapa membrana externa Anillo H Disco proximal <i>C. jejuni</i>		ME
		MotX		<i>Vibrionaceae</i>	Anillo T		periplasma
	MotY		<i>Vibrionaceae</i>	Anillo T		periplasma	

Tabla I. Lista de proteínas que ensamblan el flagelo bacteriano y sus variaciones (continuación).

	Subestructura flagelar	Proteína	Forma parte del NEFC*	Especies bacterianas en las que se describe esta proteína	Función	Subunidades presentes en la estructura	Localización en la envoltura celular
Estator		FlgQ		<i>C. jejuni</i>	Disco Basal		periplasma
		PflA		<i>C. jejuni</i>	Disco Medial		periplasma
		PflB		<i>C. jejuni</i>	Disco Proximal		periplasma
		FlbB		<i>B. burgdorferi</i>	Cuello		periplasma
		FlcA		<i>B. burgdorferi</i>	Cuello		periplasma
		FlcB		<i>B. burgdorferi</i>	Cuello		periplasma
		FlcC		<i>B. burgdorferi</i>	Cuello		periplasma

NEFC⁺: Núcleo Estructural Flagelar Conservado, conformado por 24 proteínas flagelares conservadas en todos los phyla que muestran presencia de proteínas flagelares codificadas en sus genomas (Liu & Ochman, 2007); (*): FliC, MotA y MotB, se incluyen en la lista como NEFC, ya que todos los sistemas flagelares cuentan con proteínas que forman el filamento y los estatores, aunque sus nombres varían, presentan una alta homología en estructura y función; MI: Membrana Interna; ME: Membrana Externa.

Describiremos el flagelo en el orden en el que sucede su ensamblaje, desde la membrana interna (MI), el citoplasma y hacia el espacio extracelular. Haremos una descripción exhaustiva de la biogénesis del motor flagelar, sus componentes y funciones en *E. coli* y en *Salmonella*, para posteriormente mostrar la diversidad estructural que existe en cada subestructura, con énfasis en las variaciones observadas en especies como *Rhodobacter sphaeroides*, *Bacillus subtilis*, *Vibrio alginolyticus*, *Campylobacter jejuni* y *Borrelia burgdorferi* (Tabla II). No se mencionan ni la regulación transcripcional ni la quimiotaxis por ser temas tan extensos que requieren su propia revisión (recomendamos Benítez & Camarena, 2022; Colin, Ni, Laganenka & Sourjik, 2021; Tsang & Hoover, 2014; Smith & Hoover, 2009).

EL MOTOR FLAGELAR EN *E. COLI* Y *SALMONELLA* ESTRUCTURA Y BIOGÉNESIS

El cuerpo basal: base, transportador y gobernador de la rotación

El cuerpo basal es la primera estructura en ensamblarse, además de ser el cimiento o base del rotor, que lo ancla a la envoltura celular, está involucrado activamente en el transporte de los componentes axiales del flagelo, así como en la rotación y en el cambio de dirección.

El cuerpo basal está compuesto por el eje que es un tubo que recorre la envoltura celular y al que se añaden una serie de anillos. El primero de ellos es el anillo C que se encuentra en el citoplasma de la bacteria, seguido por el anillo MS, embebido en la MI, y los anillos P y L, localizados a la altura del periplasma y de la ME respectivamente. Finalmente, en el citoplasma dentro del anillo C se localiza el sistema de secreción tipo 3 flagelar (fT3SS). Este último formado por una compuerta,

embebida en la MI y con una porción citoplásmica que forma la plataforma de anclaje del último componente del fT3SS, el complejo ATPasa (Figura 1).

La biogénesis flagelar en *Salmonella* comienza en la MI con el ensamblaje de la compuerta de exportación del fT3SS. El componente transmembranal de la compuerta está formado por cinco subunidades de FliP, cuatro de FliQ, una subunidad de FliR y FlhB, nueve subunidades de FlhA (FliP5Q4R-FlhB-FlhA9) y FliO. Esta última es indispensable para su ensamblaje, pero no forma parte de la estructura final (Fabiani *et al.*, 2017).

Inicialmente, FliO trabaja como chaperona que facilita la oligomerización del pentámero de FliP. A este complejo se une una subunidad de FliR formando así un pseudo hexámero, y en la parte externa de este último complejo se unen 4 subunidades de FliQ (Tan *et al.*, 2021; Fabiani *et al.*, 2017; Fukumura *et al.*, 2017). Es en este momento que FlhB se une y da paso a la unión de un anillo formado por 9 subunidades de FlhA. Es entonces cuando FliO se libera y concluye la formación de la compuerta de exportación del fT3SS (Milne-Davies, Wimmi & Diepold, 2021; Kuhlen *et al.*, 2018).

Posteriormente rodeando a la compuerta del sistema de secreción se ensambla el anillo MS. Este anillo, predominantemente periplásmico, está formado por una única proteína, FliF, que se ancla a la MI mediante dos hélices transmembranales ubicadas en su extremo amino y cerca del carboxilo terminal (Ueno, Oosawa & Aizawa, 1992). FliF, forma un anillo de dos niveles, de simetría interna mixta, lo que en un inicio hizo suponer que el anillo MS estaba formado por dos anillos distintos (DePamphilis & Adler, 1971). Además, también se pensó que FliF tenía una estequiometría de 23 subunidades

Tabla II. Características de las bacterias discutidas en esta revisión.

Especie bacteriana	Clase	Gram	Distribución del Flagelo	No. de flagelos	Localización intra o extracelular	Localización en el cuerpo celular
<i>Salmonella enterica serovar Typhimurium</i>	γ -proteobacteria	-	peritrico	5 a 7	flagelo externo	todo el cuerpo de la bacteria
<i>E. coli</i>	γ -proteobacteria	-	peritrico	5 a 7	flagelo externo	todo el cuerpo de la bacteria
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	α -proteobacteria	-	Flagelo 1: lofotrico	1	flagelo externo	subpolar
			Flagelo 2: monotrico (adquirido por transferencia horizontal de una γ -proteobacteria)	5	flagelo externo	polar
<i>Vibrio alginolyticus</i>	γ -proteobacteria	-	monotrico	1	flagelo envuelto por la membrana externa	polar
<i>Campylobacter jejuni</i>	ϵ -proteobacteria	-	lofotrico	1 a 2	flagelo externo	polar
<i>Borrelia burgdorferi</i>	Spirochaetia	-	anfitrico	14 (7+7)	flagelo periplásmico	ambos polos
<i>Bacillus subtilis</i>	Bacilli	+	peritrico	5 a 7	flagelo externo	todo el cuerpo de la bacteria

(Ueno *et al.*, 1992), sin embargo, las observaciones por cryo-ET, revelaron que está formado por un único anillo de dos niveles de 34 subunidades de FliF. Al exportarse, plegarse e insertarse en la MI, FliF ensambla en un inicio, una estructura en forma de anillo conformado por 34 subunidades denominado cuello. A continuación, en la región más proximal a la MI e insertada en ella continúa la formación del anillo MS donde las 34 subunidades se distribuyen formando un anillo de 23 subunidades centrales y 11 subunidades extendidas hacia la cara externa del anillo lo que explica lo observado previamente (Mariano *et al.*, 2022; Johnson *et al.*, 2020). Es el proceso de plegamiento de FliF lo que permite la formación de este anillo. FliF está formada por tres dominios globulares denominados RBM1, 2 y 3 (dominios de construcción de anillos, RBM) (Bergeron, 2016). El plegamiento del anillo MS comienza con la secreción vía SEC de los dominios RBM1 y 2. La interacción entre ambos dominios mantiene el estado monomérico de FliF. A continuación, el dominio RBM3 se secreta y se pliega formando el cuello del anillo MS con simetría de 34 subunidades. Entonces, RBM 2 se pliega para formar un anillo de simetría de 23 subunidades (Johnson *et al.*, 2020). El plegamiento de RBM2, es dirigido por la oligomerización inicial de RBM3, lo que deja 11 subunidades de estos dominios hacia el exterior, manteniendo una simetría de 34 subunidades en la región de interacción con el anillo C. Los dominios RBM1 y 2 en conjunto se terminan de plegar y aparentan un segundo anillo

que contactan con el aparato de secreción. La región carboxilo de FliF contacta directamente con el anillo C (Mariano *et al.*, 2022; Kawamoto *et al.*, 2021; Takekawa *et al.*, 2021; Johnson *et al.*, 2020).

El anillo C controla el cambio de dirección de rotación del flagelo y la generación del torque. Es necesario para la conclusión del ensamblaje y función del f3TSS y participa en el transporte de los componentes axiales del flagelo. En *Salmonella* este anillo es una estructura cilíndrica citoplásmica de 45nm de diámetro y 15nm de alto (Figura 1). Está formado por 34 subunidades de FliG y FliM, y 102 subunidades de FliN (Francis, Sosinsky, Thomas & DeRosier, 1994). En la biogénesis flagelar el anillo C es el siguiente en ensamblarse, se ancla al anillo MS mediante la interacción del carboxilo terminal de FliF con FliG que se divide en tres regiones: la región amino terminal que se une directamente al anillo MS (Xue *et al.*, 2018; Lynch *et al.*, 2017); la región media que interactúa con FliM (Paul, Brunstetter, Titen & Blair, 2011); y la región carboxilo terminal que interactúa con el estator (MotA directamente, ver más adelante). A FliM se une FliN en una relación de 1:3, que, a su vez, interactúa con FliH que es parte del complejo ATPasa (ver más adelante) (McMurry, Murphy & González-Pedrajo, 2006).

A continuación, justo por encima del anillo MS se ensambla FliE que forma una zona de transición entre la compuerta del

aparato de secreción, el anillo MS y el eje. Seis subunidades de FliE se ensamblan por encima de FliR y FliP. La hélice $\alpha 1$ de FliE se une a la superficie interna del anillo MS, mientras que el dominio D0 de esta misma proteína interactúa con FliP, FliR, FlgB y FlgC promoviendo el ensamblaje de FliE en forma de tubo, lo que resulta indispensable para la apertura eficiente de la puerta de salida de las proteínas del canal de exportación del f3TSS (Hendriksen *et al.*, 2021).

El eje es una estructura tubular, recta y rígida que se forma en el espacio periplásmico y atraviesa la pared de peptidoglicanos y la ME. La región proximal del eje se ensambla de forma secuencial por FlgB, FlgC y FlgF, con una estequiometría de 5:6:5. En la región distal se incorporan progresivamente 24 subunidades de FlgG que presentan tres estados conformacionales distintos (Tan *et al.*, 2021; Johnson *et al.*, 2021).

Actuando como rodamientos, para disminuir la fricción de rotación del eje se encuentran los anillos PyL, que se ensamblan de forma simultánea y sincronizada con la síntesis del eje en el periplasma, atravesando la pared de peptidoglicanos y la ME respectivamente (Figura 1). A diferencia de los componentes axiales, las proteínas necesarias para la formación de estos anillos se secretan vía el sistema SEC de la bacteria (Jones, Momma & Macnab, 1989).

Los anillos PyL están formados, cada uno, por 26 subunidades de las proteínas FlgI y FlgH respectivamente. Las visualizaciones, por cryo-EM, de estos anillos sugieren que la función de disminución de la fricción, cuando rota el eje, se da por dos acciones: la primera, por el anillo P y su interacción mediante puentes de hidrógeno con regiones conservadas de FlgF y FlgG que centran y estabilizan al eje con respecto al rodamiento, la segunda, gracias a la zona de repulsión electrostática entre el anillo L y el eje distal, que permite la rotación a altas velocidades y la eficiente transmisión del torque (Tan *et al.*, 2021). Para la correcta posición y ensamblaje el anillo P requiere de la chaperona FlgA (Nambu & Kutsukake, 2000), mientras que el anillo L depende de la correcta formación de éste último anillo y de la proteína FlgJ. FlgJ es una proteína de dos dominios funcionales: el extremo N-terminal actúa como una proteína de andamiaje esencial para el ensamblaje del eje y el dominio C-terminal tiene función de muraminidasa que degrada la pared de peptidoglicanos para permitir su paso (Zaloba, Bailey-Elkin, Derksen & Mark, 2016).

FlgJ con FlgH y FlgG, forman parte del mecanismo de control que permite la continuidad del proceso de ensamblaje del flagelo a nivel de la transición eje-gancho, sincronizando la formación del poro en la ME, en el lugar donde se encuentra creciendo el eje, con su paso a través de la ME y el cambio en la especificidad de sustratos exportados por el f3TSS, cambiando de FlgG, proteína distal del eje, a las proteínas que forman el gancho. Es indispensable la correcta formación del

anillo L (FlgH) para permitir el paso del eje (FlgG) a través del poro en la ME. Sin embargo, no es hasta que FlgG y su chaperona FlgJ, son capaces de contactar con FlgH, que, por un mecanismo aún no descrito del todo, se libera a FlgJ al espacio extracelular y esto permite que la proteína FlgD (proteína de andamiaje) se ensamble e inicie la formación del gancho (Cohen & Hughes, 2014).

Exportación

El transporte activo de los componentes que forman el eje, el gancho y el filamento a través de la envoltura celular requiere tanto del ATP, como de la fuerza protón motriz del potencial de la membrana (FPM) (Minamino & Namba, 2008; Paul, Erhardt, Hirano, Blair & Hughes, 2008).

La compuerta transmembranal del f3TSS formada, por FlhAB-FliPQR, como se mencionó, utiliza la FPM como fuente de energía para desdoblar y translocar a los sustratos a través de la membrana citoplasmática (Paul *et al.*, 2008). El último componente de la compuerta del aparato de secreción en ensamblarse es FlhA cuya porción citoplásmica constituye la plataforma de unión del complejo ATPasa que se ensambla dentro del anillo C y constituye la región citoplásmica del f3TSS. Anclado a los extremos C-terminal de FlhA y FlhB se asocia el complejo ATPasa. Este complejo está formado por un anillo hexamérico de FliI (la ATPasa), una subunidad de FliJ y doce subunidades de FliH. La asociación de FliH con las proteínas FliN del anillo C mantienen al anillo de FliI en la base del aparato de exportación y a la proteína FliJ, localizada en el centro del anillo de FliI, en forma de tallo, interactuando con FlhA (Minamino Kinoshita & Namba, 2022a; Minamino, Kinoshita, Inoue, Kitao & Namba, 2022b). La interacción entre FliJ y FlhA es indispensable para la activación de la compuerta de exportación (Minamino, Morimoto, Hara & Namba, 2011).

Los sustratos transportados a través del f3TSS se dividen en dos clases: tempranos, los que forman al eje y al gancho (FliE, FlgBCFG y FlgE), y tardíos, requeridos para la formación del filamento (FlgKL, FliC y FliD). Los primeros no necesitan de chaperonas específicas, mientras que los segundos sí (Minamino *et al.*, 2022b). Las proteínas FlgN, FliS y FliT, chaperonas de FlgK-FlgL, FliC y FliD respectivamente (ver más adelante) actúan de forma sustrato-específico, no sólo para proteger al sustrato de la degradación y de la agregación en el citoplasma, sino también para la transferencia eficiente de sus sustratos al f3TSS y su posterior transporte en conformación extendida por el estrecho poro de la compuerta de exportación de tan solo 2nm de diámetro (Minamino *et al.*, 2022b).

En un inicio los complejos chaperona-sustrato se anclan a FliI (ATPasa) para posteriormente interactuar con FlhA, momento en el que la chaperona se libera y la subunidad entregada se despliega para ser transportada, proceso que requiere de la hidrólisis de ATP (Bange *et al.*, 2010).

La especificidad del sustrato del FT3SS se da gracias a FlhA y FlhB. FlhA es una proteína compuesta por dos dominios: el amino terminal embebido en la MI rodeando a la compuerta de exportación del sistema de secreción, y un dominio carboxilo terminal citoplásmico que forma la plataforma de anclaje de la ATPasa. Estos dos dominios están unidos por una porción flexible (linker) que interactúa con FliJ y activa el canal iónico de la región transmembranal de FlhA lo que permite que la compuerta de exportación acople el flujo de iones con la translocación de los sustratos a través de la membrana, y suma a la FPM al proceso de exportación (Abrusci *et al.*, 2013). El motivo GYXLI de FlhA permite el paso de complejo cerrado a complejo abierto para un mecanismo eficiente y robusto de emparejamiento de energía del sistema de secreción (Minamino *et al.*, 2022a). FlhB funciona como el interruptor del cambio de especificidad en el sustrato reconocido por el FT3SS, al sufrir un corte autocatalítico entre Asn269 y Pro270, localizados en el motivo NPTH indispensable para este procesamiento. Cuando el gancho llega a la longitud específica de 55nm, el aparato de secreción, mediante la interacción entre FliK con FlgD, FlgE y FlhB, termina la exportación de los componentes del gancho para comenzar a exportar los componentes del filamento. La interacción entre FliK y la forma proteolizada de FlhB inducen un cambio estructural en FlhA que da lugar al cambio de especificidad del FT3SS (Inoue *et al.*, 2019).

Además de su papel en el transporte de las proteínas, el cuerpo basal también se relaciona con la rotación y el cambio de dirección del motor flagelar, que será discutido con detalle en la sección del estator. La rotación del flagelo se da gracias a la interacción de FliG con el asa citoplásmica de MotA, lo que permite la traducción del FPM en fuerza mecánica generando así la rotación del rotor.

El gancho, la junta universal transmisora del torque

Justo por encima del eje, se ensambla el gancho, también denominada, junta universal. El gancho tiene dos grandes funciones, une y transmite la rotación del cuerpo basal al filamento. Es una estructura tubular curva y helicoidal, que es flexible cuando se dobla, pero rígida ante las fuerzas de torsión. Estas características mecánicas permiten la transmisión del torque generado por el motor y la formación de la trenza de los filamentos en las bacterias peritricas como *Salmonella* y *E. coli* (Nord *et al.*, 2022; Samatey *et al.*, 2004).

El gancho, de 15nm de ancho y 55 de largo, está formado por 120 subunidades de la proteína FlgE (Figura 1) (Jones, Macnab, Okino & Aizawa, 1990) que se ensamblan en 11 protofilamentos.

FlgE de *Salmonella* consta de cuatro dominios D0, D1, D2 y Dc, este último conecta los dominios D0 y D1. Los dominios D0 y D1 se ensamblan formando el canal interno del gancho y el dominio D2 queda expuesto en la cara externa de esta estructura. Este último dominio es el de mayor variabilidad

entre las bacterias. El dominio de conexión está involucrado en las interacciones intramoleculares que estabilizan la estructura tubular del gancho al mismo tiempo que mantienen su flexibilidad. Se ha planteado que la diferencia de la rigidez entre el gancho y el eje reside en el cambio de tamaño que este dominio presenta en las proteínas FlgG y FlgE (Horváth, Kato Miyata & Namba, 2019).

El ensamblaje de FlgE sucede una vez que se concluye el del eje distal (FlgG) y el del anillo L (FlgH), con la ayuda de FlgJ. Para el ensamblaje del gancho es indispensable la presencia de FlgD, que es su proteína de andamiaje, la cual dirige el ensamblaje de FlgE en la punta creciente del gancho, una subunidad a la vez (Ohnishi, Ohto, Aizawa, Macnab & Iino, 1994). El tamaño del gancho está fina y estrictamente regulado por un mecanismo dependiente de FliK y de la autoproteólisis de FlhB, que aún no está descrito del todo y en el cual existe cierta controversia. Durante el ensamblaje del gancho, FliK se secreta, ocasionalmente, para medir la longitud ensamblada del gancho hasta ese momento, actuando como una regla molecular, mecanismo que permite la regulación estricta de su longitud (Hirano, Yamaguchi, Oosawa & Aizawa, 1994). Cuando el gancho llega al tamaño específico (55 nm), la autoproteólisis de FlhB en el motivo NPTH, cambia la especificidad de los sustratos secretados por el FT3SS. Este deja de exportar componentes del gancho para secretar los del filamento (Minamino, Inoue, Kinoshita & Namba, 2019). Se reemplaza a FlgD por las proteínas asociadas al gancho, HAP, HAP1 (FlgK) y HAP3 (FlgL) y posteriormente la proteína de andamiaje de la flagelina, FliD (HAP2) (Ikeda, Homma, Iino, Asakura & Kamiya, 1987). Justo debajo de FliD se comienza a ensamblar el filamento. FlgK y FlgL forman una zona de transición entre el gancho y el filamento que es posible detectar en las micrografías como una zona adelgazada (Ikeda *et al.*, 1987). Se ha demostrado que HAP3 es la proteína que se encuentra en contacto directo con la flagelina y es importante para controlar las transiciones polimórficas del filamento generadas por la rotación (Fahrner, Block, Krishnaswamy, Parkinson & Berg, 1994). Esta evidencia hace pensar que la estabilidad mecánica del filamento depende, en parte, de la estructura de las proteínas con las que se encuentra anclada.

El filamento, más que una propela

El último elemento del rotor que se ensambla es el filamento, la subestructura más axial del motor flagelar. Puede llegar a medir hasta 15µm de largo y está formado por miles de subunidades (~30,000) de una sola proteína, la flagelina.

El filamento es una estructura rígida, de forma helicoidal, que al rotar desplaza el líquido permitiendo el desplazamiento de la célula. Esta hélice es capaz de pasar por transiciones polimórficas inducidas por la fuerza de giro aplicada por la base del motor. Una característica de la flagelina es su capacidad de autoensamblarse *in vitro*, formando una estructura tubular que consta de 11

protofilamentos que forman el filamento (Yonekura, Maki-Yonekura & Namba, 2003; Namba, Yamashita & Vonderviszt, 1989). La flagelina posee 4 dominios y dos regiones de alta conservación en el N-terminal y el C-terminal que abarcan aproximadamente 250 aminoácidos (Beatson, Minamino & Pallen, 2006). Estas dos regiones forman los dominios D0 y D1 que se ensamblan formando el poro interno del filamento, y presumiblemente son los responsables de conferirle la capacidad de autoensamblaje al filamento. También se sabe que ahí residen los residuos importantes para las transiciones polimórficas. Los siguientes dos dominios, D2 y D3, se encuentran en la cara externa del filamento.

El estator, nuevo paradigma de funcionamiento y diversidad

El estator en *E. coli* y *Salmonella* es la última estructura del motor flagelar en ensamblarse y es el responsable de generar la fuerza de rotación del rotor. Recientemente fue posible visualizar los estatores, por medio de cryo-EM y cryo-ET, que han revelado los detalles estructurales de los complejos estatores y de los mecanismos que dan lugar a la generación del torque y del trabajo dinámico que en conjunto permiten la rotación del flagelo. Esto ha llevado al campo a un cambio de paradigma en el entendimiento de la función del rotor.

La fuerza de rotación o torque del motor flagelar es generada por el potencial electroquímico de iones específicos en su paso a través de la membrana citoplasmática. El complejo responsable de la generación del torque está formado por las proteínas MotA y MotB. MotA es una proteína con cuatro HTM y un asa citoplásmica grande entre los cruces 2 y 3. Por otro lado, MotB posee una HTM y en su región periplásmica tiene una región que funciona como tapón molecular (Plug), una región flexible (linker) y un dominio de unión a la pared de peptidoglicano. En conjunto MotA y MotB forman una unidad de estator, que, ahora se sabe, forman complejos con estequiometría 5:2 que se agrupan alrededor del cuerpo basal para generar la fuerza de rotación (Deme *et al.*, 2020; Santiveri *et al.*, 2020). Estos complejos estatores difunden libremente en la MI de la bacteria. Para ser reclutados y activados en la base del rotor se requiere que el dominio de unión a la pared de peptidoglicanos de MotB se anclen a ella. De esta forma, los complejos pueden funcionar como estatores del motor al estar anclados a la envoltura celular (Mot & Vanderleyden, 1994; Chun & Parkinson, 1988). En *E. coli* la región del plug de MotB está formada por una hélice anfipática que sirve como una puerta que regula el paso de los protones a través de los canales del estator según se encuentre cerca de la MI o desplegada hacia el periplasma (Hosking, Vogt, Bakker & Manson, 2006). Los estatores acoplan el paso de los iones a través de la membrana con la rotación del motor (Zhou, Lloyd & Blair, 1998). La fuerza es generada por el paso de los protones a través de un canal formado por las HTM 3 y 4 de MotA y la HTM de MotB. Cada complejo estator tiene dos canales por los que se pueden transportar los iones. El aminoácido Asp33 de la HTM de MotB media la unión de protones en su

paso por el canal. Este paso induce un cambio conformacional en el asa citoplasmática de MotA, que mantiene interacciones electrostáticas con una región de FliG, componente del anillo C. La dinámica de estas interacciones provee la fuerza que hace girar al motor. El complejo de 5 subunidades de MotA rodea al dímero de MotB y gira con respecto a este y a su vez la rotación de MotA hace girar al anillo C, de manera similar a los engranajes de un reloj (Deme *et al.*, 2020; Santiveri *et al.*, 2020). El cambio de dirección de la rotación se da cuando FliG cambia de conformación, haciendo que, en lugar de contactar al cono de MotA por la parte interna del anillo C, esta interacción se dé por la parte externa (Chang, Carroll & Liu, 2021a). Así ahora sabemos que el motor flagelar rota gracias a una serie de engranes rotatorios más pequeños que lo rodean.

Estudios de restitución de los motores flagelares, donde las células ancladas por el filamento eran depletadas de estatores, para a continuación inducir la expresión *de novo* poco a poco de estos, mostraron que la rotación del motor se da mediante una serie de incrementos precisos en la velocidad de rotación. Esto llevó a la conclusión de que cada complejo MotAB da una cantidad fija de torque al rotor y que los incrementos precisos en la velocidad de rotación están dados por el número de estatores funcionales unidos al flagelo, por lo tanto, la fuerza de rotación máxima del flagelo es generada por el número total de complejos asociados al rotor (Block & Berg, 1984). Los primeros análisis de microscopía electrónica por fractura de congelación de flagelos embebidos en la membrana plasmática en *Salmonella* mostraron que los estatores se encuentran acomodados alrededor del cuerpo basal en números de entre 11 y 12 en cada motor (Khan, Dapice & Reese, 1988). Los estatores inactivos se encuentran en la membrana plasmática en conformación cerrada, como poza de reserva, y entran y salen de la base del flagelo según se requiera una mayor fuerza de torque, como cuando aumenta la viscosidad del medio. Al reclutarse hacia al cuerpo basal, los complejos estatores se asocian al rotor, se fijan a la pared de peptidoglicanos y abren los canales para el paso de los iones, para lo que requieren, en parte, de su interacción con el anillo P (Homma & Kojima, 2022). Visualizaciones más recientes de los motores flagelares de estas mismas bacterias por cryo-EM no mostraron la localización de los complejos estatores en la base del flagelo, a diferencia de lo observado para otras especies (ver más adelante), por lo que se estableció la hipótesis de que esto podría ser por la alta tasa de movilidad de estos complejos.

LAS VARIACIONES

EL CUERPO BASAL

Ausencia y sustitución de los anillos L y P

Como se mencionó, los anillos L y P disminuyen la fricción de rotación del eje flagelar (Figura 2A). Aunque en las bacterias Gram-positivas como *B. subtilis*, que carecen de ME, estos anillos no están presentes, y no ha sido descrita ninguna otra estructura que cumpla con esta función, tal vez debido a que la

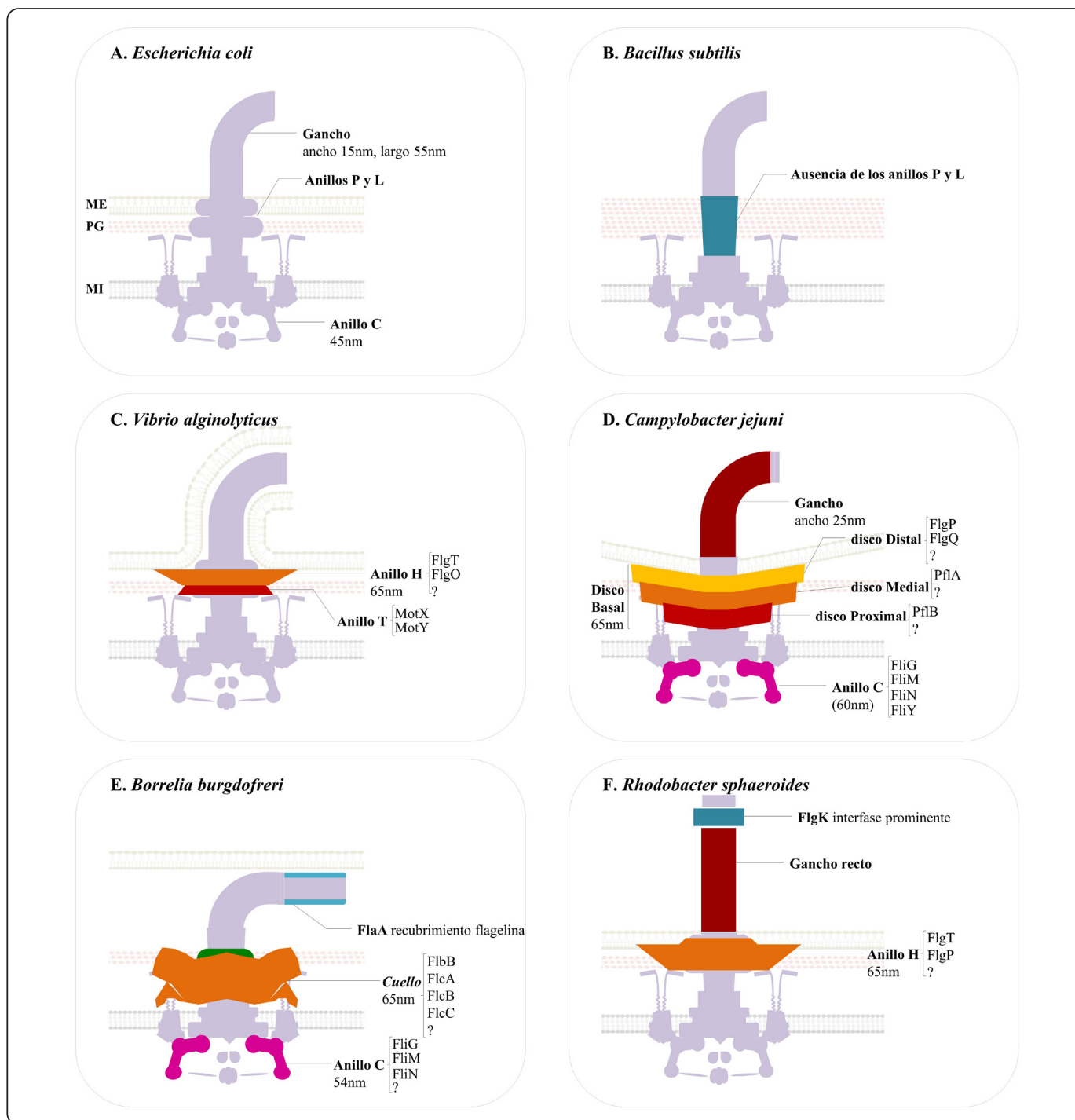


Figura 2. Variaciones sobre la estructura Flagelar. Modelos estructurales de los flagelos de las especies bacterianas descritas en esta revisión que muestran las diferencias entre ellos: A) *E. coli*, estructura del núcleo estructural flagelar conservado (NEFC); B) *B. subtilis*, señala ausencia de la membrana externa, una pared de peptidoglicanos más robusta y la ausencia de los anillos L y P; C) *V. alginolyticus*, se resalta la presencia de los anillos H y T cubriendo a los anillos P y L; D) *C. jejuni*, que muestra la localización del disco basal formado por los discos distal, medial y proximal, aumento en el diámetro del anillo C e incremento en el ancho del gancho; E) *B. burgdorferi*, donde se indica la localización de la estructura del *cuello* que rodea al eje, el aumento en el diámetro del anillo C y el recubrimiento del filamento; F) *R. sphaeroides*, donde se observa el gancho recto, la protuberancia en la zona entre el gancho y el filamento y la localización del anillo H. Se indican las proteínas que forman las estructuras, el signo de interrogación (?) significa la posibilidad de que estas estructuras estén formadas por más proteínas que las descritas en la actualidad. Se muestran las medidas de las variaciones que presentan las estructuras en los diversos modelos bacterianos.

fricción en la pared no sea tan elevada como en el periplasma y la ME (Figura 2B) (Depamphilis & Adler, 1971).

En las espiroquetas como *B. burgdorferi*, que tienen flagelos periplásmicos, sólo se encuentra presente el anillo P y su ensamblaje no es esencial para la rotación flagelar (Liu *et al.*, 2009). En este caso, la reducción de la fricción podría atribuirse a la estructura llamada *cuello* que cubre la región del eje y parte del anillo P, no obstante, en estas bacterias el papel del *cuello* no solo es necesario para reclutar a los estatores, sino también para mantener la orientación de los flagelos en el periplasma y el control de la morfología de las células (Chang, Motaleb & Liu, 2021b) (Figura 2E).

Aumento en el diámetro del anillo C

El análisis de ϵ -proteobacterias como *C. jejuni*, por cryo-ET muestra un aumento del diámetro del anillo C hasta los 60 nm en comparación con los 45 nm que presenta el de *Salmonella* (Beeby *et al.*, 2016; Francis *et al.*, 1994). De acuerdo con lo descrito, FliN es indispensable para la unión de FliH. En bacterias como *B. subtilis*, FliY sustituye a FliN en el anillo C y son mutuamente excluyentes (Ward *et al.*, 2018). Sin embargo, en *C. jejuni* y otras ϵ -proteobacterias, ambas proteínas se conservan y se ensamblan en el anillo C lo que aumenta su diámetro (Figura 2D). Este aumento, da lugar a un área de anclaje mayor para los estatores que se traduce en el incremento del torque producido por la rotación flagelar en las ϵ -proteobacterias (Henderson *et al.*, 2020).

El aumento en el diámetro del anillo C también se ha descrito para espiroquetas como *B. burgdorferi* donde el anillo C mide 54 nm (Figura 2E) (Chen *et al.*, 2011). La razón molecular de ésta variación no se ha descrito hasta el momento, pero se sabe que la carga del motor en las espiroquetas es muy alta por lo que el aumento en el diámetro del anillo C puede estar relacionado con la fuerza que el motor soporta para su mejor desempeño.

Ensamblaje entre el eje y el gancho

Otra función de los anillos L y P es facilitar la biogénesis flagelar al dirigir el paso del eje a través de las diferentes capas de la envoltura celular. Datos que apoyan esta hipótesis muestran la importancia de FlgH y FlgJ como punto de control del paso de ensamblaje entre el eje y el gancho en las bacterias Gram-negativas, como antes se presentó. El arreglo de dos dominios de FlgJ descrito en *Salmonella* resulta ser poco usual entre las bacterias flageladas. El trabajo de Pallen *et al.* (2005) sobre la conservación de las proteínas flagelares en diversos phyla indica que lo más común entre bacterias flageladas es la separación de ambos dominios en proteínas distintas.

Por ejemplo, en *R. sphaeroides* FlgJ sólo presenta el dominio de chaperona y requiere de la transglucosilasa lítica SltF para la formación del eje en su paso por la pared de peptidoglicanos. Ambas proteínas están codificadas dentro

del cluster flagelar lo cual sincroniza su expresión con la biogénesis. La interacción de SltF con FlgJ y las proteínas del eje, dirigen a SltF al lugar específico de la síntesis del flagelo donde la hidrólisis de la pared es requerida (García-Ramos, Mora, Ballado, Camarena & Dreyfus, 2021; Mora, Ballado, González-Pedrajo, Camarena & Dreyfus, 2007; González-Pedrajo, Mora, Ballado, Camarena & Dreyfus, 2002). También en *B. burgdorferi*, recientemente se describió la glucosaminidasa específica indispensable para la biogénesis de su motor flagelar, LTasaBb, sin la cual la progresión eje-gancho no sucede (Xu, Hu, Flesher, Liu & Motaleb, 2021). La variabilidad en la composición de la pared de las bacterias entre phyla podría explicar la separación de las funciones dada la necesidad de diferentes enzimas capaces de degradar la pared de peptidoglicanos dependiendo de la especie. De hecho, un análisis filogenético de FlgJ ha mostrado que la hipótesis más plausible es que en *E. coli* y en *Salmonella* se hayan fusionado ambos dominios dando lugar a FlgJ (Pallen *et al.*, 2005).

EL GANCHO

Tamaño, forma y características físicas del gancho

En las espiroquetas como *B. burgdorferi* o *Treponema denticola*, los ganchos están formados por subunidades de FlgE unidas covalentemente (Figura 2E). Esto es gracias a la presencia de un dominio autocatalítico codificado dentro de la secuencia de FlgE, que añade estabilidad a esta estructura (Miller *et al.*, 2016). Los motores flagelares de las espiroquetas son enteramente periplásmicos y se enrollan en el cuerpo de la bacteria uniéndose entre sí, lo que les confiere una morfología característica en espiral. La alta torsión del gancho, así como la fuerza para mover y cambiar la forma del cuerpo de la bacteria, hace que los ganchos de las espiroquetas estén sujetos a una fuerza de torque mayor que otras especies.

C. jejuni posee ganchos de 25 nm de ancho, en comparación con el de *Salmonella* de 18 nm (Figura 2D) (Fujii, Kato & Namba, 2009). La proteína FlgE de esta bacteria posee dos dominios extras D3 y D4, lo que aumentan su tamaño en cerca de 900 aminoácidos (aa) e incrementa las interacciones entre las subunidades de FlgE que da como resultado ganchos más robustos. Mutantes deficientes en estos dominios producen ganchos frágiles (Matsunami, Barker, Yoon, Wolf & Samatey, 2016; Yoon, Baker, Bulieris, Matsunami & Samatey, 2016). El torque en *C. jejuni* es mayor al de *Salmonella*, y es probable que un gancho con un diámetro mayor le ayude a sobrellevar el aumento de la fuerza de torque.

En el flagelo subpolar de *R. sphaeroides* se observa que el gancho es recto. La eliminación de una región rica en prolinas cerca del amino terminal de FlgE, resulta en ganchos curvos que reducen la capacidad de nado de esta bacteria (Figura 2F) (Ballado, Camarena, González-Pedrajo, Silva-Herzog & Dreyfus, 2001; González-Pedrajo *et al.*, 1997). Se sabe que

FlgG y FlgE de *Salmonella* tienen un alto grado de identidad de un 39%, pero las estructuras que forman estas proteínas, el eje y el gancho respectivamente, poseen propiedades mecánicas distintas, el eje es recto y rígido, mientras que el gancho es curvo y flexible al doblarse. Las diferencias mecánicas de estas dos estructuras están dadas tan solo por diferencias sutiles en la orientación y la interacción entre sus subunidades (Fujii *et al.*, 2017). En esta misma bacteria se ha demostrado que en el extremo N-terminal de FlgG, formado por 18 residuos, se localiza el motivo GSS (secuencia específica de FlgG) que se encuentra ausente en FlgE y que al ser introducido a esta proteína produce ganchos rectos (Hiraoka *et al.*, 2017). En el caso de *Salmonella*, lo mencionado impide la formación de la trenza y reduce la capacidad de nado de la bacteria. En *R. sphaeroides*, al ser una bacteria monotrica, con un patrón de rotación de giro y paro, la estructura recta favorecería la transmisión de la fuerza en una sola dirección perpendicular al cuerpo de la bacteria. En esta misma bacteria la interfase entre el gancho y el filamento, dada por la proteína FlgK (HAP1), es fácilmente visible, en las micrografías electrónicas, como una protuberancia entre el gancho y el filamento (Figura 2F) (Kobayashi *et al.*, 2003; West & Dreyfus, 1997). La razón de esta protuberancia se debe a que FlgK es tres veces más grande que la de *Salmonella*. Las regiones N- y C-terminal de la proteína están conservadas pero la región central tiene una inserción de lo que parecen ser duplicaciones de regiones repetidas. La presencia de esta región es importante para el correcto desplazamiento de las células (González-Pedrajo *et al.*, 2002; Castillo, Ballado, Camarena & Dreyfus, 2009). Dado que, tanto la curvatura como las interacciones entre los componentes del flagelo son importantes para la transferencia del torque, es posible que las modificaciones que presenta *R. sphaeroides* a nivel del gancho permitan que sea más eficiente la transmisión de la fuerza del torque al filamento en esta bacteria.

EL FILAMENTO

Filamentos diversos en tamaño y función

La flagelina es una proteína que presenta una amplia variabilidad entre especies. Su peso molecular en *Salmonella* es de 51kDa mientras que en especies como *Bermanella marisrubri* es de 120kDa (Thomson *et al.*, 2018a). Los dominios D2 y D3 son los que le confieren la alta variabilidad, estos pueden variar en tamaño de muy pequeños como es el caso de *B. subtilis* (50 aa, aproximadamente) hasta más de 700 aa en el caso de *Oleibacter marinus* (Thomson, Ferreira, Matthews-Palmer, Beeby & Pallen, 2018a; Thomson, Rossmann, Ferreira, Matthews-Palmer, Beeby & Pallen, 2018b). En esta y otras γ -proteobacterias marinas se ha descrito una inserción entre los dominios D2 y D3 debida a una duplicación y una posterior inserción de un dominio de función desconocida que da como resultado una flagelina de más de 1000 aa. Estas flagelinas gigantes al incorporarse en el filamento hacen que la estructura sea un 25% más ancha (Thomson *et al.*, 2018a; 2018b).

Anteriormente se pensó que la variabilidad en el tamaño de las flagelinas sólo confería a la bacteria mejores capacidades físicas, es decir, más resistencia en ambientes altamente viscosos o que permitía la modificación de la curvatura de la hélice para un desplazamiento más eficaz (Thomson *et al.*, 2018a). Sin embargo, un estudio sobre las características de las regiones variables de la flagelina mostró que se encuentran hasta 61 dominios distintos en esta región, entre los que destacan dominios con actividades enzimáticas como peptidasas, colagenasas o metaloproteasas. En específico la secuencia de la flagelina de *Clostridium haemolyticum* presenta codificada en su región variable una metaloproteasa dependiente de zinc. Esta flagelina se ensambla en el filamento y presenta actividad enzimática de metaloproteasa (Eckhard *et al.*, 2017). Por lo tanto, aunque hay casos en los que el aumento del tamaño de la flagelina confiere mejores propiedades físicas al filamento, hay casos donde estas inserciones confieren al filamento funciones adicionales, tal vez degradando compuestos complejos para su asimilación o como una forma de defensa ante las respuestas inmunológicas de algunos eucariontes (Eckhard *et al.*, 2017).

Filamentos flagelares formados por más de un tipo de flagelina

Existen bacterias como *Vibrio cholerae*, *Rhizobium lupini*, *Sinorhizobium meliloti*, *Caulobacter crescentus*, o *Agrobacterium tumefaciens*, que a diferencia de *E. coli*, poseen diferentes tipos de flagelina (Faulds-Pain *et al.*, 2011; Scharf, Schuster-Wolff-Buhring, Rachel & Schmitt, 2001; Deakin *et al.*, 1999; Klose & Mekalanos, 1998; Pleier & Schmitt, 1989). En un principio parecía un hallazgo excepcional pero el análisis de 607 genomas bacterianos muestra que al menos el 45% de las bacterias con potencial para ensamblar un filamento funcional codifican para más de una flagelina (Faulds-Pain *et al.*, 2011). Por ejemplo, *C. crescentus* posee 6 genes que codifican para flagelina. Todas ellas forman parte estructural del filamento y son ensambladas en un orden específico. La pérdida de alguna de ellas produce filamentos cortos o que presentan hélices alteradas, estas modificaciones tienen un efecto negativo sobre la velocidad de desplazamiento de la bacteria (Faulds-Pain *et al.*, 2011; Ely, Ely, Crymes & Minnich, 2000). Es decir, cada flagelina juega un papel específico dentro de la estructura y sólo el conjunto de todas produce filamentos completamente funcionales. Este es el caso para muchos de los ejemplos en los que el filamento está formado por más de dos tipos de flagelinas distintas, incluso existen casos, como la misma *C. crescentus*, en los que cada flagelina se transcribe de forma independiente a las otras (Deakin *et al.*, 1999; Pleier & Schmitt, 1991). Otro ejemplo es el filamento del endoflagelo periplásmico de la espiroqueta *Brachyspira hydrodysenteriae*, que posee 3 flagelinas homólogas a FlhC denominadas FlaB1-FlaB3 y una flagelina no relacionada, denominada FlaA. Las flagelinas FlaB1-FlaB3 se exportan y se insertan en el filamento vía el FT3SS, en cambio, FlaA se exporta por el sistema de secreción tipo SEC y se ensambla

envolviendo al filamento (Figura 2E). La falta de FlaA impide la rotación y altera la forma de las células, ya que modifica la longitud de onda del filamento. Al modificar los parámetros de la hélice y el diámetro, la incorporación de FlaA al filamento permite que las espiroquetas sean capaces de desplazarse por medios tipo gel en los que la mayoría de las bacterias flageladas no podrían. (Li, Wolgemuth, Marko, Morgan & Charon, 2008; Motaleb, Sal & Charon, 2004). En otra espiroqueta, *Leptospira*, visualizaciones por cryo-ET del filamento muestran que la modificación en la curvatura del filamento también puede estar dada por proteínas asociadas a la flagelina. Las proteínas FcpA y FcpB, se unen sólo en una cara del filamento para generar filamentos más curvos y menos sensibles a las transiciones polimórficas, lo que ayuda a la modificación de la forma de la célula para su mejor desplazamiento (Gibson *et al.*, 2020).

EL ESTATOR

Recientemente, para algunas especies bacterianas, se han descrito nuevas estructuras y proteínas asociadas a los estatores y que generalmente potencian su función. Gracias a las visualizaciones por Cryo-EM y sus variantes, se han podido visualizar estas estructuras y en conjunto con evidencia genética y bioquímica nos ha llevado a comenzar a entender su papel y las proteínas que las conforman.

Anillos y discos

En *V. alginolyticus* se ha descrito la presencia de dos estructuras que mejoran el rendimiento del estator flagelar, estos son los anillos T y H (Figura 2C) (Terashima, Koike, Kojima & Homma, 2010). El anillo T sólo se ha descrito en Vibrionaceae y está formado por las proteínas MotX y MotY que son indispensables para la rotación flagelar. MotY ancla el anillo T al anillo P, y MotX es la responsable de unirse al homólogo de MotB (Zhu *et al.*, 2019). En el caso de las Vibrionaceae a este homólogo se le conoce como PomB, y junto con el homólogo de MotA, PomA, acoplan el flujo de iones de sodio a la rotación flagelar. En general la estructura y funcionamiento de estos homólogos son similares a los reportados para MotAB. Sin embargo, en la región periplásmica de PomB, el dominio de anclaje (linker) es de mayor tamaño que el de MotB. Por encima del anillo T, cubriendo al anillo P, se forma el anillo H. Este anillo se encuentra debajo de la ME y en *V. alginolyticus* se sabe que está compuesto por FlgT, FlgP y FlgO (Figura 2C) (Zhu *et al.*, 2019; Terashima *et al.*, 2010; Martínez, Dharmasena, Kirn & Taylor, 2009). FlgO es la proteína más distal del anillo H, con respecto al anillo P, seguido por FlgP y en la parte interna se encuentra FlgT (Zhu *et al.*, 2019). Se sabe que FlgT interactúa con MotY, aunque la formación del anillo H es independiente del anillo T, pero no al contrario (Terashima, Fukuoka, Yakushi, Kojima & Homma, 2006). La presencia del anillo H es indispensable para la rotación flagelar y en el caso de *Vibrio cholerae* para el mejor anclaje del filamento al cuerpo celular (Martínez, Jude, Kirn, Skorupski & Taylor, 2010; Martínez *et al.*, 2009). También en las Vibrionaceae se

detecta la presencia del anillo O, del que no se conocen las proteínas que lo conforman, pero se cree que su función es la de ayudar a doblar la ME para que esta recubra al filamento (Zhu, Nishikino, Kojima, Homma & Liu, 2018).

También se ha descrito la presencia del anillo H en el flagelo subpolar de *R. sphaeroides* (Figura 2F). En la formación del anillo H de *R. sphaeroides* también interviene la proteína FlgT, pero a diferencia de lo descrito para las *Vibrionaceae*, no existe un anillo T, ni homólogos de MotXY en su genoma. La presencia de FlgT permite la formación de un anillo debajo de la ME de 65 nm de diámetro. Este anillo es indispensable para la rotación del flagelo y permite la localización de otros componentes que por sí solos también son importantes para la rotación, como MotF y FliL (Fabela *et al.*, 2013).

En *R. sphaeroides* además no existe el homólogo de *flgO* y el papel de FlgP parece estar más relacionado con la transición eje-gancho, ya que mutantes en esta proteína no son capaces de ensamblar el gancho. FlgP interactúa con FlgH, proteína del anillo L, y con FlgT, pero en ausencia de FlgP no ensamblan el anillo H lo que aparenta ser una característica que comparte con *Vibrio alginolyticus* donde se ha descrito el papel del anillo H como facilitador de la penetración de la ME (Figura 2F) (Pérez-González *et al.*, 2018; Zhu *et al.*, 2018).

R. sphaeroides y *C. jejuni* comparten el papel de FlgP, ya que en las mutantes de esta no se ensambla el flagelo. Sin embargo, las estructuras que se forman alrededor del cuerpo basal de estas bacterias son muy diferentes.

En observaciones por cryo-EM del motor flagelar de *C. jejuni* es evidente la presencia del denominado complejo disco, que forma una estructura de 100 nm de diámetro debajo de la ME (Figura 2D). El complejo está formado por subestructuras discales: basal, medial y proximal. Para la formación del primero es indispensable la presencia de FlgP, además de FlgQ y tal vez otras proteínas no descritas, aunque no FlgT, ya que esta bacteria no posee homólogos de FlgT (Sommerlad, & Hendrixson, 2006). Debajo se forma el disco medial compuesto por PflA y otras proteínas no descritas. Finalmente se ensambla el disco proximal formado por PflB (Figura 2D) (Beeby *et al.*, 2016). En las microscopías se observan claramente los estatores unidos al disco lo que hace pensar que estos se encuentran fijos y el disco es el encargado de fijarlos.

Es importante señalar que FlgP es la única proteína conservada en *R. sphaeroides*, *Vibrionaceae* y *C. jejuni* involucrada en la formación de las estructuras descritas.

Las espiroquetas no presentan ninguna de las estructuras mencionadas, pero sí cuentan con una estructura denominada *cuello* que se ancla a la MI y que recubre al eje y al anillo P (Figura 2E) (Liu *et al.*, 2009). Esta estructura parece estar

formada por múltiples proteínas, hasta la fecha se han reportado FlbB, FlcA, FlcB y FlcC entre sus componentes. FlbB forma parte de la base del *cuello*, y FlcABC de la estructura tipo turbina que sirve de andamio del estator. La ausencia de cualquiera de estas proteínas impide la motilidad, aunque sí son capaces de ensamblar flagelos incompletos (Chang *et al.*, 2021b; Xu, He, Liu & Motaleb, 2019; Moon, Zhao, Xu, Liu & Motaleb, 2018; Moon *et al.*, 2016). El *cuello* juega un papel importante en la formación y en la inmovilización de los estatores en el motor flagelar. Cryo-EM de los motores de *B. burgdorferi* muestran la presencia de los estatores insertados en el *cuello* localizados en la periferia del anillo C cerca de la MI en el periplasma (Chang *et al.*, 2019).

En todos estos modelos, se piensa que la función de los anillos además de robustecer a la estructura para hacerla más eficiente en ambientes con requerimiento de mayor torque, aumente el área de asociación de los estatores para elevar su número e incrementar, con ello, la fuerza de rotación. Por ejemplo, sabemos que en *Helicobacter pylori* se unen al motor flagelar 18 estatores, en *C. jejuni* 17 estatores, en *Vibrio fischeri* 13 y en *Salmonella* 11 (Chaban, Coleman & Beeby, 2018).

La diversidad de estas estructuras y la falta de homología entre sus componentes parecen indicar que el evento de reforzamiento del estator pudo haber aparecido varias veces en la historia evolutiva.

En estos últimos años, se han observado nuevos anillos a los que aún no se les atribuye una función o conocer las proteínas que los forman; que se pueden encontrar en el citoplasma o presentes sólo durante una etapa de la biogénesis del flagelo, lo que muestra que aún hay componentes por descubrir (Kaplan *et al.*, 2022).

MotF

En *R. sphaeroides* se ha descrito la presencia de la proteína de membrana MotF como indispensable para la rotación del flagelo. Esta proteína no presenta homólogos en otras bacterias. MotF es reclutada por el motor flagelar a la base del flagelo y requiere de la presencia del motor flagelar completo para su reclutamiento. Además, para la estabilización de su localización es necesaria la presencia de la región *plug* de MotB. La obtención de mutantes secundarios, capaces de nadar en ausencia de MotF, resultan en mutantes en la región del *plug* de MotB, lo que hace pensar que controla indirectamente la rotación del flagelo de *R. sphaeroides* a través de la estabilización de MotB (Ramírez-Cabrera *et al.*, 2012; Fabela *et al.*, 2013).

FliL

A pesar de ser FliL una proteína ubicua en los sistemas flagelares, ha resultado difícil su caracterización por la gran variedad de fenotipos que tiene su delección.

Fue en *R. sphaeroides* donde por primera vez se describió la relación directa de FliL con la regulación del estator. FliL es una proteína de MI con una región periplásmica que en *R. sphaeroides* es indispensable para la rotación del flagelo (Suaste-Olmos *et al.*, 2010). La obtención de mutantes capaces de nadar en ausencia de esta proteína, resulta en la obtención de mutaciones secundarias que alteran la región del *plug* de MotB. Este fenotipo no se revierte por la reintroducción de FliL lo que hace pensar que el cambio en MotB es el resultado de estatores siempre abiertos (Suaste-Olmos *et al.*, 2010).

Al igual que en *R. sphaeroides* en otros modelos como *V. alginolyticus*, la presencia de FliL es requerida para la correcta rotación del flagelo y se ha propuesto que forma un complejo que rodea a los estatores formados por las proteínas PomAB de esta bacteria (Takekawa *et al.*, 2019). La localización de FliL se ha observado, por cryo-EM, en el motor flagelar de *C. jejuni* ubicada entre los estatores y el cuerpo basal (Motaleb, Pitzer, Sultan & Liu, 2011). Las observaciones realizadas, por cryo-ET, en *Helicobacter pylori*, muestran a FliL localizada en el motor y dentro de la estructura denominada *jaula* que contiene al estator en estas bacterias y donde postulan la interacción de FliL con el complejo MotAB como proteína de andamiaje y su posible papel en la estabilización extendida de MotB en interacción con la pared (Tachiyama *et al.*, 2022). En *Borrelia* se ha podido visualizar la ubicación de FliL en la misma zona y se sabe que su presencia permite la correcta orientación de los flagelos periplásmicos (Motaleb *et al.*, 2011). En esta misma bacteria se ha descrito que, tras el reclutamiento de los complejos estatores al rotor flagelar, FliL se oligomeriza envolviendo a la región *linker* de MotB estabilizando la conformación abierta del estator, además, favorece la ubicación de los estatores abiertos en la estructura *cuello* (Guo, Xu, Chang, Motaleb & Liu, 2022). Estos datos han mostrado que el papel de FliL descrito en *R. sphaeroides* sobre la estabilización de la función del estator parece ser un mecanismo ampliamente utilizado entre las bacterias.

CONCLUSIONES

El motor flagelar bacteriano posee un núcleo estructural flagelar conservado (NEFC), y es al mismo tiempo una estructura diversa y adaptada a numerosos ambientes, nichos y necesidades. Actualmente, se ha podido visualizar el arreglo y conformación específica de las proteínas flagelares embebidas en la MI, las cuales habían resultado difíciles, sino imposibles de cristalizar. Además, se ha producido un cambio de paradigma en nuestra comprensión del mecanismo que permite la rotación del flagelo y el funcionamiento del estator. Conjuntamente, hemos comenzado a reconocer la gran diversidad de componentes que forman parte de este motor. Se han descrito multitud de variaciones estructurales que afectan, por ejemplo, el grosor del filamento y del gancho; que modifican las uniones entre estas dos estructuras que pueden incorporar nuevos dominios funcionales. Asimismo, se han identificado anillos, antes desconocidos, a

nivel de la envoltura celular y la presencia de estructuras que estabilizan a los estatores en el motor flagelar.

Las adaptaciones estructurales que se conocen al momento modifican todas las subestructuras que forman al motor flagelar. Modifican su funcionalidad e impactan de forma positiva las capacidades de adaptación, crecimiento, invasión o mimetismo de las bacterias que las han incorporado.

Estudios futuros en el campo seguirán aportando evidencia de la complejidad y versatilidad que ha ganado el flagelo bacteriano a lo largo de la evolución, ya que las soluciones que sirvieron a una especie podrán converger para después divergir y generar nuevas estructuras que favorezcan la supervivencia, lo que hace fascinante el campo de estudio del flagelo en las bacterias.

AGRADECIMIENTOS

Especial dedicatoria póstuma al Dr. Georges Dreyfus Cortés, con profundo agradecimiento por su apoyo y enseñanzas. Las autoras agradecemos al CONAHCYT por el financiamiento otorgado, a la Dra. Clelia Domenzain Reyna, a través de la beca “Estancias posdoctorales por México para la formación y consolidación de las y los Investigadores por México”. Y a la UNAM por el financiamiento de PAPIIT IN215023.

REFERENCIAS

- Abrusci, P., Vergara-Irigaray, M., Johnson, S., Beeby, M. D., Hendrixson, D. R., Roversi, P., Friede, M. E., Deane, J. E., Jensen, G. J., Tang, C. M. & Lea, S. M. (2013). Architecture of the major component of the type III secretion system export apparatus. *Nature Structural & Molecular Biology*, **20**(1), 99-106. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2452>.
- Bäuerlein, F. J. B. & Baumeister, W. (2021). Towards Visual Proteomics at High Resolution. *Journal of Molecular Biology*, **433**(20), 167187. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.167187>.
- Ballado, T., Camarena, L., González-Pedrajo, B., Silva-Herzog, E. & Dreyfus, G. (2001). The hook gene (flgE) is expressed from the flgBCDEF operon in *Rhodobacter sphaeroides*: study of an flgE mutant. *Journal of Bacteriology*, **183**(5), 1680-1687. <https://doi.org/10.1128/jb.183.5.1680-1687.2001>.
- Bange, G., Kümmerer, N., Engel, C., Bozkurt, G., Wild, K. & Sinning, I. (2010). FlhA provides the adaptor for coordinated delivery of late flagella building blocks to the type III secretion system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **107**(25), 11295-11300. <https://doi.org/10.1073/pnas.1001383107>.
- Beatson, S. A., Minamino, T. & Pallen, M. J. (2006). Variation in bacterial flagellins: from sequence to structure. *Trends in Microbiology*, **14**(4), 151-155. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2006.02.008>.
- Beeby, M., Ribardo, D. A., Brennan, C. A., Ruby, E. G., Jensen, G. J. & Hendrixson, D. R. (2016). Diverse high-torque bacterial flagellar motors assemble wider stator rings using a conserved protein scaffold. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **113**(13), E1917-E1926. <https://doi.org/10.1073/pnas.1518952113>.
- Benítez, J. M. & Camarena, L. (2022). Mecanismos de regulación que controlan la expresión de la flagelina en bacterias. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, **25**, 1-25. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2022.460>.
- Bergeron, J. R. (2016). Structural modeling of the flagellum MS ring protein FliF reveals similarities to the type III secretion system and sporulation complex. *PeerJ*, **4**, e1718. <https://doi.org/10.7717/peerj.1718>.
- Block, S. M. & Berg, H. (1984). Successive incorporation of force-generating units in the bacterial rotary motor. *Nature*, **309**, 470-472. <http://doi.org/10.1038/309470a0>.
- Castillo, D. J., Ballado, T., Camarena, L. & Dreyfus, G. (2009). Functional analysis of a large non-conserved region of FlgK (HAP1) from *Rhodobacter sphaeroides*. *Antonie van Leeuwenhoek*, **95**(1), 77-90. <https://doi.org/10.1007/s10482-008-9290-7>.
- Chaban, B., Coleman, I. & Beeby, M. (2018). Evolution of higher torque in *Campylobacter*-type bacterial flagellar motors. *Scientific Reports*, **8**(1), 97. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18115-1>.
- Chang, Y., Carroll, B. L. & Liu, J. (2021a). Structural basis of bacterial flagellar motor rotation and switching. *Trends in Microbiology*, **29**(11), 1024-1033. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2021.03.009>.
- Chang, Y., Xu, H., Motaleb, M. A. & Liu, J. (2021b). Characterization of the Flagellar Collar Reveals Structural Plasticity Essential for Spirochete Motility. *mBio*, **12**(6), e02494-21. <https://doi.org/10.1128/mbio.02494-21>.
- Chang, Y., Moon, K. H., Zhao, X., Norris, S. J., Motaleb, M. A. & Liu, J. (2019). Structural insights into flagellar stator-rotor interactions. *eLife*, **8**(e48979), 1-18. <https://doi.org/10.7554/elife.48979>.
- Chen, S., Beeby, M., Murphy, G. E., Leadbetter, J. R., Hendrixson, D. R., Briegel, A., Li, Z., Shi, J., Tocheva, E. I., Müller, A., Dobro, M. J. & Jensen, G. J. (2011). Structural diversity of bacterial flagellar motors. *The EMBO Journal*, **30**(14), 2972-2981. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.186>.
- Chun, S. & Parkinson, J. (1988). Bacterial motility: membrane topology of the *Escherichia coli* MotB protein. *Science*, **239**(4837), 276-278. <https://doi.org/10.1126/science.2447650>.
- Cohen, E. J. & Hughes, K. T. (2014). Rod-to-Hook Transition for Extracellular Flagellum Assembly Is Catalyzed by the L-Ring-Dependent Rod Scaffold Removal. *Journal of Bacteriology*, **196**(13), 2387-2395. <https://doi.org/10.1128/JB.01580-14>.
- Colin, R., Ni, B., Laganenka, L. & Sourjik, V. (2021). Multiple functions of flagellar motility and chemotaxis in bacterial physiology. *FEMS Microbiology Reviews*, **45**(6), fuab038,

- 1-19. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuab038>.
- Deakin, W. J., Parker, V. E., Wright, E. L., Ashcroft, K. J., Loake, G. J. & Shaw, C. H. (1999). *Agrobacterium tumefaciens* possesses a fourth flagellin gene located in a large gene cluster concerned with flagellar structure, assembly and motility. *Microbiology*, **145**(6), 1397–1407. <https://doi.org/10.1099/13500872-145-6-1397>.
- Deme, J. C., Johnson, S., Vickery, O., Muellbauer, A., Monkhouse, H., Griffiths, T., James, R. H., Berks, B. C., Coulton, J. W., Stansfeld, P. J. & Lea, S. M. (2020). Structures of the stator complex that drives rotation of the bacterial flagellum. *Nature Microbiology*, **5**, 1553–15564. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0788-8>.
- DePamphilis, M. L. & Adler, J. (1971). Fine Structure and Isolation of the Hook-Basal Body Complex of Flagella from *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, **105**(1), 384–395. <https://doi.org/10.1128/jb.105.1.384-395.1971>.
- Eckhard, U., Bandukwala, H., Mansfield, M. J., Marino, G., Cheng, J., Wallace, I., Holyoak, T., Charles, T. C., Austin, J., Overall, C. M. & Doxey, A. C. (2017). Discovery of a proteolytic flagellin family in diverse bacterial phyla that assembles enzymatically active flagella. *Nature Communications*, **8**(521), 1-9. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00599-0>.
- Ely, B., Ely, T., Crymes, W. & Minnich, S. (2000). A Family of Six Flagellin Genes Contributes to the *Caulobacter crescentus* Flagellar Filament. *Journal of Bacteriology*, **182**(17), 5001–5004. <https://doi.org/10.1128/jb.182.17.5001-5004.2000>.
- Fabela, S., Domenzain, C., Mora, J. la, Osorio, A., Ramírez-Cabrera, V., Poggio, S., Dreyfus, G. & Camarena, L. (2013). A distant homologue of the FlgT protein interacts with MotB and FliL and is essential for flagellar rotation in *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of Bacteriology*, **195**(23), 5285–5296. <https://doi.org/10.1128/jb.00760-13>.
- Fabiani, F. D., Renault, T. T., Peters, B., Dietsche, T., Gálvez, E. J., Guse, A., Freier, K., Charpentier, E., Strowig, T., Franz-Wachtel, M., Macek, B., Wagner, S., Hensel, M. & Erhardt, M. (2017). A flagellum-specific chaperone facilitates assembly of the core type III export apparatus of the bacterial flagellum. *PLOS Biology*, **15**(8), e2002267. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2002267>.
- Fahrner, K. A., Block, S. M., Krishnaswamy, S., Parkinson, J. S. & Berg, H. C. (1994). A Mutant Hook-associated Protein (HAP3) Facilitates Torsionally Induced Transformations of the Flagellar Filament of *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, **238**(2), 173–186. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1994.1279>.
- Faulds-Pain, A., Birchall, C., Aldridge, C., Smith, W. D., Grimaldi, G., Nakamura, S., Miyata, T., Gray, J., Li, G., Tang, J. X., Namba, K., Minamino, T. & Aldridge, P. D. (2011). Flagellin redundancy in *Caulobacter crescentus* and its implications for flagellar filament assembly. *Journal of Bacteriology*, **193**(11), 2695–2707. <https://doi.org/10.1128/jb.01172-10>.
- Francis, N., Sosinsky, G., Thomas, D. & DeRosier, D. (1994). Isolation, characterization and structure of bacterial flagellar motors containing the switch complex. *Journal of Molecular Biology*, **235**(4), 1261–1270. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1994.1079>.
- Fujii, T., Kato, T. & Namba, K. (2009). Specific Arrangement of α -Helical Coiled Coils in the Core Domain of the Bacterial Flagellar Hook for the Universal Joint Function. *Structure*, **17**(11), 1485–1493. <https://doi.org/10.1016/j.str.2009.08.017>.
- Fujii, T., Kato, T., Hiraoka, K. D., Miyata, T., Minamino, T., Chevance, F. F., Hughes, K. T. & Namba, K. (2017). Identical folds used for distinct mechanical functions of the bacterial flagellar rod and hook. *Nature Communications*, **8**(1), 14276. <https://doi.org/10.1038/ncomms14276>.
- Fukumura, T., Makino, F., Dietsche, T., Kinoshita, M., Kato, T., Wagner, S., Namba, K., Imada, K. & Minamino, T. (2017). Assembly and stoichiometry of the core structure of the bacterial flagellar type III export gate complex. *PLOS Biology*, **15**(8), e2002281. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2002281>.
- García-Ramos, M., Mora, J. de la, Ballado, T., Camarena, L. & Dreyfus, G. (2021). Modulation of the Enzymatic Activity of the Flagellar Lytic Transglycosylase SlfF by Rod Components and the Scaffolding Protein FlgJ in *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of Bacteriology*, **203**(20), e0037221. <https://doi.org/10.1128/jb.00372-21>.
- Gibson, K. H., Trajtenberg, F., Wunder, E. A., Brady, M. R., Martin, F. S., Mechaly, A., Shang, Z., Liu, J., Picardeau, M., Ko, A., Buschiazzi, A. & Sindelar, C. V. (2020). An asymmetric sheath controls flagellar supercoiling and motility in the *Leptospira* spirochete. *eLife*, **9**(e53672), 1-24. <https://doi.org/10.7554/elife.53672>.
- González-Pedrajo, B., Ballado, T., Campos, A., Sockett, R. E., Camarena, L. & Dreyfus, G. (1997). Structural and genetic analysis of a mutant of *Rhodobacter sphaeroides* WS8 deficient in hook length control. *Journal of Bacteriology*, **179**(21), 6581–6588. <https://doi.org/10.1128/jb.179.21.6581-6588.1997>.
- González-Pedrajo, B., Mora, J. de la, Ballado, T., Camarena, L. & Dreyfus, G. (2002). Characterization of the flgG operon of *Rhodobacter sphaeroides* WS8 and its role in flagellum biosynthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, **1579**(1), 55–63. [https://doi.org/10.1016/s0167-4781\(02\)00504-3](https://doi.org/10.1016/s0167-4781(02)00504-3).
- Grognot, M. & Taute, K. M. (2021). More than propellers: how flagella shape bacterial motility behaviors. *Current Opinion in Microbiology*, **61**, 73–81. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2021.02.005>.
- Guo, S., Xu, H., Chang, Y., Motaleb, M. A. & Liu, J. (2022). FliL ring enhances the function of periplasmic flagella. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **119**(11), e2117245119, 1-9.

- <https://doi.org/10.1073/pnas.2117245119>.
- Henderson, L. D., Matthews-Palmer, T. R., Gulbranson, C. J., Ribardo, D. A., Beeby, M. & Hendrixson, D. R. (2020). Diversification of *Campylobacter jejuni* Flagellar C-Ring Composition Impacts Its Structure and Function in Motility, Flagellar Assembly, and Cellular Processes. *mBio*, **11**(e02286-19), 1-19. <https://doi.org/10.1128/mbio.02286-19>.
- Hendriksen, J. J., Lee, H. J., Bradshaw, A. J., Namba, K., Chevance, F. F. V., Minamino, T. & Hughes, K. T. (2021). Genetic Analysis of the *Salmonella* FlhE Protein That Forms the Base of the Flagellar Axial Structure. *mBio*, **12**(e02392-21), 1-15. <https://doi.org/10.1128/mbio.02392-21>.
- Hirano, T., Yamaguchi, S., Oosawa, K. & Aizawa, S. (1994). Roles of FlhK and FlhB in determination of flagellar hook length in *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology*, **176**(17), 5439–5449. <https://doi.org/10.1128/jb.176.17.5439-5449.1994>.
- Hiraoka, K. D., Morimoto, Y. V., Inoue, Y., Fujii, T., Miyata, T., Makino, F., Minamino, T. & Namba, K. (2017). Straight and rigid flagellar hook made by insertion of the FlgG specific sequence into FlgE. *Scientific Reports*, **7**(46723), 1-8. <https://doi.org/10.1038/srep46723>.
- Homma, M. & Kojima, S. (2022). The Periplasmic Domain of the Ion-Conducting Stator of Bacterial Flagella Regulates Force Generation. *Frontiers in Microbiology*, **13**(869187), 1-12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.869187>.
- Horváth, P., Kato, T., Miyata, T. & Namba, K. (2019). Structure of *Salmonella* Flagellar Hook Reveals Intermolecular Domain Interactions for the Universal Joint Function. *Biomolecules*, **9**(9), 1-13. <https://doi.org/10.3390/biom9090462>.
- Hosking, E. R., Vogt, C., Bakker, E. P. & Manson, M. D. (2006). The *Escherichia coli* MotAB proton channel unplugged. *Journal of Molecular Biology*, **364**(5), 921–937. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.09.035>.
- Ikeda, T., Homma, M., Iino, T., Asakura, S. & Kamiya, R. (1987). Localization and stoichiometry of hook-associated proteins within *Salmonella typhimurium* flagella. *Journal of Bacteriology*, **169**(3), 1168–1173. <https://doi.org/10.1128/jb.169.3.1168-1173.1987>.
- Inoue, Y., Ogawa, Y., Kinoshita, M., Terahara, N., Shimada, M., Kodera, N., Ando, T., Namba, K., Kitao, A., Imada, K. & Minamino, T. (2019). Structural Insights into the Substrate Specificity Switch Mechanism of the Type III Protein Export Apparatus. *Structure*, **27**(6), 965-976.e6. <https://doi.org/10.1016/j.str.2019.03.017>.
- Johnson, S., Fong, Y. H., Deme, J. C., Furlong, E. J., Kuhlen, L. & Lea, S. M. (2020). Symmetry mismatch in the MS-ring of the bacterial flagellar rotor explains the structural coordination of secretion and rotation. *Nature Microbiology*, **5**(7), 966–975. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0703-3>.
- Johnson, S., Furlong, E. J., Deme, J. C., Nord, A. L., Caesar, J. J. E., Chevance, F. F. V., Berry, R. M., Hughes, K. T. & Lea, S. M. (2021). Molecular structure of the intact bacterial flagellar basal body. *Nature Microbiology*, **6**(6), 712–721. <https://doi.org/10.1038/s41564-021-00895-y>.
- Jones, C. J., Homma, M. & Macnab, R. M. (1989). L-, P-, and M-ring proteins of the flagellar basal body of *Salmonella typhimurium*: gene sequences and deduced protein sequences. *Journal of Bacteriology*, **171**(7), 3890–3900. <https://doi.org/10.1128/jb.171.7.3890-3900.1989>.
- Jones, C. J., Macnab, R. M., Okino, H. & Aizawa, S.-I. (1990). Stoichiometric Analysis of the Flagellar Hook-(Basal-Body) Complex of *Salmonella typhimurium*. *Journal of Molecular Biology*, **2**(212), 377–387. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(90\)90132-6](https://doi.org/10.1016/0022-2836(90)90132-6).
- Kaplan, M., Oikonomou, C. M., Wood, C. R., Chreifi, G., Subramanian, P., Ortega, D. R., Chang, Y., Beeby, M., Shaffer, C. L. & Jensen, G. J. (2022). Novel transient cytoplasmic rings stabilize assembling bacterial flagellar motors. *The EMBO Journal*, **41**(e109523), 1-15. <https://doi.org/10.15252/embj.2021109523>.
- Kawamoto, A., Miyata, T., Makino, F., Kinoshita, M., Minamino, T., Imada, K., Kato, T. & Namba, K. (2021). Native flagellar MS ring is formed by 34 subunits with 23-fold and 11-fold subsymmetries. *Nature Communications*, **12**(1), 4223. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24507-9>.
- Khan, S., Dapice, M. & Reese, T. (1988). Effects of mot gene expression on the structure of the flagellar motor. *Journal of Molecular Biology*, **202**(3), 575-584. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(88\)90287-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(88)90287-2).
- Klose, K. E. & Mekalanos, J. J. (1998). Differential Regulation of Multiple Flagellins in *Vibrio cholerae*. *Journal of Bacteriology*, **180**(2), 303–316. <https://doi.org/10.1128/jb.180.2.303-316.1998>.
- Kobayashi, K., Saitoh, T., Shah, D., Ohnishi, K., Goodfellow, I., Sockett, R. & Aizawa, S.-I. I. (2003). Purification and characterization of the flagellar basal body of *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of Bacteriology*, **185**(17), 5295–5300. <https://doi.org/10.1128/jb.185.17.5295-5300.2003>.
- Kuhlen, L., Abrusci, P., Johnson, S., Gault, J., Deme, J., Caesar, J., Dietsche, T., Mebrhatu, M. T., Ganief, T., Macek, B., Wagner, S., Robinson, C. V. & Lea, S. M. (2018). Structure of the core of the type III secretion system export apparatus. *Nature Structural & Molecular Biology*, **25**(7), 583–590. <https://doi.org/10.1038/s41594-018-0086-9>.
- Li, C., Wolgemuth, C., Marko, M., Morgan, D. & Charon, N. (2008). Genetic Analysis of Spirochete Flagellin Proteins and Their Involvement in Motility, Filament Assembly, and Flagellar Morphology. *Journal of Bacteriology*, **190**(16), 5607–5615. <https://doi.org/10.1128/jb.00319-08>.
- Liu, J., Lin, T., Botkin, D. J., McCrum, E., Winkler, H. & Norris, S. J. (2009). Intact flagellar motor of *Borrelia burgdorferi* revealed by cryo-electron tomography: evidence for stator ring curvature and rotor/C-ring assembly flexion. *Journal of Bacteriology*, **191**(16), 5026–5036. <https://doi.org/10.1128/jb.00340-09>.
- Liu, R. & Ochman, H. (2007). Stepwise formation of the bacterial

- flagellar system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**(17), 7116–7121. <https://doi.org/10.1073/pnas.0700266104>.
- Lynch, M. J., Levenson, R., Kim, E. A., Sircar, R., Blair, D. F., Dahlquist, F. W., & Crane, B. R. (2017). Co-Folding of a FliF-FliG Split Domain Forms the Basis of the MS:C Ring Interface within the Bacterial Flagellar Motor. *Structure*, **25**(2), 317–328. <https://doi.org/10.1016/j.str.2016.12.006>.
- Mariano, G., Faba-Rodríguez, R., Bui, S., Zhao, W., Ross, J., Tzokov, S. B. & Bergeron, J. R. C. (2022). Oligomerization of the FliF Domains Suggests a Coordinated Assembly of the Bacterial Flagellum MS Ring. *Frontiers in Microbiology*, **12**(781960), 1-12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.781960>.
- Martínez, R. M., Dharmasena, M. N., Kim, T. J. & Taylor, R. K. (2009). Characterization of two outer membrane proteins, FlgO and FlgP, that influence *Vibrio cholerae* motility. *Journal of Bacteriology*, **191**(18), 5669–5679. <https://doi.org/10.1128/jb.00632-09>.
- Martínez, R. M., Jude, B. A., Kim, T. J., Skorupski, K. & Taylor, R. K. (2010). Role of FlgT in anchoring the flagellum of *Vibrio cholerae*. *Journal of Bacteriology*, **192**(8), 2085–2092. <https://doi.org/10.1128/jb.01562-09>.
- Matsunami, H., Barker, C. S., Yoon, Y.-H., Wolf, M. & Samatey, F. A. (2016). Complete structure of the bacterial flagellar hook reveals extensive set of stabilizing interactions. *Nature Communications*, **7**(13425), 1-10. <https://doi.org/10.1038/ncomms13425>.
- McMurry, J. L., Murphy, J. W. & González-Pedrajo, B. (2006). The FliN–FliH Interaction Mediates Localization of Flagellar Export ATPase FliI to the C Ring Complex. *Biochemistry*, **45**(39), 11790–11798. <https://doi.org/10.1021/bi0605890>.
- Miller, M. R., Miller, K. A., Bian, J., James, M. E., Zhang, S., Lynch, M. J., Callery, P. S., Hettick, J. M., Cockburn, A., Liu, J., Li, C., Crane, B. R. & Charon, N. W. (2016). Spirochaete flagella hook proteins self-catalyse a lysinoalanine covalent crosslink for motility. *Nature Microbiology*, **1**(16134), 1-8. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.134>.
- Milne-Davies, B., Wimmi, S. & Diepold, A. (2021). Adaptivity and dynamics in type III secretion systems. *Molecular Microbiology*, **115**(3), 395–411. <https://doi.org/10.1111/mmi.14658>.
- Minamino, T. & Namba, K. (2008). Distinct roles of the FliI ATPase and proton motive force in bacterial flagellar protein export. *Nature*, **451**(7177), 485–488. <https://doi.org/10.1038/nature06449>.
- Minamino, T., Morimoto, Y. V., Hara, N. & Namba, K. (2011). An energy transduction mechanism used in bacterial flagellar type III protein export. *Nature Communications*, **2**(475), 1-9. <https://doi.org/10.1038/ncomms1488>.
- Minamino, T., Inoue, Y., Kinoshita, M. & Namba, K. (2019). FliK-driven conformational rearrangements of FlhA and FlhB are required for export switching of the flagellar protein export apparatus. *Journal of Bacteriology*, **202**(3), 1-13. <https://doi.org/10.1128/jb.00637-19>.
- Minamino, T., Kinoshita, M. & Namba, K. (2022a). Insight Into Distinct Functional Roles of the Flagellar ATPase Complex for Flagellar Assembly in *Salmonella*. *Frontiers in Microbiology*, **13**(864178), 1-14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.864178>.
- Minamino, T., Kinoshita, M., Inoue, Y., Kitao, A. & Namba, K. (2022b). Conserved GYXLI Motif of FlhA Is Involved in Dynamic Domain Motions of FlhA Required for Flagellar Protein Export. *Microbiology Spectrum*, **10**(4), e01110-22. <https://doi.org/10.1128/spectrum.01110-22>.
- Moon, K., Zhao, X., Xu, H., Liu, J. & Motaleb, M. A. (2018). A Tetratricopeptide Repeat Domain Protein has Profound Effects on Assembly of Periplasmic Flagella, Morphology, and Motility of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Molecular Microbiology*, **110**(4), 634–647. <https://doi.org/10.1111/mmi.14121>.
- Moon, K., Zhao, X., Manne, A., Wang, J., Yu, Z., Liu, J. & Motaleb, M. A. (2016). Spirochetes flagellar collar protein FlbB has astounding effects in orientation of periplasmic flagella, bacterial shape, motility, and assembly of motors in *Borrelia burgdorferi*. *Molecular Microbiology*, **102**(2), 336–348. <https://doi.org/10.1111/mmi.13463>.
- Mora, J. de la, Ballado, T., González-Pedrajo, B., Camarena, L. & Dreyfus, G. (2007). The flagellar muramidase from the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *Journal of Bacteriology*, **189**(22), 7998–8004. <https://doi.org/10.1128/jb.01073-07>.
- Mot, D. R. & Vanderleyden, J. (1994). The C-terminal sequence conservation between OmpA-related outer membrane proteins and MotB suggests a common function in both Gram-positive and Gram-negative bacteria, possibly in the interaction of these domains with peptidoglycan. *Molecular Microbiology*, **12**(2), 333-334. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1994.tb00431.x>.
- Motaleb, M., Sal, M. S., & Charon, N. W. (2004). The Decrease in FlaA Observed in a *flaB* Mutant of *Borrelia burgdorferi* Occurs Posttranscriptionally. *Journal of Bacteriology*, **186**(12), 3703-3711. <https://doi.org/10.1128/jb.186.12.3703-3711.2004>.
- Motaleb, M., Pitzer, J. E., Sultan, S. Z. & Liu, J. (2011). A novel gene inactivation system reveals altered periplasmic flagellar orientation in a *Borrelia burgdorferi* *fliL* mutant. *Journal of Bacteriology*, **193**(13), 3324–3331. <https://doi.org/10.1128/jb.00202-11>.
- Nakane, T., Kotecha, A., Sente, A., McMullan, G., Masiulis, S., Brown, P. M. G. E., Grigoras, I. T., Malinauskaite, L., Malinauskas, T., Miehl, J., Uchański, T., Yu, L., Karia, D., Pechnikova, E. V., Jong, E. de, Keizer, J., Bischoff, M., McCormack, J., Tiemeijer, P., Hardwick, S. W., Chirgadze, D. Y., Murshudov, G., Aricescu, A. R. & Scheres, S. H. W. (2020). Single-particle cryo-EM at atomic resolution. *Nature*, **587**(7832), 152–156. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2829-0>.

- Namba, K., Yamashita, I. & Vonderviszt, F. (1989). Structure of the core and central channel of bacterial flagella. *Nature*, **342(6250)**, 648–654. <https://doi.org/10.1038/342648a0>.
- Nambu, T. & Kutsukake, K. (2000). The *Salmonella* FlgA protein, a putative periplasmic chaperone essential for flagellar Pring formation. *Microbiology* (Reading, England), **146(Pt 5)**, 1171–1178. <https://doi.org/10.1099/00221287-146-5-1171>.
- Nord, A. L., Biquet-Bisquert, A., Abkarian, M., Pigaglio, T., Seduk, F., Magalon, A. & Pedaci, F. (2022). Dynamic stiffening of the flagellar hook. *Nature Communications*, **13(1)**, 2925. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-30295-7>.
- Ohnishi, K., Ohto, Y., Aizawa, S., Macnab, R. M. & Iino, T. (1994). FlgD is a scaffolding protein needed for flagellar hook assembly in *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology*, **176(8)**, 2272–2281. <https://doi.org/10.1128/jb.176.8.2272-2281.1994>.
- Pallen, M. J., Penn, C. W. & Chaudhuri, R. R. (2005). Bacterial flagellar diversity in the post-genomic era. *Trends in Microbiology*, **13(4)**, 143–149. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2005.02.008>.
- Paul, K., Brunstetter, D., Titen, S. & Blair, D. F. (2011). A molecular mechanism of direction switching in the flagellar motor of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **108(41)**, 17171–17176. <https://doi.org/10.1073/pnas.1110111108>.
- Paul, K., Erhardt, M., Hirano, T., Blair, D. F. & Hughes, K. T. (2008). Energy source of flagellar type III secretion. *Nature*, **451(7177)**, 489–492. <https://doi.org/10.1038/nature06497>.
- Pérez-González, C., Domenzain, C., Poggio, S., González-Halphen, D., Dreyfus, G. & Camarena, L. (2018). Characterization of FlgP, an Essential Protein for Flagellar Assembly in *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of Bacteriology*, **201(5)**, 1–16. <https://doi.org/10.1128/jb.00752-18>.
- Pleier, E. & Schmitt, R. (1989). Identification and sequence analysis of two related flagellin genes in *Rhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology*, **171(3)**, 1467–1475. <https://doi.org/10.1128/jb.171.3.1467-1475.1989>.
- Pleier, E. & Schmitt, R. (1991). Expression of two *Rhizobium meliloti* flagellin genes and their contribution to the complex filament structure. *Journal of Bacteriology*, **173(6)**, 2077–2085. <https://doi.org/10.1128/jb.173.6.2077-2085.1991>.
- Ramírez-Cabrera, V., Poggio, S., Domenzain, C., Osorio, A., Dreyfus, G. & Camarena, L. (2012). A novel component of the *Rhodobacter sphaeroides* Fla1 flagellum is essential for motor rotation. *Journal of Bacteriology*, **194(22)**, 6174–6183. <https://doi.org/10.1128/jb.00850-12>.
- Samatey, F. A., Matsunami, H., Imada, K., Nagashima, S., Shaikh, T. R., Thomas, D. R., Chen, J. Z., DeRosier, D. J., Kitao, A. & Namba, K. (2004). Structure of the bacterial flagellar hook and implication for the molecular universal joint mechanism. *Nature*, **431(7012)**, 1062–1068. <https://doi.org/10.1038/nature02997>.
- Santiveri, M., Roa-Eguiara, A., Kühne, C., Wadhwa, N., Hu, H., Berg, H. C., Erhardt, M. & Taylor, N. M. I. (2020). Structure and Function of Stator Units of the Bacterial Flagellar Motor. *Cell*, **183(1)**, 244–257.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.08.016>.
- Scharf, B., Schuster-Wolff-Buhring, H., Rachel, R. & Schmitt, R. (2001). Mutational Analysis of the *Rhizobium lupini* H13-3 and *Sinorhizobium meliloti* Flagellin Genes: Importance of Flagellin A for Flagellar Filament Structure and Transcriptional Regulation. *Journal of Bacteriology*, **183(18)**, 5334–5342. <https://doi.org/10.1128/jb.183.18.5334-5342.2001>.
- Shepherd, D. C., Dalvi, S. & Ghosal, D. (2022). From cells to atoms: Cryo-EM as an essential tool to investigate pathogen biology, host–pathogen interaction, and drug discovery. *Molecular Microbiology*, **117(3)**, 610–617. <https://doi.org/10.1111/mmi.14820>.
- Smith, T. G. & Hoover, T. R. (2009). Deciphering bacterial flagellar gene regulatory networks in the genomic era. *Advances in Applied Microbiology*, **67**, 257–295. [https://doi.org/10.1016/s0065-2164\(08\)01008-3](https://doi.org/10.1016/s0065-2164(08)01008-3).
- Snyder, L. A. S., Loman, N. J., Fütterer, K. & Pallen, M. J. (2009). Bacterial flagellar diversity and evolution: seek simplicity and distrust it? *Trends in Microbiology*, **17(1)**, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.10.002>.
- Sommerlad, S. M. & Hendrixson, D. (2006). Analysis of the Roles of FlgP and FlgQ in Flagellar Motility of *Campylobacter jejuni*. *Journal of Bacteriology*, **189(1)**, 179–186. <https://doi.org/10.1128/jb.01199-06>.
- Suaste-Olmos, F., Domenzain, C., Mireles-Rodríguez, J. C., Poggio, S., Osorio, A., Dreyfus, G. & Camarena, L. (2010). The flagellar protein FliL is essential for swimming in *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of Bacteriology*, **192(23)**, 6230–6239. <https://doi.org/10.1128/jb.00655-10>.
- Tachiyama, S., Chan, K. L., Liu, X., Hathroubi, S., Peterson, B., Khan, M. F., Ottemann, K. M., Liu, J. & Roujeinikova, A. (2022). The flagellar motor protein FliL forms a scaffold of circumferentially positioned rings required for stator activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **119(4)**, e2118401119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2118401119>.
- Takekawa, N., Isumi, M., Terashima, H., Zhu, S., Nishino, Y., Sakuma, M., Kojima, S., Homma, M. & Imada, K. (2019). Structure of Vibrio FliL, a New Stomatin-like Protein That Assists the Bacterial Flagellar Motor Function. *mBio*, **10(2)**, 1–13. <https://doi.org/10.1128/mbio.00292-19>.
- Takekawa, N., Kawamoto, A., Sakuma, M., Kato, T., Kojima, S., Kinoshita, M., Minamino, T., Namba, K., Homma, M. & Imada, K. (2021). Two Distinct Conformations in 34 FliF Subunits Generate Three Different Symmetries within the Flagellar MS-Ring. *mBio*, **12(2)**, e03199-20. <https://doi.org/10.1128/mbio.03199-20>.
- Tan, J., Zhang, X., Wang, X., Xu, C., Chang, S., Wu, H., Wang,

- T., Liang, H., Gao, H., Zhou, Y. & Zhu, Y. (2021). Structural basis of assembly and torque transmission of the bacterial flagellar motor. *Cell*, **184**(10), 2665-2679. e19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.03.057>.
- Terashima, H., Fukuoka, H., Yakushi, T., Kojima, S. & Homma, M. (2006). The *Vibrio* motor proteins, MotX and MotY, are associated with the basal body of Na-driven flagella and required for stator formation. *Molecular Microbiology*, **62**(4), 1170–1180. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05435.x>.
- Terashima, H., Koike, M., Kojima, S. & Homma, M. (2010). The flagellar basal body-associated protein FlgT is essential for a novel ring structure in the sodium-driven *Vibrio* motor. *Journal of Bacteriology*, **192**(21), 5609–5615. <https://doi.org/10.1128/jb.00720-10>.
- Thomson, N. M., Ferreira, J. L., Matthews-Palmer, T. R., Beeby, M. & Pallen, M. J. (2018a). Giant flagellins form thick flagellar filaments in two species of marine γ -proteobacteria. *PLOS ONE*, **13**(11), e0206544. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206544>.
- Thomson, N. M., Rossmann, F. M., Ferreira, J. L., Matthews-Palmer, T. R., Beeby, M. & Pallen, M. J. (2018b). Bacterial Flagellins: Does Size Matter? *Trends in Microbiology*, **26**(7), 575–581. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.11.010>.
- Thormann, K. M., Beta, C. & Kühn, M. J. (2022). Wrapped Up: The Motility of Polarly Flagellated Bacteria. *Annual Review of Microbiology*, **76**(1), 349-367. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-041122-101032>.
- Tsang, J. & Hoover, T. R. (2014). Themes and Variations: Regulation of RpoN-Dependent Flagellar Genes across Diverse Bacterial Species. *Scientifica*, **2014**, 681754. <https://doi.org/10.1155/2014/681754>.
- Ueno, T., Oosawa, K. & Aizawa, S.-I. (1992). M ring, S ring and proximal rod of the flagellar basal body of *Salmonella typhimurium* are composed of subunits of a single protein, FliF. *Journal of Molecular Biology*, **227**(3), 672–677. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(92\)90216-7](https://doi.org/10.1016/0022-2836(92)90216-7).
- Wadhwa, N. & Berg, H. C. (2022). Bacterial motility: machinery and mechanisms. *Nature Reviews Microbiology*, **20**(3), 161–173. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00626-4>.
- Ward, E., Kim, E. A., Panushka, J., Botelho, T., Meyer, T., Kearns, D. B., Ordal, G. & Blair, D. F. (2018). Organization of the Flagellar Switch Complex of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, **201**(8), 1-22. <https://doi.org/10.1128/jb.00626-18>.
- West, M. & Dreyfus, G. (1997). Isolation and ultrastructural study of the flagellar basal body complex from *Rhodobacter sphaeroides* WS8 (wild type) and a polyhook mutant PG. *Biochemical and biophysical research communications*, **238**(3), 733-737. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.7359>.
- Xu, H., He, J., Liu, J. & Motaleb, M. A. (2019). BB0326 is responsible for the formation of periplasmic flagellar collar and the assembly of the stator complex in *Borrelia burgdorferi*. *Molecular Microbiology*, **113**(2), 418-429. <https://doi.org/10.1111/mmi.14428>.
- Xu, H., Hu, B., Flesher, D. A., Liu, J. & Motaleb, M. A. (2021). BB0259 Encompasses a Peptidoglycan Lytic Enzyme Function for Proper Assembly of Peiplasmic Flagella in *Borrelia burgdorferi*. *Frontiers in Microbiology*, **12**, 692707. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.692707>.
- Xue, C., Lam, K. H., Zhang, H., Sun, K., Lee, S. H., Chen, X. & Au, S. W. N. (2018). Crystal structure of the FliF–FliG complex from *Helicobacter pylori* yields insight into the assembly of the motor MS–C ring in the bacterial flagellum. *Journal of Biological Chemistry*, **293**(6), 2066–2078. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.797936>.
- Yonekura, K., Maki-Yonekura, S. & Namba, K. (2003). Complete atomic model of the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy. *Nature*, **424**(6949), 643–650. <https://doi.org/10.1038/nature01830>.
- Yoon, Y.-H., Barker, C. S., Bulieris, P. V., Matsunami, H. & Samatey, F. A. (2016). Structural insights into bacterial flagellar hooks similarities and specificities. *Scientific Reports*, **6**(1), 35552. <https://doi.org/10.1038/srep35552>.
- Zaloba, P., Bailey-Elkin, B. A., Derksen, M. & Mark, B. L. (2016). Structural and Biochemical Insights into the Peptidoglycan Hydrolase Domain of FlgJ from *Salmonella typhimurium*. *PLOS ONE*, **11**(2), e0149204. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149204>.
- Zhou, J., Lloyd, S. & Blair, D. (1998). Electrostatic interactions between rotor and stator in the bacterial flagellar motor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**(11), 6436-6441. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.11.6436>.
- Zhu, S., Nishikino, T., Kojima, S., Homma, M. & Liu, J. (2018). The *Vibrio* H-ring facilitates the outer membrane penetration of polar-sheathed flagellum. *Journal of Bacteriology*, **200**(21), 1-10. <https://doi.org/10.1128/jb.00387-18>.
- Zhu, S., Nishikino, T., Takekawa, N., Terashima, H., Kojima, S., Imada, K., Homma, M. & Liu, J. (2019). *In situ* Structure of the *Vibrio* Polar Flagellum Reveals a Distinct Outer Membrane Complex and Its Specific Interaction with the Stator. *Journal of Bacteriology*, **202**(4), 1-12. <https://doi.org/10.1128/jb.00592-19>