



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Bases moleculares de la senescencia en
*Caulobacter crescentus***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

JOSÉ ANDRÉS LÓPEZ MEJÍA



DIRECTOR DE TESIS:

DR. SEBASTIÁN POGGIO GHILARDUCCI

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

1. Datos del alumno	1. Datos del alumno
Apellido paterno	López
Apellido materno	Mejía
Nombre (s)	José Andrés
Teléfono	55 19 88 47
Universidad Nacional Autónoma de México	Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias	Facultad de Ciencias
Carrera	Biología
Número de cuenta	305051518
2. Datos del tutor	2. Datos del tutor
Grado	Doctor
Nombre (s)	Sebastián
Apellido paterno	Poggio
Apellido materno	Ghilarducci
3. Datos del sinodal 1	3. Datos del sinodal 1
Grado	Doctor
Nombre (s)	Víctor Manuel
Apellido paterno	Valdés
Apellido materno	López
4. Datos del sinodal 2	4. Datos del sinodal 2
Grado	Doctora
Nombre (s)	Claudia Andrea
Apellido paterno	Segal
Apellido materno	Kischinevzky
5. Datos del sinodal 3	5. Datos del sinodal 3
Grado	Doctor
Nombre (s)	Jesús
Apellido paterno	Ramírez
Apellido materno	Santos
6. Datos del sinodal 4	6. Datos del sinodal 4
Grado	Doctor
Nombre (s)	Saúl
Apellido paterno	Cano
Apellido materno	Colín
7. Datos del trabajo escrito	7. Datos del trabajo escrito
Título	Bases moleculares de la senescencia en <i>Caulobacter crescentus</i>
Número de páginas	85
Año	2017

Agradecimientos

Este trabajo fue apoyado por el proyecto del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (SEP-CONACYT 178685) y DGAPA/UNAM (IA201314).

Agradezco a la técnico del laboratorio Aurora Ventura Osorio Franco por el apoyo brindado para la realización de este proyecto.

INDICE

Resumen.....	1
Introducción.....	2
El envejecimiento.....	2
Daño oxidativo y carbonilación en proteínas	5
Estudios de senescencia y daño oxidativo a proteínas en organismos unicelulares ..	11
Caulobacter crescentus como modelo de estudio	20
Justificación.....	28
Hipótesis	29
Objetivo general.....	29
Objetivos particulares	29
Materiales y métodos.....	30
Resultados.....	49
Actualización de técnica de sincronización de cultivos de <i>C. crescentus</i> para la separación de tres poblaciones celulares distintas.....	49
Control de detección de proteínas carboniladas en <i>C. crescentus</i>	50
Acumulación diferencial de proteínas carboniladas en los distintos tipos celulares de <i>C. crescentus</i> determinada por Western-blot.....	57
Protocolo para la detección in-situ de proteínas carboniladas en <i>C. crescentus</i>	61
Análisis in-situ de proteínas carboniladas en <i>C. crescentus</i>	64
Discusión	71
Conclusiones.....	77
Referencias	78
Apéndice I.....	84

Resumen

El estudio del envejecimiento o la senescencia se ha restringido principalmente a organismos multicelulares en los que son fácilmente distinguibles sus efectos sobre los individuos. En procariontes, la fisión binaria que da origen a dos células hijas aparentemente iguales llevó a que por mucho tiempo se considerase a estos organismos como seres inmortales. Sin embargo, se han observado similitudes inherentes al envejecimiento en la tasa de crecimiento y reproducción de las bacterias, pero aún se carece de estudios sobre los mecanismos moleculares que dan lugar a este fenómeno. Una de las principales teorías sobre el envejecimiento es que se debe a la acumulación diferencial de agregados de proteínas, siendo la oxidación una de las causas de su agregación.

Con la finalidad de hacer una primera aproximación a estos mecanismos moleculares del envejecimiento en procariontes, en este trabajo se utilizó a la bacteria *Caulobacter crescentus*, una alfa-proteobacteria Gram-negativa de vida libre en aguas frescas y que, tiene como principal característica una división celular asimétrica, con una célula madre y una hija que difieren una de la otra en tamaño, morfología y función. Esto facilita estudios sobre procesos moleculares que regulan el ciclo celular, así como el control espacio-temporal de la replicación cromosomal y otros mecanismos celulares.

En este trabajo se estandarizaron técnicas que permiten el estudio de poblaciones celulares sincronizadas (con la misma edad generacional), y la localización *in situ* de las proteínas oxidadas en la célula de *C. crescentus* con ayuda de técnicas de inmunodetección y microscopia de fluorescencia. Con los análisis tipo Western-blot y microscopia se determinó, además, que la concentración de proteínas oxidadas en células progenitoras e hijas es distinta, siendo mayor en la célula progenitora, indicando un posible marcador de senescencia, ya que los resultados sugieren una posible segregación diferencial del material proteico dañado.

Introducción

El envejecimiento

El envejecimiento es sin duda uno de los aspectos de la biología humana más evidentes, pero sin embargo el menos entendido. Cada uno de nosotros tenemos una percepción del envejecimiento, observando lo que les sucede a otros y luego experimentando sus efectos nosotros mismos. Casi todo aspecto del fenotipo de un organismo conlleva modificaciones por el envejecimiento y esta complejidad ha llevado, a lo largo de los años, a una amplia gama de nuevas ideas sobre causas celulares y moleculares específicas sobre el envejecimiento (Kirkwood, 2005).

El envejecimiento, en general puede definirse y entenderse en un contexto dinámico de una adecuación disminuida hacia el ambiente, recapitulada en un decremento de la tasa reproductiva y un eventual incremento exponencial en la mortalidad, al transcurrir el tiempo. De igual manera, está caracterizado por un deterioro progresivo de las funciones fisiológicas durante la vida adulta del individuo, lo que conlleva a una vulnerabilidad mayor a los cambios en el ambiente y a una disminución en la capacidad del organismo para sobrevivir a distintos tipos de estrés (Hinkal, Gatza, Parikh, & Donehower, 2009).

Mientras que el envejecimiento es un fenómeno determinístico que puede ser visto como la rendición del sistema vivo al equilibrio metabólico con su ambiente, es un proceso llevado de la mano por riesgos o peligros estocásticos extrínsecos (clima, contaminación, infecciones, etc.) e intrínsecos (especies reactivas del oxígeno [ROS], errores de transcripción, traducción y replicación, proteínas mal plegadas, metabolitos tóxicos, etc.).

El proceso de envejecimiento permanece incluso al minimizar la contribución de agentes externos como, por ejemplo, en condiciones controladas de laboratorio. Esto implica también que puede existir una acumulación de los daños ocasionados dentro del organismo, y que, al fallar un proceso, este puede influir y afectar a otros procesos relacionados con el primero (Lindner & Demarez, 2009).

A nivel celular, la acumulación no lineal de los distintos daños resulta en el envejecimiento del organismo. En este proceso iniciado estocásticamente, la no linealidad puede explicar la larga variabilidad en los fenotipos de envejecimiento y la duración de la vida, independientemente de las diferencias ambientales y clonales (Lindner & Demarez, 2009).

Resulta que el ambiente interno (intracelular, tejido, órgano, cuerpo) modula la probabilidad y el alcance del peligro y del daño. En particular, esto pone las bases para la evolución de sistemas moleculares para mantener las amenazas y los daños controlados hasta que al menos la reproducción del organismo sea asegurada, como por ejemplo, la existencia de las enzimas superóxido dismutasas que minimizan la presencia de moléculas que pueden dañar al DNA, o bien, los mecanismos de reparación del DNA dados por las distintas DNA-polimerasas. Sin embargo, la inversión en minimizar los daños es a cuenta del crecimiento y la reproducción (Lindner & Demarez, 2009).

Desde una perspectiva evolutiva, se habla de que las mutaciones ocasionadas por especies reactivas del oxígeno y agentes ambientales que llevan al envejecimiento no son removidas eficientemente por la selección natural, haciendo que puedan acumularse en las poblaciones a través del tiempo. La selección hacia estas mutaciones es débil, ya que bajo condiciones naturales, la mayoría de los individuos mueren por otras razones externas antes de que se manifiesten signos del envejecimiento.

En contraste al envejecimiento, la progenie está compuesta de células, tejidos o estructuras sub-celulares recientemente sintetizados. Esto tiene como consecuencia que estas estructuras recién sintetizadas estén menos afectadas por el deterioro fenotípico experimentado por sus padres envejecidos. Sin esta síntesis los efectos negativos se acumularían de generación en generación y haría que los linajes envejecidos desaparecieran (Ackermann, Schauerte, Stearns, & Jenal, 2007).

Debido a la alta complejidad del envejecimiento, que involucra múltiples mecanismos a diferentes niveles, se han propuesto diversas teorías que intentan explicar cómo se origina este proceso. Una de estas teorías es la de las mutaciones somáticas, la cual involucra el daño a las macromoléculas relacionado con el aumento, dependiente de la edad, en mutaciones o algunas otras formas de daño al DNA, proteínas, lípidos, algunos carbohidratos estructurales, etc. Esto ha sugerido que la capacidad de reparación del DNA y de las proteínas es un determinante importante en la tasa de envejecimiento celular a un nivel molecular (Promislow, 1994).

En eucariontes también se habla de la pérdida de telómeros, lo cual implica que las células somáticas ya no puedan dividirse debido a la ausencia de la enzima telomerasa que se expresa normalmente en células germinales. Se ha demostrado que el estrés oxidante incrementa la tasa de pérdida de telómeros. Las mitocondrias también juegan un papel

importante en las teorías del envejecimiento, sugiriendo que la acumulación de mutaciones en el DNA mitocondrial genera una baja en la producción de ATP, resultando en un declive de la bioenergética celular (von Zglinicki, 2002).

Las mutaciones y el daño a macromoléculas dentro de la célula se consideran como un marcador de envejecimiento. El recambio de proteínas en la célula es esencial para preservar las funciones celulares. El desacoplamiento de estos mecanismos de recambio, reparación o degradación proteica es una de las formas en que se acumula material celular dañado, principalmente de proteínas alteradas, lo que también ha sido mencionado como un marcador de envejecimiento celular (Kirkwood, 2005).

Aunado a esto, diversos estudios en humanos proveen evidencia altamente descrita de que la acumulación de proteínas dañadas en el envejecimiento conlleva a diferentes desórdenes o enfermedades como el Alzheimer y Parkinson, entre otros. Una de las principales fuentes de daño a las proteínas es el estrés oxidante, al que están sometidos durante los mismos procesos metabólicos celulares (Kirkwood, 2005).

Inicialmente se pensó que los daños inherentes al envejecimiento ocurrían únicamente en organismos con una distinción entre una línea germinal y una somática, en donde los efectos negativos de la edad estarían confinados al soma y no serían heredados a la progenie producida por la línea germinal. Sin embargo, al comenzar a estudiar los mecanismos celulares y moleculares del envejecimiento, el criterio de envejecimiento se expandió a distintos organismos en los que no se encuentra presente esta distinción. Posteriormente se aplicó este concepto como una de las características elementales de los organismos eucariontes, desde las levaduras unicelulares como *Saccharomyces cerevisiae*, hasta los humanos (Ackermann et al., 2007).

Solo recientemente el debate se centró en las bacterias, las mayores representantes de los organismos procariontes. Debido a que la división celular de las bacterias es casi siempre simétrica, se pensaba que estos organismos no podían estar sujetos al proceso de envejecimiento. Bajo condiciones óptimas de crecimiento (cultivos con nutrientes adecuados, temperatura, pH y oxígeno) las bacterias eran consideradas esencialmente inmortales.

Esta percepción de inmortalidad de los organismos procariontes, implica una simplificación de su ciclo de vida y reproducción que ya no es compatible con los conocimientos actuales. En la década pasada se comenzaron a hacer especulaciones y aproximaciones en las que

se proponía que las bacterias podrían también envejecer, en un proceso similar a los organismos eucariontes. En esa década se realizaron estudios en las bacterias *Escherichia coli* (Stewart, Madden, Paul, & Taddei, 2005) y *C. crescentus* (Ackermann et al., 2007); en los que se presentaron evidencias de que algunas bacterias podrían envejecer, abriendo una nueva rama en la investigación de la senescencia (Książek, 2010).

Daño oxidativo y carbonilación en proteínas

Una consecuencia del metabolismo aerobio de los organismos es la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS), que se originan por una reducción incompleta del oxígeno en las reacciones químicas intracelulares. Dentro del ambiente celular existe un balance entre la producción y el procesamiento metabólico de estas ROS mediado por mecanismos de defensas antioxidantes a nivel celular. Una descompensación de este equilibrio puede llevar a un estrés oxidante dentro de la célula y puede afectar muchos de los componentes celulares (DNA, carbohidratos, ácidos grasos insaturados y proteínas). Cuando los mecanismos de defensa contra el estrés oxidante son sobrepasados, la cantidad de daño incluyendo la acumulación de proteínas oxidadas conlleva generalmente al envejecimiento y muerte celular (Møller, Rogowska-Wrzesinska, & Rao, 2011).

En el caso de las proteínas, las modificaciones oxidantes por ROS pueden llevar a cambios estructurales, así como también a una pérdida parcial o total de su función. Pueden ser inducidas directamente por las ROS o indirectamente por una reacción secundaria con productos derivados del estrés oxidante. Estas modificaciones reducen la actividad y termoestabilidad de las proteínas debido a un cambio de la hidrofobicidad de los aminoácidos modificados (Lasch et al., 2001).

Correlacionado a este efecto, se ha reportado que las modificaciones oxidantes conllevan también a un desdoblamiento proteico. Si las proteínas se encuentran parcialmente desnaturalizadas tienden a acumularse y, si no son degradadas, a formar agregados (Chondrogianni et al., 2014). A pesar de que las células tienen diferentes sistemas proteolíticos, ciertas proteínas oxidadas, especialmente en grandes agregados moleculares y además conjugadas con productos de glicación (glicosilación no enzimática) y glicooxidación, no pueden ser eficientemente removidos por las proteasas celulares.

Las modificaciones de las proteínas por daño oxidante pueden afectar numerosas funciones celulares como vías metabólicas, la expresión de genes (ya sea directamente o por vía de factores de transcripción) como la función de sus productos. Sin embargo, la consecuencia más importante es la acumulación de proteínas dañadas por oxidación (Chondrogianni et al., 2014). La agregación de proteínas dañadas se relaciona con el proceso de envejecimiento, por los niveles intracelulares de proteínas carboniladas (Grune et al., 2001), como se ha medido en distintos modelos celulares, por ejemplo, músculo esquelético de la rata (Feng et al., 2008), en fibroblastos humanos (Ahmed, Picot, Bulteau, & Friguet, 2007), etc.

Los niveles intracelulares de proteínas oxidadas dependen de muchas variables, por lo que los mecanismos responsables de la acumulación y agregación de las mismas varían entre los diferentes organismos (Stadtman, 1992). Las proteínas con un mal plegamiento, desnaturalizadas u oxidadas, las cuales normalmente no interactúan entre sí, tienden a formar complejos oligoméricos las unas con las otras, resultando en los agregados proteicos. Estos son insolubles y metabólicamente estables, sin embargo, como difieren de las estructuras proteicas originales, resultan tóxicas para la célula.

El proceso de agregación es sumamente lento en el envejecimiento, debido a su complejidad, y depende de la concentración de proteínas dañadas, de las condiciones intracelulares y de muchos otros factores. Algunos estudios sugieren que la agregación proteica es un proceso regulado (Kopito, 2000) y continuo, acompañado posiblemente de un crecimiento del agregado dependiente del tiempo (Grune et al., 2004).

El estrés oxidante puede afectar a las proteínas de muchas maneras distintas, algunas de estas modificaciones pueden ser reversibles, pero muchas otras resultan en una modificación irreversible. Los cambios reversibles ocurridos por la oxidación de las proteínas ocurren la mayor parte de las veces en residuos de cisteínas y metioninas, los cuales son aminoácidos que contienen azufre, y pueden ser reparados por enzimas específicas. Se ha descrito que estas modificaciones reversibles pueden estar actuando a un nivel de modulación de la función de la proteína y a su vez, están involucradas en la regulación redox (Herrero et al., 2008).

En el caso de las modificaciones proteicas postraduccionales irreversibles, causadas por la oxidación se presenta la carbonilación. Esta modificación no puede ser revertida eficientemente por las defensas antioxidantes de la célula, lo que puede llevar a la

inactivación y acumulación de la proteína modificada (figura 1). La carbonilación es el tipo más estudiado de oxidación irreversible de las proteínas.

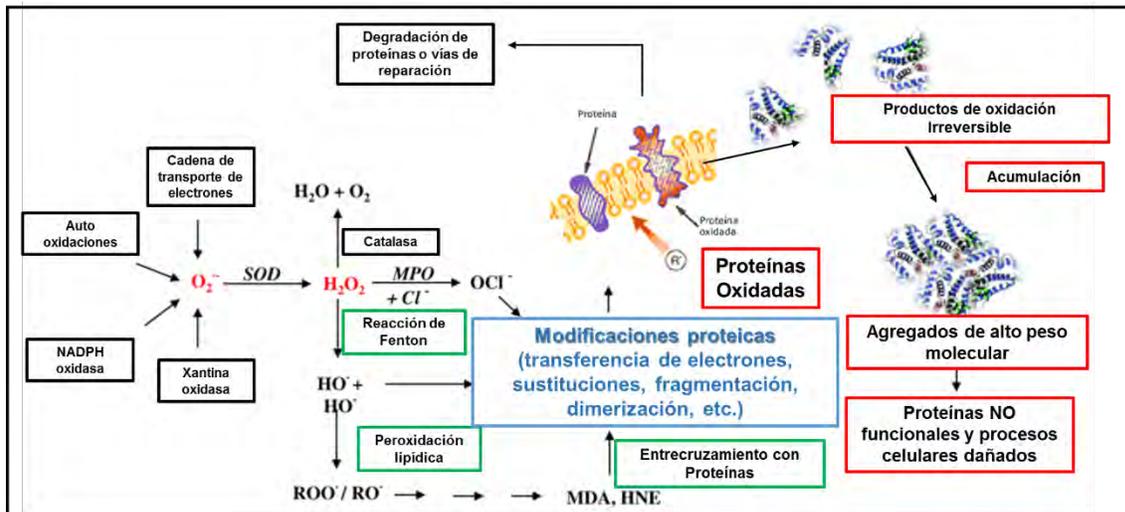


Figura 1. Esquema general de la oxidación de proteínas por ROS. HNE (hidroxinonenal), OH (radical hidroxilo), H₂O₂ (peróxido de hidrógeno), MDA (malondialdehído), MPO (peroxidasa), O₂ (superóxido), OCl (hipoclorito), SOD (superóxido dismutasa), RO (radical alcoxi), ROO (radical peroxil). Los daños irreversibles por oxidación proteica pueden llevar a la acumulación de proteínas dañadas, a la pérdida de la función proteica y a un desbalance en los procesos celulares, lo que también se considera como una de las causas del envejecimiento celular (Modificado de Chondrogianni & Petropoulos, 2014).

En el daño oxidante por carbonilación, grupos carbonilo (cetonas y aldehídos reactivos) pueden ser introducidos en las proteínas por la oxidación en las cadenas laterales de algunos residuos de aminoácidos, por el ataque de radicales hidroxilo (los aminoácidos más susceptibles son la prolina, la arginina, la lisina y la treonina); o pueden ser generados a través del decaimiento oxidante de las proteínas por distintas vías metabólicas (figura 2).

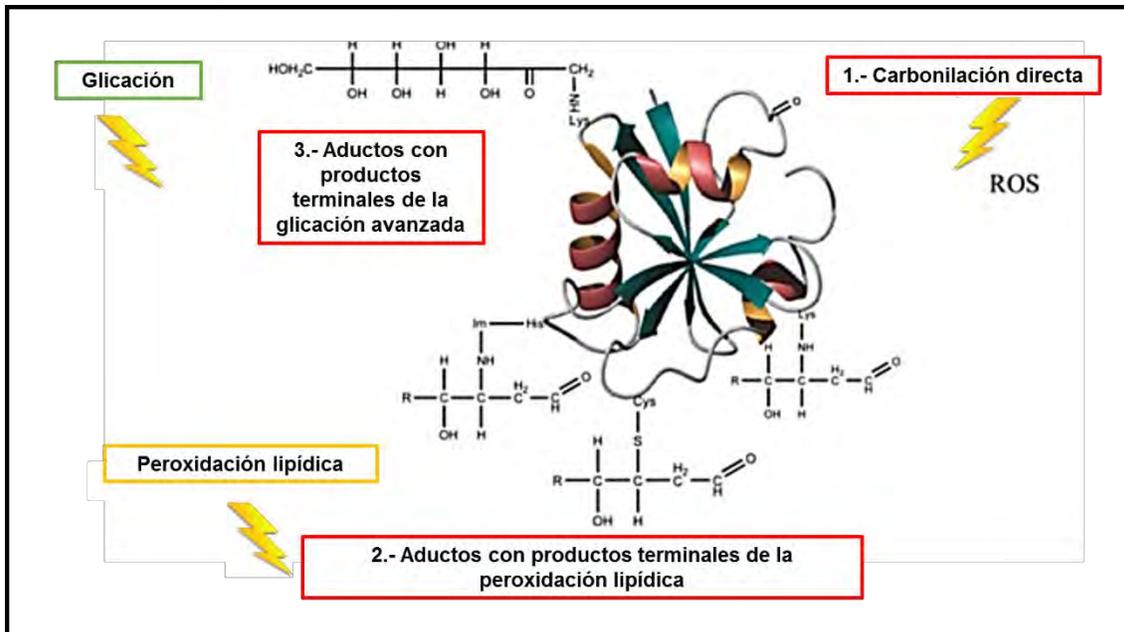


Figura 2. Esquema general para las diferentes rutas de carbonilación proteica. La carbonilación es una modificación postraducciona que lleva a la pérdida de la función proteica. Puede existir una carbonilación directa a causa de ROS, o por medio de reacciones con productos de la glicación avanzada y de la peroxidación lipídica. (Madian & Regnier, 2010).

Las reacciones en las proteínas con productos generados en la peroxidación lipídica (como el 4-hidroxinonenal, 4-HNE) involucra la adición de grupos aldehído reactivos a las cadenas laterales de los residuos de cisteína, histidina y lisina principalmente (figura 2) (Cabiscol, Tamarit, & Ros, 2014).

La tercera forma en la que las proteínas son carboniladas es a través de la reacción del grupo amino secundario de residuos de lisina u otros aminoácidos, con carbohidratos reductores o sus productos de oxidación (también conocidos como productos terminales de la glicación avanzada o AGE), generando compuestos como la carboximetil-lisina (Møller et al., 2011). La degradación oxidante de estos productos puede llevar a una formación extensa de carbonilos, los cuales pueden inducir entrecruzamiento de proteínas y la formación de agregados en la célula (figura 3).

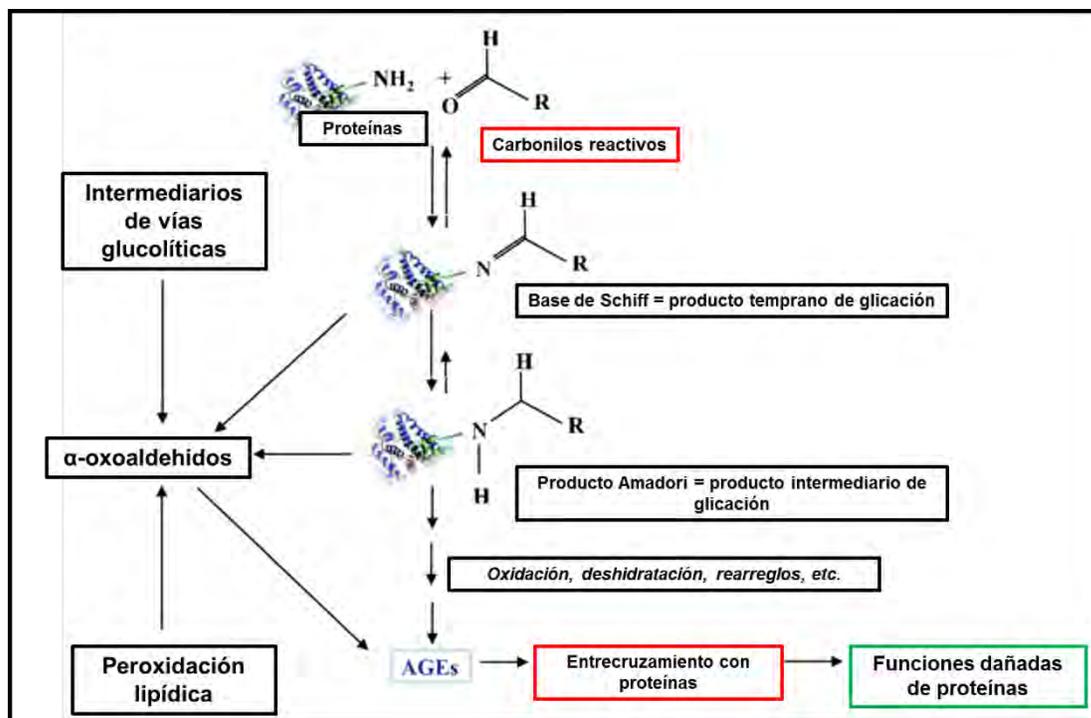


Figura 3. Modificaciones proteicas por azúcares y aldehídos reactivos. Formación de los productos terminales de la glicación avanzada (AGEs). Las reacciones involucran carbohidratos reducidos, los cuales forman bases de Schiff y productos Amadori con grupos carbonilo, que posteriormente llevan a un cruzamiento con proteínas, alterando o nulificando su función (Modificado de Chondrogianni & Petropoulos, 2014).

La detección y cuantificación de las proteínas carboniladas presentes en las células es una manera indirecta de medir o determinar la existencia de un daño por estrés oxidante. La detección y cuantificación de la carbonilación global de proteínas puede realizarse por distintos métodos. Uno de ellos y el más usado comúnmente es la derivatización de los grupos carbonilos con 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) (figura 4).

Este compuesto reacciona con los grupos carbonilo formando un compuesto estable llamado 2,4-dinitrofenilhidrazona. El grupo dinitrofenil (DNP) de este compuesto puede ser detectado y cuantificado espectrofotométricamente, ya que muestra un espectro de absorción característica con un pico máximo de absorción a 365-375nm (Levine, Williams, Stadtman, & Shacter, 1994), o bien mediante inmunodetección con anticuerpos específicos contra DNP en experimentos tipo Western-blot, dot-blot, inmunohistoquímica o con un ELISA (Buss, Chan, Sluis, Domigan, & Winterbourn, 1997; Davies, Poljak, Duncan, Smythe, & Murphy, 2001; Robinson et al., 1999).

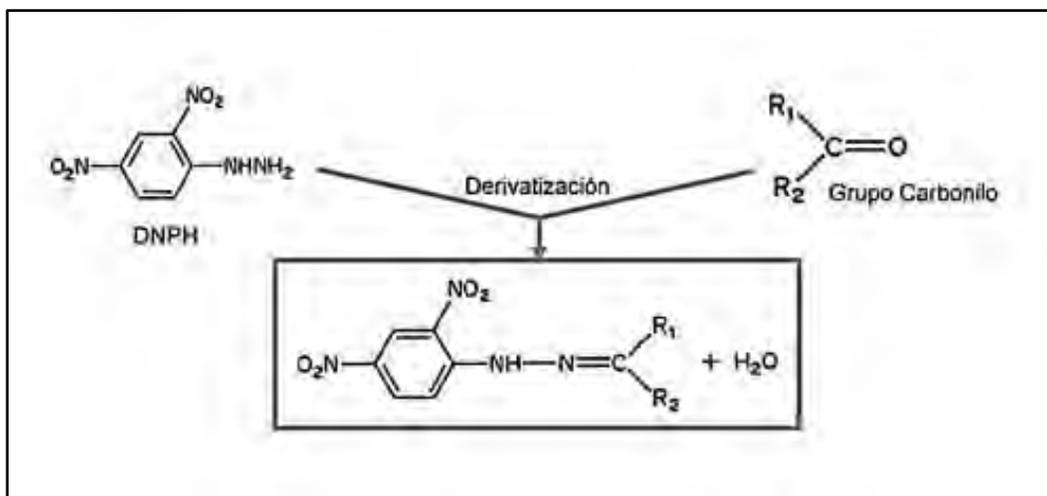


Figura 4. Reacción de derivatización de DNPH con grupos carbonilo para la formación de 2,4-dinitrofenilhidrona (Modificado de Irazusta, Moreno-Cermeño, Cabiscol, Tamarit, & Ros, 2010).

Esta reacción química es de las más usadas para el estudio de las proteínas carboniladas, ya que presenta muchas ventajas entre ellas la accesibilidad y manejo en laboratorio; sin embargo puede generar falsos positivos si no se toman las precauciones necesarias (Luo & Wehr, 2009). Recientemente se ha reportado que la DNPH puede reaccionar con otras moléculas cuando se encuentra en presencia de agentes reductores como el β -mercaptoetanol; sin embargo, aunque esta reacción puede llevar a una sobreestimación del contenido de proteínas carboniladas, aún no se ha determinado en qué proporción (Dalle-Donne et al., 2009).

Otros métodos que han sido usados para el análisis de las proteínas carboniladas incluyen ensayos con borohidruro de sodio tritiado, pruebas con biotina y algunas otras de fluorescencia, teniendo las últimos dos en común el uso de derivados de moléculas como la hidrazina que reacciona con los grupos carbonilados. Aunado a estos, también se han realizado estudios de espectrometría de masas que permiten la identificación de sitios específicos de daño oxidante en las proteínas y de sus productos. En la tabla 1 se muestra una comparación entre las pruebas disponibles para la identificación de proteínas carboniladas.

Sonda	Aplicaciones y/o ventajas	Desventajas
DNPH	Buena en ensayos colorimétricos, Western-blot e inmunofluorescencia	Eficiencia del marcaje afectada por el pH. Interferencia por ácidos nucleicos.
NaB ³ H ₄	Alta sensibilidad, buena para ensayos basados en geles	Radioactiva
Biotina-hidrazida	Buena para Western-blot, purificación por afinidad y proteómica	Marcaje necesita una mayor reducción
ARP	No necesita una mayor reducción de la muestra	Posible falso positivo en el marcaje
NIR ^b sondas fluorescentes	Excelente para análisis de Western-blot, alta sensibilidad, estable	Necesita de equipo altamente costoso

Tabla 1. Pruebas disponibles para la detección de proteínas carboniladas. Pruebas con 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH); ensayos con borohidruro de sodio tritiado (NaB₃H₄); Pruebas con Biotina (Biotina-Hidrazida); con N'-aminooximetilcarbonilhidrazina-d-biotina (ARP); y Pruebas de fluorescencia del infrarrojo cercano (NIR). El método con la DNPH resulta bueno debido a su precio y que puede aplicarse con distintas técnicas como lo es el Western-blot, ensayos colorimétricos, etc. Entre las desventajas de este método se encuentra que la eficiencia del marcaje se ve alterada por el pH, la presencia de ácidos nucleicos y que los derivados de la DNP suelen ser inestables bajo ciertas condiciones (Modificado de Yan & Forster, 2011).

Estudios de senescencia y daño oxidativo a proteínas en organismos unicelulares

Considerando al envejecimiento o senescencia como un deterioro progresivo de las funciones celulares en función del tiempo, se ha establecido una correlación entre el envejecimiento biológico y la agregación de proteínas oxidadas en una gran variedad de organismos y tejidos (Oliver, Ahn, Moerman, Goldstein, & Stadtman, 1987; Papáček S., Čelikovský, Reháč, & Štys, 2010; Sohal, Sohal, & Orr, 1995), robusteciendo el entendimiento sobre los procesos que se llevan a cabo durante el envejecimiento.

En la mayoría de los estudios que han llevado a estas conclusiones, se ha utilizado la detección de proteínas carboniladas por medio de la DNPH ya sea en inmuno-detecciones o por técnicas espectrofotométricas. Además de esto, se han realizado estudios de proteómica con espectrometría de masas que han permitido identificar proteínas blanco para la carbonilación en extractos celulares completos.

En lo referente a organismos unicelulares, se han analizado proteínas susceptibles a carbonilación (tabla 2) y se han agrupado acorde a la actividad celular en la que están involucradas, dando una idea de que procesos metabólicos se ven primeramente alterados como consecuencia de un incremento de la carbonilación de sus proteínas (Cabisco et al., 2014).

El decremento en el metabolismo celular, propio del envejecimiento, se relaciona con ciertas proteínas que se consideran como blancos de carbonilación o con una alta probabilidad de sufrir un daño oxidante, el cual impide que las proteínas realicen de manera correcta su función. Inicialmente se identificaron enzimas de vías glucolíticas, como la piruvato cinasa en *S. cerevisiae* (Mannarino et al., 2008), ciertas enzimas involucradas en la síntesis de aminoácidos y proteínas, como la glutamato sintasa y la serina hidroximetiltransferasa en *E. coli* (Fredriksson, Ballesteros, Dukan, & Nyström, 2005), como las más susceptibles a presentar una modificación por estrés oxidante (tabla 2), indicando que las biosíntesis de macromoléculas son funciones celulares que se ven afectadas inicialmente durante el envejecimiento, alterando el recambio de las mismas (Cabisco et al., 2014).

Para la biosíntesis y recambio de estas biomoléculas se requiere de factores de elongación que asistan en el proceso de la traducción de proteínas. En organismos unicelulares se ha observado que factores de elongación como EF-Tu (Fredriksson et al., 2005) y EF1A (Tamarit et al., 2012) son blancos de carbonilación, lo que puede llevar a una traducción aberrante de proteínas y a su acumulación, lo cual se considera también una característica del envejecimiento (Grillari, Grillari-Voglauer, & Jansen-Dürr, 2010).

Para prevenir la acumulación de proteínas mal plegadas o dañadas existen chaperonas como la HSP27, HSP60, HSP70 y HSP90 pertenecientes a las proteínas de choque térmico (HSPs), que ayudan a disuadir los agregados de proteínas. En células senescentes, los genes de respuesta a estrés como los de las HSPs, muestran un incremento en su transcripción, lo que habla de la importancia de la oxidación de proteínas y la prevención de los agregados de las mismas para el proceso biológico del envejecimiento (Calderwood, Murshid, & Prince, 2009).

Sin embargo, las HSPs también son altamente susceptibles a sufrir daños por carbonilación (tabla 2), y sus funciones de reparación y plegamiento hacia otras proteínas se ven comprometidas. Entre las más susceptibles a oxidarse se encuentran: Hsp60 (Feng et al., 2008), Ssa1 (Erjavec, Larsson, Grantham, & Nyström, 2007), y Hsp82 (Reverter-Branchat, Cabisco, Tamarit, & Ros, 2004). Es por esto que, desde procariontes hasta humanos, la oxidación de estas proteínas se considera un marcador de envejecimiento celular (Cabisco et al., 2014).

Proteína	Organismo	Contexto de envejecimiento	Referencias
Metabolismo de glucosa			
Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	<i>S. cerevisiae</i>	Replicativo/cronológico	Reverter et al., 2004; Erjavec et al., 2007
Fosfoglicerato cinasa	<i>S. cerevisiae</i>	Cronológico	Tamarit et al., 2012
Piruvato cinasa	<i>E. coli</i>	Arresto del crecimiento	Dukan & Nystrom, 1998
	<i>S. cerevisiae</i>	Cronológico	Mannarino et al., 2008; Tamarit et al., 2012
Fructosa 1,6- bifosfatasa	<i>S. cerevisiae</i>	Cronológico	Reverter et al., 2004
Componente E1piruvato deshidrogenasa	<i>E. coli</i>	Arresto del crecimiento	Fredrickson et al., 2005
Isocitrato deshidrogenasa	<i>E. coli</i>	Arresto del crecimiento	Dukan & Nystrom, 1998; Fredrickson et al., 2005
	<i>S. cerevisiae</i>	Cronológico	Tamarit et al., 2012
Malato deshidrogenasa	<i>E. coli</i>	Arresto del crecimiento	Dukan & Nystrom, 1998; Fredrickson et al., 2006
Metabolismo de aminoácidos y proteínas			
Serina hidroximetiltransferasa (GlyA)	<i>E. coli</i>	Arresto del crecimiento	Fredrickson et al., 2005
Glutamato sintasa	<i>E. coli</i>	Arresto del crecimiento	Dukan & Nystrom, 1998; Fredrickson et al., 2005
Metionina sintasa	<i>S. cerevisiae</i>	Replicativo	Erjavec et al., 2007
Factor de elongación			
Factor de elongación Tu (EF- Tu)	<i>E. coli</i>	Arresto del crecimiento	Dukan & Nystrom, 1998; Fredrickson et al., 2005
Factor de elongación 1- alfa (EF1A)	<i>S. cerevisiae</i>	Cronológico	Tamarit et al., 2012
Sistemas de defensa antioxidantes			
Catalasa T	<i>S. cerevisiae</i>	Cronológico	Reverter et al., 2004
Choque térmico proteínas / Chaperonas			
Chaperona molecular Dnak	<i>E. coli</i>	Arresto del crecimiento	Dukan & Nystrom, 1998; Fredrickson et al., 2005
Chaperona molecular GroEL	<i>E. coli</i>	Arresto del crecimiento	Fredrickson et al., 2005
HSP 60	<i>S. cerevisiae</i>	Replicativo/cronológico	Reverter et al., 2004; Erjavec et al., 2007
Diversos			
Fosfoenolpiruvato-fosfotransferasa	<i>E. coli</i>	Arresto del crecimiento	Dukan & Nystrom, 1998; Fredrickson et al., 2005
Malato sintasa 1	<i>S. cerevisiae</i>	Cronológico	Tamarit et al., 2012
ALDH4	<i>S. cerevisiae</i>	Cronológico	Tamarit et al., 2012
RpoB	<i>E. coli</i>	Arresto del crecimiento	Fredrickson et al., 2005

Tabla 2. Lista de proteínas modificadas por carbonilación en *E. coli* y *S. cerevisiae*, incluyendo la referencia del artículo donde se realizó el trabajo. (Modificado de Cabiscol et al., 2014).

En la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (un organismo eucarionte unicelular) se han descrito dos tipos de envejecimiento, el cronológico y el replicativo. El envejecimiento cronológico se refiere a la capacidad de cultivos estacionarios para mantener su viabilidad a lo largo del tiempo. Investigaciones en este campo han provisto de un valioso modelo para estudiar el daño oxidativo y el envejecimiento de tejidos postmitóticos en organismos superiores (Herman, 2002; MacLean, Harris, & Piper, 2001; Sinclair, 2002).

Los componentes celulares dañados no se pueden diluir en estas células, por lo que la presencia de sistemas que se deshacen de estos componentes dañados o que previenen dicho daño contribuyen a un tiempo de vida más largo. Las células en estado estacionario desarrollan una alta resistencia al estrés oxidante y térmico y por medio de la

sobreexpresión de *Sod1* y *Sod2* (superóxido dismutasa 1 y 2 respectivamente) aumentan su esperanza de vida en un 30%. En estas células se tiende a acumular glucógeno y la pared celular se adelgaza (Werner-Washburne, Braun, Crawford, & Peck, 1996).

El otro tipo de envejecimiento, el replicativo, se refiere al número finito de veces que la levadura puede dividirse por gemación. Este modelo ha sido usado para estudiar el daño oxidante y el envejecimiento en tejidos replicativos de organismos superiores. Conforme la levadura se hace vieja, acumula cicatrices de división, aumenta de tamaño, se vuelve infértil y el núcleo se fragmenta.

Para ambos tipos de envejecimiento se han realizado estudios de carbonilación de proteínas y se ha observado que los dos procesos comparten las proteínas blanco de carbonilación (tabla 2), en las que se incluyen proteínas de resistencia a estrés y enzimas involucradas en el metabolismo de la glucosa (Mannarino et al., 2008; Reverter-Branchat et al., 2004; Tamarit et al., 2012).

Se ha observado además que, en la levadura, ciertos materiales celulares como los círculos extracromosómicos de DNA ribosomal (ECRs) se heredan asimétricamente durante la citocinesis de la levadura, provocando un envejecimiento replicativo ya que se acumulan en la célula progenitora (D. A. Sinclair, 1997). Las proteínas dañadas por carbonilación muestran un patrón similar, heredándose asimétricamente durante la citocinesis, sugiriendo que la edad asimétrica de las células depende de la repartición de los componentes celulares no dañados a la progeñe y en el que las células progenitoras muestran marcadores de estrés oxidante.

Este estrés se debe a una carga extra de proteínas dañadas por carbonilación, la cual es retenida por las células progenitoras durante la división celular (figura 5). La capacidad de las células progenitoras de retener las proteínas carboniladas disminuye conforme aumenta la edad replicativa (Aguilaniu, Gustafsson, Rigoulet, & Nyström, 2003).

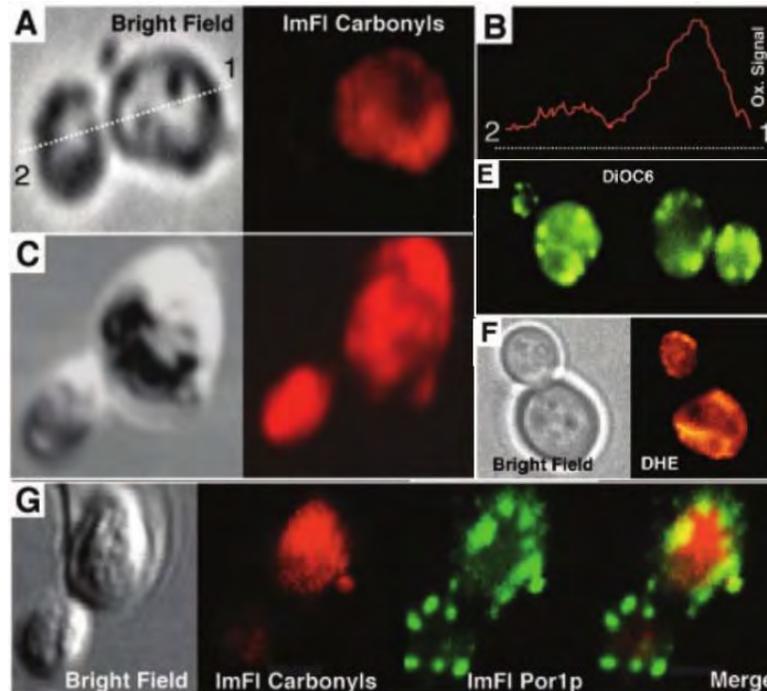


Figura 5. Distribución de proteínas dañadas por oxidación, mitocondrias y ROS durante la citocinesis de la levadura *S. cerevisiae*. A) izquierda micrografía de contraste de fases, a la derecha, proteínas carboniladas detectadas por inmunofluorescencia *in-situ* (en rojo) de una levadura en gemación. B) Señal de carbonilos cuantificada a lo largo de la línea de la imagen de campo claro de A. C) Proteínas carboniladas (en rojo) en una levadura en gemación tratada con paraquat, un agente oxidante, 20 minutos antes de la fijación de las células. E) Distribución de las mitocondrias en una levadura en gemación, analizadas con un colorante DiOC₆ que es dependiente del potencial de membrana. F) Detección del ion superóxido en una levadura en gemación con dihidroetidio (DHE). G) Colocalización de las mitocondrias y las proteínas carboniladas, en el primer panel se muestra la imagen de contraste de fase, el segundo panel muestra las proteínas carboniladas en rojo, el tercer panel muestra la ubicación de las mitocondrias en verde y el último panel muestra la imagen superpuesta de los paneles dos y tres. En esta imagen se muestra cómo la célula progenitora retiene el material dañado (proteínas carboniladas) durante la citocinesis celular y previene que la célula hija adquiera una proporción significativa de las proteínas dañadas, a pesar de que la célula hija presenta su metabolismo aeróbico y produce ROS en presencia de mitocondrias. Esta distribución asimétrica de las proteínas carboniladas es importante para la adecuación de las células hijas recientemente nacidas. Esto se puede relacionar con un fenómeno involucrado en el envejecimiento celular replicativo. Tomado de Aguilaniu et al., 2003.

Recientemente se describió en la levadura la maquinaria responsable de la segregación diferencial de los agregados de proteínas oxidadas, la cual es dependiente del polarisoma (Liu et al., 2010, 2011), indicando que en organismos eucariontes unicelulares en los que se presenta una división celular como tipo de reproducción, existe una maquinaria celular

responsable del acarreo del material dañado (proteínas carboniladas). Esto le confiere una ventaja en la adecuación a las células hijas, y que en contraparte se presenta un fenómeno de envejecimiento en el organismo como consecuencia del tiempo.

En las bacterias el crecimiento depende de la disponibilidad de nutrientes. En el laboratorio los cultivos de bacterias se mantienen en sistemas cerrados en los que los nutrientes, y los productos terminales del metabolismo o de desecho, se encuentran en suspensión. *In-vivo* las bacterias no experimentan estas restricciones. En estas condiciones artificiales los cultivos se comportan de una manera predecible en un crecimiento semilogarítmico parecido a las células somáticas humanas cultivadas *in-vitro*.

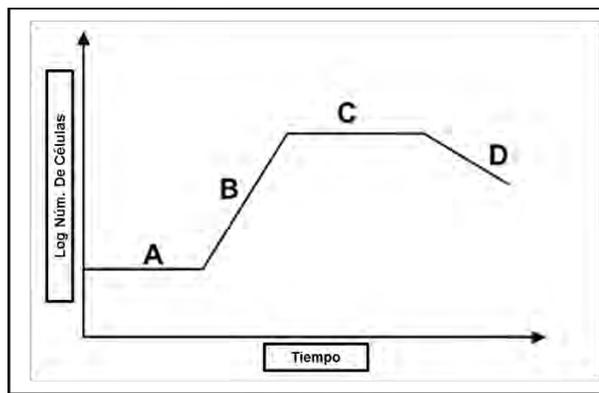


Figura 6. Curva de crecimiento de bacterias en un cultivo *in vitro*, denotado como número de células por tiempo de cultivo. A) Fase de aclimatación. B) fase de crecimiento exponencial. C) Fase estacionaria. D) Fase de muerte celular. (Modificado de Książek, 2010).

Conforme las bacterias crecen *in-vitro* se reducen los nutrientes debido al consumo de los mismos y se comienzan a acumular los productos de desecho celular. En la fase estacionaria ya no hay un incremento en la biomasa del cultivo; sin embargo, las células vivas aún mantienen sus funciones metabólicas, permitiendo la sobrevivencia de las bacterias en condiciones de bajos nutrientes y concentraciones de metabolitos tóxicos que se incrementan conforme avanza el tiempo. En estas condiciones, las células entran en un estado conocido como envejecimiento condicional (figura 6).

En este estado de fase estacionaria se activan respuestas asociadas con la protección celular contra estrés oxidante dependiente del envejecimiento, así como la producción de

ciertas chaperonas y proteasas para tratar de contender con la acumulación de proteínas aberrantes y dañadas por oxidación (Książek, 2010).

La presencia de nucleoides condensados es una de las principales características fenotípicas de las bacterias en un envejecimiento condicional asociado a la fase estacionaria del cultivo (Wolf et al., 1999). Otras características importantes son ribosomas dimerizados (Yoshida, Yamamoto, Uchiumi, & Wada, 2004), un tamaño celular reducido y una esferificación (Lange & Hengge-Aronis, 1991), además de un reducido contenido proteico en la membrana externa (Lam et al., 2009), y una disminución en la fluidez de la membrana interna (Cronan, 1968), así como diversos fenómenos asociados a oxidación de proteínas y su acumulación.

En organismos unicelulares procariontes la mayoría de los estudios realizados han sido en el modelo *E. coli*. En esta bacteria se describió un envejecimiento condicional dado por una detención del crecimiento, el cual ha revelado ciertas similitudes con el proceso de envejecimiento de organismos superiores. Se ha sugerido también que, el declive en la actividad proteosomal durante el envejecimiento condicionado o detención del crecimiento esté quizá relacionado con una acumulación gradual de agregados resistentes a la proteólisis de proteínas carboniladas, que se unen e inhiben a los proteosomas, incrementando el contenido de proteínas carboniladas durante el envejecimiento condicional (Grune, Jung, Merker, & Davies, 2004).

Sin embargo, no existe información disponible sobre si productos del daño oxidante, como las proteínas carboniladas, se acumulan preferencialmente en la célula bacteriana “progenitora” como una función de la edad replicativa, infiriendo un envejecimiento como tal, sin la restricción de nutrientes o espacio. Al no poder utilizar en las bacterias la mortalidad por edad como un indicador de envejecimiento, éste ha sido cuantificado a partir del declive en la reproducción y en la tasa de crecimiento (Ackermann et al., 2007).

Definiendo el envejecimiento en procariontes en términos de la velocidad de división y la expectativa de vida reproductiva, y no en términos de la detención del crecimiento por condiciones de limitación de nutrientes y espacio (envejecimiento condicionado), se han realizado estudios siguiendo el crecimiento y reproducción de células individuales a lo largo del tiempo, tratando de determinar si el tiempo de vida afecta a la reproducción, traduciendo estos efectos como consecuencias de un envejecimiento funcional más parecido al de organismos eucariontes pluricelulares.

Es estos estudios se han identificado efectos en la reproducción a costa de la expectativa de vida relacionados a un envejecimiento generacional en células individuales de *E. coli*. Esta bacteria se reproduce por fisión binaria generando un polo nuevo en cada división y manteniendo un polo que se puede denominar viejo (figura 7A).

Las células que conservan a los polos viejos después de un cierto número de divisiones celulares (figura 7A, polo color rojo), muestran efectos del envejecimiento generacional como lo son un lento crecimiento acumulativo (decremento en la eficiencia metabólica, figura 7C), una menor producción de biomasa en las células hijas conforme aumenta la edad generacional y un incremento en la probabilidad o susceptibilidad a muerte (Stewart et al., 2005).

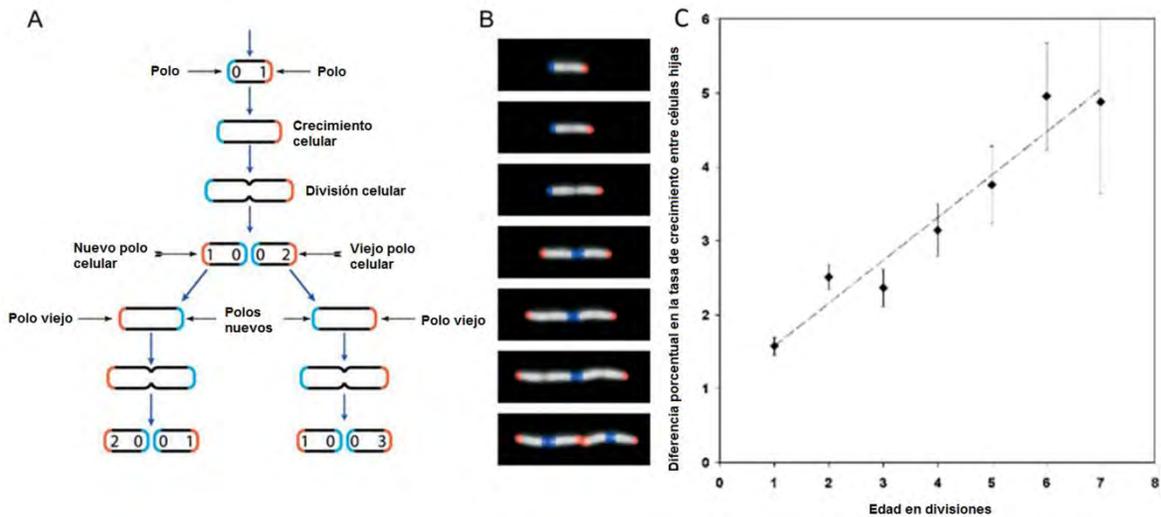


Figura 7. División celular de *E. coli* y tasa de crecimiento. A) En la división celular se sintetiza un polo nuevo en cada célula hija (azul) y el polo preexistente se considera el polo viejo (rojo). El número de divisiones desde que cada polo fue formado se indica con un número dentro del polo, se puede asignar una edad generacional a las células con el número de veces que el polo viejo se ha mantenido en la célula con cada división. B) Micrografías a distintos tiempos de células creciendo indicando con los colores la ubicación del polo nuevo y el polo viejo. C) El porcentaje en la diferencia en la tasa de crecimiento de una célula conforme aumenta su edad generacional medida por las divisiones celulares, comparado contra una célula con polos nuevos. Conforme aumenta la edad generacional, la diferencia en la tasa de crecimiento se va incrementando mostrando una menor eficiencia metabólica en las células con mayor edad generacional. (Tomado de Stewart et al., 2005).

En las condiciones experimentales usadas se estimó que las células dejan de crecer cuando heredan un polo viejo con una edad de 100 generaciones. Esto sugiere que no es necesaria la presencia de una línea germinal distinta de una somática para observar los efectos del envejecimiento y que sólo se requiere de una asimetría fisiológica en la reproducción (Stewart et al., 2005). La asimetría fisiológica durante la división celular podría representar la acumulación del material celular dañado por medio de una partición preferencial hacia una célula (Stewart et al., 2005).

Existen organismos procariontes que se dividen asimétricamente (a diferencia de *E. coli* con una división morfológicamente simétrica) permitiendo distinguir a la célula progenitora de la célula hija. Tal es el caso de la bacteria *Caulobacter crescentus*. En esta bacteria se observaron consecuencias del envejecimiento similares a las descritas para *E. coli*, como una tasa metabólica reducida, la susceptibilidad a muerte aumentada y una disminución en la velocidad de división (Ackermann et al., 2007).

Se ha observado que disminuye la tasa reproductiva de células progenitoras de *C. crescentus* conforme aumenta la edad (figura 8), mientras que las células hijas de esta bacteria mantienen una tasa reproductiva alta y constante, sin importar si la célula progenitora a partir de la cual tienen origen, tiene poca edad generacional o muestra ya un avanzado número de divisiones celulares (Ackermann et al., 2007).

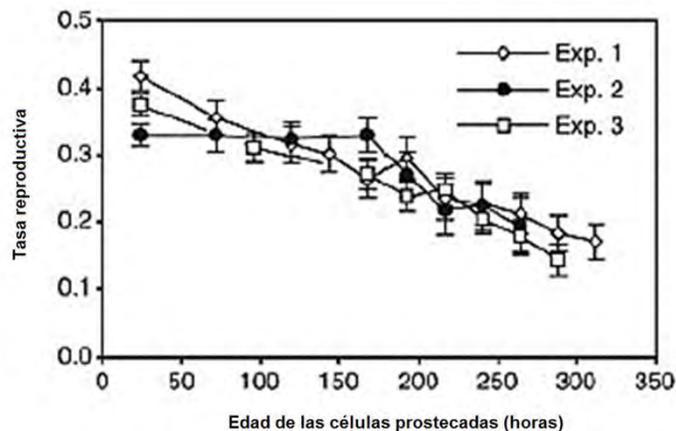


Figura 8. Tasa reproductiva de *C. crescentus* (progenie producida por célula progenitora por hora) como resultado del envejecimiento. Cada línea representa un experimento independiente. Conforme aumenta la edad y las células envejecen, su tasa de reproducción decrece. (Tomado de Ackermann & Schauerte, 2007).

Además de estos estudios, se ha descrito que las mutaciones que contribuyen al envejecimiento pueden ocurrir en bacterias y pueden alcanzar altas frecuencias si la fuerza de selección es débil en etapas de edad avanzada. Cuando las mutaciones tienen inesperados efectos fenotípicos, el desarrollo del envejecimiento puede tomar diferentes caminos (Ackermann et al., 2007).

El entendimiento del envejecimiento y su evolución en organismos procariontes requiere de experimentos que provean de información sobre los efectos mutacionales en el envejecimiento y de los mecanismos de diferenciación entre una célula progenitora y su progenie, así como de técnicas que ayuden al estudio de los procesos moleculares involucrados en el envejecimiento.

***Caulobacter crescentus* como modelo de estudio**

Caulobacter crescentus representa una plataforma de estudio en organismos procariontes excepcional para los análisis relacionados con los mecanismos que permiten la diferenciación entre una célula progenitora y una célula hija. Es una alfa-proteobacteria acuática Gram-negativa que desarrolla un importante papel en el ciclo global del carbono, por medio de la mineralización de material orgánico disuelto.

Su ciclo de vida dimórfico, la división asimétrica y la posibilidad de obtener fácilmente poblaciones sincronizadas, facilitan el seguimiento espacio-temporal de la expresión génica, la localización subcelular de proteínas, la segregación cromosomal y el crecimiento a través del curso del ciclo celular de la bacteria. Ésto permite una descripción detallada no sólo de los mecanismos del desarrollo y diferenciación bacteriana, sino también de procesos altamente conservados en la replicación cromosomal y regulación del ciclo celular que son menos trazables en especies modelo con una división simétrica como *E. coli* (Microbewiki & Wikipedia, 1964).

C. crescentus presenta dos formas celulares, ambas con el mismo material genético. La primera como una célula móvil o nadadora, que no se replica. La segunda es una célula sésil, con una prosteca. La célula nadadora hace rotar su único flagelo polar para desplazarse, lo que reduce la competencia local por nutrientes; también presenta un pilus, el cual se sintetiza en el polo flagelar inmediatamente después de la división celular.

La diferenciación de la célula nadadora a célula prostecada ocurre antes de que inicie la replicación del DNA, en este tiempo el flagelo es expulsado, el pilus se retrae y crece en este sitio una extensión de la envoltura celular cilíndrica y estrecha (conocida como prosteca) (Siegal-Gaskins & Crosson, 2008). A esta estructura se le han atribuido funciones de adquisición de nutrientes por aumento de la superficie celular, ya que presenta membrana interna y externa, peptidoglicano y espacio periplásmico.

Al final de la prosteca se encuentra el asidero (Holdfast), el cual es un complejo de polisacáridos y proteínas (N-acetilglucosamina entre ellos) que sirve para adherirse con gran fuerza a sustratos o superficies (Li, Brun, & Tang, 2013). La prosteca contiene bandas cruzadas perpendiculares al eje largo, que aparentemente se sintetizan una vez durante el ciclo celular y pueden ser usadas para determinar la edad de una célula prostecada. También se ha propuesto que estas bandas estabilizan la prosteca (Poindexter & Staley, 1996).

Ciclo celular de *Caulobacter crescentus* y su regulación

La generación de distintos tipos celulares se lleva a cabo por medio de dos procesos fundamentales: una división asimétrica de la célula y la diferenciación celular. La progresión a través del ciclo celular y la división asimétrica de la célula resulta de una serie secuencial de cambios en la morfología celular y requiere de la coordinación de varios procesos, entre ellos la replicación cromosomal y su segregación, la morfogénesis y diferenciación secuencial polar, el crecimiento celular, la biosíntesis del flagelo y el pilus, la formación del complejo quimiotáctico, entre otros. En la regulación de este proceso participan el control transcripcional, la fosforilación de proteínas, la metilación de regiones de DNA y la localización y degradación diferencial de proteínas (Zhou et al., 2015).

El avance de la célula por estos cambios estructurales es guiado por programas genéticos secuenciales que llevan a una expresión diferencial del genoma. Como consecuencia de esta alta regulación, *Caulobacter* replica su cromosoma sólo una vez durante el ciclo celular, por lo que las fases G1, S y G2 son fácilmente distinguibles (Brown, Hardy, Trimble, & Brun, 2008) y en consecuencia, los distintos tipos celulares generados (célula progenitora y célula hija).

Algunos autores mencionan que aproximadamente el 19% del genoma de *Caulobacter*, que equivale a 553 genes, se expresan en niveles que varían a través del ciclo celular (Laub, McAdams, Feldblyum, Fraser, & Shapiro, 2000). Recientemente se ha trabajado para identificar sitios de inicio de la transcripción de estos genes, así como la medición de sus niveles específicos de actividad en cada etapa del ciclo celular, con la finalidad de definir las regiones reguladoras correspondientes a cada promotor regulado por el ciclo celular (Zhou et al., 2015).

La regulación del ciclo celular se da por proteínas maestras reguladoras de la transcripción, por medio de un proceso cíclico. Actualmente se conocen 5 de estas proteínas involucradas: DnaA, GcrA, CtrA, SciP y una metil-transferasa de DNA llamada CcrM (figura 9), que dirigen la transcripción de aproximadamente el 60% de los genes regulados por el ciclo celular (Zhou et al., 2015) (Lasker, Mann, & Shapiro, 2016).

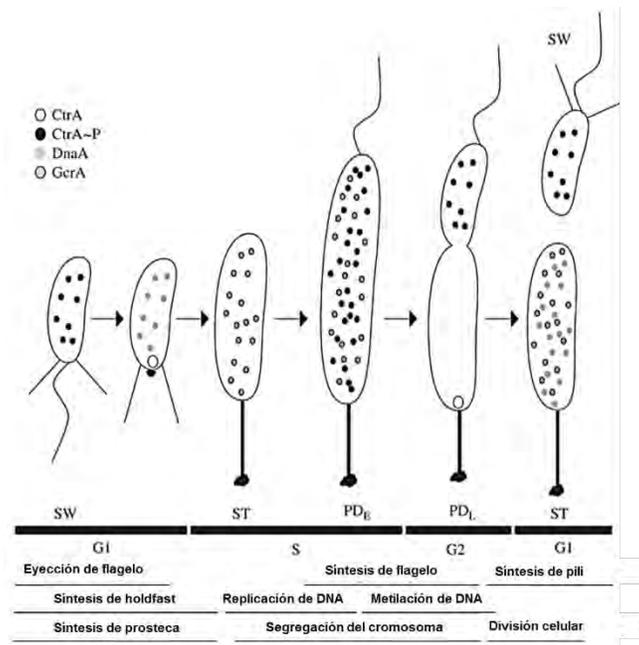


Figura 9. Ciclo celular de *C. crescentus* y localización de los principales reguladores maestros CtrA, DnaA y GrcA. En la parte inferior se muestran las fases del ciclo celular y los principales eventos morfológicos. Célula flagelada (SW), Célula prostecada (ST), célula predivisional temprana (PD_E) y célula predivisional tardía (PD_L). (Tomado de Brown et al., 2008).

Existen a la vez, niveles adicionales de regulación del ciclo, los cuales se ayudan de los factores sigma. La secuenciación del genoma de *C. crescentus* reveló la presencia de 16 factores sigma putativos de función extracitoplásmica, que dirigen cambios en la expresión génica en respuesta a estímulos periplásmicos o extracelulares, como otro nivel de regulación del ciclo celular (Nierman et al., 2001).

Dentro de estos factores sigma, existen algunos reguladores importantes de respuesta a estrés oxidante, entre ellos sigma^F, que no se requiere durante el crecimiento normal si no en la respuesta a estrés oxidante que ocurre durante la fase estacionaria. Este factor activa la transcripción de 8 genes, incluyendo los que codifican para la metionina-sulfóxido-reductasa, la superóxido dismutasa y la anhidrasa carbónica, los cuales están relacionados con la protección contra estrés oxidante (Alvarez-Martinez, Baldini, & Gomes, 2006).

Además de los reguladores transcripcionales, se conocen proteínas de transducción de señales de dos componentes que regulan la progresión del ciclo celular. Con la secuenciación del genoma de *Caulobacter crescentus*, se reveló la presencia de 105 genes que codifican para proteínas de transducción de señales de dos componentes, incluyendo 34 cinasas de histidinas (entre ellas PleC y DivJ), 44 reguladores de respuesta y 27 híbridos de cinasas de histidinas y reguladores de respuesta (Nierman et al., 2001).

Al menos 39 de estos genes se requieren para la progresión del ciclo celular, el crecimiento y la diferenciación morfológica; y 9 genes más son esenciales para la sobrevivencia celular (Skerker, Prasol, Perchuk, Biondi, & Laub, 2005). La organización espacial de las proteínas de transducción de señales juegan un papel importante en la preparación de los compartimientos de la célula predivisional para la formación de los distintos tipos celulares (Brown et al., 2008).

La distribución y el mecanismo de acción de las proteínas reguladoras maestras de la transcripción y de algunos otros factores de la regulación del ciclo celular, comienzan en la fase G1. En esta fase del ciclo se encuentra activa y fosforilada CtrA, que es una proteína reguladora de respuesta con sitio de unión a DNA, que se une al origen de replicación y reprime la replicación del cromosoma. Además de esto, CtrA regula la expresión de la hemimetiltransferasa CcrM, y con ello regula el estado de metilación del DNA en la célula prostecada y en la predivisional (Sanselicio, Bergé, Théraulaz, Radhakrishnan, & Viollier, 2015). Su estado de fosforilación está dado por CckA (cinasa de histidina del ciclo celular);

y también por un segundo regulador de respuesta denominado CpdR (regulador de degradación de proteína CtrA) (Collier, 2016).

Durante el proceso de transición de célula flagelada a prostecada, para dar paso a la fase S, CtrA se degrada rápidamente por proteólisis en. El control de la replicación cromosomal comienza con la estabilización de DnaA, que es un activador esencial de la replicación cromosomal (Gorbatyuk & Marczyński, 2001), ya que presenta una actividad de desdoblamiento del DNA, actuando como iniciador y regulador transcripcional durante la fase S temprana (Collier, 2016).

DnaA es responsable de la activación tanto de *ftsZ* como de *podJ* y de la síntesis de GcrA, esta última se acumula durante la fase S. La proteína DnaA se une al origen de replicación cromosomal, sin embargo al momento de iniciar la replicación en las células prostecadas también se promueve su degradación (Collier, 2016). La rápida degradación de DnaA asegura que la replicación del DNA no se reinicie de nuevo durante el mismo ciclo celular.

La proteína CtrA en esta fase S temprana se encuentra degradada o inactiva, es GcrA el regulador dominante y activa los genes requeridos para la replicación cromosomal, elongación celular y el desarrollo de la polaridad (Holtzendorff, Reinhardt, & Viollier, 2006).

GcrA muestra una afinidad por diversos promotores, entre ellos, el promotor P1 de *ctrA*. Conforme la célula avanza de la fase S a la G2, GcrA promueve la transcripción de *ctrA* y la proteína comienza a acumularse. El nuevo CtrA sintetizado es fosforilado y evita también que exista una re-iniciación de la replicación cromosomal, reprimiendo también a *GcrA* (Quon, Yang, Domian, Shapiro, & Marczyński, 1998).

La localización espacio-temporal de estas proteínas también se encuentra controlada por los reguladores globales de los que se habló anteriormente, entre estos CtrA y DivK, reguladores de respuesta ubicados al final de sistemas de dos componentes. El primer sistema involucra a DivJ y PleC, cuyas interacciones van a tener un efecto final sobre DivK; y el segundo sistema con DivL y CckA, el cual va actuar sobre CtrA. PleC y CckA son enzimas que actúan sobre residuos de histidina, pueden actuar como cinasas o fosfatasa hacia sus respectivos reguladores de respuesta (Subramanian, Paul, & Tyson, 2015).

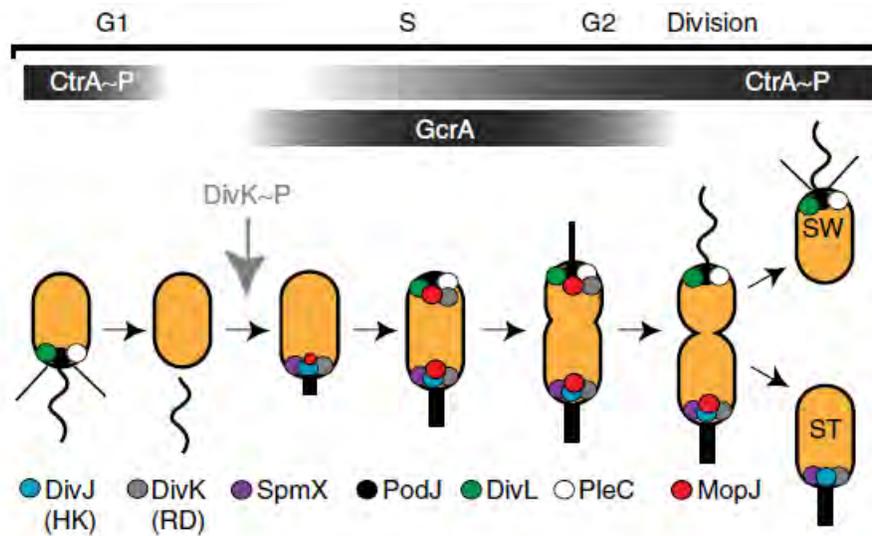


Figura 10. Modelo que muestra las principales proteínas cinasas y sus reguladores durante el ciclo celular de *C. crescentus*. Las barras negras muestran la abundancia relativa de los reguladores transcripcionales CtrA y GcrA. Las proteínas como DivJ y PleC ayudan a la localización de las distintas proteínas y procesos para la replicación y la división celular. (Tomado de Sanselicio et al., 2015).

Por consiguiente, para determinar la asimetría celular, existe una regulación en la actividad y los niveles de la proteína señalizadora CtrA, que necesita encontrarse fosforilada para presentar actividad de factor transcripcional. Para ello, el módulo de determinación de la asimetría desencadena una cascada de activación o degradación de CtrA dependiendo de los reguladores espaciales en los andamios polares; por lo que en la célula predivisiva, CtrA permanece fosforilado en el compartimiento de la célula flagelada, mientras que en el compartimiento prostecado permanece desfosforilado y degradado (Lasker et al., 2016).

Como ya se mencionó anteriormente, el módulo que determina la asimetría está compuesto por dos vías de señalización proteica localizadas diferencialmente en los polos de las células predivisivas. La vía de activación de CtrA se localiza en el nuevo polo debido a interacciones con la proteína de andamiaje polar PodJ, y en menor medida también con TipN. Mientras tanto, el factor tipo-lisozima SpmX localiza a la cinasa de histidina DivJ en el polo viejo de la célula predivisiva, activando la vía de degradación de CtrA (figura 10). Cabe recalcar que PopZ es una proteína crítica para la localización diferencial de los miembros de las vías correspondientes a los distintos polos (Radhakrishnan, Pritchard, & Viollier, 2010).

Uno de los ejes del módulo de determinación de la asimetría es la cinasa de histidina híbrida bifuncional CckA. Cuando muestra actividad de cinasa, se autofosforila y transfiere su fosfato a una proteína intermediaria llamada ChpT, la cual, a su vez, pasa el fosfato a CtrA activándolo, o a CpdR, inhibiendo la degradación de CtrA. Por otro lado, cuando CckA es estimulado como fosfatasa, grupos fosfato pasan de CtrA a ChpT, y, finalmente a CckA, en donde son hidrolizados. Con este mecanismo de acción, CckA promueve la degradación de CtrA gracias a que se detiene el flujo de fosfatos hacia CpdR (Lasker et al., 2016).

El que CckA actúe como cinasa o fosfatasa depende del polo o compartimiento en el que reside y de la interacción con proteínas sensibles al compartimiento, ya sea DivK o PleD. Entonces, al iniciar el ciclo celular, CckA se encuentra deslocalizada en células flageladas. En contraparte, en células prostecadas se localiza en el polo prostecado y, subsecuentemente, se localiza o en ambos polos o sólo en el polo flagelar de la célula predivisional. La acumulación de CckA en el nuevo polo celular, mediada por la pseudocinasa DivL, promueve la actividad de cinasa en el compartimiento flagelado (Sanselicio et al., 2015).

Posteriormente, cuando DivK se encuentra fosforilado, se une a DivL, formando un complejo que puede inhibir la actividad de cinasa de CckA. En el caso en el que PleD se encuentre fosforilada, sintetiza GMP-di-cíclico (cdG), el cual puede unirse a CckA e inhibir de igual manera la actividad de cinasa de esta proteína. Los niveles de DivK~P y PleD~P se encuentran determinados por la proteína PleC, que señala la diferenciación hacia una célula flagelada, o por DivJ, que lleva a la célula a mostrar una morfología con prosteca (Lasker et al., 2016).

En células predivisionales, DivJ es activado indirectamente por KidO y fosforila a DivK y PleD, además de que eleva los niveles de cdG en el compartimiento prostecado. PleC desfosforila a DivK~P y a PleD~P, permitiendo la actividad de CckA en el compartimiento flagelado. Durante la diferenciación de célula flagelada a prostecada, DivJ reemplaza a PleC en el polo prostecado, permitiendo que aumente DivK~P y cdG, permitiendo el paso a CtrA (Radhakrishnan et al., 2010).

Para pasar de la fase S a la G2 se lleva a cabo la citocinesis. Este proceso necesita de un complejo proteico encabezado por FtsZ. La función de esta proteína es formar filamentos que dirigen la citocinesis dando forma al sitio de división por medio de una estructura denominada anillo-Z. Durante la constricción del anillo Z se cierra la membrana interna en

este sitio, formando los compartimientos en la célula predivisional, los cuales tienen una presencia asimétrica de factores que definirán el destino celular de cada compartimiento (Ardissone & Viollier, 2015).

La posición de ensamblaje del anillo Z es determinada por MipZ; esta proteína activa la actividad de GTPasa de FtsZ, impidiendo su polimerización. MipZ forma un gradiente de concentración desde los polos hacia la mitad de la célula, donde su concentración es mínima. Para lograr este gradiente, MipZ se ayuda de ParB y PopZ. ParB es una proteína de unión al centrómero y se localiza junto con la matriz multimérica PopZ. Ambas proteínas son segregadas junto con la región de origen del cromosoma hacia los polos celulares, arrastrando a MipZ y logrando el gradiente (Ardissone & Viollier, 2015).

Cuando las células se encuentran ante un estrés oxidante, se puede detener la progresión del ciclo celular. La presencia de ROS puede llevar a la síntesis por SpoT, del alarmón (p)ppGpp. Este alarmón reprime la transcripción de *dnaA*, llevando a una detención del ciclo celular en la transición G1-S. DnaA también puede ser degradado por la proteasa Lon, impidiendo la replicación del DNA en células con una alta acumulación de proteínas mal plegadas durante un estrés proteotóxico agudo (Collier, 2016). Por consiguiente, en el envejecimiento, es de gran relevancia la presencia de un estrés oxidante, así como de agregados de proteínas carboniladas, ya que se sugiere podrían detener el ciclo celular y como consecuencia disminuir la tasa reproductiva de la célula, pero no existe información sobre si hay algún mecanismo de segregación diferencial de proteínas carboniladas al momento de la división celular que explique que una célula progenitora envejezca.

Justificación

Los estudios de envejecimiento en procariontes se han centrado en un envejecimiento condicionado, limitado a la disponibilidad de nutrientes y espacio en cultivo. Recientemente, se ha sugerido la existencia de un envejecimiento generacional debido a experimentos en los que se demostró un decremento en la tasa de crecimiento y división celular de *C. crescentus* después de mantener a un grupo de células a lo largo de 100 divisiones. Sin embargo, no se conocen los mecanismos moleculares por los cuales pueda existir un envejecimiento generacional en procariontes que involucre la acumulación de daño celular intrínseco, como la formación de agregados de proteínas carboniladas observado en otros organismos unicelulares como *S. cerevisiae*. La presencia de proteínas carboniladas se debe al estrés oxidante al que están sometidas todas las células, y la acumulación de las mismas se considera un marcador de envejecimiento celular en eucariontes, este tipo de estrés también se ha descrito que tiene un efecto sobre la detención del ciclo celular. Además de esto, en *C. crescentus* existe una compleja maquinaria que regula la progresión del ciclo celular y la segregación del cromosoma y otros componentes celulares en el momento de la división celular, lo que nos lleva a pensar que puede existir algún mecanismo molecular que ayude a que exista una segregación diferencial de proteínas carboniladas, las cuales se consideran marcadores de envejecimiento celular. Es por ello que es de gran interés asociar este fenómeno en el modelo *C. crescentus* como una de las bases moleculares del envejecimiento en procariontes.

Hipótesis

La presencia de proteínas oxidadas (dañadas por carbonilación) en *C. crescentus* mostrará una dinámica espacio-temporal en la que se segregarán diferencialmente estas proteínas al momento de la división celular preferencialmente hacia la célula prostecada o progenitora, y su concentración aumentará directamente con la edad generacional.

Objetivo general

Determinar la presencia, el incremento y la posible segregación durante la división celular hacia la célula progenitora, de agregados de proteínas carboniladas en *C. crescentus* conforme aumenta su edad generacional, para asociar este fenómeno como una de las bases moleculares del envejecimiento en procariontes.

Objetivos particulares

- Determinar la presencia en condiciones óptimas y bajo estrés oxidante de proteínas carboniladas en *C. crescentus*.
- Evaluar el efecto del peróxido de hidrógeno como agente oxidante en la sobrevivencia y tasa de crecimiento de cultivos de *C. crescentus*.
- Determinar la presencia diferencial de proteínas carboniladas en células progenitoras y células hijas de *C. crescentus* mediante Western-blot.
- Detectar *in-situ* las proteínas carboniladas en células de *C. crescentus*.
- Realizar la fusión de una proteína fluorescente con DivJ como marcador de polaridad.
- Caracterizar *in-situ* la segregación de las proteínas carboniladas, durante la división celular en células de *C. crescentus*.

Materiales y métodos

Cepas bacterianas y medios de cultivo

Plásmidos y cepas utilizadas en este trabajo			
Nombre	Resistencia	Descripción	Referencia
CB15N	-	Cepa silvestre de <i>C. crescentus</i>	
TOP10	-	Cepa de <i>E. coli</i> para clonaciones	Invitrogen
pCHYC-4	Gentamicina	Plásmido integrativo para fusiones de proteínas en el extremo carboxilo terminal bajo el control del promotor nativo y fusión con la proteína fluorescente mCherry.	(Thanbichler, Iniesta, & Shapiro, 2007)
pDivJ-CHYC-4	Gentamicina	Plásmido integrativo a DivJ con una fusión de la proteína fluorescente mCherry expresados bajo el control del promotor nativo.	Este trabajo
TOP10 pDivJ-CHYC-4	Gentamicina	<i>E. coli</i> TOP 10 que contiene el plásmido pDivJ-CHYC-4	Este trabajo
JA1	Gentamicina	CB15N <i>divJ::mCherry</i>	Este trabajo
S1		CB15N <i>mipZ::YFP</i>	Laboratorio Poggio

Tabla 3. Descripción de cepas y plásmidos utilizados en este trabajo.

Escherichia coli

Se creció en medio LB (1l: 10g de bacto triptona, 5g de extracto de levadura y 10g de NaCl). Para placas de medio sólido se añadió 15g/L de bacto agar. Esta bacteria se creció a 37°C y en agitación para medios líquidos. Antibióticos utilizados: kanamicina 0.5% (10 µl/ml) y gentamicina 0.3% (5 µl/ml).

Caulobacter crescentus

Se creció en distintos medios de cultivo dependiendo del protocolo a seguir: Medio rico PYE (1l: 2g de Bactopeptona, 1g de extracto de levadura, 1ml de MgSO₄ 1M, 0.5ml de CaCl₂ 1M), para placas de medio sólido se añadió 15g/L de bacto agar. M5GG altos fosfatos (1l: 10ml de Tris-HCl pH 7 1M, 1ml de NaCl 1M, 1ml de KCl 1M, 6.25ml de NH₄Cl₂ 8%, 850µl de glutamato de sodio 212.5mM, 0.5ml de MgSO₄ 1M, 10ml de Glucosa 20%, 1ml de FeSO₄ 10mM EDTA, 0.5ml de CaCl₂ 1M, 10ml de sales M2 sin nitrógeno 100x). Sales M2 sin nitrógeno 100x (1l: 87g de Na₂HPO₄, 53g de KH₂PO₄). La bacteria se cultivó a 30°C y en agitación para medios líquidos. Antibiótico utilizado: gentamicina al 0.3% (5 µl/ml).

Sincronización de *Caulobacter crescentus*

Para separar poblaciones de células con flagelo (*swarmer*, las cuales acaban de originarse por la división celular y comienzan el ciclo celular) del resto de las células progenitoras (prostecadas y divisionales), se utilizó el procedimiento descrito por Evinger M. y Agabian N. (1977) de sincronía para un cultivo de 500 ml a una DO_{660} de 0.3. Con este método sólo se obtienen dos poblaciones celulares, las células flageladas y las predivisionales y divisionales juntas.

Para realizar la sincronía de un cultivo y separarlo en las tres poblaciones de las distintas etapas del ciclo celular de *C. crescentus* (flageladas, predivisionales o prostecadas y divisionales), se estandarizó un protocolo en este trabajo. Un cultivo de 50 ml con una DO_{660} de 0.3 en medio M5GG altos fosfatos se enfrió a 4°C y a partir de este punto todo el procedimiento se realizó en hielo o en centrifuga a 4°C.

El cultivo se concentró a 12 ml y se colocó en tubos de vidrio de 15ml previamente enfriados, se añadió 3 ml de Ludox frío (previamente ajustado a un pH neutro: 3 ml Ludox + 226.4 µl de HCl 1M, mezclado por inversión) y se mezcló por inversión. Se centrifugó a 9000 rpm por 30 minutos a 4°C. Esto resulta en la formación de 2 bandas, una en la parte superior del tubo correspondiente a células predivisionales y divisionales y otra en la parte inferior del tubo correspondiente a células flageladas.

Se recolectó con micropipeta 5.2 ml de la banda superior tratando de recuperar la mayor cantidad de células posible y se colocaron en un nuevo tubo de vidrio frío. Se añadieron 400 µl de sales de medio M2 frías; se centrifugó 10 minutos a 9000 rpm a 4°C. Se obtuvieron dos bandas nuevas: superior e inferior (divisionales y predivisionales respectivamente) las cuales se recolectaron en tubos de vidrio fríos distintos y rotulados (figura 11).

Las células se lavaron 3 veces con 10 ml de sales M2 1x frías, centrifugando 5 minutos a 9000 rpm a 4°C y aspirando el sobrenadante con vacío para evitar perder células. Se colocó una alícuota de cada población celular recuperada en camas de agarosa y se observaron al microscopio Nikon Eclipse E600 con un aumento de 1000x.

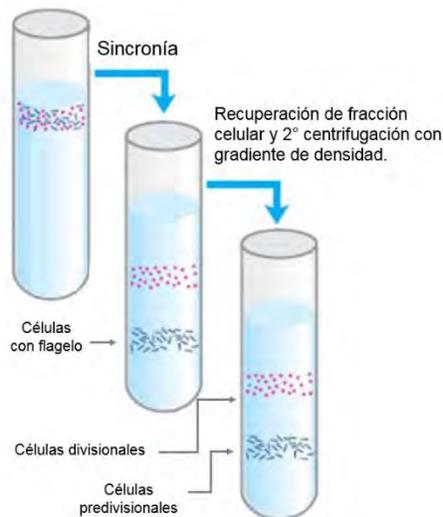


Figura 11. Sincronización de tres poblaciones celulares. Centrifugación con gradiente de densidad por Ludox. Después de la primera centrifugación, de la banda formada en la parte superior se recolectan en otro tubo para volver a centrifugar y separar las células divisionales de las predivisionales. Las células con flagelo de la primera centrifugación se recuperaron y se lavaron para retirar el exceso de Ludox.

Para realizar sincronías de mayor volumen para separar las tres poblaciones celulares, se siguió el mismo procedimiento ajustando los volúmenes de los cultivos, soluciones y cantidad de células recolectadas. Para un cultivo de 120 ml con una DO_{660} de 0.3 se concentró a 30 ml, se utilizaron 7.5 ml de Ludox (con pH neutro ajustado previamente: 7.5 ml de ludox + 566 μ l de HCl 1M); y se recolectaron 13 ml de la banda superior que contenía células divisionales y predivisionales añadiéndoles 1ml de sales M2 1x para separarlas por gradiente de densidad en centrifugación. Después de los lavados para retirar el Ludox, los paquetes celulares se inocularon en medio fresco M5GG altos fosfatos previamente calentado a 30°C.

Para ajustar los volúmenes se utilizaron las siguientes proporciones: concentrar el cultivo a $\frac{1}{4}$ del total; la cantidad de Ludox con pH neutro que se añadió fue $\frac{1}{4}$ de la cantidad total del volumen del cultivo concentrado; para ajustar el pH del Ludox a neutralidad se añadió una parte de HCl 1M por cada 13 partes de la cantidad de Ludox usado; para centrifugar y separar células divisionales y predivisionales se añadió una parte de sales M2 1x fría por cada 13 partes de volumen recolectado de células de la banda de divisionales y predivisionales.

Pruebas de tratamientos oxidantes en *C. crescentus*

Para detectar la presencia de proteínas intracelulares modificadas por oxidación, se sometió a *Caulobacter crescentus* CB15N a condiciones oxidantes, entre ellas, peróxido de hidrógeno y privación de glucosa. Se utilizaron cuatro cultivos de 3ml en tubos de vidrio con medio M5GG altos fosfatos; al momento de darles el tratamiento los cultivos se encontraban a una DO_{660} de 0.3. Al primer y segundo cultivo se les adicionó peróxido de hidrógeno a una concentración final de 0.4mM y 0.1mM respectivamente; se incubaron durante 30 minutos en agitación a 30°C.

Se decantó la mitad del cultivo a un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml, se centrifugó un minuto y se desechó el exceso de medio, se vació en el mismo tubo el resto del cultivo, se centrifugó y se desechó el exceso de medio. Posteriormente, se lavaron las células para remover el peróxido de hidrógeno 2 veces con medio M5GG altos fosfatos estéril. Por último, se centrifugó 2 minutos a 13000 rpm, se decantó el exceso de medio y los paquetes celulares se congelaron a -70°C.

Al tercer cultivo se le dio un tratamiento de privación de glucosa, para ello, se centrifugó 5 minutos a 13000 rpm, se descartó el sobrenadante y el paquete se resuspendió en 3ml de medio M5GG altos fosfatos sin glucosa previamente preparado. Se incubó a 30°C en agitación durante 4 horas. Se traspasó a un tubo de microcentrifuga y se centrifugó 5 minutos a 13000 rpm, se decantó el exceso de medio y el paquete celular se almacenó a -70°C.

El cuarto cultivo se utilizó como control negativo a los tratamientos oxidantes, por lo que solamente se encontró en medio M5GG altos fosfatos, después de que alcanzó la densidad óptica deseada se centrifugó y almacenó al igual que los otros cultivos en un tubo de microcentrifuga (las muestras se congelaron por una noche). Se realizó un extracto de proteínas a cada una de las muestras y se utilizó el kit de detección de oxidación de proteínas OxyBlot™ (Millipore™).

Detección de oxidación en proteínas con el kit Oxyblot™ (Millipore™)

Extracción y cuantificación de proteínas. Las muestras se colocaron en hielo y se les añadieron 100 µl de buffer de resuspensión (Tris pH 8 10Mm y EDTA 5mM). Se resuspendieron las células con ayuda de la micropipeta.

La lisis se llevó a cabo con 4 pulsos de sonicación de 10 segundos cada uno, el tubo con la muestra se colocó en hielo entre cada pulso. La concentración de proteína se cuantificó por el método de Bradford (Protein Assay, Bio-Rad™), utilizando albúmina sérica bovina (Bio-Rad™) como estándar para hacer la curva patrón. Las muestras se llevaron a una concentración de 4 µg/µl, adicionando buffer de resuspensión o concentrando en vacío para diluir o concentrar la muestra respectivamente. La detección de la oxidación de proteínas se llevó a cabo el mismo día en que se realizaron los extractos, de acuerdo a (Luo & Wehr, 2009) utilizando el kit OxyBlot™ (Millipore™).

Reacción de derivatización de los extractos de proteína. Para detectar los grupos carbonilos de las proteínas modificadas por oxidación, éstos se derivatizaron a 2,4-dinitrofenilhidrazona (DNP-hidrazona) por medio de la reacción con 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH). Por cada muestra se usaron dos tubos de microcentrifuga nuevos, en ellos se colocaron 4 µl del extracto de proteína en cada tubo (16 µg de proteína total por tubo), se le adicionó 6 µl de SDS al 10% (concentración final de SDS 6%) y se mezcló por pipeteo. Uno de los tubos se sometió a la reacción de derivatización, añadiéndole 10 µl de la solución 1x DNPH (OxyBlot, Millipore™) y se mezcló suavemente por pipeteo.

La segunda muestra fue usada como control negativo para la reacción, se le añadieron 10 µl de la solución 1x control-derivatización (OxyBlot, Millipore™). Ambos tubos se incubaron a temperatura ambiente por 20 minutos. Pasado este tiempo, se detuvo la reacción añadiendo 7.5 µl de la solución neutralizadora (OxyBlot, Millipore™) y se mezcló con ayuda de una micropipeta. Una vez neutralizada la reacción, las muestras estuvieron listas para electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS.

Electroforesis y western-blot. Para analizar la presencia y expresión de las proteínas de interés, se cargó el total de la muestra obtenida en la reacción de derivatización y su respectivo control negativo en un gel de SDS-poliacrilamida al 12% (gel al 12%: 2ml de acrilamida bisacrilamida, 1.875ml de Tris 1M pH 8.8, 50 µl de SDS al 10%, 40 µl de persulfato de amonio al 10%, 1ml de H₂O, 3 µl de solución TEMED. Se utilizó el gel

concentrador al 4%). No se usó buffer de carga, las muestras ya eran lo suficientemente densas después de la reacción de derivatización. La electroforesis se realizó a 25mA con buffer de glicina (1l: 14.4g de Glicina, 3g de Tris base, 10ml de SDS al 10%).

Después de la electroforesis, el gel se colocó en un recipiente en el que quedara completamente cubierto con 10ml de buffer de glicina nuevo y se le añadieron 90 µl de β-mercaptoetanol, se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente con agitación constante. Posteriormente, se realizó la electrotransferencia a una membrana de nitrocelulosa (buffer de transferencia 1l: 0.32g de carbonato de sodio, 0.84g de bicarbonato de sodio, 200ml de metanol y se aforó a 1l con agua fría) a 250mA durante 1 hora. La membrana se bloqueó con leche sin grasa al 1% disuelta en TBS-Tween (1L: 100ml de TBS 10x, 1ml de Tween20) a 4°C toda la noche con agitación constante.

Al día siguiente, se sometió la membrana a 4 lavados de 10 minutos cada uno con TBS-Tween. La membrana se incubó 1 hora con el anticuerpo primario (conejo anti-DNP diluido 1:150, OxyBlot, Millipore™) en agitación constante. Después se realizaron 4 lavados de 10 minutos con TBS-Tween. Al terminar se prosiguió a incubar la membrana con el anticuerpo secundario (cabra anti-conejo IgG (HRP-conjugado) diluido 1:300, OxyBlot, Millipore™) durante 1 hora en agitación constante, terminada la incubación se realizaron otros 4 lavados con TBS-T. Las bandas se detectaron por quimioluminiscencia con SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific™), con exposiciones de 1 y 3 segundos. Las densitometrías se realizaron con ayuda del *software* ImageJ.

Control del tratamiento con peróxido de hidrógeno en la sobrevivencia y tasa de crecimiento poblacional de *C. crescentus*

Para analizar el efecto del peróxido de hidrógeno en la sobrevivencia de la bacteria, se prepararon cultivos de 3ml de *C. crescentus* CB15N con una DO₆₆₀ de 0.3 en medio M5GG altos fosfatos, se añadió peróxido de hidrógeno (*stock* al 30%) a concentraciones finales de 4, 1, 0.5, 0.2, 0.1, 0.05mM y 0 como control. Se incubaron a 30°C en agitación constante durante 1 hora y posteriormente se realizó un lavado con medio fresco M5GG altos fosfatos para retirar el peróxido de hidrógeno. Las células se resuspendieron en 3ml de medio fresco.

En tubos de vidrio se realizaron diluciones de los cultivos con valores de 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} ; colocando 990 μ l de medio fresco en el primer tubo y 900 μ l de medio fresco en otros 4 tubos de vidrio. Se añadieron 10 μ l del cultivo celular al primer tubo y se agitó con *vortex*, se tomaron 100 μ l de este tubo y se colocaron en el segundo tubo con medio fresco, se agitó con *vortex*. Esto se repitió en los tubos restantes para completar las diluciones deseadas. Inmediatamente en cajas con medio sólido PYE se colocaron gotas de 10 μ l de cada dilución. Se incubaron durante 36 horas a 30°C. Se observaron las UFC (unidades formadoras de colonias) en las distintas concentraciones de peróxido de hidrógeno.

Para analizar los niveles de proteínas carboniladas en extractos de proteínas de células tratadas con peróxido de hidrógeno se utilizaron cultivos de 10ml de *C. crescentus* CB15N con una DO_{660} de 0.3 en medio M5GG altos fosfatos, se les añadió peróxido de hidrógeno a concentraciones finales de 0.1, 0.05mM y 0 como control. Se incubaron a 30°C en agitación constante durante 1 hora y posteriormente se realizó un lavado con medio fresco M5GG altos fosfatos para retirar el peróxido de hidrógeno. Los cultivos se centrifugaron 5 minutos a 9000rpm y se desechó el sobrenadante.

Las células se traspasaron a tubos de microcentrifuga y se centrifugaron de nuevo para retirar el exceso de sobrenadante. Las células se resuspendieron en 100 μ l de buffer para extracto de proteínas y se prosiguió con el protocolo de detección de oxidación de proteínas con el Kit OxyBlot™ (Millipore™) previamente descrito.

Para analizar el efecto del peróxido de hidrógeno en la tasa de crecimiento de células de la cepa CB15N, se utilizaron cultivos en medio M5GG altos fosfatos. Se inocularon 50 ml de medio con un cultivo saturado de CB15N y se incubó a 30°C en agitación constante. Cada 2 horas se tomó una alícuota de 1ml y se midió su DO_{660} hasta fase estacionaria. A las 10h, cuando el cultivo se encontró en fase de crecimiento exponencial, el cultivo se separó en dos partes iguales, una se utilizó como control de crecimiento y al resto del cultivo se le agregó peróxido de hidrógeno a una concentración final de 0.05mM durante 1 hora a 30°C en agitación.

Terminado el tratamiento con el peróxido de hidrógeno, ambos cultivos se centrifugaron y se les retiró el medio, posteriormente se les añadió la misma cantidad de medio fresco (previamente calentado a 30°C) que se les retiró y continuaron incubándose en agitación constante a 30°C. El efecto del peróxido de hidrógeno en la tasa de crecimiento se analizó espectrofotométricamente con los datos de las densidades ópticas a 660nm.

Para analizar el efecto del peróxido de hidrógeno sobre la tasa de crecimiento y sobrevivencia de las tres distintas poblaciones celulares de *C. crescentus* (flageladas, predivisionales y divisionales en la cepa CB15N) y determinar si en cierta etapa del ciclo celular la bacteria es más susceptible a muerte inducida por el tratamiento de estrés oxidante con peróxido de hidrógeno, se utilizaron dos cultivos de 50 ml a una DO_{660} de 0.3. Un cultivo se utilizó como control al tratamiento y al otro se le añadió peróxido de hidrógeno a una concentración final de 0.05 mM y se incubó durante 1 hora a 30°C en agitación constante.

Una vez terminado el tratamiento, se realizó una sincronía tanto del cultivo control como al que se le aplicó el tratamiento, para separar las tres poblaciones celulares de *C. crescentus* con el protocolo descrito previamente. Se recuperaron las poblaciones en las tres etapas distintas del ciclo celular de ambos cultivos y se resuspendieron en 10ml de medio fresco M5GG altos fosfato previamente calentado a 30°C y se ajustó inmediatamente a una DO_{660} de 0.05 y se añadió medio fresco de ser necesario.

Para analizar la sobrevivencia, se tomó una alícuota de cada cultivo y se realizaron diluciones con valores de 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} como se describió previamente. En cajas de medio sólido PYE se colocaron gotas de 10 μ l de cada dilución. Se incubaron durante 36 horas a 30°C y se observaron las UFC en las distintas concentraciones de peróxido de hidrógeno. Para analizar la tasa de crecimiento los cultivos con la DO de 0.05 continuaron incubándose a 30°C en agitación constante, cada dos horas se tomó una alícuota de cada cultivo y se midió el cambio en su DO, durante un periodo de 10 horas. El efecto del peróxido de hidrógeno en la tasa de crecimiento se analizó con los datos de las densidades ópticas.

Detección de proteínas carboniladas en células de *C. crescentus* con distinta edad generacional por Western-blot

Para determinar si existen diferencias en la cantidad de proteínas carboniladas en células progenitoras (prostecadas) y en células hijas de *C. crescentus*, se sincronizaron los cultivos y se tomaron alícuotas de los diferentes tipos celulares. Se utilizó medio líquido M5GG altos fosfatos a 30°C en agitación constante. Los ensayos se realizaron con cepa silvestre CB15N de *C. crescentus*.

Se trabajó con los cultivos a una DO_{660} de 0.3. Una vez recuperadas las células sincronizadas, inmediatamente se congelaron a -70°C . Al día siguiente se realizaron extractos de proteína totales y se detectaron las proteínas carboniladas mediante el Kit de oxidación de OxyBlot™ (Millipore™) descrito anteriormente. Las distintas variantes que se realizaron fueron las siguientes:

A) CÉLULAS PROGENITORAS CON UNA DIVISIÓN CELULAR. Se sincronizó un cultivo de 100 ml. Se recuperaron únicamente las células con flagelo (células recién nacidas *swarmers*, sin ninguna división celular). Estas células se reinocularon en medio fresco precalentado a 30°C , a una densidad óptica aproximada de 0.3. Se incubaron aproximadamente 90 minutos a 30°C en agitación constante. Se observaron alícuotas al microscopio. Al observar que la mayoría de las células se dividieron, se colocó el cultivo en hielo.

Se realizó una sincronía y se recuperaron en tubos de microcentrifuga distintos las células *swarmer* y las células progenitoras (prostecadas y divisionales), las cuales presentaban una edad reproductiva de una división celular o una generación. Se centrifugó y se retiró todo el sobrenadante. Los tubos con el paquete celular se colocaron en hielo seco y se congelaron a -70°C durante la noche. Al día siguiente se realizaron los extractos de proteína total y se detectaron las proteínas carboniladas con el Kit de oxidación de OxyBlot™ (Millipore™), como se describió anteriormente. En este apartado se tuvieron un total de dos muestras celulares.

B) CÉLULAS PROGENITORAS CON DOS DIVISIONES CELULARES. Se utilizó un cultivo inicial de 500 ml para realizar una sincronía y se recuperaron las células *swarmer*, que se reinocularon en 100 ml de medio fresco pre calentado y se incubaron 90 minutos aproximadamente a 30°C en agitación constante. Se observaron alícuotas al microscopio y cuando se vio que la mayoría de las células se dividieron, se colocó el cultivo en hielo. Se realizó una nueva sincronía a este cultivo. Las células *swarmer* obtenidas de esta sincronía se almacenaron a -70°C .

Las células prostecadas se reinocularon en medio fresco a una DO_{660} aproximada de 0.3 y se incubaron aproximadamente 60 minutos. Cuando se observó que la mayoría de las células se dividieron, se colocó el cultivo en hielo. Se realizó inmediatamente una sincronía a este cultivo recuperando las dos poblaciones

celulares. Las células motiles se almacenaron a -70°C . Las células prostecadas presentaron en este punto una edad reproductiva de dos divisiones o dos generaciones, se almacenaron también a -70°C . En este apartado se tuvieron un total de tres muestras celulares.

- C) CÉLULAS PROGENITORAS CON UNA Y CON DOS DIVISIONES CELULARES. A un cultivo de 500 ml se le realizó una sincronía. Se recuperaron las células motiles, las cuales se re inocularon en 100 ml de medio fresco precalentado y se incubaron 90 minutos aproximadamente a 30°C en agitación constante. Se observaron alícuotas al microscopio y cuando se observó que la mayoría de las células se dividieron, se colocó el cultivo en hielo. Se realizó una sincronía a este cultivo. Las células motiles obtenidas de esta sincronía se almacenaron a -70°C .

Las células prostecadas que en este momento presentaban una edad reproductiva de 1 división celular se separaron en dos alícuotas equivalentes. Una alícuota se centrifugó, se retiró todo el sobrenadante y se almacenó a -70°C . La segunda alícuota de células prostecadas se reinocularon en medio fresco a una DO_{660} aproximada de 0.3 y se incubaron por 60 minutos. Se le realizó una sincronía a este cultivo recuperando las dos poblaciones celulares. Las células motiles se almacenaron a -70°C . Las células prostecadas se almacenaron de igual manera a -70°C .

En este punto, estas células habían dado origen a dos generaciones de células hijas, por lo que presentaron una edad reproductiva de dos divisiones. En este apartado se tuvieron un total de cuatro muestras celulares.

- D) CÉLULAS PROGENITORAS CON UNA Y CON MÁS DE UNA DIVISIONES CELULARES. Se utilizó un cultivo de 240 ml al que se le realizó un tratamiento con peróxido de hidrógeno durante 1 hora a una concentración de 0.05mM. Posteriormente se realizó una sincronía para separar las tres distintas poblaciones celulares. Las células divisionales se desecharon. Se recuperaron las células predivisionales y se congelaron a -70°C . En este caso, como no se realizó una sincronía previa al tratamiento, la población de células predivisionales estaba compuesta por células de distintas edades, la mitad de la población debe tener una

división celular de edad, un cuarto dos divisiones celulares, un octavo de la población tres divisiones celulares y así sucesivamente.

También se recuperaron las células *swarmer*, las cuales se separaron en dos alícuotas equivalentes. Una alícuota se centrifugó, se retiró todo el sobrenadante y se almacenaron las células a -70°C . La segunda alícuota de células *swarmer* se reinoculó en medio fresco a una DO_{660} aproximada de 0.3 y se incubaron por 90 minutos. Se le realizó una sincronía para separar tres poblaciones celulares. Se almacenaron las células *swarmer* y las células prostecadas o progenitoras a -70°C por separado.

Las células prostecadas presentaban en este momento una edad reproductiva de 1 división celular. Las células en estado divisional se desecharon. En este apartado se obtuvieron un total de cuatro muestras celulares.

E) SEGREGACIÓN DE PROTEÍNAS CARBONILADAS PRODUCIDAS POR EXPOSICIÓN A PERÓXIDO DE HIDRÓGENO. Un cultivo de 500 ml fue tratado con peróxido de hidrógeno 0.05 mM durante 1 hora y sincronizado inmediatamente después para separar tres poblaciones celulares con el protocolo descrito.

Los tres tipos celulares se inocularon en matraces distintos con 100 ml de medio fresco precalentado a 30°C a una DO_{660} aproximada de 0.3, a 30°C en agitación constante. Se siguió el progreso del ciclo celular de las distintas poblaciones y cuando la mayoría de las células se dividieron (140 minutos para las células motiles, 110 minutos para las predivisionales, y 90 minutos para las divisionales) se pasó el cultivo a 4°C . Se realizó una sincronía para separar las tres poblaciones celulares de cada matraz una vez que se colocaba en el hielo. De esta sincronía se recuperaron las nuevas células *swarmer* y las nuevas células predivisionales de cada cultivo, las células divisionales se desecharon en cada caso. Las células recuperadas se almacenaron a -70°C .

En este apartado se tuvieron un total de seis muestras y las proteínas carboniladas se detectaron con el Kit OxyBlot™ (Millipore™). Se realizó un gel de electroforesis por duplicado. Un gel se utilizó para realizar la detección de proteínas carboniladas y al segundo gel se le tiñó con azul de Coomassie para corroborar que la cantidad de proteína cargada en cada carril era la misma en cada muestra. Esto se utilizó

como control adicional a la cuantificación de proteínas por el método de Bradford requerido en el procedimiento descrito anteriormente.

Estandarización de un protocolo para la detección *in-situ* de proteínas carboniladas en *C. crescentus*

El protocolo para la detección *in-situ* de proteínas carboniladas en *C. crescentus* se adaptó a partir de la técnica de fluorescencia por hibridación *in situ* (FISH) en *C. crescentus* (Montero Llopis et al., 2010) y una técnica de inmunofluorescencia para proteínas carboniladas en *Saccharomyces cerevisiae* (Aguilaniu et al., 2003).

Fijación de células. Para fijar las células, se utilizaron 3 ml de cultivo a una DO_{660} de 0.3 de CB15N en medio M5GG altos fosfatos por cada protocolo a seguir. Se concentraron los 3 ml en un tubo de microcentrifuga y se dio un lavado con sales M2 1x, se centrifugó y se descartó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 100 μ l de sales M2 1x. Se fijaron las células con una solución fresca de formaldehído (formaldehído 30%: 0.3g de paraformaldehído + 800 μ l de H_2O + 2.5 μ l NaOH 1M + 33 μ l $NaPO_4$ 1M pH 7.3) a una concentración final de 4% añadiendo 13.5 μ l de formaldehído al 30%. Se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se dieron 3 lavados con sales M2 1x. Las células ya fijadas se resuspendieron en 100 μ l de sales M2 1x. Se colocaron las células en hielo o se almacenaron a 4°C.

Se agregaron 32 μ l de lisozima (10mg/ml) a 100 μ l de células en suspensión y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó 1-2 minutos a 6000 rpm y se desechó el sobrenadante. Se resuspendió en 10 μ l de sales M2 1x. A partir de este punto se continuó inmediatamente con alguno de los protocolos siguientes:

TRATAMIENTO CON METANOL Y ACETONA. Se añadieron 500 μ l de metanol frío (-20°C), se resuspendieron células con micropipeta suavemente y se colocó 10 minutos a -20°C. Se centrifugó 1 minuto en frío a 9000 rpm y se retiró el metanol con micropipeta evitando perder células. Se añadieron 500 μ l de acetona fría (-20°C) y se colocó 30 segundos a -20°C. Se centrifugó en frío 1 minuto a 9000 rpm y se retiró el sobrenadante con micropipeta rápidamente evitando perder células. Se resuspendió en 10 μ l de sales M2 1x.

Protocolo en portaobjetos con poli-L-lisina

Una muestra de células fijadas se trató con metanol y acetona y otra se utilizó como control sin el tratamiento de metanol acetona o lisozima. Ambas muestras se trataron como se describe a continuación.

Se centrifugó en frío 1 minuto a 9000 rpm y se retiró el sobrenadante con micropipeta rápidamente, evitando perder células. Se resuspendió en 10 µl de sales M2 1x. Se tomaron 4 µl de las células y se traspasaron a un tubo de microcentrífuga nuevo, se añadieron 6 µl de H₂O y 10 µl de la solución derivatizadora con DNPH del Kit OxyBlot™ (Millipore™). Se mezcló por pipeteo suave y se incubó 20 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 7.5 µl de la solución neutralizadora del Kit OxyBlot™ (Millipore™) y se mezcló con micropipeta.

Posteriormente se centrifugó 1 minuto a 13000 rpm y se desechó el sobrenadante con ayuda de una micropipeta. Las células se resuspendieron en 10 µl de sales M2 1x. Se colocó una alícuota en un portaobjetos con poli-L-lisina y se incubó durante 15 minutos en una caja húmeda. Transcurrido el tiempo de incubación se retiró el líquido del portaobjetos con una micropipeta y se agregaron gotas de buffer de bloqueo (leche sin grasa al 1% disuelta en TBS-Tween). Se incubó 30 minutos en la caja húmeda. Finalmente se realizó un lavado con TBS-T.

El portaobjetos se incubó 1 hora con el anticuerpo primario (conejo anti-DNP diluido 1:150, OxyBlot, Millipore™) en la caja húmeda. Después se realizaron 4 lavados de 10 minutos con TBS-Tween. Al terminar se prosiguió a incubar el portaobjetos con el anticuerpo secundario unido a un fluoróforo (cabra anti-conejo IgG (Alexa Fluor 488), Invitrogen™) diluido 1:200) durante 1 hora en la caja húmeda, terminada la incubación se realizaron 4 lavados con TBS-Tween. Se colocó un cubreobjetos y se selló con esmalte. Se observó al microscopio y se tomaron micrografías para evaluar la presencia de fluorescencia utilizando un microscopio con epifluorescencia.

Protocolo de células en suspensión

A) DERIVATIZACIÓN. De las células fijadas y tratadas con lisozima se tomaron 5 µl y se traspasaron a un tubo de microcentrífuga nuevo para realizar la reacción de derivatización. En otro tubo nuevo se colocaron otros 5 µl de células para utilizarlas como control de la reacción de derivatización. Al primer tubo se le añadieron 5 µl de H₂O y 10 µl de la solución derivatizadora con DNPH del Kit OxyBlot™ (Millipore™). Al tubo control se le añadieron 5

µl de H₂O y 10 µl de la solución Control del Kit OxyBlot™ (Millipore™). Se mezcló por pipeteo suave, ambos tubos se incubaron 20 minutos a temperatura ambiente. A partir de este punto se trató por igual a cada tubo. Se añadieron 7.5 µl de la solución neutralizadora Kit OxyBlot™ (Millipore™) y se mezcló con micropipeta. Se centrifugó 1 minuto a 13000 rpm y se desechó el sobrenadante con ayuda de una micropipeta. Las células se resuspendieron en 10 µl de sales M2 1x y se les trató con metanol y acetona.

C) INMUNOFLUORESCENCIA. Se centrifugó 1 minuto y se retiró el sobrenadante con micropipeta. Posteriormente se añadieron 50 µl de la solución del anticuerpo primario (conejo anti-DNP diluido 1:150, OxyBlot, Millipore™) y se incubó 1 hora a temperatura ambiente. Después se realizaron 4 lavados incubando 10 minutos con TBS-Tween en cada uno, con cuidado de no perder células en cada centrifugación. Al terminar, se resuspendieron las células en 50 µl de la solución con el anticuerpo secundario (cabra anti-conejo IgG (Alexa Fluor 488), Invitrogen™) diluido 1:200) y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Terminada la incubación se realizaron otros 4 lavados con TBS-Tween. Al final se resuspendieron las células en 10 µl de TBS-Tween. En camas de agarosa en portaobjetos (sales M2 1x + agarosa al 1.5% final) se colocaron alícuotas de las células. Se colocó un cubreobjetos y se observó al microscopio con el objetivo de 100x. Se tomaron micrografías de campo claro y de fluorescencia para evaluar la presencia de proteínas marcadas.

Para determinar si el protocolo de células en suspensión emite una señal fuerte y específica, se probó alterar el orden de los pasos de este protocolo como se indica en la tabla 4.

PROTOCOLO DE CÉLULAS EN SUSPENSIÓN		
Variante 1	Variante 2	Variante 3
1. Derivatización y muestra Control de derivatización	1. Tratamiento con metanol y acetona	1. Tratamiento con metanol y acetona
2. Tratamiento con metanol y acetona	2. Derivatización y muestra Control de derivatización	-
3. Inmunofluorescencia	3. Inmunofluorescencia	2. Inmunofluorescencia

Tabla 4. Estandarización del protocolo para detección in-situ de proteínas carboniladas en células en suspensión. Esto se realizó con células CB15N fijadas y tratadas con lisozima como se describió anteriormente.

Análisis *in-situ* de proteínas carboniladas en células de *C. crescentus*

Para analizar la cantidad de proteínas carboniladas *in situ* en células de la cepa CB15N, se realizó el protocolo para la detección *in situ* de proteínas carboniladas de células en suspensión descrito anteriormente (variante 1 que se observa en la tabla 4). De las micrografías tomadas se escogieron al azar 102 células en fase divisional. Con ayuda del *software* ImageJ, se midió la fluorescencia tanto del compartimiento del polo prostecado como del compartimiento del polo con flagelo de cada célula, delimitando manualmente el perímetro de cada compartimiento celular. La medida arrojada por el *software* fue la suma de los valores de fluorescencia de todos los píxeles de la selección dividida entre el número total de píxeles seleccionados.

Para identificar el compartimiento prostecado se utilizó un criterio referente al tamaño, en el que el compartimiento más grande se determinó como el prostecado y el más pequeño como el compartimiento correspondiente a la parte con flagelo de la célula. Se compararon estos datos dividiendo el valor arrojado para el compartimiento del flagelo entre el valor de fluorescencia del compartimiento prostecado de cada célula para analizar en qué compartimiento celular se encuentra una mayor concentración de proteínas carboniladas.

Para evaluar la posible presencia de una segregación diferencial de proteínas carboniladas durante la división celular, se utilizó la cepa JA1 (CB15N:: DivJmCherry) de *C. crescentus* obtenida en este trabajo. Se utilizó un cultivo de la cepa JA1 de 50 ml con una DO_{660} de 0.3 en medio M5GG altos fosfatos. Se dio un tratamiento con peróxido de hidrógeno 0.05 mM durante 1 hora. Posteriormente se realizó una sincronía y se recuperaron en medio fresco únicamente las células motiles y se ajustaron a una DO_{660} de 0.3. Se tomó una alícuota de 3 ml cada 30 minutos durante 2 horas e inmediatamente después de tomar cada alícuota se fijaron las células con formaldehído como se describió anteriormente.

Una vez que todas las alícuotas se fijaron, se prosiguió a darles el tratamiento con lisozima y se les realizó el protocolo para la detección *in-situ* de proteínas carboniladas de células en suspensión descrito anteriormente (variante 1). Se tomaron micrografías de contraste de fase y de fluorescencia para detectar las proteínas carboniladas y la proteína fluorescente fusionada a DivJ. Las micrografías de las células divisionales (alícuota de 120 minutos) se analizaron con el *software* MatLab. Se tomaron en cuenta 118 células

divisionales. La superficie de las células fue reconocida por un algoritmo del *software* y a cada célula se le asignó una polaridad ayudándose de la proteína DivJ::mCherry reclutada al polo prostecado. Se cuantificó la señal de las proteínas carboniladas a lo largo de la célula comenzando desde el polo prostecado hasta el polo con flagelo. La fluorescencia fue normalizada al área de la selección por el mismo *software*.

Construcción de la cepa JA1 (CB15N *Divj::Mcherry*) como marcador de polaridad celular

Para construir una cepa con un marcador de polaridad, se realizó una fusión de la proteína fluorescente mCherry al extremo carboxilo terminal de la proteína DivJ bajo el control de su promotor nativo, ya que esta proteína se recluta al polo prostecado antes de la división celular. Para ello se utilizaron los oligonucleótidos siguientes:

DivJ F1 *HindIII* CAAAAGCTTCGAGGCGGTTTCAGGCGGGCGATGC

DivJ R1 *SacI* CAAGAGCTCGGCGCGGCGCAAAGGCGATGACG

Con estos oligonucleótidos se amplificó un fragmento de 571pb del extremo 3' terminal del gen que codifica para DivJ mediante PCR. Se corrió un gel de agarosa para verificar que el fragmento coincidía con el tamaño esperado y se purificó este fragmento de DNA a partir del gel de agarosa con el kit QIAquick *gel extraction*. Posteriormente, este fragmento de DNA se digirió con las enzimas de restricción *HindIII* y *SacI* (50ng de DNA, 0.7 µl de *HindIII*, 0.7 µl de *SacI*, 2 µl de buffer 2 BioRad, 11 µl de H₂O; por 2 horas a 37°C e inactivación de 10 minutos a 75°C).

De igual manera, se digirió el plásmido pCHYC-4 (Thanbichler, Iniesta, & Shapiro, 2007) con las mismas enzimas de restricción (200ng de plásmido, 0.7 µl de *HindIII*, 0.7 µl de *SacI*, 2 µl de buffer 2 BioRad, 16 µl de H₂O; por 2 horas a 37°C e inactivación de 10 minutos a 75°C). Este plásmido se replica en *E. coli* pero en *C. crescentus* se integra al cromosoma mediante la región de *id* clonada, permitiendo la fusión del gen de interés con el gen codificante para la proteína fluorescente m-Cherry y permite la selección de colonias mediante resistencia a gentamicina.

El fragmento y el plásmido fueron ligados para dar origen a la construcción pDivJ-CHYC-4 (7 µl de DNA amplificado y digerido, 1 µl de plásmido digerido, 1.5 µl de ATP, 0.8 µl de enzima T4 DNA ligasa; por 3 horas a temperatura ambiente e inactivación de 10 minutos a 75°C). Esta construcción se introdujo en células competentes de *E. coli* TOP10 mediante electroporación. Para determinar cuál de las transformantes contenía la construcción esperada, se realizaron parches en cajas con medio sólido selectivo de las colonias que crecieron y a su vez se colocaron cultivos en medio líquido de estas colonias.

De los cultivos se purificaron los plásmidos mediante el método de minipreparaciones hervidas y se digirieron con las enzimas de restricción *Hind*III y *Sac*I. Para confirmar la presencia del inserto de interés en el plásmido, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%. Finalmente se seleccionó la colonia que contenía el fragmento de DNA del tamaño esperado. Esta cepa (*E. coli* TOP10 pDivJ-CHYC-4) se almacenó a -70°C.

De esta cepa se purificó el plásmido pDivJ-CHYC-4 mediante el protocolo del Kit QIAprep Spin Miniprep, QIAGEN. Este plásmido se electroporó en la cepa CB15N. De las colonias resultantes se realizaron parches en cajas de medio sólido selectivo y se observaron cultivos de estas colonias con microscopía de fluorescencia para determinar si la transformación fue exitosa. La colonia positiva dio origen a la cepa JA1 (CB15N::DivJmCherry) y se almacenó a -70°C.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para amplificar fragmentos de DNA del gen *divJ*, se llevó a cabo la reacción con 16µl de H₂O, 25µl de buffer 2x, 5µl de dNTPs 2mM, 1.5 µl de cada oligonucleótido, 1 µl de DNA cromosomal CB15N 100ng/µl, 0.3 µl de DNA Pol PRIME STAR (Takara). En el termociclador se utilizó el siguiente programa: 95°C por 2 min, 30 ciclos consistentes de desnaturalización (95°C por 30s), pegado (58°C por 15s) y extensión (72°C por 60s); y una extensión final (72°C por 10min).

Purificación de DNA a partir de geles de agarosa (*Qiaquick Gel Extraction Kit*). Para purificar los fragmentos amplificados en el PCR, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%/TAE para separar los fragmentos deseados de DNA de las muestras. El gel se tiñó con bromuro de etidio y con ayuda de una lámpara de luz UV de longitud de onda larga se cortaron las bandas deseadas de DNA, estas se recolectaron en un tubo de microcentrifuga nuevo. Se añadieron 500 µl del Buffer de captura y se incubó a 60°C durante 15 minutos, mezclando por inversión. Se prosiguió de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Se cuantificó la concentración de DNA por absorbancia y se realizó una electroforesis en gel de una alícuota para comprobar el tamaño del fragmento de DNA recuperado. El tubo de microcentrífuga con la muestra se almacenó a -20°C.

Purificación de plásmidos (Kit QIAprep Spin Miniprep, QIAGEN). Se utilizó un cultivo en fase estacionaria (*overnight*) de 10ml, se centrifugó 5 minutos a 4000 rpm, se decantó el sobrenadante. Al paquete celular se le añadieron 750 µl de buffer P1 y 30 µl de RNAsa 10mg/ml, se mezcló en *vortex* y se distribuyó uniformemente a tres tubos de microcentrífuga de 1.5ml (260 µl cada uno). A partir de este punto se prosiguió de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

El DNA obtenido se cuantificó por absorbancia y se almacenó a -20°C. Con una alícuota de 2 µL se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% para observar el fragmento purificado.

Purificación de plásmidos con mini preparaciones hervidas. De un cultivo en fase estacionaria (*overnight*) de 3ml en medio selectivo se decantó la mitad a un tubo de microcentrífuga de 1.5ml. Se centrifugó 1 minuto a 13000 rpm, se decantó el sobrenadante. Se añadieron 300 µl de solución STET (8% de sacarosa, 50mM de EDTA pH 8, tritón al 5%, 50mM de Tris-HCl pH 8) y 30 µl de lisozima 10mg/ml (se puede agregar 3-5 µl de RNAsa). Se agitó en *vortex*. Los tubos se colocaron en agua hirviendo durante 50 segundos, posteriormente se centrifugaron 15 minutos a 13000 rpm.

El sobrenadante se decantó a un tubo de microcentrífuga nuevo, a este se le agregaron 300 µl de isopropanol y se mezcló con ayuda del *vortex*. Se incubaron 10 minutos en hielo. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se centrifugó 20 minutos a 14000 rpm en frío (4°C). Se desechó el sobrenadante. El paquete se lavó con 500 µl de etanol al 70% frío, invirtiendo el tubo una vez, se decantó el etanol. Se incubaron los tubos abiertos a 70°C por

10 minutos. Por último, se agregaron 35 μl de H_2O para resuspender el paquete. Con una alícuota de 5 μl se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Transformación bacteriana (electroporación). Este procedimiento se realizó en condiciones de esterilidad. Se enfrió una celda de electroporación de 0.1cm con ayuda de hielo. A un tubo con células competentes de *C. crescentus* se le añadieron 500ng del DNA de interés (plásmido) o 1 μl de la reacción de ligasa para transformar células de *E. coli*, se resuspendió con ayuda de una micropipeta e inmediatamente se traspasaron todas las células a la celda, a ésta se le dio un pulso de 1.6 mV.

Inmediatamente se añadió a la celda 1mL de medio líquido (LB para *E. coli*; PYE para *C. crescentus*) y se resuspendió con micropipeta. Se traspasó todo a un tubo de microcentrífuga nuevo estéril y se incubó durante 1 hora en agitación (37°C para *E. coli*; 30°C para *C. crescentus*). Se centrifugó para eliminar exceso de medio y se plateó en una caja con medio sólido selectivo.

Criopreservación de cepas bacterianas. Para la criopreservación de cepas bacterianas se utilizó DMSO (Dimetil sulfóxido, Sigma-Aldrich™). En condiciones estériles, a un vial de 1.5ml se le añadieron 900 μl de cultivo en fase estacionaria de la cepa de interés, 100 μl de DMSO, se mezcló por inversión y se colocó en hielo seco rápidamente. Se almacenó a -70°C.

Resultados

Actualización de técnica de sincronización de cultivos de *C. crescentus* para la separación de tres poblaciones celulares distintas

La técnica normalmente usada para la sincronización de células de *C. crescentus* sólo permite separar la población de células *swarmer*, mientras que las poblaciones de células prostecadas (que incluyen a células predivisionales y divisionales) se encuentran en la misma banda y no son separadas.

Para permitir la sincronía de células más allá de unos ciclos celulares y para mejorar la pureza de las poblaciones obtenidas, se modificó el protocolo de sincronización. La mejoría consistió en ajustar la densidad del medio de centrifugación para permitir la separación de las células predivisionales de las divisionales.

Se realizó una sincronía para separar tres poblaciones celulares de *C. crescentus* con el protocolo descrito en este trabajo con la cepa S1 de CB15N y se tomaron micrografías de cada población celular obtenida por este procedimiento (figura 12). Para determinar la fase del ciclo celular de las células de cada una de las poblaciones separadas por este protocolo, se utilizó una cepa que expresa la proteína MipZ fusionada a la proteína fluorescente venus.

Si los focos de fluorescencia de MipZ son únicamente polares y las células no tienen prostecas, las células son flageladas (células motiles, figura 12 C y F), si las células tienen dos focos polares de fluorescencia, las células han segregado los orígenes de replicación del cromosoma y se encuentran en el estado predivisional (figura 12 B y E), finalmente si las células tienen dos focos de fluorescencia polares pero presentan ya una invaginación (surco de división bien definido), las fracciones celulares encontradas corresponden al estadio divisional (figura 12 A y D). Así, este protocolo es efectivo al separar tres poblaciones celulares sincronizadas en una fase específica del ciclo celular.

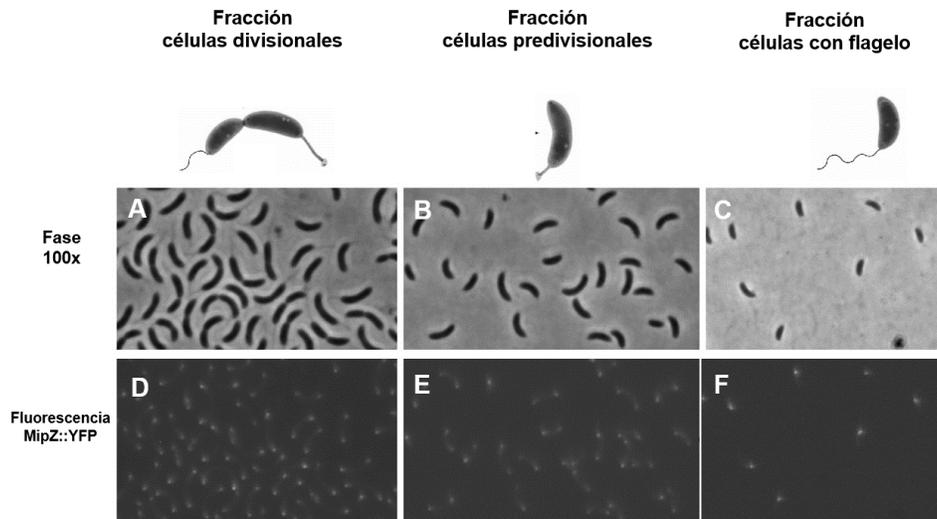


Figura 12. Tres poblaciones celulares de *C. crescentus* (cepa S1) separadas por el método de sincronía adaptado en este trabajo por medio de centrifugación por gradiente de densidad con Ludox. A-C corresponden a una fotomicrografía de contraste de fases, D-F corresponden a fotomicrografías de del mismo campo con fluorescencia en la proteína MipZ cercana al origen de replicación del cromosoma. Cada foco de fluorescencia corresponde a un cromosoma en la célula, esto ayuda a identificar en qué etapa del ciclo celular se encuentra cada población celular recuperada. A, D) corresponde a la fracción recuperada de células divisionales. B, E) fracción recuperada de células predivisionales. C, F) fracción de células *swarmer* o con flagelo (correspondiente a células recién nacidas).

Control de detección de proteínas carboniladas en *C. crescentus*

Selección de un tratamiento oxidante que aumente la concentración de proteínas carboniladas.

Para determinar si era factible determinar la presencia de proteínas oxidadas en *C. crescentus* y diferenciar diferentes niveles de éstas, se sometieron cultivos de *C. crescentus* a tres ambientes oxidantes: peróxido de hidrógeno a una concentración final de 0.4 y 0.1mM durante 30 minutos y privación de glucosa durante 4 horas. Como control negativo un cultivo no fue sometido a ningún ambiente oxidante.

Los resultados indican que la privación de glucosa y el peróxido de hidrógeno mostraron un mayor incremento en la concentración de proteínas carboniladas en comparación con el control. En células que no se sometieron a algún estrés oxidante se observó la presencia

de proteínas carboniladas en menor cantidad, lo cual sugiere la presencia natural de proteínas carboniladas en la célula de la bacteria (figura 13).

En los carriles correspondientes al control de la reacción de derivatización no se observa ninguna señal, por lo que la señal es específica a proteínas carboniladas. En todos los carriles se cargaron 16 μg de proteína total.

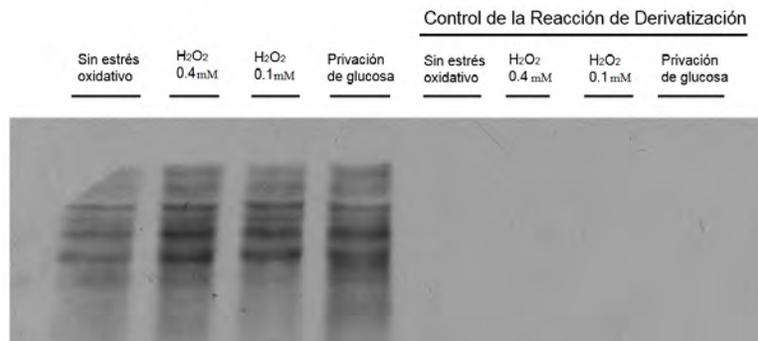


Figura 13. Western-blot de proteínas carboniladas en células con estrés oxidante. El control mostrado en el primer carril de izquierda a derecha muestra la presencia de proteínas carboniladas presentes en la célula en condiciones óptimas de cultivo. Las células sometidas a los tratamientos oxidantes se observan con una mayor cantidad de proteínas carboniladas. En los carriles de extrema derecha se observan los controles para la reacción de derivatización, en la cual se sustituyó la DNPH por la solución de control negativo a la reacción de derivatización del Kit. El no observar ninguna banda en estos carriles indica que la reacción es específica, al igual que los anticuerpos para la detección del compuesto formado.

Determinación de la concentración óptima de peróxido de hidrógeno como factor de estrés oxidante para la detección de proteínas carboniladas

Presencia de proteínas carboniladas, sobrevivencia celular y tasa de crecimiento con distintas concentraciones de peróxido de hidrógeno

Una vez establecido que el tratamiento con peróxido de hidrógeno permite inducir la carbonilación de proteínas en células de *C. crescentus*, se decidió establecer condiciones que permitieran la utilización de este estrés para el estudio de la segregación de proteínas carboniladas. Para esto se procedió a determinar la concentración de peróxido de hidrógeno que causara la menor muerte celular posible, pero que incrementara la concentración de proteínas carboniladas en la célula. Determinando la viabilidad celular

después del tratamiento con distintas concentraciones de H₂O₂ se encontró que a concentraciones mayores a 0.1mM de H₂O₂ existe un porcentaje muy alto de muerte celular en los cultivos de *C. crescentus*, teniendo como máximo 1.6 x 10⁵ UFC/ml de cultivo (tabla 5).

A una concentración de 0.05mM la muerte celular es mínima en comparación con concentraciones más altas de H₂O₂, ya que las unidades formadoras de colonia (UFC) son casi equivalentes a las formadas en ausencia de peróxido de hidrógeno (figura 13 A, B). La variación en cuanto al número de células es mínima de 2.3 x 10⁷ UFC/ml de cultivo con 0.05mM de H₂O₂ a un 3.6 x 10⁷ UFC/ml en un cultivo sin estrés oxidante (tabla 5).

UFC/ml en peróxido de hidrógeno				
0.5 mM	0.2 mM	0.1 mM	0.05 mM	0 mM
1.2x10 ⁵ UFC/ml	1.6x10 ⁵ UFC/ml	2x10 ⁶ UFC/ml	2.3x10 ⁷ UFC/ml	3.6x10 ⁷ UFC/ml

Tabla 5. Sobrevivencia de *C. crescentus* a distintas concentraciones de peróxido de hidrógeno. Las UFC indicaron que a una concentración de 0.05mM la muerte celular es casi nula, ya que las colonias formadas por células no sometidas a algún estrés oxidante son parecidas a las de esta concentración.

Al evaluar la concentración de proteínas carboniladas en muestras sometidas a un estrés oxidante de 0.1 y 0.05 mM de H₂O₂ mediante Western-blot, se observó que en ambos casos existe un aumento en la cantidad de proteínas carboniladas en comparación con células sin estrés oxidante (figura 14 C).

Se determinó que la concentración óptima de H₂O₂ es de 0.05mM, ya que no existe muerte celular significativa y la señal de proteínas carboniladas detectadas mediante Western-blot es mayor en comparación con células sin tratamiento.

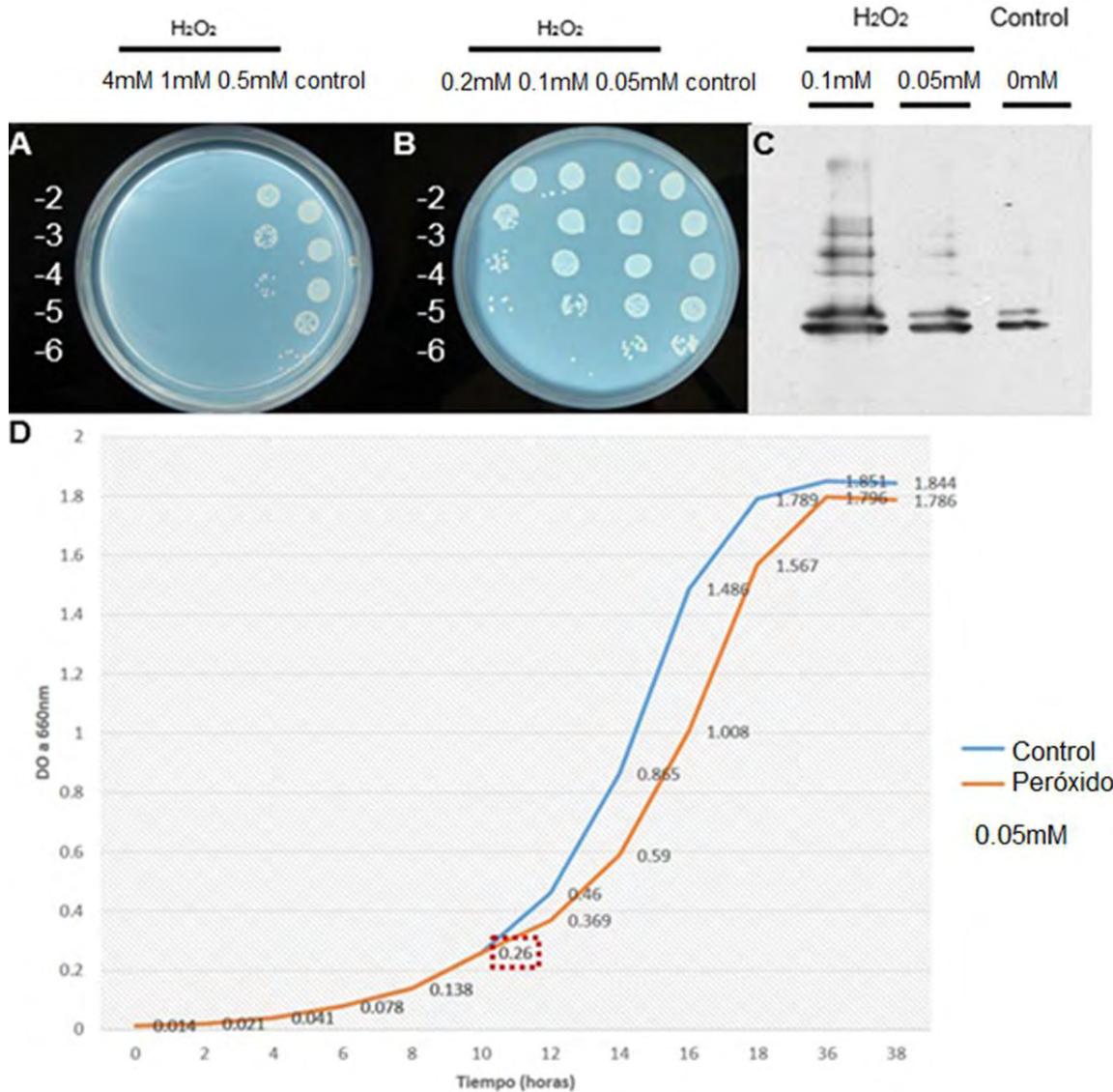


Figura 14. Sobrevivencia y crecimiento de un cultivo de *C. crescentus* sometido a un estrés con peróxido de hidrógeno. A, B) Cajas de sobrevivencia de CB15N, cada columna representa las diluciones de un cultivo tratado con peróxido de hidrógeno a la concentración señalada, y se compara su crecimiento con la columna control de cada caja. A concentraciones de 4 y 1 mM de H_2O_2 , la mortalidad es del 100%; a concentraciones de 0.2 y 0.1 mM de H_2O_2 la sobrevivencia de la bacteria es de un orden de magnitud menor que sin tratamiento oxidativo. A una concentración de 0.05 mM no existen diferencias significativas en cuanto a sobrevivencia comparando con bacterias sin estrés oxidante. C) Western blot representativo de la presencia de proteínas dañadas por carbonilación a distintas concentraciones de H_2O_2 . D) Curva de crecimiento de cultivos de CB15N. La línea azul representa un cultivo sin estrés oxidante. La línea roja representa un cultivo con un tratamiento de H_2O_2 de 1 hora dado cuando el cultivo se encontraba en fase de crecimiento exponencial (recuadro punteado). El crecimiento se retrasa aproximadamente dos horas.

Otro fenómeno del H_2O_2 que se evaluó en *C. crescentus* fue su efecto en la velocidad de crecimiento después de someter a un cultivo a 1 hora de estrés oxidante con 0.05 mM de H_2O_2 (figura 14 D). Se observó un retraso en el crecimiento de dos horas, sin embargo, el cultivo se recuperó y llegó a fase estacionaria, indicando que el cultivo no se queda en un estado de arresto de crecimiento debido al tratamiento oxidante.

Sobrevivencia celular y tasa de crecimiento en las tres poblaciones distintas de *C. crescentus* con un tratamiento de estrés oxidativo

Para determinar si el retraso en el crecimiento mostrado en la figura 14D es causado por el efecto del tratamiento oxidante sobre los distintos tipos celulares o si se debe a alguna población celular particular, se midió la tasa de crecimiento de las tres poblaciones celulares distintas de *C. crescentus*. En las tres poblaciones tratadas con H_2O_2 se observó un retraso en el crecimiento en comparación con las poblaciones control, como se observa en la figura 15.

Al comparar el tiempo de generación de cada población celular tratada con H_2O_2 con su equivalente sin el tratamiento oxidante, la población que mostró una mayor diferencia fue la población de células divisionales, con un tiempo de generación de 59 minutos comparado con su igual sin estrés oxidante. Las células predivisionales mostraron un retraso de 37 minutos. Finalmente, las células *swarmer* o flageladas fueron las que mostraron un retraso menor en el crecimiento posterior al estrés oxidante, con 26 minutos de diferencia con el control (figura 15A).

A partir del punto de las 4 horas pos-tratamiento, el tiempo de generación se normalizó en las tres poblaciones sometidas al estrés oxidante, e incluso es similar al de las células control (figura 15B y apéndice 1).

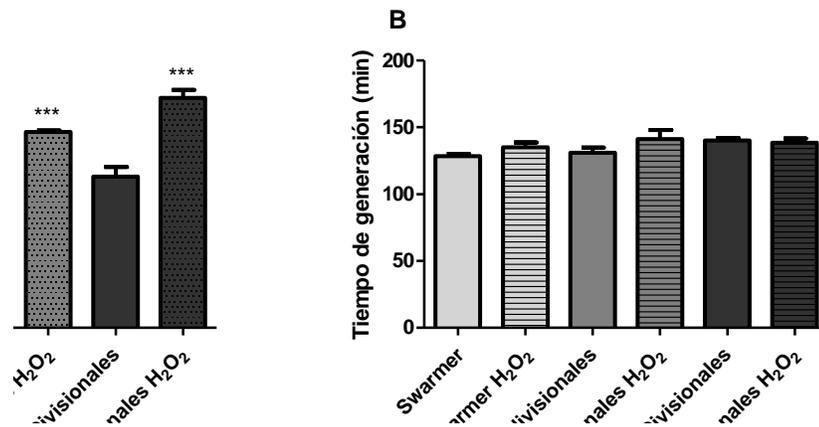


Figura 15. Crecimiento en las tres poblaciones distintas de un cultivo de CB15N después de un tratamiento con peróxido de hidrógeno a 0.05mM. A) tiempo de generación celular obtenido a partir de los datos de crecimiento. En las primeras 4 horas seguidas del estrés oxidante las células aumentan el tiempo de generación (barras punteadas) en comparación con células que no fueron sometidas al tratamiento (barras lisas). B) tiempo de generación celular en las horas posteriores a las primeras 4 después del estrés oxidante (barras rayadas), el cual se observa normalizado en comparación con células control (barras lisas), sin mostrar diferencias significativas.

Debido a que los cultivos recuperan su tasa de crecimiento después de transcurridas 4 horas del tratamiento oxidante, se determinó si alguna etapa del ciclo celular de *C. crescentus* es más susceptible a morir a causa del mismo y descartar que este retraso en el crecimiento es consecuencia de la muerte de un porcentaje de las células del cultivo. Se realizó una sincronía para separar las tres poblaciones distintas de *C. crescentus* y a cada población celular se le evaluó la capacidad para formar UFC (figura 16).

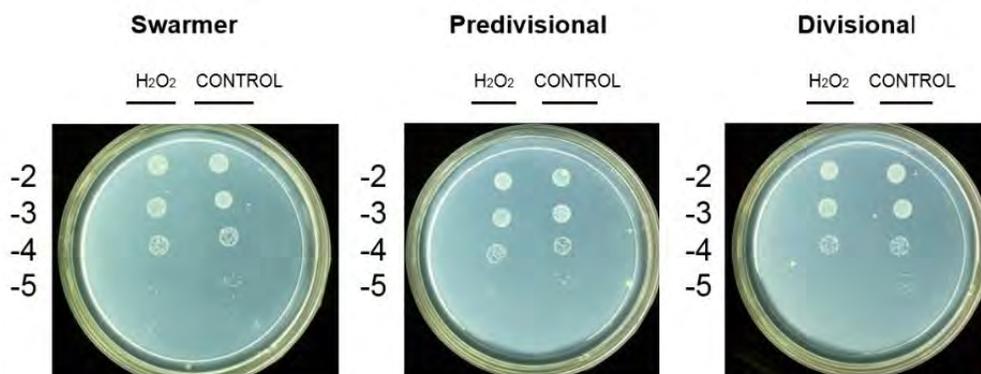


Figura 16. Sobrevivencia de las tres poblaciones en distintas etapas del ciclo celular de CB15N al tratamiento de H₂O₂ durante 1 hora. En las tres poblaciones celulares (*swarmer* o con flagelo, predivisionales o *stalked*, y divisionales) sometidas al tratamiento oxidante se observó el mismo crecimiento que en células control.

Como se observa en la tabla 6, el número de células no mostró diferencia significativa ubicándose alrededor de 1.1×10^5 UFC/ml tanto de células tratadas con peróxido de hidrógeno a 0.05 mM como de las células sin tratamiento oxidante de las tres poblaciones distintas de *C. crescentus*. Así, podemos decir que ninguna población celular es más susceptible que otra a morir por causa del tratamiento con peróxido de hidrógeno. Con estos datos se muestra que el mayor retraso en la tasa de crecimiento de las células divisionales no se debe a un incremento en la muerte celular, si no a un retraso en la recuperación del estrés oxidante.

UFC/ml	H ₂ O ₂	Sin tratamiento
swarmer	11×10^5	14×10^5
predivisional	10×10^5	11×10^5
divisional	9×10^5	13×10^5

Tabla 6. Sobrevivencia de células tratadas con peróxido de hidrógeno y sin tratamiento, medida a partir de las UFC. Los datos se obtuvieron de las cajas de sobrevivencia de la figura 16. La diferencia es mínima en cuanto al número de células que sobreviven al tratamiento, independientemente de la etapa del ciclo celular en el que se da el estrés oxidante.

Por ende, el tratamiento oxidante de peróxido de hidrógeno es óptimo a una concentración de 0.05 mM durante 1 hora para analizar proteínas carboniladas en células de *C. crescentus*, evitando sesgos por muerte celular.

Acumulación diferencial de proteínas carboniladas en los distintos tipos celulares de *C. crescentus* determinada por Western-blot

Para determinar si el proceso normal de envejecimiento celular podía conducir a la acumulación preferencial de proteínas carboniladas en las células progenitoras se llevaron a cabo diferentes experimentos donde se comparó por Western-blot la cantidad de proteínas carboniladas en células con distintas edades.

Células progenitoras con una división celular

En un cultivo sincronizado se permitió que las células motiles se dividieran una vez y se volvió a sincronizar, obteniendo como resultado una población de células progenitoras (predivisionales) y sus descendientes (motiles). En 16 µg de proteína total de cada muestra se observó que existe una mayor concentración de proteínas carboniladas en las células progenitoras en comparación con las células hijas o *swarmer* (figura 17 A).

Células progenitoras con dos divisiones celulares

A partir de un cultivo sincronizado se permitió que las células se dividieran dos veces separando las células motiles (hijas) del cultivo después de cada división. En el Western-blot se observó que las células progenitoras con dos generaciones de edad mostraron una mayor cantidad de proteínas carboniladas en comparación con las células hijas producto de la primera división celular. Sin embargo, al comparar las células progenitoras con las células hijas producto de la segunda división celular, esta diferencia no es tan marcada (figura 17 B).

Comparación entre células progenitoras con una y con dos divisiones celulares

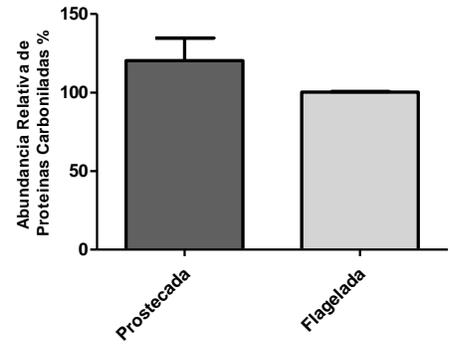
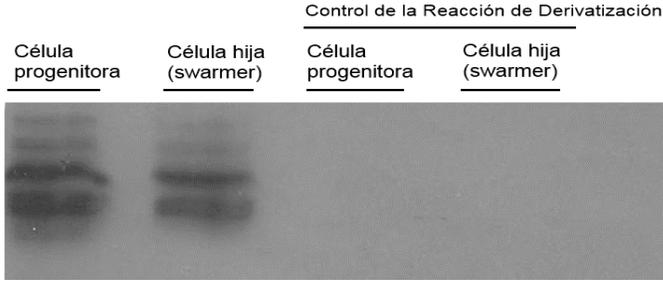
A partir de un cultivo sincronizado se permitió que las células se dividieran dos veces, separando las células predivisionales de las *swarmer* después de cada división. Se almacenó una alícuota de cada población. En la figura 17C se observó que la muestra con la mayor concentración de proteínas carboniladas corresponde a las células progenitoras que presentaban dos divisiones celulares. Estas células contuvieron incluso más proteínas carboniladas que las células progenitoras con una división celular. Las muestras de ambas células hijas o *swarmers* mostraron una menor presencia de proteínas carboniladas.

Células progenitoras de una división celular y células progenitoras con diversas divisiones celulares

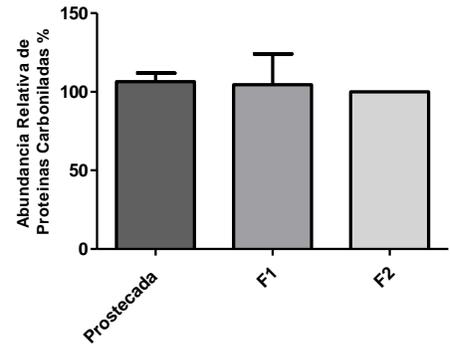
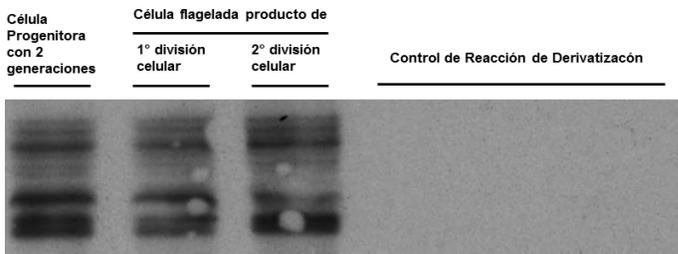
A partir de un cultivo exponencial (conteniendo células progenitoras con una o más divisiones celulares), se obtuvieron las células predivisionales y motiles, se almacenó una alícuota de ambas y a las células motiles se les permitió dividirse, obteniendo una población de células progenitoras con 1 división celular y una de células hijas.

Se observó una mayor concentración de proteínas carboniladas en las muestras de células progenitoras en comparación con las muestras de células hijas. En la figura 17D no se observó una tendencia clara a presentar más proteínas carboniladas en cultivos de células prostecadas con diverso número de divisiones celulares, comparándolo con las células progenitoras, que sólo presentan una división de edad generacional.

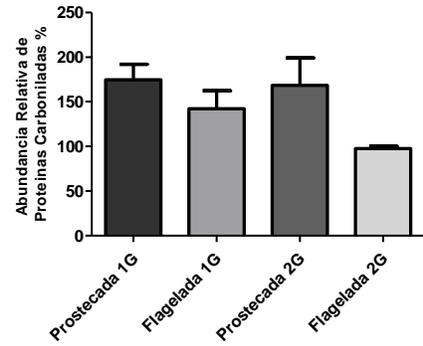
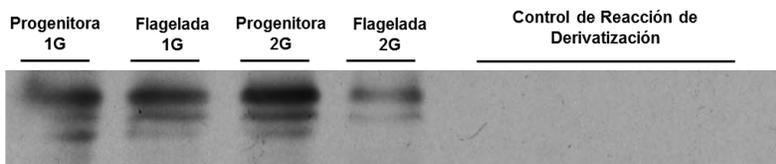
A



B



C



D

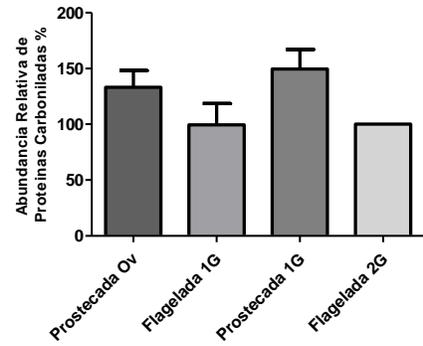
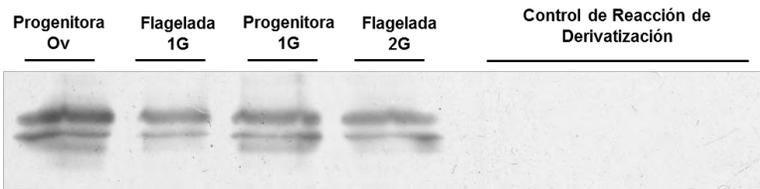


Figura 17. Western-blot representativo de proteínas carboniladas. A) proteínas carboniladas presentes en células *swarmer* y células progenitoras. Los carriles de extrema derecha representan el control a la reacción de derivatización por DNPH del Kit. B) Células progenitoras con dos divisiones celulares de edad generacional (carril izquierdo, las cuales muestran una mayor concentración de proteínas carboniladas en comparación con las células hijas *swarmer* a las que dieron origen (carriles de extrema derecha). C) células progenitoras con una y con dos divisiones celulares y su respectiva progenie. D) Proteínas carboniladas en células progenitoras con distintas edades generacionales. El carril de extrema izquierda (Ov) muestra las proteínas carboniladas de una población de células progenitoras con distintas edades generacionales. Los datos fueron normalizados respecto a la abundancia relativa de proteínas carboniladas en las células hijas (flageladas) producto de la última división celular.

Determinación mediante Western-blot del momento de segregación de proteínas carboniladas durante el ciclo celular

Los resultados anteriores sugieren que las proteínas carboniladas se acumulan en las células progenitoras. Para determinar si hay un punto del ciclo celular donde se origina esta distribución, se sometió un cultivo a un estrés oxidante con peróxido de hidrógeno, después del cual se obtuvieron las células predivisionales, divisionales y motiles, a las tres poblaciones se les permitió dividirse y se obtuvieron de cada una las células predivisionales y motiles. Como se esperaba, si el estrés oxidante se presenta en la última etapa del ciclo celular correspondiente a las células divisionales, la segregación de las proteínas carboniladas es casi nula. Al dividirse, tanto la hija como la progenitora mostraron aparentemente la misma cantidad de proteínas carboniladas (figura 18).

En el caso en de las células predivisionales, la segregación de proteínas carboniladas fue ligeramente evidente, ya que después de la división las células motiles mostraron una menor cantidad de proteínas carboniladas que las células progenitoras (figura 18). Las células motiles mostraron un patrón similar al de las células predivisionales, sin embargo la segregación diferencial no fue igual de evidente. Estos resultados sugieren que la distribución diferencial de proteínas carboniladas está basada en una segregación de las proteínas dañadas hacia la célula progenitora y que este proceso se da antes de las etapas tardías de la división.

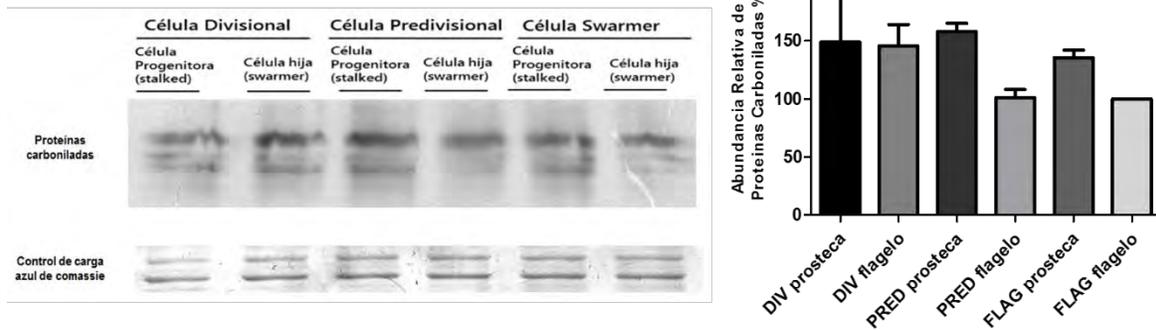


Figura 18. Western-blot representativo de la segregación diferencial de proteínas carboniladas durante la división celular. Los carriles de extrema izquierda correspondientes a la población original de células divisionales que recibieron el estrés oxidante, muestran que la concentración de proteínas carboniladas es similar después de su división, tanto en células progenitoras como en hijas. En las poblaciones correspondientes a las poblaciones originales de células predivisionales y *swarmer*, una vez que éstas se dividieron, las células progenitoras presentan una mayor concentración de proteínas carboniladas. Esto puede indicar que, si las proteínas dañadas se acumulan en etapas tempranas o intermedias del ciclo celular, el material dañado puede ser segregado a la célula progenitora al momento de la división celular. La gráfica representa la cuantificación del western-blot normalizado respecto a la cantidad de proteínas teñidas por azul de Comassie y a la abundancia relativa de proteínas carboniladas en la célula flagelada producto de la última división celular.

Protocolo para la detección *in-situ* de proteínas carboniladas en *C. crescentus*

Los resultados obtenidos mediante la separación diferencial de poblaciones celulares y la comparación de la cantidad de proteínas carboniladas a nivel poblacional por Western-blot, no permitieron obtener resultados suficientemente claros y fácilmente reproducibles. Adicionalmente, este tipo de análisis está limitado por la capacidad de separar las células en distintos estadios del ciclo celular. Para contender con estos inconvenientes, se decidió montar un protocolo que permitiera determinar la distribución de las proteínas carboniladas a nivel celular, por medio de su identificación microscópica mediante una técnica de inmuno-fluorescencia.

En un primer acercamiento, las células fijadas se montaron en un portaobjetos con poli-L-lisina (ver material y métodos), en la muestra tratada con metanol y acetona se observaron gránulos de fluorescencia a lo largo de toda la célula (figura 19, campo A). Sin embargo, en distintos campos de la muestra en el portaobjetos no se observó fluorescencia, como se

observa en la figura 19, campo B, por lo que la señal de fluorescencia no es muy consistente. En la muestra control en la que no se utilizó metanol, acetona, ni lisozima, no se observó fluorescencia alguna a pesar de seguir el tratamiento de derivatización de las proteínas para su inmunodetección, como se observa en la figura 19, control.

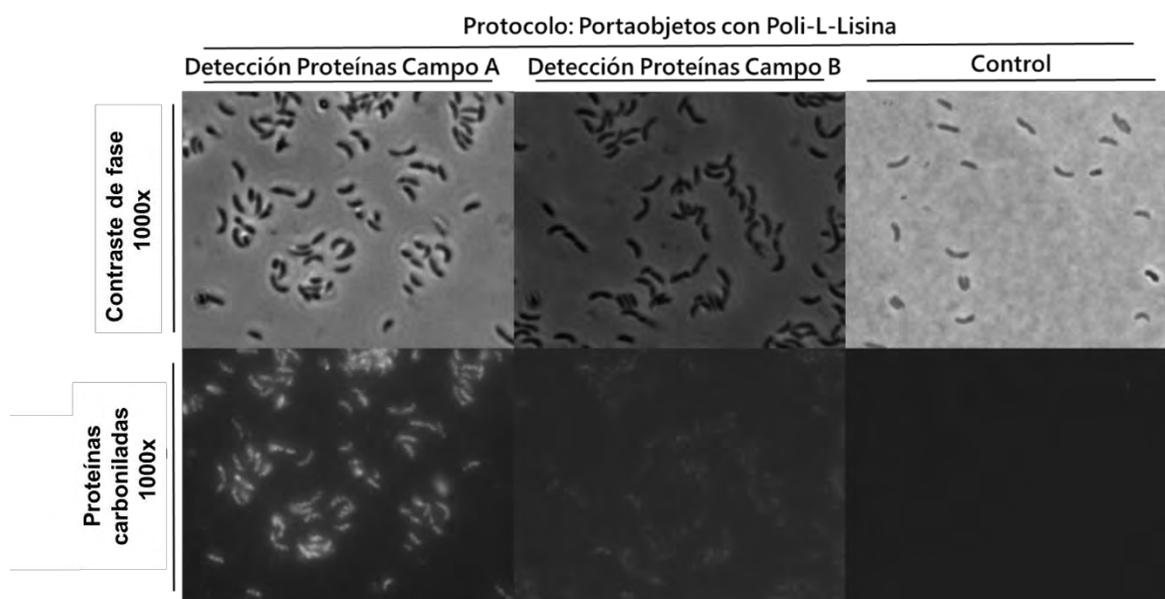


Figura 19. Detección *in-situ* de proteínas carboniladas mediante el protocolo en portaobjetos con poli-L-Lisina. Columna extrema izquierda: Campo A de la muestra de células tratadas con este protocolo, se observa una señal de fluorescencia en las células correspondiente a las proteínas carboniladas. Sin embargo, al comparar con la columna central, la intensidad de la señal de fluorescencia disminuye en otros campos a pesar de tratarse de la misma muestra. Por lo que la señal de fluorescencia no es constante en toda la muestra. Columna de extrema derecha se trata del control del experimento con células a las que no se les añadió lisozima, metanol, ni acetona y que fueron sometidas a la reacción de derivatización con DNPH. En esta muestra no se observa fluorescencia alguna, indicando que es necesario el tratamiento con lisozima, metanol y acetona para poder detectar las proteínas carboniladas *in-situ*.

Para mejorar la reproducibilidad, se siguió un protocolo de inmunodetección utilizando células en suspensión (material y métodos). Los controles realizados mostraron que la reacción de derivatización es necesaria para la detección de señal, indicando que la reacción de derivatización para detectar las proteínas carboniladas es específica, al igual que los anticuerpos empleados, como se observa en la figura 20.

En la variante 1 del protocolo de células en suspensión se observó una fluorescencia localizada y específica en las células de *C. crescentus* (figura 20, columna extrema izquierda), la cual se observó en todos los campos de la muestra en el microscopio. En la variante 2 del protocolo en la que se realizó el tratamiento con metanol y acetona seguido de la reacción de derivatización, se observó una señal débil, que adicionalmente se observó en aproximadamente el 50% de los campos vistos en la muestra (figura 20, columna central).

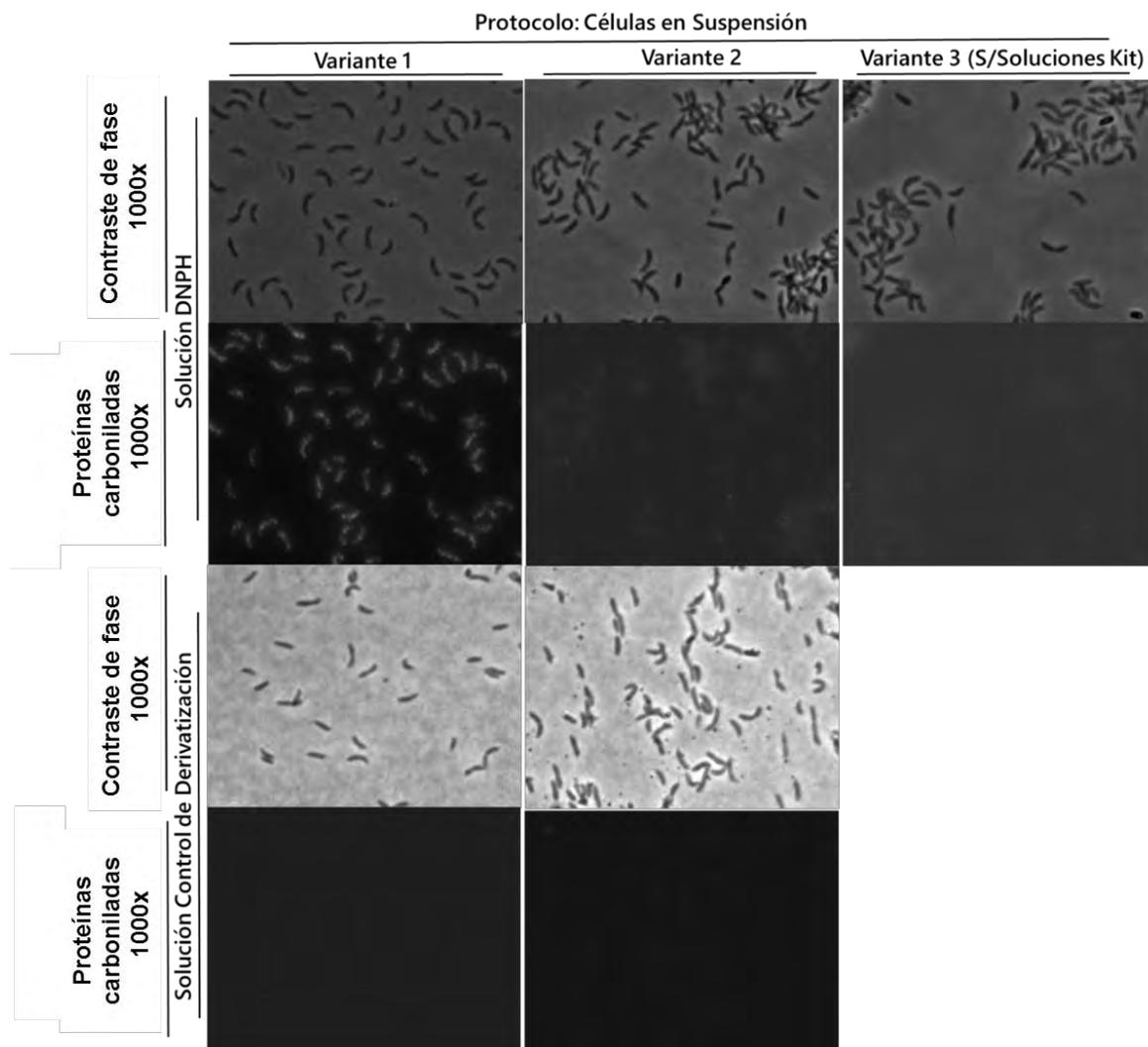


Figura 20. Detección in-situ de proteínas carboniladas mediante el protocolo de células en suspensión. A) Columna extrema izquierda: variante 1. Al realizar primero la reacción de derivatización y después utilizar un tratamiento con metanol y acetona en las células, se obtiene una señal fuerte y consistente de fluorescencia referente a las proteínas carboniladas en células de *C. crescentus*. Esta variante del protocolo de células en suspensión es en la que se obtiene una mejor señal y resulta óptima para realizar experimentos posteriores. B) Columna central, variante 2. Al utilizar metanol y acetona

antes de realizar la reacción de derivatización en las células, se obtiene una señal de fluorescencia débil, la cual no es consistente en todos los campos de la muestra, por lo que esta variante no resulta óptima. C) Columna extrema derecha, variante 3, control. En estas células se utilizó el tratamiento con metanol y acetona, y no se realizó la reacción de derivatización con DNPH ni con la solución control del kit, sin embargo, sí se aplicaron los anticuerpos específicos para la identificación de proteínas carboniladas. No se observó fluorescencia alguna.

En lo que respecta a la variante 3 del protocolo de células en suspensión, no se observó fluorescencia en ningún campo. Esta tercera variante fue utilizada como control al no usar ninguna de las soluciones del kit OxyBlot™ (Millipore™) y demostró que la señal de la reacción obtenida en la variante 1 y 2 es específica a los grupos carbonilados (figura 20 columna extrema derecha).

Análisis *in-situ* de proteínas carboniladas en *C. crescentus*

Comparación de concentración de proteínas carboniladas en los compartimientos celulares progenitor e hijo

Como un primer acercamiento para comparar la acumulación de proteínas carboniladas, se decidió tomar ventaja de la división asimétrica que presenta *C. crescentus*, la cual resulta en un menor tamaño del compartimento celular correspondiente a la futura célula motil en la célula divisional (figura 21 B). Utilizando esta característica, se determinó la fluorescencia ajustada en ambos compartimentos celulares utilizando el programa ImageJ, se observó que a nivel poblacional existe una mayor cantidad de proteínas carboniladas en el compartimento progenitor de la célula divisional (figura 21 C).

Al comparar el compartimento progenitor con el compartimento de la futura célula hija de la misma célula divisional, se observó que el 80% de las células analizadas mostraron una mayor concentración de proteínas carboniladas en su compartimento progenitor (figura 21 A).

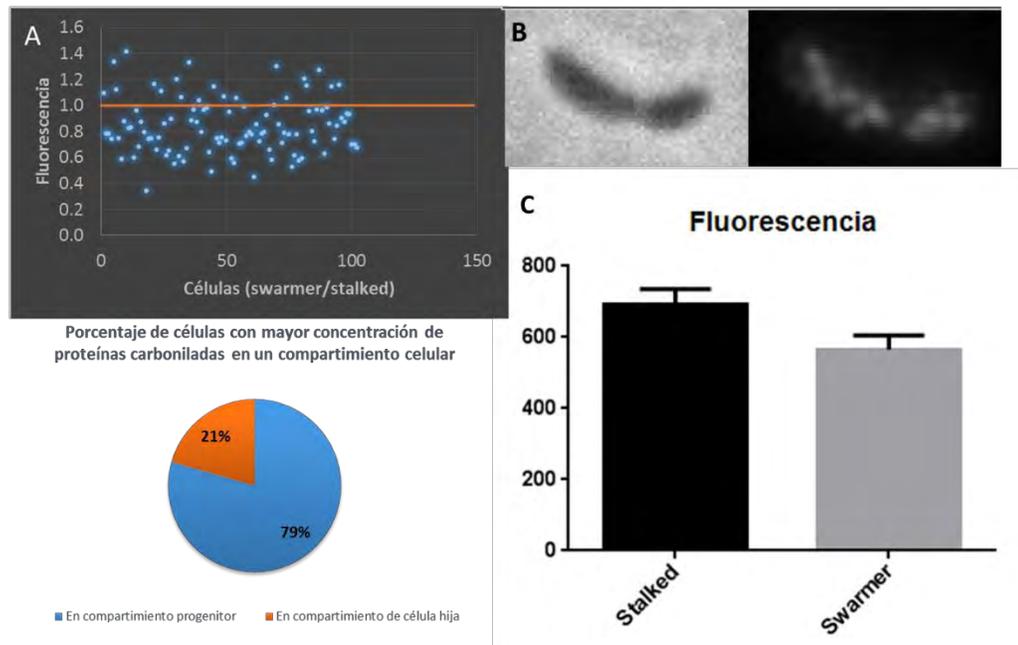


Figura 21. Análisis de la fluorescencia *in-situ* de proteínas carboniladas en los compartimentos celulares progenitor e hijo con el *software* Image J. A) En la gráfica de dispersión se muestra la relación entre la señal de fluorescencia de proteínas carboniladas en el compartimiento de la célula hija y en el progenitor. Cada punto corresponde a una célula en fase divisional, los ubicados debajo de la línea naranja corresponden a las células donde existe una mayor concentración de proteínas carboniladas en el compartimiento progenitor. La gráfica de pastel muestra el porcentaje de las células que tiene una mayor concentración de proteínas carboniladas en el compartimiento progenitor, con el 79% de las células analizadas. Mientras que el 21% de células muestra una mayor concentración de proteínas carboniladas en el compartimiento correspondiente a la célula hija. B) Imagen de célula en fase divisional con los dos compartimentos celulares a los que se les midió la fluorescencia para posteriormente realizar las gráficas en A. C) El compartimiento de la célula *stalked* o progenitora muestra una mayor cantidad de proteínas carboniladas que el compartimiento de la célula hija o *swarmer*. Existe una diferencia significativa entre ambos compartimentos celulares (prueba de t con la corrección de Welch, *software* GraphPad Prism 6).

Construcción de la cepa JA1

Para poder determinar con más precisión y en estadios más tempranos del ciclo celular la identidad de los polos celulares (polo de la futura célula prostecada y polo de la futura célula hija), se obtuvo una fusión de *divJ* con el gen de la proteína fluorescente mCherry (figura 22).

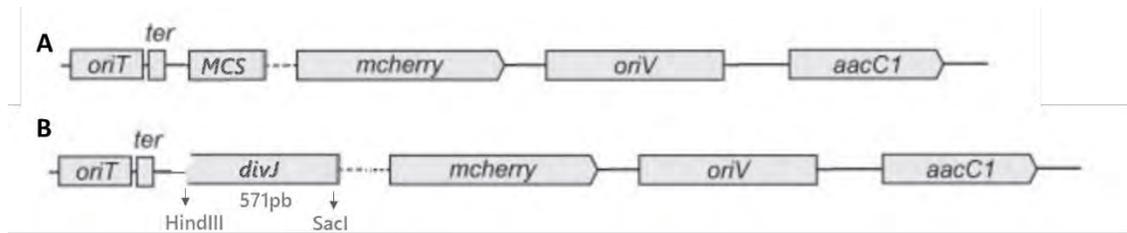


Figura 22. Representación esquemática del plásmido pCHYC-4 utilizado para la fusión de la proteína fluorescente mCherry a DivJ. A) Plásmido pCHYC-4 (Thanbichler et al., 2007). B) plásmido con un fragmento de la parte carboxilo terminal (571pb) de la proteína DivJ de *C. crescentus* insertado en el sitio de clonación con las enzimas de restricción HindIII y SacI, utilizado para crear la cepa JA1 con la proteína mCherry fusionada a DivJ y con una expresión de la proteína bajo el promotor nativo. Abreviaciones: origen de transferencia (oriT), terminador transcripcional T1T2 de *E. coli* (ter); Fragmento amplificado de DivJ de *C. crescentus* (DivJ); proteína fluorescente (mCherry); origen de replicación pMB1 (OriV); y gen de resistencia a gentamicina (aminoglucósido adenililtransferasa, aacC1).

Para obtener esta fusión, el producto amplificado por PCR del extremo 3' del gen de *divJ* de 571pb se purificó, se digirió y se ligó con el plásmido pCHYC-4 digerido (figura 23).

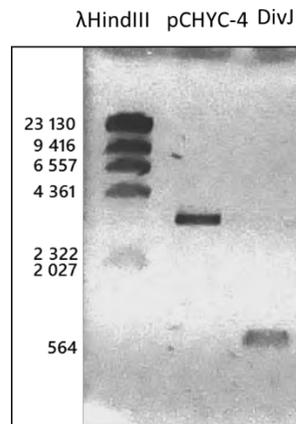


Figura 23. Producto obtenido por PCR con los oligonucleótidos DivJF1HindIII y DivJR1SacI; purificado con un tamaño de 571pb y una concentración de 29.2 ng/μL. Se muestra también el marcador de pares de bases λHindIII y el plásmido pCHYC-4.

Las clonas se analizaron para verificar que llevaran el fragmento esperado (figura 24). Las clonas 1-5 se cultivaron y el plásmido se purificó mediante minipreparaciones hervidas. Se seleccionó la clona 1 y se digirió con las enzimas HindIII y SacI correspondientes a los sitios de unión del fragmento de *divJ* con el plásmido pCHYC-4. El plásmido pDivJCHYC-4 se purificó y se transformó la cepa CB15N mediante electroporación.

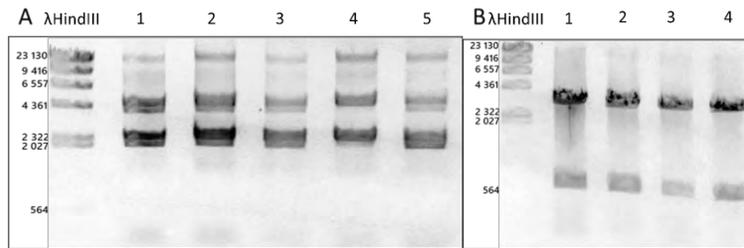


Figura 24. Plásmidos obtenidos de las clonas de la ligación del producto de PCR DivJ-pCHYC4 purificados por el método de minipreparaciones hervidas. B) Se seleccionaron los plásmidos de las clonas 1, 2, 3 y 4 y se digirieron con las enzimas HindIII y SacI, el producto esperado es DivJ de 571pb por lo que se seleccionó el plásmido de la clona 1.

En la figura 25, se observa mediante microscopia de epifluorescencia, la clona recombinante de *C. crescentus* expresando la fusion DivJ::mCherry que dio origen a la cepa JA1 de *C. crescentus*. Esta fusión puede utilizarse como marcador de polaridad ya que la proteína DivJ se recluta al polo prostecado cuando ocurre la diferenciación de la célula *swarmer* en célula predivisional.

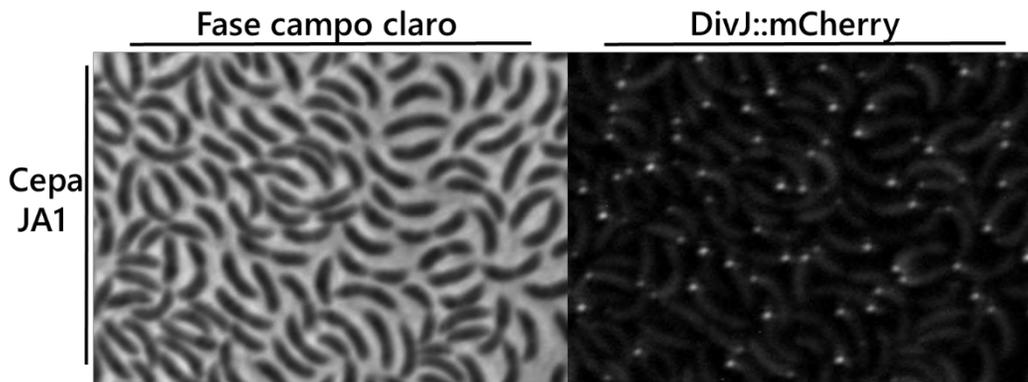


Figura 25. Cepa JA1. El plásmido pDivJ-CHYC-4 obtenido de la clona 1 se purificó y se electroporó en células competentes de *C. crescentus* CB15N. De las clonas obtenidas se realizaron cultivos y se almacenó la que mostró fluorescencia para la proteína DivJ dando origen a la cepa JA1. La fusión de la proteína Divj-mCherry se recluta al polo prostecado en etapas avanzadas del ciclo celular, pudiendo servir como marcador de polaridad. La proteína DivJ está relacionada con la progresión del ciclo.

Localización de proteínas carboniladas en la célula de *C. crescentus* (cepa JA1) después de un estrés oxidante

Células *swarmer* de la cepa JA1 fueron sometidas a un estrés oxidante con peróxido de hidrógeno y se les permitió proseguir con su ciclo celular y se intentó determinar la distribución de proteínas carboniladas a lo largo del ciclo celular.

Sin embargo, se observó que, bajo las condiciones de este experimento, el reclutamiento de DivJ-mCherry apareció en un estadio intermedio del ciclo celular, por lo que en etapas tempranas del mismo no se logró diferenciar la polaridad de las células. Esto tuvo como consecuencia que no se pudiera determinar el polo en el que se encontraban las proteínas carboniladas en etapas tempranas del ciclo celular (figura 26).

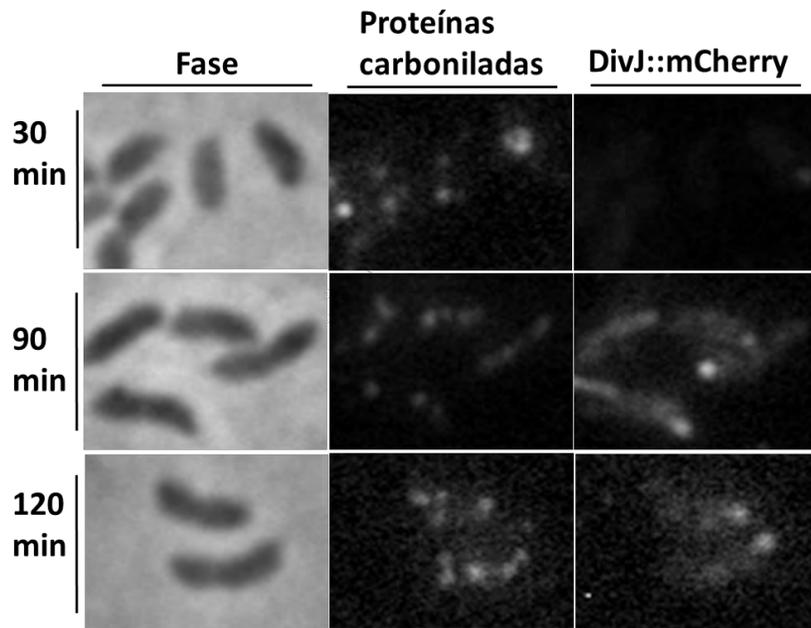


Figura 26. Proteínas carboniladas en distintas etapas del ciclo celular de la cepa JA1. Se recuperaron células *swarmer* de un cultivo que se le dio un tratamiento oxidante con peróxido de hidrógeno. Estas células se continuaron incubando y se tomaron alícuotas cada 30 minutos, en las que se detectaron in-situ las proteínas carboniladas. La proteína DivJ se recluta al polo prostecado en etapas intermedias del ciclo celular (columna extrema derecha) por lo que no es posible detectar el polo prostecado en etapas tempranas del mismo. Las proteínas carboniladas (columna central) se observan con una distribución preferente en el polo prostecado al minuto 120, sin embargo, en el minuto 30 no se puede determinar la polaridad de la célula ni si las proteínas carboniladas se ubican preferentemente en algún polo.

Al observar mediante microscopía de epifluorescencia las proteínas carboniladas en 118 células cuya polaridad pudo ser determinada (figura 27) y que además estaban en una etapa avanzada de su ciclo celular (estadio divisional), con ayuda de un análisis cualitativo de la intensidad ajustada de la fluorescencia a lo largo de cada célula (figura 27 D), se encontró que un 53% de las células mostraban una mayor concentración de las proteínas dañadas en el compartimiento progenitor (figura 28 A y B). El 31% mostró una mayor concentración en el compartimiento flagelado y el 16% de las células mostró una distribución central de los agregados de proteínas carboniladas (figura 28).

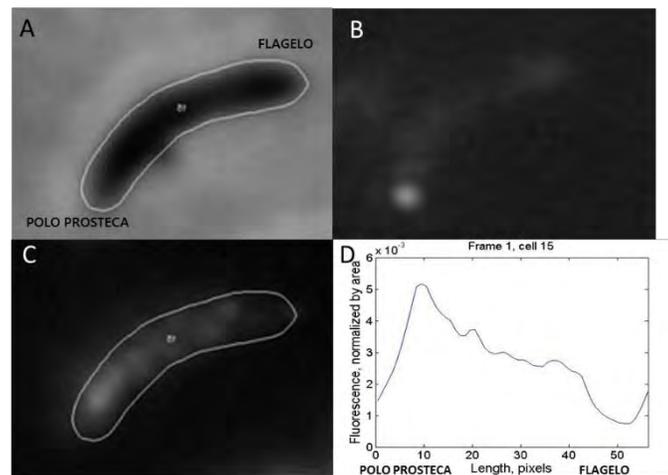


Figura 27. Fluorescencia de proteínas carboniladas en la cepa JA1 de *C. crescentus*. A) Imagen de campo claro de una célula en estadio divisional de la cepa JA1. B) Proteína DivJ localizada en el polo prostecado de la célula. C) Fluorescencia de proteínas carboniladas. D) Distribución de la fluorescencia de proteínas carboniladas a lo largo de la célula comenzando por el polo prostecado identificado con la proteína DivJ. Como se observa en la gráfica, el área bajo la curva correspondiente al polo prostecado es mayor que en el polo del flagelo (análisis cualitativo), indicando que en el polo progenitor hay una mayor cantidad de proteínas carboniladas. El análisis de esta célula se realizó con el software MatLab.

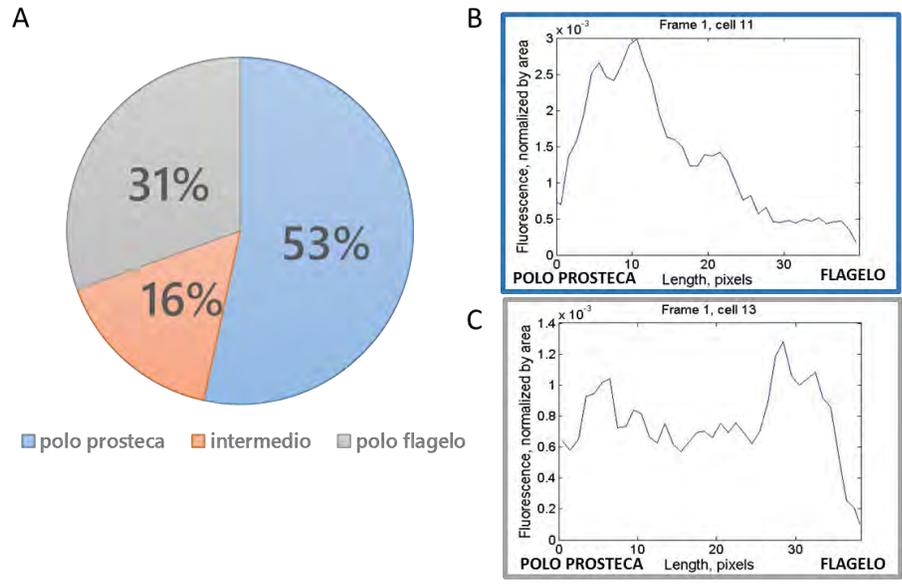


Figura 28. Análisis de fluorescencia de proteínas carboniladas de 118 células de la cepa JA1 sometidas a un estrés oxidante. A) El 53 % de las células mostró una mayor concentración de proteínas carboniladas en el compartimiento progenitor. El polo prostecado fue identificado por el reclutamiento de la proteína DivJ. B) Gráfico que ejemplifica la fluorescencia de proteínas carboniladas con una mayor concentración en el polo prostecado o progenitor, esto se observa como una mayor área bajo la curva en la parte correspondiente al polo prostecado. C) Gráfico que ejemplifica una distribución de proteínas carboniladas con una mayor concentración de las mismas en el polo del flagelo o compartimiento de la célula hija, distribuciones similares a esta se observaron en el 31% de las células analizadas con el software MatLab.

Discusión

En el estudio de la fisiología y biología celular microbiana, la separación de poblaciones mediante gradientes de densidad ha sido una herramienta útil al permitir separar células con distintas características morfológicas y fisiológicas. Este tipo de técnicas ha resultado ser de gran ayuda para estudiar variaciones en sus perfiles de expresión génica, bajo distintos tipos de estímulos (Chen et al., 2011; Maisonneuve, Ezraty, & Dukan, 2008; Makinoshima, Nishimura, & Ishihama, 2002). Una de las facilidades de esta técnica es que se puede adaptar dependiendo del modelo de estudio que se maneje y de las características de interés a estudiar.

Se han utilizado centrifugaciones en gradiente de densidad con Radioselectan (sodio y amidotriazoato de meglumina) para la separación de células viables y células viables no cultivables en cultivos de *E. coli* (Desnues et al., 2003) y *Salmonella entérica* (Passerat, Got, Dukan, & Monfort, 2009). En el caso de *C. crescentus* se ha utilizado Ludox (una suspensión coloidal de sílica) para sincronizar cultivos de forma rápida y sencilla. Esta sincronización se logra gracias a que las densidades de la célula prostecada y de la célula *swarmer* son distintas.

La sincronización de cultivos de *C. crescentus* se ha utilizado en el análisis de la expresión génica y para determinar los patrones de localización de distintas proteínas durante el ciclo celular. En el método tradicional se recuperan las células *swarmer* que se encuentran al inicio del ciclo celular y la otra fracción contiene una mezcla de células en estados predivisional y divisional (Schrader & Shapiro, 2015).

El método descrito en este trabajo permite la obtención en un solo procedimiento de poblaciones sincronizadas representativas de los distintos estadios del ciclo celular, lo que facilitará por un lado la descripción rápida de distintos patrones de localización o de expresión, permitiendo también abordar preguntas particulares.

En el caso de este proyecto, este procedimiento permitió obtener poblaciones con distintas edades y así poder determinar la cantidad relativa de proteínas carboniladas. En otros trabajos, objetivos similares se han alcanzado mediante otras técnicas que son más difíciles de implementar y que limitan la obtención de material biológico (Ackermann, Stearns, & Jenal, 2003; Siegal-Gaskins & Crosson, 2008).

Es posible detectar las proteínas carboniladas en *C. crescentus*, como consecuencia propia del metabolismo celular y se puede observar un incremento de éstas después de un estrés oxidante (figura 13). Existe una cantidad basal de proteínas carboniladas en la célula, sin embargo, éstas pueden acumularse rápidamente cuando la célula es sometida a algún tipo de estrés oxidante, entre ellos, la privación de glucosa, situación probablemente muy frecuente en condiciones naturales, o la adición de especies reactivas del oxígeno, como el peróxido de hidrógeno.

Para este trabajo se determinó que experimentalmente este último es el ideal, ya que es posible modular fácilmente la formación de carbonilos y éstos se generan rápidamente; las células incubadas en ausencia de glucosa requieren de 4 horas de incubación, a diferencia del tratamiento con peróxido de hidrógeno, que requiere una incubación de 30-60 minutos, por lo que es metodológicamente más sencillo.

Para poder utilizar el peróxido de hidrógeno como estrés oxidante en el estudio de la segregación de proteínas carboniladas, fue necesario determinar la viabilidad de las células tratadas. No sería posible correlacionar concentraciones de proteínas carboniladas con el envejecimiento de la célula si esta se encuentra ya muerta, y mucho menos hablar de una caracterización de la segregación posiblemente diferencial de dicho material durante la división celular.

De ahí la importancia de conocer la concentración ideal de peróxido de hidrógeno a utilizar en el protocolo experimental que maximice la presencia de proteínas carboniladas, sin presentar una muerte celular a causa del tratamiento. Como se observa en la sección 2.2 de resultados, la concentración ideal que se puede utilizar de peróxido de hidrógeno es de 0.05mM, ya que no altera demasiado la dinámica del ciclo celular.

Una vez estandarizados los protocolos de detección y controles de viabilidad, el análisis de la concentración de proteínas carboniladas en células de *C. crescentus* con distinta edad generacional, se llevó a cabo a nivel poblacional, por medio de análisis de los Western-blot de extractos totales de cultivos sincronizados. Las diferentes aproximaciones que se hicieron a esta pregunta se basaron en poblaciones celulares con una o dos divisiones celulares de diferencia.

En un cultivo asincrónico de *C. crescentus*, aproximadamente la mitad de las células son *swarmer* o predivisionales nuevas que se acaban de diferenciar de las células *swarmer* originadas la división celular anterior (figura 29). La otra mitad de las células corresponde a

las que ya se encontraban diferenciadas a células prostecadas y han dado origen a más de una generación de células motiles. Por ende, las células con un mayor número de divisiones celulares (más viejas) son las que se encuentran en menor cantidad en el cultivo.

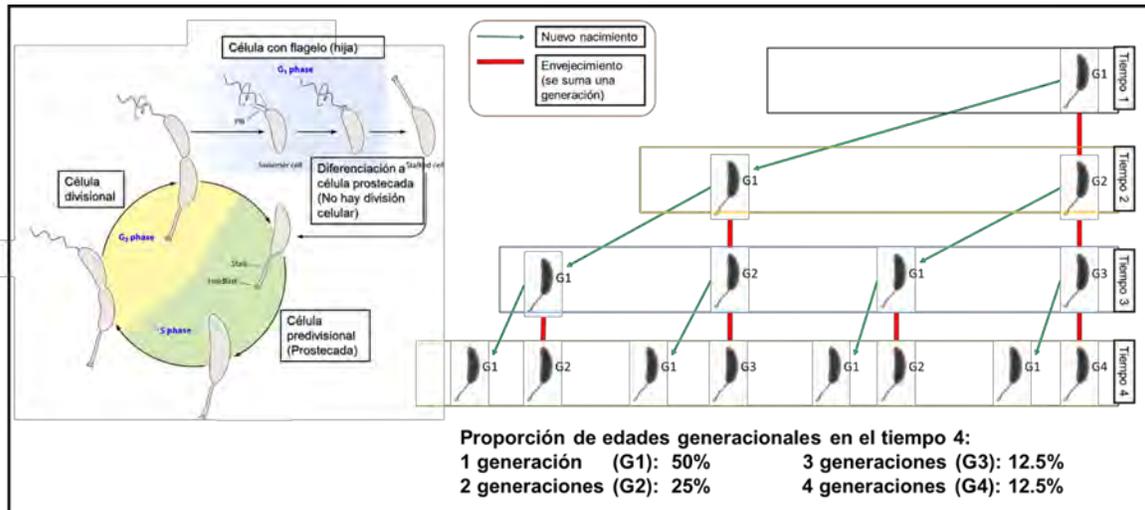


Figura 29. Esquema del crecimiento generacional dentro de un cultivo de *C. crescentus*. El ciclo de vida de la bacteria permite que solamente las células prostecadas se repliquen, dando origen a una nueva célula. La célula hija (con flagelo) no puede replicarse, debe diferenciarse a una célula prostecada para poder dividirse. Debido a la dinámica de crecimiento de las bacterias, en un cultivo estándar, el 50% de las bacterias acaba de generarse gracias a un proceso de división. El 25% de las bacterias del cultivo presentará una edad de dos divisiones celulares, y así progresivamente. Esta es la razón por la cual es muy complicado tener una población celular de bacterias que muestren una edad generacional muy alta.

Por motivos técnicos solo se trabajó con células que variaban entre 1 o 2 divisiones celulares. Aunque la diferencia en las concentraciones de proteínas entre las células progenitoras y las células hijas es mínima, los resultados obtenidos sugieren que existe una mayor proporción de proteínas carboniladas en la célula progenitora, aun cuando sólo existe 1 división de diferencia en la edad generacional (figura 17).

En los reportes anteriores, donde se determinan los efectos del envejecimiento general en procariontes sobre características como la tasa de reproducción y el crecimiento en *C. crescentus*, se concluye que estas características disminuyen significativamente después de 130 divisiones celulares (Ackermann et al., 2003). Un estudio de la concentración de proteínas carboniladas en células progenitoras con una edad generacional de 130

divisiones podría dar resultados más conclusivos que confirmen los presentados en este trabajo sobre todo con la localización *in-situ* de las proteínas carboniladas.

Distintos grupos de trabajo han utilizado la acumulación de proteínas carboniladas como marcador de senescencia condicional en bacterias como *E. coli*. En estos estudios se demostró que conforme el cultivo crece en fase exponencial, la cantidad de proteínas carboniladas aumenta. De igual manera en fase estacionaria, las células que han perdido la capacidad de ser cultivables pero aún son viables, contienen una mayor concentración de proteínas carboniladas que las células cultivables presentes en el mismo cultivo (Desnues et al., 2003). Esto apoya a este trabajo demostrando que células con algún tipo de envejecimiento presentan una acumulación mayor de agregados de proteínas carboniladas, en comparación con células más jóvenes o con un potencial de replicación no disminuido.

En el trabajo de (Lindner, Madden, Demarez, Stewart, & Taddei, 2008), en *E. coli* se reporta la presencia de cuerpos de inclusión inducidos al haber una sobreproducción de proteínas o bajo condiciones de estrés oxidante o térmico, que se forman en posiciones celulares discretas. Estos cuerpos de inclusión fueron detectados mediante la fusión fluorescente de una proteína de choque térmico denominada LbpA (proteína A de cuerpos de inclusión, por sus siglas en inglés).

Los cuerpos de inclusión se acumulan en los polos viejos de las células al dividirse, de donde raramente se mueven. En células que presentan cuerpos de inclusión de mayor tamaño, la tasa de reproducción y la tasa de crecimiento disminuyen en comparación con células que no presentan estos cuerpos de inclusión (Lindner et al., 2008).

En *C. crescentus* se observa un patrón de carbonilación de proteínas en el que no hay mucha diferencia entre la célula progenitora y la célula hija, adicionalmente la señal está distribuida en varios cúmulos pequeños (figuras 21, 26 y 27C) y no en uno polar, como se ha reportado para *E. coli* (Lindner et al., 2008), lo que sugiere que bajo condiciones normales las proteínas carboniladas no se acumulan en un único cuerpo de inclusión, dificultando algún tipo de distribución diferencial de los agregados.

Adicionalmente, en una senescencia condicional ocasionada por la limitación de nutrientes, de espacio y la acumulación progresiva de metabolitos de desecho en un cultivo cerrado, podría ocasionar patrones de agregación de proteínas distintos a los presentados en una senescencia generacional (Książek, 2010).

Se ha propuesto, además, que la carbonilación en las bacterias no proliferantes en cultivos estacionarios (senescencia condicionada) fuera causada por un aumento en la síntesis de proteínas defectivas, sobresaturando las chaperonas de estrés térmico, ya que en mutantes con ribosomas híper funcionales se mostró un decremento significativo en la carbonilación de proteínas en etapas tempranas de este tipo de senescencia. La inducción de la respuesta a choque térmico puede contrarrestar, en parte, el efecto de la deficiente traducción proteica y así atenuar la carbonilación en el estado inducido de estasis (Ballesteros, Fredriksson, Henriksson, & Nyström, 2001).

Es por ello que el modelo propuesto en este trabajo evita que se dé un envejecimiento condicionado a la saturación del cultivo, en cambio, el patrón de carbonilación de proteínas es más parecido a un envejecimiento dado por la cantidad de divisiones celulares que puede mostrar una célula, y por ello puede correlacionar ambas afirmaciones para sentar las bases del estudio de la senescencia generacional en procariontes y no estar atado a las posibles limitantes de la senescencia condicional.

Los análisis de la tasa de crecimiento de las tres poblaciones celulares de *C. crescentus* después de ser sometidas a un estrés oxidativo con peróxido de hidrógeno no letal, muestran un arresto del crecimiento, en el que la célula se recupera del estrés, llevando a cabo la reparación de las macromoléculas y la segregación de las proteínas carboniladas (figura 15, anexo 1) para poder recuperar la tasa de crecimiento normal.

Esto se corrobora con los resultados obtenidos mediante la detección *in-situ* de las proteínas carboniladas (figuras 21, 26-28). El que sólo el 50% de las células muestren aparentemente una mayor concentración de proteínas carboniladas en el compartimento celular correspondiente al polo prostecado (progenitor), puede deberse a que el estrés oxidante al que fueron sometidas las células antes de la detección *in-situ*, ocasionó daños en los polos correspondientes a las células hijas en los que pudieron haber sido retenidas algunas proteínas carboniladas.

La tendencia que se muestra de acumular material dañado progresivamente en células más viejas, concuerda de igual manera con las propuestas evolutivas de que el envejecimiento o la senescencia generacional es probablemente una propiedad fundamental de todos los organismos celulares. Al hacer que las mutaciones deletéreas o cualquier otro tipo de daño relacionado con el envejecimiento se vuelva relevante en etapas tardías de la vida, se evita el debilitamiento de toda la población, atenuando el efecto de la selección (Ackermann et

al., 2007), sugiriendo las bacterias no pueden evadir la acumulación de dichas mutaciones o material dañado a través de su expectativa de vida, llevando a estos organismos a un envejecimiento como tal.

La alta dinámica y regulación del ciclo celular de *C. crescentus* muestra una amplia gama de proteínas que pueden ser utilizadas como marcadores de polaridad para determinar la ubicación de los cúmulos de proteínas carboniladas. En el caso de este trabajo, la utilización de la proteína DivJ fusionada con una proteína reportera fluorescente fue útil para determinar la polaridad de la célula en etapas intermedias y avanzadas del ciclo celular. Sin embargo, para determinar etapas tempranas del ciclo se necesitan reporteros de fusión con proteínas nativas que se acumulen en los polos en etapas tempranas del mismo.

Estos resultados presentan evidencia preliminar de una de las posibles bases moleculares del envejecimiento en *C. crescentus*, abriendo el camino para muchas otras interrogantes que surgen o que pueden plantearse a partir de los datos obtenidos aquí. Por ejemplo, se podría cuantificar por determinaciones densitométricas el contenido de carbonilos de bandas o puntos de interés, en los geles de los Western-blot.

La relación entre la intensidad de la señal de los carbonilos y la intensidad de la señal de las proteínas daría el contenido específico de carbonilos de la proteína que es de interés, la cual se podría expresar igualmente como nmol-carbonilos/mg-proteína siempre y cuando se utilice una proteína estándar oxidada como marcador (Yan & Forster, 2011). Además, los pesos moleculares de las proteínas carboniladas podrían ser comparados con los de las principales proteínas susceptibles a carbonilación, para identificar aquellas que se encuentran en mayor proporción, e inferir las funciones celulares con las que están relacionadas.

Existen reportes también de que genes para la superóxido dismutasa, catalasas-peroxidasas, reguladores de respuesta a estrés oxidativo como *SkpA*, *rho*, entre otros, aumentan su expresión en células senescentes. El daño a las proteínas codificadas por estos genes podría también correlacionarse con una tasa de envejecimiento más alta en procariontes. O bien, en caso contrario, ayudar a la bacteria a aumentar su expectativa de vida.

Conclusiones

En condiciones óptimas de cultivo existen proteínas carboniladas en las células de *C. crescentus*, sin embargo, se puede aplicar un estrés oxidante con peróxido de hidrógeno al 0.05mM para aumentar la concentración de estas proteínas, sin causar una muerte celular significativa.

Se detectó por western-blot una mayor concentración de proteínas carboniladas en células prostecadas progenitoras que en células *swarmer*.

Con microscopía de epifluorescencia se determinó *in-situ* que un 53% de la población celular mantiene las proteínas carboniladas en la célula progenitora después de la división celular.

Los datos presentados, sugieren que el estudio de proteínas dañadas por oxidación (carboniladas) es una alternativa viable para el estudio del envejecimiento en *C. crescentus*, ya que es posible que una senescencia generacional en este organismo procarionte se encuentre guiada por la acumulación de proteínas dañadas en las células progenitoras, con una tendencia a una distribución asimétrica de dicho material durante las divisiones celulares.

Debido a la duración del ciclo de vida de los procariontes y de su expectativa de vida, se propone realizar estudios en los que exista una diferencia generacional de más de 100 divisiones para observar diferencias más evidentes en las concentraciones de proteínas carboniladas como consecuencia del envejecimiento.

Referencias

- Ackermann, M., Schauerte, A., Stearns, S. C., & Jenal, U. (2007). Experimental evolution of aging in a bacterium. *BMC Evolutionary Biology*, 7, 126. <http://doi.org/10.1186/1471-2148-7-126>
- Ackermann, M., Stearns, S. C., & Jenal, U. (2003). Senescence in a bacterium with asymmetric division. *Science (New York, N.Y.)*, 300(5627), 1920. <http://doi.org/10.1126/science.1083532>
- Aguilaniu, H., Gustafsson, L., Rigoulet, M., & Nyström, T. (2003). Asymmetric Inheritance of Oxidatively Damaged Proteins During Cytokinesis. *Science*, 299(5613), 1751–1753. <http://doi.org/10.1126/science.1080418>
- Ahmed, E. K., Picot, C. R., Bulteau, A. L., & Friguet, B. (2007). Protein oxidative modifications and replicative senescence of WI-38 human embryonic fibroblasts. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1119(1), 88–96. <http://doi.org/10.1196/annals.1404.020>
- Alvarez-Martinez, C. E., Baldini, R. L., & Gomes, S. L. (2006). A *Caulobacter crescentus* extracytoplasmic function sigma factor mediating the response to oxidative stress in stationary phase. *Journal of Bacteriology*, 188(5), 1835–1846. <http://doi.org/10.1128/JB.188.5.1835-1846.2006>
- Ardissone, S., & Viollier, P. H. (2015). Interplay between flagellation and cell cycle control in *Caulobacter*. *Current Opinion in Microbiology*, 28, 83–92. <http://doi.org/10.1016/j.mib.2015.08.012>
- Ballesteros, M., Fredriksson, A., Henriksson, J., & Nyström, T. (2001). Bacterial senescence: Protein oxidation in non-proliferating cells is dictated by the accuracy of the ribosomes. *EMBO Journal*, 20(18), 5280–5289. <http://doi.org/10.1093/emboj/20.18.5280>
- Brown, P. J. B., Hardy, G. G., Trimble, M. J., & Brun, Y. V. (2008). Complex Regulatory Pathways Coordinate Cell-Cycle Progression and Development in *Caulobacter crescentus*. *Advances in Microbial Physiology*, 54(8), 1–101. [http://doi.org/10.1016/S0065-2911\(08\)00001-5](http://doi.org/10.1016/S0065-2911(08)00001-5)
- Buss, H., Chan, T. P., Sluis, K. B., Domigan, N. M., & Winterbourn, C. C. (1997). Protein carbonyl measurement by a sensitive ELISA method. *Free Radical Biology and Medicine*, 23(3), 361–366. [http://doi.org/10.1016/S0891-5849\(97\)00104-4](http://doi.org/10.1016/S0891-5849(97)00104-4)
- Cabiscol, E., Tamarit, J., & Ros, J. (2014). Protein carbonylation: Proteomics, specificity and relevance to aging. *Mass Spectrometry Reviews*, 33(1), 21–48. <http://doi.org/10.1002/mas.21375>
- Calderwood, S. K., Murshid, A., & Prince, T. (2009). The shock of aging: Molecular chaperones and the heat shock response in longevity and aging - A mini-review. *Gerontology*. <http://doi.org/10.1159/000225957>
- Chen, Y. E., Tropini, C., Jonas, K., Tsokos, C. G., Huang, K. C., & Laub, M. T. (2011). Spatial gradient of protein phosphorylation underlies replicative asymmetry in a bacterium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(3), 1052–1057. <http://doi.org/10.1073/pnas.1015397108>

- Chondrogianni, N., Petropoulos, I., Grimm, S., Georgila, K., Catalgol, B., Friguet, B., ... Gonos, E. S. (2014). Protein damage, repair and proteolysis. *Molecular Aspects of Medicine*, 35(1), 1–71. <http://doi.org/10.1016/j.mam.2012.09.001>
- Collier, J. (2016). Cell cycle control in Alphaproteobacteria. *Current Opinion in Microbiology*, 30, 107–113. <http://doi.org/10.1016/j.mib.2016.01.010>
- Cronan, J. E. (1968). Phospholipid alterations during growth of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 95(6), 2054–2061. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=315134&tool=pmcentrez&endertype=abstract>
- Dalle-Donne, I., Carini, M., Orioli, M., Vistoli, G., Regazzoni, L., Colombo, G., ... Aldini, G. (2009). Protein carbonylation: 2,4-dinitrophenylhydrazine reacts with both aldehydes/ketones and sulfenic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 46(10), 1411–1419. <http://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.02.024>
- Davies, S. M. K., Poljak, A., Duncan, M. W., Smythe, G. A., & Murphy, M. P. (2001). Measurements of protein carbonyls, ortho- and meta-tyrosine and oxidative phosphorylation complex activity in mitochondria from young and old rats. *Free Radical Biology and Medicine*, 31(2), 181–190. [http://doi.org/10.1016/S0891-5849\(01\)00576-7](http://doi.org/10.1016/S0891-5849(01)00576-7)
- Desnues, B., Cuny, C., Grégori, G., Dukan, S., Aguilaniu, H., & Nyström, T. (2003). Differential oxidative damage and expression of stress defence regulons in culturable and non-culturable *Escherichia coli* cells. *EMBO Reports*, 4(4), 400–404. <http://doi.org/10.1038/sj.embor.embor799>
- Erjavec, N., Larsson, L., Grantham, J., & Nyström, T. (2007). Accelerated aging and failure to segregate damaged proteins in Sir2 mutants can be suppressed by overproducing the protein aggregation-remodeling factor Hsp104p. *Genes and Development*, 21(19), 2410–2421. <http://doi.org/10.1101/gad.439307>
- Feng, J., Xie, H., Meany, D. L., Thompson, L. V., Arriaga, E. A., & Griffin, T. J. (2008). Quantitative proteomic profiling of muscle type-dependent and age-dependent protein carbonylation in rat skeletal muscle mitochondria. *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences*, 63(11), 1137–52. <http://doi.org/63/11/1137> [pii]
- Fredriksson, Å., Ballesteros, M., Dukan, S., & Nyström, T. (2005). Defense against protein carbonylation by DnaK/DnaJ and proteases of the heat shock regulon. *Journal of Bacteriology*, 187(12), 4207–4213. <http://doi.org/10.1128/JB.187.12.4207-4213.2005>
- Gorbatyuk, B., & Marczynski, G. T. (2001). Physiological consequences of blocked *Caulobacter crescentus* dnaA expression, an essential DNA replication gene. *Molecular Microbiology*, 40(2), 485–497. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02404.x>
- Grillari, J., Grillari-Voglauer, R., & Jansen-Dürr, P. (2010). Post-translational modification of cellular proteins by ubiquitin and ubiquitin-like molecules: Role in cellular senescence and aging. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 694, 172–196. http://doi.org/10.1007/978-1-4419-7002-2_13
- Grune, T., Jung, T., Merker, K., & Davies, K. J. A. (2004). Decreased proteolysis caused by protein aggregates, inclusion bodies, plaques, lipofuscin, ceroid, and

- “aggresomes” during oxidative stress, aging, and disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 36(12), 2519–2530.
<http://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.04.020>
- Herman, P. K. (2002). Stationary phase in yeast. *Current Opinion in Microbiology*, 5(6), 602–607. [http://doi.org/10.1016/S1369-5274\(02\)00377-6](http://doi.org/10.1016/S1369-5274(02)00377-6)
- Hinkal, G. W., Gatza, C. E., Parikh, N., & Donehower, L. A. (2009). Altered senescence, apoptosis, and DNA damage response in a mutant p53 model of accelerated aging. *Mechanisms of Ageing and Development*, 130(4), 262–271.
<http://doi.org/10.1016/j.mad.2009.01.001>
- Holtzendorff, J., Reinhardt, J., & Viollier, P. H. (2006). Cell cycle control by oscillating regulatory proteins in *Caulobacter crescentus*. *BioEssays*, 28(4), 355–361.
<http://doi.org/10.1002/bies.20384>
- Irazusta, V., Moreno-Cermeno, A., Cabisco, E., Tamarit, J., & Ros, J. (2010). Proteomic Strategies for the Analysis of Carbonyl Groups on Proteins. *Current Protein & Peptide Science*, 11(8), 652–658. <http://doi.org/10.2174/138920310794557664>
- Kirkwood, T. B. L. (2005). Understanding the odd science of aging. *Cell*, 120(4), 437–447.
<http://doi.org/10.1016/j.cell.2005.01.027>
- Książek, K. (2010). Let's stop overlooking bacterial aging. *Biogerontology*, 11(6), 717–723.
<http://doi.org/10.1007/s10522-010-9278-3>
- Lam, H., Oh, D.-C., Cava, Felipe, Takacs, C. N., Jon, C., de Pedro, M. a., & Waldor, M. K. (2009). D-Amino Acids Govern Stationary Phase. *Science*, 325(September), 1552–1555. <http://doi.org/10.1126/science.1178123>
- Lange, R., & Hengge-Aronis, R. (1991). Growth phase-regulated expression of *bolA* and morphology of stationary-phase *Escherichia coli* cells are controlled by the novel sigma factor σ^{S} . *Journal of Bacteriology*, 173(14), 4474–4481. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=208111&tool=pmcentrez&endertype=abstract>
- Lasker, K., Mann, T. H., & Shapiro, L. (2016). An intracellular compass spatially coordinates cell cycle modules in *Caulobacter crescentus*. *Current Opinion in Microbiology*, 33, 131–139. <http://doi.org/10.1016/j.mib.2016.06.007>
- Laub, M. T., McAdams, H. H., Feldblyum, T., Fraser, C. M., & Shapiro, L. (2000). Global Analysis of the Genetic Network Controlling a Bacterial Cell Cycle. *Science*, 290(5499), 2144–2148. <http://doi.org/10.1126/science.290.5499.2144>
- Levine, R. L., Williams, J. A., Stadtman, E. R., & Shacter, E. (1994). Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. In *Methods in Enzymology* (Vol. 233, pp. 346–357). [http://doi.org/10.1016/S0076-6879\(94\)33040-9](http://doi.org/10.1016/S0076-6879(94)33040-9)
- Li, G., Brun, Y. V., & Tang, J. X. (2013). Holdfast spreading and thickening during *Caulobacter crescentus* attachment to surfaces. *BMC Microbiology*, 13(1), 139.
<http://doi.org/10.1186/1471-2180-13-139>
- Lindner, A. B., & Demarez, A. (2009). Protein aggregation as a paradigm of aging. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1790(10), 980–996.
<http://doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.06.005>

- Lindner, A. B., Madden, R., Demarez, A., Stewart, E. J., & Taddei, F. (2008). Asymmetric segregation of protein aggregates is associated with cellular aging and rejuvenation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(8), 3076–81. <http://doi.org/10.1073/pnas.0708931105>
- Liu, B., Larsson, L., Caballero, A., Hao, X., Öling, D., Grantham, J., & Nyström, T. (2010). The Polarisome Is Required for Segregation and Retrograde Transport of Protein Aggregates. *Cell*, *140*(2), 257–267. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2009.12.031>
- Liu, B., Larsson, L., Franssens, V., Hao, X., Hill, S. M., Andersson, V., ... Nyström, T. (2011). Segregation of protein aggregates involves actin and the polarity machinery. *Cell*, *147*(5), 959–961. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2011.11.018>
- Luo, S., & Wehr, N. B. (2009). Protein carbonylation: avoiding pitfalls in the 2,4-dinitrophenylhydrazine assay. *Redox Report*, *14*(4), 159–166. <http://doi.org/10.1179/135100009X392601>
- MacLean, M., Harris, N., & Piper, P. W. (2001). Chronological lifespan of stationary phase yeast cells; a model for investigating the factors that might influence the ageing of postmitotic tissues in higher organisms. *Yeast*, *18*(6), 499–509. <http://doi.org/10.1002/yea.701>
- Maisonneuve, E., Ezraty, B., & Dukan, S. (2008). Protein aggregates: An aging factor involved in cell death. *Journal of Bacteriology*, *190*(18), 6070–6075. <http://doi.org/10.1128/JB.00736-08>
- Makinoshima, H., Nishimura, A., & Ishihama, A. (2002). Fractionation of Escherichia coli cell populations at different stages during growth transition to stationary phase. *Molecular Microbiology*, *43*(2), 269–279. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02746.x>
- Mannarino, S. C., Amorim, M. A., Pereira, M. D., Moradas-Ferreira, P., Panek, A. D., Costa, V., & Eleutherio, E. C. A. (2008). Glutathione is necessary to ensure benefits of calorie restriction during ageing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mechanisms of Ageing and Development*, *129*(12), 700–705. <http://doi.org/10.1016/j.mad.2008.09.001>
- Microbewiki, F., & Wikipedia, F. (1964). *Caulobacter crescentus*. *Current Biology*, *5*(8), 1–6. <http://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000463>
- Møller, I. M., Rogowska-Wrzesinska, A., & Rao, R. S. P. (2011). Protein carbonylation and metal-catalyzed protein oxidation in a cellular perspective. *Journal of Proteomics*, *74*(11), 2228–2242. <http://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.05.004>
- Montero Llopis, P., Jackson, A. F., Sliusarenko, O., Surovtsev, I., Heinritz, J., Emonet, T., & Jacobs-Wagner, C. (2010). Spatial organization of the flow of genetic information in bacteria. *Nature*, *466*(7302), 77–81. <http://doi.org/10.1038/nature09152>
- Nierman, W. C., Feldblyum, T. V., Laub, M. T., Paulsen, I. T., Nelson, K. E., Eisen, J., ... Fraser, C. M. (2001). Complete genome sequence of *Caulobacter crescentus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*(7), 4136–4141. <http://doi.org/10.1073/pnas.061029298>
- Oliver, C. N., Ahn, B. W., Moerman, E. J., Goldstein, S., & Stadtman, E. R. (1987). Age-related changes in oxidized proteins. *Journal of Biological Chemistry*, *262*(12), 5488–

5491. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3571220>

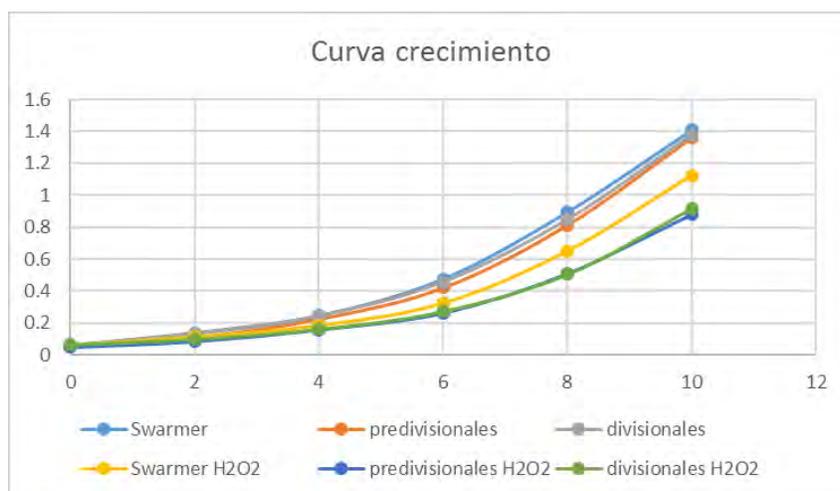
- Papáček S., Š., Čelikovský, S., Reháč, B., & Štys, D. (2010). Experimental design for parameter estimation of two time-scale model of photosynthesis and photoinhibition in microalgae. *Mathematics and Computers in Simulation*, *80*(6), 1302–1309. <http://doi.org/10.1016/j.matcom.2009.06.033>
- Passerat, J., Got, P., Dukan, S., & Monfort, P. (2009). Respective roles of culturable and viable-but-nonculturable cells in the heterogeneity of *Salmonella enterica* serovar typhimurium invasiveness. *Applied and Environmental Microbiology*, *75*(16), 5179–5185. <http://doi.org/10.1128/AEM.00334-09>
- Poindexter, J. S., & Staley, J. T. (1996). *Caulobacter* and *Asticcacaulis* stalk bands as indicators of stalk age. *Journal of Bacteriology*, *178*(13), 3939–3948. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=232657&tool=pmcentrez&endertype=abstract>
- Quon, K. C., Yang, B., Domian, I. J., Shapiro, L., & Marczynski, G. T. (1998). Negative control of bacterial DNA replication by a cell cycle regulatory protein that binds at the chromosome origin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(1), 120–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9419339%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC18146>
- Radhakrishnan, S. K., Pritchard, S., & Viollier, P. H. (2010). Coupling Prokaryotic Cell Fate and Division Control with a Bifunctional and Oscillating Oxidoreductase Homolog. *Developmental Cell*, *18*(1), 90–101. <http://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.10.024>
- Reverter-Branchat, G., Cabiscol, E., Tamarit, J., & Ros, J. (2004). Oxidative damage to specific proteins in replicative and chronological-aged *Saccharomyces cerevisiae*. Common targets and prevention by calorie restriction. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(30), 31983–31989. <http://doi.org/10.1074/jbc.M404849200>
- Robinson, C. E., Keshavarzian, a, Pasco, D. S., Frommel, T. O., Winship, D. H., & Holmes, E. W. (1999). Determination of protein carbonyl groups by immunoblotting. *Analytical Biochemistry*, *266*(1), 48–57. <http://doi.org/10.1006/abio.1998.2932>
- Sanselicio, S., Bergé, M., Théraulaz, L., Radhakrishnan, S. K., & Viollier, P. H. (2015). Topological control of the *Caulobacter* cell cycle circuitry by a polarized single-domain PAS protein. *Nature Communications*, *6*(May), 7005. <http://doi.org/10.1038/ncomms8005>
- Schrader, J. M., & Shapiro, L. (2015). Synchronization of *Caulobacter crescentus* for investigation of the bacterial cell cycle. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, *2*(98), e52633. <http://doi.org/10.3791/52633>
- Siegal-Gaskins, D., & Crosson, S. (2008). Tightly-Regulated and Heritable Division Control in Single Bacterial Cells. *Biophys. J.*, *95*(4), biophysj.108.128785. <http://doi.org/10.1529/biophysj.108.128785>
- Sinclair, D. A. (2002). Paradigms and pitfalls of yeast longevity research. *Mechanisms of Ageing and Development*, *123*(8), 857–867. [http://doi.org/10.1016/S0047-6374\(02\)00023-4](http://doi.org/10.1016/S0047-6374(02)00023-4)
- Skerker, J. M., Prasol, M. S., Perchuk, B. S., Biondi, E. G., & Laub, M. T. (2005). Two-

- component signal transduction pathways regulating growth and cell cycle progression in a bacterium: A system-level analysis. *PLoS Biology*, 3(10), e334. <http://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030334>
- Sohal, R. S., Sohal, B. H., & Orr, W. C. (1995). Mitochondrial superoxide and hydrogen peroxide generation, protein oxidative damage, and longevity in different species of flies. *Free Radical Biology and Medicine*, 19(4), 499–504. [http://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)00037-X](http://doi.org/10.1016/0891-5849(95)00037-X)
- Stewart, E. J., Madden, R., Paul, G., & Taddei, F. (2005). Aging and death in an organism that reproduces by morphologically symmetric division. *PLoS Biology*, 3(2), 0295–0300. <http://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030045>
- Subramanian, K., Paul, M. R., & Tyson, J. J. (2015). Dynamical Localization of DivL and PleC in the Asymmetric Division Cycle of *Caulobacter crescentus*: A Theoretical Investigation of Alternative Models. *PLOS Computational Biology*, 11(7), e1004348. <http://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004348>
- Tamarit, J., de Hoogh, A., Obis, E., Alsina, D., Cabiscol, E., & Ros, J. (2012). Analysis of oxidative stress-induced protein carbonylation using fluorescent hydrazides. *Journal of Proteomics*, 75(12), 3778–3788. <http://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.04.046>
- Thanbichler, M., Iniesta, A. A., & Shapiro, L. (2007). A comprehensive set of plasmids for vanillate - And xylose-inducible gene expression in *Caulobacter crescentus*. *Nucleic Acids Research*, 35(20), e137. <http://doi.org/10.1093/nar/gkm818>
- Werner-Washburne, M., Braun, E. L., Crawford, M. E., & Peck, V. M. (1996). Stationary phase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology*, 19(6), 1159–1166. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1996.tb02461.x>
- Wolf, S. G., Frenkiel, D., Arad, T., Finkel, S. E., Kolter, R., & Minsky, a. (1999). DNA protection by stress-induced biocrystallization. *Nature*, 400(6739), 83–85. <http://doi.org/10.1038/21918>
- Yan, L. J., & Forster, M. J. (2011). Chemical probes for analysis of carbonylated proteins: A review. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 879(17–18), 1308–1315. <http://doi.org/10.1016/j.jchromb.2010.08.004>
- Yoshida, H., Yamamoto, H., Uchiumi, T., & Wada, A. (2004). RMF inactivates ribosomes by covering the peptidyl transferase centre and entrance of peptide exit tunnel. *Genes to Cells*, 9(4), 271–278. <http://doi.org/10.1111/j.1356-9597.2004.00723.x>
- Zhou, B., Schrader, J. M., Kalogeraki, V. S., Abeliuk, E., Dinh, C. B., Pham, J. Q., ... Shapiro, L. (2015). The Global Regulatory Architecture of Transcription during the *Caulobacter* Cell Cycle. *PLoS Genetics*, 11(1). <http://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004831>

Apéndice I

Sobrevivencia celular y tasa de crecimiento en las tres poblaciones distintas de *C. crescentus* con un tratamiento de estrés oxidante.

La tasa de crecimiento de las distintas poblaciones de *C. crescentus* sometidas o no al tratamiento oxidante se determinó con la DO_{660} de una alícuota del cultivo en determinadas horas. Con ello, se obtuvieron curvas de crecimiento exponencial para cada una de las poblaciones celulares.



Al analizar el logaritmo del crecimiento exponencial para cada población, se observó un patrón en el que en las primeras 4 horas inmediatas al estrés oxidante, el crecimiento del cultivo muestra una tasa de crecimiento más lenta. Inmediatamente después de aplicar el estrés, los cultivos se ajustaron a concentraciones similares, como se observa en el primer punto de las gráficas A, C y E.

Sin embargo, las alícuotas medidas hasta las 4 primeras horas muestran pendientes distintas comparándolas con las células control en cada caso. Esta diferencia en la pendiente se traduce como un retraso en el crecimiento del cultivo. La tasa de crecimiento se midió en función del tiempo de generación celular, dado por la pendiente de la recta de la gráfica del logaritmo de las densidades ópticas medidas en la curva de crecimiento.

$$\text{Tiempo de generación} = \frac{\ln 2}{m}$$

Posterior a estas 4 horas, la tasa de crecimiento se normalizó, observándose en las gráficas B, D y F, que las pendientes tanto de los controles, como de las células tratadas son similares.

