



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Caracterización de la localización de las proteínas
tipo OmpA de *Caulobacter crescentus* y su papel en
la estabilidad de la membrana externa.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Biólogo

P R E S E N T A:

Luis David Ginez Vázquez



DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Sebastián Poggio Ghilarducci

Ciudad Universitaria, Ciudad de México. Abril
de 2018.



Universidad Nacional
Autónoma de México



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

Ginez
Vázquez
Luis David
55 21 49 99 56
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
410056075

2. Datos del Tutor

Dr
Sebastián
Poggio
Ghilarducci

3. Datos del sinodal 1

Dra
Claudia Andrea
Segal
Kischinevzky

4. Datos del sinodal 2

Dra
Laura
Kawasaki
Watanabe

5. Datos del sinodal 3

Dra
Wendy
Xolalpa
Villanueva

6. Datos del sinodal 4

Dr
Juan Luis
Chávez
Pacheco

7. Datos del trabajo escrito

Caracterización de la localización de las proteínas tipo OmpA de *Caulobacter crescentus* y su papel en la estabilidad de la membrana externa.

105 p
2018

A mi familia.

Agradecimientos

Este trabajo se realizó bajo la tutoría del Dr. Sebastian Poggio Ghilarducci en el Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB), UNAM y con el financiamiento parcial del programa PAPIIT/DGAPA IN210511.

Agradezco a la Facultad de Ciencias de la UNAM, donde cursé mis estudios de licenciatura y conocí a personas que impactaron mi trayectoria académica, en particular a la Dra. Martha Martínez, al Dr. Alejandro Marché, a la Dra. Claudia Segal, a la Dra. Wendy Xolalpa, a la Dra. Josefina Herrera, al Dr. Gerardo Vázquez-Nin, a la Dra. Olga Echeverría y al Dr. Juan Luis Chávez.

A los revisores de este trabajo por sus acertadas observaciones y correcciones.

A mi tutor, el Dr. Sebastian Poggio, por todo el apoyo y confianza brindados para mi formación como futuro investigador, también a la Dra. Laura Camarena y a la Dra. Clelia Domenzain por sus observaciones, consejos y contribuciones a este proyecto.

A la QFB Aurora Osorio Franco, por compartirme un poco de su vasta experiencia en el trabajo experimental desde mis primeros tropiezos en este laboratorio, por sus consejos, atenciones, cariño y por aquellas frases que seguro recordaré siempre.

A mis compañeros de laboratorio en el IIB, quienes han hecho aún más amenas nuestra estancia y labores de aprendizaje e investigación a lo largo de varias generaciones.

A mis amigos Karla Rodríguez y Alberto Ramos, con quienes he compartido más alegrías que tristezas y numerosas experiencias académicas.

Por último, pero con especial énfasis, agradezco a mi familia: a mis padres, Mariana y Simón, quienes merecen mi admiración, amor y respeto; a mis hermanas, Ana y Fabiola, con quienes crecí entre cariño, risas, juegos, peleas, consejos y retos y a sus compañeros de vida: Marco y Raúl, de quienes he recibido apoyo siempre que lo he necesitado; a mi querida sobrina Abril por su cariño sincero y de quien espero ser un buen ejemplo y amigo. A mis abuelos Federico, Isaura, Rosendo y Agustina, aunque algunos de ellos ya no estén con nosotros.

ÍNDICE

Resumen	7
Introducción	8-41
1. Estructura de la envoltura celular en bacterias didermas	9-18
1.1 La membrana plasmática o membrana interna	10
1.2 El periplasma	11
1.3 La pared celular de peptidoglicano	12
1.4 La membrana externa	15
2. Mantenimiento de la estabilidad de la envoltura celular	18-33
2.1 Lipoproteína de Braun	18
2.2 Proteínas del complejo Tol-Pal	22
2.3 OmpA: estructura, función y expresión	26
2.4 Mecanismos globales que mantienen la integridad de la envoltura celular	32
3. Características de <i>Caulobacter crescentus</i>	34-41
3.1 Ciclo celular	34
3.2 Organización lineal del cromosoma	35
3.3 Adaptaciones a condiciones limitadas en nutrientes	37
3.4 Caracterización de la envoltura celular	38
3.5 Mantenimiento de la integridad de la envoltura celular	39
Hipótesis	41
Objetivos	41
Resultados	42-67
1. El genoma de <i>Caulobacter crescentus</i> codifica para dos proteínas con similitud estructural a OmpA de <i>E. coli</i>	42
2. OmpA1 y OmpA2 son proteínas secretadas a través de la membrana interna	44
3. Predicción de las características estructurales de OmpA1 y OmpA2	45
4. OmpA1 y OmpA2 son importantes en el mantenimiento de la estabilidad de la envoltura celular en <i>C. crescentus</i>	49

5. Participación de OmpA1 y OmpA2 en el crecimiento de la prosteca de <i>C. crescentus</i>	55
6. Distribución de OmpA1 y OmpA2 en el cuerpo celular de <i>C. crescentus</i> .	
a) OmpA1 se localiza de forma dispersa en <i>C. crescentus</i>	56
b) OmpA2 forma un gradiente de concentración a partir del polo celular prostecado	59
7. La formación del gradiente de OmpA2 comienza en etapas tempranas del ciclo celular	61
8. OmpA2 se distribuye de manera homogénea cuando se expresa a partir de un plásmido	62
9. La localización de OmpA2 en <i>C. crescentus</i> depende de la posición del gen en el cromosoma	64
10. La localización de OmpA2 es relevante para la función de la proteína	66
Discusión	68
Conclusiones	76
Material y métodos	77
Anexo 1. Construcción de plásmidos y obtención de cepas	88
Referencias	91

Resumen

La envoltura celular (EC) de las bacterias didermas (Gram-negativas) consta de la membrana interna (MI), la pared de peptidoglicano (PG) y la membrana externa (ME). En *E. coli*, su integridad se mantiene por la interacción entre las proteínas del complejo Tol-Pal, OmpA y Lpp consigo mismas y con la EC. Estas proteínas tienen redundancia funcional, puesto que ninguna es esencial, pero la ausencia de alguna de ellas ocasiona problemas en el crecimiento y la división así como la formación de vesículas de ME. La lipoproteína Lpp tiene una participación muy importante en esta función porque establece enlaces covalentes con el PG y su interacción con la ME mantiene a ambas capas en estrecha cercanía. Su presencia exclusiva en enterobacterias (como *E. coli*) sugiere la existencia de estrategias diferentes para la homeostasis de la EC en la mayoría de los grupos bacterianos. Este podría ser el caso de *Caulobacter crescentus*, bacteria que carece de Lpp o de cualquier otra proteína unida de forma covalente al PG. De manera consistente, en esta bacteria las proteínas Tol-Pal son esenciales y una reducción en su abundancia causa problemas en la EC y la división, fenotipos que conducen a la muerte.

En este trabajo caracterizamos dos proteínas tipo OmpA (OmpA1 y OmpA2) en *C. crescentus*. Ambas poseen un dominio barril beta de ME y conservan en su dominio C-terminal los residuos relevantes para su unión no-covalente con el PG. La elevada abundancia de OmpA2 es congruente con su contribución importante en la estabilidad de la EC (sobre todo en condiciones de estrés), así como en el crecimiento de la prosteca, mientras que OmpA1 tiene una participación secundaria en ambas funciones. Su fusión con una proteína fluorescente mostró que OmpA1 se distribuye de manera dispersa en la ME y que OmpA2 forma un gradiente de concentración a partir de la prosteca y el polo celular viejo. La localización de OmpA2 no depende del reconocimiento de ninguna señal particular en el polo prostecado, pero sí de la ubicación del gen en el cromosoma, el cual en *C. crescentus* tiene un arreglo longitudinal con respecto al cuerpo celular. Aunque la correcta localización de OmpA2 en el polo viejo es relevante para el crecimiento de la prosteca, no lo es para su función en la estabilidad de la envoltura celular.

En conjunto, nuestros resultados muestran que en *C. crescentus* OmpA1 y OmpA2 participan en la integridad de la EC y sugieren que la localización de OmpA2 depende de la difusión limitada de la proteína o sus intermediarios, ocupando la posición del gen en el cromosoma como una plataforma de organización.

INTRODUCCIÓN

La envoltura celular bacteriana (ECB) es una estructura multicapa compleja con una amplia diversidad de proteínas, que de acuerdo con predicciones bioinformáticas, constituyen cerca del 30% de los proteomas bacterianos (Díaz-Mejía *et al.*, 2009). Su función es proteger a la célula frente a condiciones ambientales variables, impredecibles y a menudo hostiles (Silhavy *et al.*, 2010).

La arquitectura de la ECB permite la distinción de dos grandes grupos, las bacterias Gram-positivas y las Gram-negativas. Las características que los definen son la presencia de una capa gruesa de peptidoglicano (PG) de 20 a 33nm y ausencia de membrana externa (ME) en el caso de las bacterias Gram-positivas y de forma contraria, una capa delgada de PG (de 3 a 8nm) y la presencia de ME en las Gram-negativas (**Figura 1**). El grosor de la capa de PG es el factor que diferencia ambos grupos mediante la tinción de Gram, técnica que ha sido el método de caracterización y diagnóstico microbiológico por excelencia desde 1884 (Beveridge, 2001). Sin embargo, esto ha conducido a sobre-simplificaciones respecto a la diversidad de la arquitectura de la ECB, sumado a la existencia de grupos bacterianos con un comportamiento aberrante de tinción. En este sentido, es más trascendente hacer referencia directa al número de membranas celulares, más que a las propiedades de tinción. Así, las bacterias con una membrana son consideradas de forma más apropiada como monodermas, mientras que aquellas con una membrana plasmática y una ME son consideradas didermas (Gupta, 1998).

De acuerdo con datos bioquímicos y genómicos, el grupo de las bacterias didermas es el de mayor distribución en el árbol filogenético bacteriano, pues incluye 17 de los 25 *phyla* descritos (Sutcliffe, 2010). De éstos, algunos *phyla* didermos poseen ME que carecen de ciertos componentes típicos, razón por la que son considerados didermos arquetipo y una transición evolutiva entre las bacterias mono- y didermas. El escenario evolutivo más plausible es el origen de las bacterias didermas a partir de las monodermas, donde la ME constituyó un mecanismo de defensa contra antibióticos. Esta estrategia fue empleada de manera independiente por varios grupos bacterianos, lo que llevó al desarrollo de ME con propiedades bioquímicas diferentes y es considerada una invención evolutiva aparentemente irreversible, dado que no se conocen ejemplos en los que esta estructura haya desaparecido (Gupta, 2011).

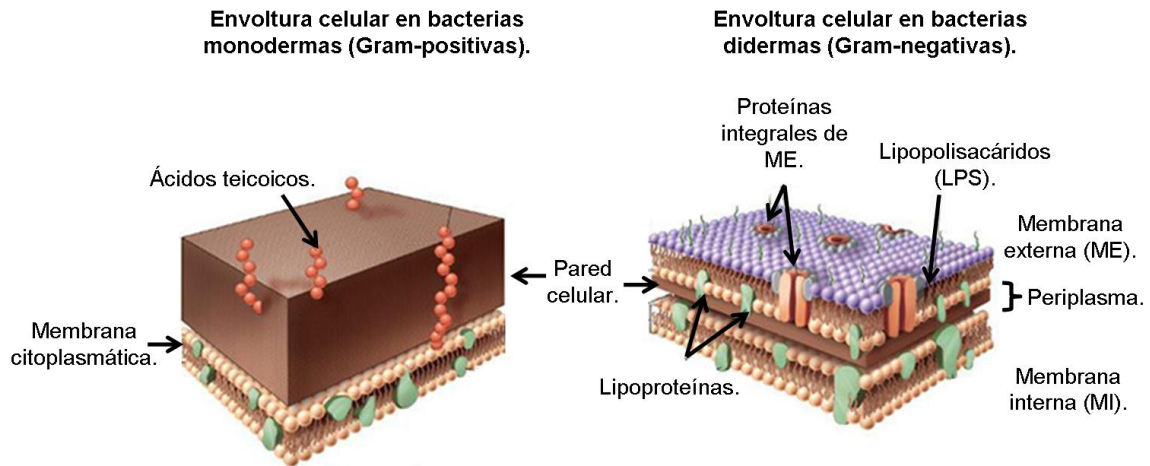


Figura 1. Características estructurales de la envoltura celular en bacterias monodermas y didermas típicas. En las primeras, es notable la gruesa capa de peptidoglicano (PG) y su modificación con ácidos teicoicos. Por su parte, las bacterias didermas, además de la membrana citoplasmática (o MI) poseen una membrana externa (ME) de composición lipídica asimétrica y de estado semicristalino, característica otorgada por los lipopolisacáridos (LPS); está decorada por proteínas únicas, tanto integrales como asociadas (lipoproteínas) y junto con la MI limita el espacio periplásmico, el cual alberga abundantes proteínas degradativas y una pared celular de grosor reducido. Modificado de <http://microbioenergetica.squarespace.com>.

1. Estructura de la envoltura celular en bacterias didermas (Gram-negativas).

La envoltura celular de las bacterias didermas consta de la pared de PG y dos membranas que delimitan el espacio periplásmico. Muchos grupos poseen una cubierta externa adicional conocida como capa S (*surface-layer*), la cual está constituida por una proteína de naturaleza oligomérica que integra una red ordenada y repetitiva alrededor de toda la superficie celular. Esta capa muestra una estabilidad extraordinaria ante condiciones adversas, por lo que contribuye al mantenimiento de la integridad de la envoltura celular (Fagan y Fairweather, 2014). De igual forma, diversos grupos bacterianos presentan una cápsula formada por polisacáridos y cuyas funciones son impedir la desecación y la fagocitosis y permitir la adhesión a superficies (Madigan *et al.*, 2002).

Los componentes de la ECB en bacterias didermas, descritos de adentro hacia fuera (de la MI hacia la ME), se detallan a continuación.

1.1 La membrana plasmática o membrana interna (MI).

La MI es una estructura común entre bacterias mono- y didermas y su principal función es delimitar y conferir unidad a la célula. La estructura fundamental de todas las membranas biológicas es una matriz bidimensional y simétrica de fosfolípidos, carbohidratos y proteínas, que se comporta como una solución viscosa y cuyo espesor promedio es de 30Å (Gorter y Grendel, 1924; Singer y Nicholson, 1972).

Algunas funciones de la membrana citoplásmica bacteriana son (Madigan *et al.*, 2002):

- 1) brindar unidad a la célula,
- 2) por su naturaleza lipídica, actúa como barrera selectiva de permeabilidad,
- 3) es el sitio de reacción del metabolismo celular,
- 4) es el lugar donde ocurre la generación de la fuerza protón motriz,
- 5) transporte de iones inorgánicos,
- 6) transducción de señales,
- 7) síntesis y exportación de todos los componentes de la pared celular y la ME.

Los fosfolípidos (FL) son compuestos de naturaleza anfipática y sus interacciones con moléculas hidrofílicas e hidrofóbicas, contribuyen a la estabilización de las membranas (Madigan *et al.*, 2002). En *Escherichia coli*, la MI está formada por 75% de fosfatidiletanolamina (FL zwitteriónico), 20% de fosfatidil-glicerol (FL aniónico) y 5% de cardiolipina (FL aniónico) (Raetz, 1978). Esta composición debe ser mantenida, puesto que la disminución en la síntesis de los FL más abundantes, resulta en alargamiento de las células, desacoplamiento de las membranas en regiones cercanas a los polos celulares y capacidad reducida para formar biopelículas (Rowlett *et al.*, 2017).

El modelo del mosaico fluido propone también que, en condiciones fisiológicas, los FL se desplazan libremente e intercambian posiciones dentro de la membrana. Dicho movimiento es conocido como difusión lateral y aunque es el más común, los FL también están sujetos a rotación, flexión y flip-flop (de una monocapa a la otra) (Singer y Nicholson, 1972). La fluidez de la membrana permite que sus componentes difundan desde los sitios en los que se insertan hasta regiones específicas de la célula, donde deben interactuar con otras moléculas; facilita su distribución equitativa entre las células hijas después de la división celular y es importante en la fusión de membranas. La fluidez de la membrana depende de su composición lipídica y de la temperatura ambiental. Una membrana es más rígida cuando los FL tienen ácidos grasos saturados, mientras que un incremento en la temperatura favorece la fluidez (Alberts *et*

al., 2006). Se ha reportado que algunos grupos bacterianos modifican la longitud e insaturación de sus lípidos de membrana cuando están expuestos a oscilaciones de temperatura, manteniendo así la viscosidad de la membrana o adaptándola a fluctuaciones en el ambiente (Chintalapati *et al.*, 2004; Davydova *et al.*, 2016).

Otra propiedad física de la membrana otorgada por los FL, es la flexibilidad. Cuando la célula crece, la membrana aumenta de superficie sin perder su continuidad y gracias a su capacidad de deformarse sin romperse permite cambios en la morfología celular (Alberts *et al.*, 2006). Por otra parte, en algunas bacterias, la membrana citoplásmica se invagina dando lugar a estructuras saculares conocidas como mesosomas, cuya formación aumenta en situaciones de estrés, como la exposición a antibióticos (Greenawalt *et al.*, 1975; Santhana *et al.*, 2007; Saier y Bogdanov, 2013).

Aunque la matriz de la MI está constituida por FL, las proteínas de membrana constituyen cerca del 50% del peso seco de una célula y desempeñan funciones como el transporte de nutrientes, metabolitos e iones, la detección de señales químicas extracelulares, la conversión de energía, así como múltiples reacciones enzimáticas del metabolismo celular (Alberts *et al.*, 2006).

Un gran número de proteínas están integradas en la MI mediante una, dos y tres (o más) alfa hélices transmembranales, razón por la cual se clasifican como mono-, bi- o politópicas, respectivamente (Lee H. y Kim H., 2014). En bacterias, el proceso de inserción de proteínas en la MI ocurre de manera co-traducciona por la partícula de reconocimiento de señales (SRP, *Signal Recognition Particle*), la cual consta de un complejo de RNA 4.5S y la proteína Ffh. Por lo general, SRP reconoce de forma específica el primer cruce transmembranal de las proteínas de MI y junto con su receptor asociado a membrana (FtsY), permite la entrega de la proteína naciente al aparato de translocación SecYEG ubicado en la membrana. De esta forma, se acopla la traducción de las proteínas transmembranales con su integración en la MI (Kudva *et al.*, 2013).

1.2 El periplasma.

Éste es un compartimento único de las bacterias didermas y en el caso de *E. coli*, mide de 12 a 15 nm. Es un ambiente de naturaleza oxidante, en el que los precursores nutricionales y biosintéticos así como algunos antibióticos son retenidos o modificados antes de entrar al citoplasma (Madigan *et al.*, 2002).

El periplasma tiene una viscosidad de $34 \pm 1.5 \text{cP}$, cerca de cuatro veces mayor que la del citoplasma ($9.7 \pm 2.3 \text{cP}$), esto se debe a la saturación con enzimas de funciones diversas (Brass, *et al.*, 1986; Mullineaux *et al.*, 2006). Algunas descomponen moléculas de gran tamaño o se unen con alta afinidad a diversos sustratos, facilitando su transporte hacia el citoplasma (Madigan *et al.*, 2002). Otras participan en la quimiotaxis, proceso que les permite a las bacterias sensor las condiciones químicas de su entorno, señalar esta información al interior de la célula y dirigirse o alejarse de dichos estímulos químicos (Ehrmann, 2007). El periplasma también protege a las bacterias contra antibióticos que interfieren con la síntesis de la pared celular, pues contiene enzimas que los modifican, inactivan o degradan. Es un espacio que secuestra enzimas degradativas tales como RNasa y fosfatasa alcalina, que de estar libres en el citoplasma, serían tóxicas. (Miller y Salama, 2018). Además, en el periplasma existen sistemas de proteínas con función de chaperona, que dirigen el plegamiento y evitan la agregación de proteínas periplásmicas y de ME (Rollauer *et al.*, 2015). También, en este espacio está confinada la pared celular, cuya biosíntesis y remodelación involucran proteínas periplásmicas y de membrana (De Pedro y Cava, 2015).

1.3 La pared celular de peptidoglicano.

La pared celular o sáculo de mureína, es una estructura de naturaleza glico-peptídica y polimérica que rodea a la célula bacteriana, le confiere forma y rigidez, previene la lisis osmótica y es esencial para el crecimiento y la división celular (Vollmer *et al.*, 2008; Cava y De Pedro, 2015). La pared se encuentra en la mayoría de las bacterias, excepto en algunos *phyla* como Planctomycetes y Tenericutes, donde se incluyen parásitos intracelulares (micoplasmas) y bacterias halófilas, que habitan medios hipertónicos e hiperosmóticos (Tocheva *et al.*, 2016).

Estructura del peptidoglicano (PG).

La unidad fundamental del PG es un disacárido formado por *N*-acetil-glucosamina (NAG) y ácido *N*-acetil-murámico (NAM) unidos a través de un enlace O-glicosídico $1\beta \rightarrow 4$. El residuo NAM posee un grupo O-lactilo, donde se une un pentapéptido que permite el entrecruzamiento entre hebras de glicano y la formación de la red (Schleifer y Kandler, 1972). El pentapéptido típico en las bacterias didermas es (L)-Ala-(D)-Glu-(γ)-(meso)-DAP-(D)-Ala-(D)-Ala, donde DAP representa al ácido meso-diaminopimélico, un aminoácido bacteriano único. Se estima que en *E. coli* el

contenido de estas unidades monoméricas es aproximadamente 3.5×10^6 copias (Wientjes *et al.*, 1991). De acuerdo con estudios de modelado molecular, esta unidad básica tiene propiedades bioquímicas y estructurales inusuales, con una disposición compacta en la que el residuo (D)-Ala terminal interactúa con (L)-Ala en la posición 1 del pentapéptido mediante enlaces de H (**Figura 2**). (Dmitriev *et al.*, 2005; Gumbart *et al.*, 2014).

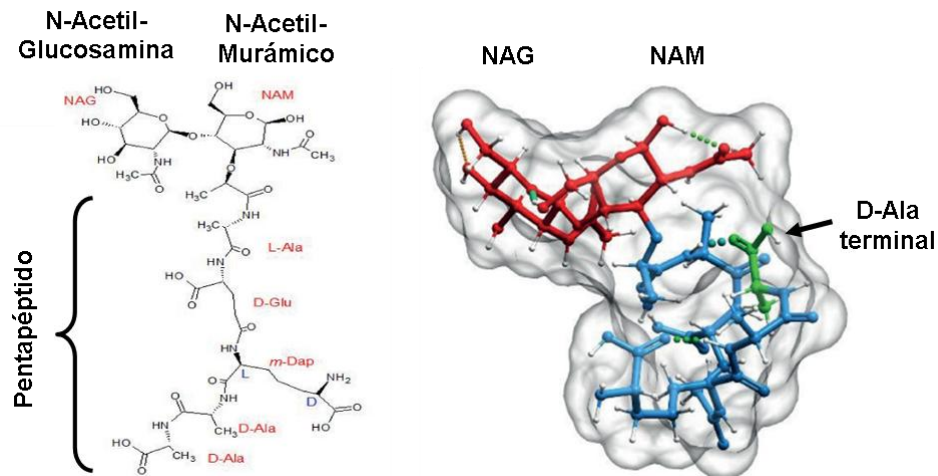


Figura 2. Estructura de la unidad fundamental del peptidoglicano. Disacárido formado por N-acetil-glucosamina y N-acetil-murámico, así como por un pentapéptido que incluye el residuo meso-DAP, característico de bacterias Gram-negativas. A la derecha, representación tridimensional obtenida mediante Chemscketch, donde se muestra el plegamiento del peptapéptido y la interacción del residuo D-Ala terminal (verde) con L-Ala en la posición 1. Modificado de De Pedro y Cava, 2015.

Para formar una red de naturaleza polimérica, las subunidades del PG deben asociarse en polímeros lineales pequeños, de 20 a 100 monómeros, los cuales posteriormente son entrelazados con otros polímeros a través de sus porciones peptídicas (**Figura 3**) (de Pedro y Cava, 2015). Estos eventos ocurren en el espacio periplásmico y son catalizados por las enzimas bifuncionales DD-transglicosilasas-transpeptidasas, llamadas PBPs (*Penicillin Binding Proteins* / Proteínas de unión a penicilina) (Typas *et al.*, 2012). De esta forma, el péptido de un ácido N-acetil-murámico es entrelazado con otros péptidos presentes en otras unidades NAM-NAG (Huang *et al.*, 2008). Este entrecruzamiento permite que el PG forme una red alrededor de las bacterias y les confiere fuerza y rigidez frente a la presión osmótica que ejerce el citoplasma sobre la MI hacia el exterior (Vollmer *et al.*, 2008).

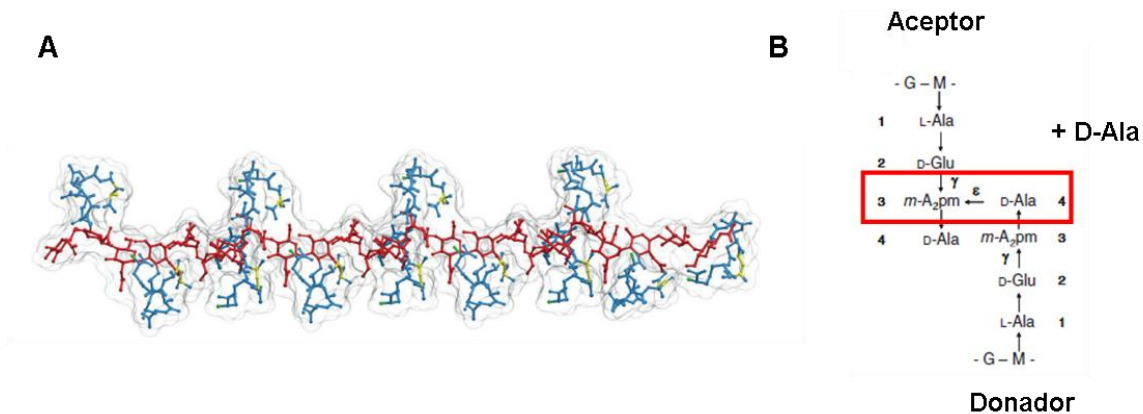


Figura 3. Estructura de los polímeros lineales de PG y entrecruzamiento de cadenas adyacentes a través de los pentapéptidos. A) Hebra de PG formada por 12 subunidades básicas. En rojo se muestra el esqueleto de glicano y en azul las porciones peptídicas. **B)** Entrecruzamiento típico del PG en *E. coli*, donde dos hebras de glicano se unen a través de un enlace covalente entre dos pentapéptidos. Éste involucra los residuos meso-DAP (en la posición 3 del péptido aceptor) y D-Ala (en la posición 4 del péptido donador) y causa la pérdida de D-Ala terminal en el pentapéptido donador. Modificado de De Pedro y Cava, 2015.

La pared celular difiere significativamente entre bacterias mono- y didermas. En éstas últimas, hay sólo una capa de PG cuyo grosor es de 3 a 8nm, y donde las hebras de PG están entrelazadas de manera lateral a través de enlaces entre D-Ala y meso-DAP presentes en residuos NAM distintos (Gan *et al.*, 2008). Las bacterias monodermas tienen paredes celulares más gruesas (20-33nm), en las que el PG está unido de manera covalente a polímeros de ribosa o glicerol (ácidos teicoicos) y presenta un alto grado de entrecruzamiento otorgado por múltiples variaciones en los sustituyentes en las posiciones 2 y 3 del péptido NAM (Vollmer y Seligman, 2009; De Pedro y Cava, 2015).

El peptidoglicano sirve también de andamiaje para moléculas únicas en bacterias. Por ejemplo, en algunas bacterias didermas, existe una lipoproteína llamada Lpp (Lipoproteína de Braun), unida a aproximadamente el 10% de las moléculas de meso-DAP. Esta proteína se inserta en la cara interna de la ME y la mantiene en una relación estrecha con la pared celular (Silhavy *et al.*, 2010).

1.4 La membrana externa (ME).

La ME es una estructura característica y esencial de las bacterias didermas y constituye la interfase entre ellas y el ambiente. Es una bicapa lipídica de composición asimétrica, pues su cara interna está formada por fosfolípidos, mientras que la hemicapa externa se constituye de glicolípidos aniónicos, generalmente lipopolisacáridos (LPS) (**Figura 4**). Dicha asimetría es esencial y es mantenida por distintos mecanismos, cuya disrupción resulta en inestabilidad de esta membrana (Malinverni y Silhavy, 2009; Sutterlin *et al.*, 2016).

En *E. coli*, la cara interna de la ME está compuesta en un 90% por fosfatidiletanolamina. Es decir, está más enriquecida en este FL en comparación con la MI, donde dicha abundancia es del 75%. Otra diferencia es que los FL de la ME contienen ácidos grasos más saturados que los de MI. Estas dos características le otorgan a la ME una carga negativa menor y una mayor rigidez (Lugtenberg y Peters, 1976). Por otra parte, en la cara externa de la ME, los LPS son moléculas que proporcionan identidad a las distintas especies y cepas bacterianas, y son de importancia clínica, pues son reconocidos por el sistema inmune.

Los LPS están constituidos por una subunidad lipídica (de 5-7 ácidos grasos) conocida como lípido A, la cual permite el anclaje a la ME; un oligosacárido central que incluye al ácido 3-deoxi-D-*mano*-oct-2-ulosónico (o Kdo₂) y por último, por un polisacárido de longitud variable, conocido como antígeno O (Nikaido, 2003; Henderson *et al.*, 2016). Es común, que tanto el oligosacárido central como el antígeno O estén fosforilados o pirofosforilados. Los LPS que poseen todos los componentes antes descritos son conocidos como LPS lisos, mientras que ciertas mutaciones generan LPS rugosos, que carecen del antígeno O e incluso de alguna porción del oligosacárido central (Kabanov y Prokhorenko, 2010; Ciesielski *et al.*, 2013).

A diferencia de otras membranas biológicas, la ME es bastante impermeable a moléculas y compuestos hidrofóbicos. Esto se debe a la existencia de interacciones laterales fuertes entre moléculas adyacentes de LPS mediadas por cationes divalentes, las cuales contrarrestan la fuerza de repulsión originada por la carga negativa de los grupos fosfato de los LPS. De esta forma, la ME adquiere una estructura altamente compacta, con una apariencia de gel, que es crucial para su función como barrera (Polissi y Sperandeo, 2014).

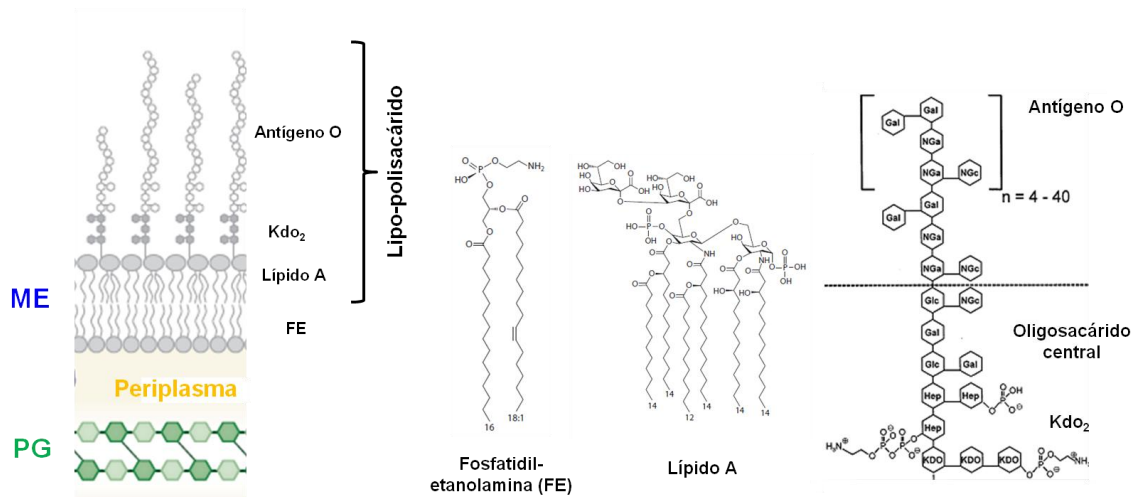


Figura 4. Estructura de los lípidos que constituyen la ME bacteriana. La membrana externa bacteriana es una bicapa lipídica de composición asimétrica. Cerca del 90% está constituida por fosfatidil-etanolamina, presente en la cara interna, mientras que la externa está formada por el lípido A, el cual es parte del LPS. Proyectándose hacia el medio extracelular, el LPS está formado por el azúcar Kdo₂, un oligosacárido central de heptosa (Hep)/galactosa (Gal)/glucosa (Glc) y una parte variable conocida como antígeno O constituido por N-acetilglucosamina (NGa)/Gal. Modificado de Magalhaes *et al.*, 2007; Henderson *et al.*, 2016.

La ME es un mosaico de lipoproteínas (Lpt) y proteínas integrales de ME (OMPs, *Outer Membrane Proteins*). Las lipoproteínas constituyen del 1 al 3% de los proteomas en bacterias mono- y didermas (Nakayama *et al.*, 2012), y pueden ser moléculas muy abundantes con funciones diversas. Por ejemplo, en *E. coli* se conocen cerca de 100 lipoproteínas, de las cuales la gran mayoría están expuestas en el periplasma, donde cumplen funciones esenciales relacionadas con la división y la biosíntesis de la envoltura celular (Szewczyk y Collet 2016). Algunas son indispensables en la expulsión de fármacos, la adhesión a tejidos del hospedero y en la transducción de señales (Juncker *et al.*, 2003; Brokx *et al.*, 2004; Babu *et al.*, 2006; Tokuda *et al.*, 2007).

Por otra parte, las OMPs poseen un dominio compuesto por hebras beta antiparalelas, cuya estructura terciaria es un cilindro conocido como barril beta. Muchas de las OMPs actúan como porinas, permitiendo la difusión pasiva de moléculas pequeñas, tales como mono- y disacáridos, aminoácidos y aniones (como el fosfato). Estas porinas forman complejos homotriméricos y algunas como OmpF y OmpC, son altamente expresadas, llegando a producirse hasta 250,000 copias por célula, (Silhavy *et al.*, 2010). Otras OMPs presentes en menor cantidad, son barriles beta de 20-24 cruces

transmembranales, que funcionan como canales abiertos para el transporte de alta afinidad de ligandos grandes, tales como quelados de Fe^{2+} o vitaminas (B12). Otra función de las porinas es limitar la difusión de moléculas hidrofílicas más allá de 700 Da, por ejemplo antibióticos y toxinas, lo cual hace a la ME una barrera selectiva permeable muy efectiva (Nikaido, 2003; Silhavy *et al.*, 2010).

- **Síntesis y ensamblaje de proteínas en la ME.**

Las proteínas periplásmicas, lipoproteínas y OMPs constituyen un grupo conocido como proteínas de secreción y son producidas en el citoplasma como pre-proteínas con una secuencia señal en el extremo N-terminal, el cual determina su procesamiento por la vía post-traducciona Sec. Dicha vía es dependiente de SecA, una proteína motora que interactúa con el ribosoma y reconoce el péptido señal. Una vez concluida la traducción, las proteínas de secreción son mantenidas en un estado no-plegado por la chaperona SecB, hasta que son entregadas al aparato de translocación SecYEG, encargado de exportarlas al periplasma (Huber *et al.*, 2011; Kudva *et al.*, 2013). En dicho espacio, las proteínas secretadas adoptan sus conformaciones funcionales mediante un proceso dirigido por chaperonas periplásmicas que evitan su agregación, mal plegamiento y degradación, causados por las condiciones oxidantes del periplasma (Lyu y Zhao, 2015). En *E. coli*, las chaperonas DegP, Skp y de manera muy importante SurA, constituyen la vía principal de plegamiento en el periplasma (Rollauer *et al.*, 2015).

El procesamiento de las lipoproteínas incluye la adición covalente (en la MI) de tres ácidos grasos, mismos que sirven como anclaje a las membranas. Dependiendo de las características presentes en su péptido señal, las Lpt pueden estar ancladas a la MI o la ME. En el último de los casos es requerido el sistema Lol, que consta de un complejo localizado en la MI formado por las proteínas LolCDE, que actúan como un transportador ABC y cuya función requiere la hidrólisis de ATP (Yakushi *et al.*, 2000; Narita *et al.*, 2002; Narita, 2011). LolCDE entrega la lipoproteína madura a LolA, una chaperona soluble del periplasma que la transfiere al receptor LolB, localizado en la cara interna de la ME. Finalmente, LolB se encarga de integrar la lipoproteína en la ME (Yokota *et al.*, 1999).

Por su parte, las OMPs son insertadas en la ME a través del complejo BAM, el cual consta de BamA y de cuatro lipoproteínas asociadas a la ME, que forman el complejo BamBCDE. La parte más importante y conservada del complejo es BamA, una

proteína integral de ME que posee en su porción periplásmica cinco dominios POTRA (*Polypeptide Transport Associated*), a través de los cuales interactúa con secuencias C-terminal de las OMPs. Esta interacción permite el inicio del plegamiento de las OMPs en un proceso conocido como “refuerzo de láminas beta”. Sin embargo, el mecanismo por el cual el complejo BAM logra la inserción y plegamiento de las OMPs en la ME es poco conocido (Leyton *et al.*, 2015; O’Neil *et al.*, 2015).

2. Mantenimiento de la estabilidad de la envoltura celular.

La envoltura celular de las bacterias didermas está en un proceso continuo de síntesis, mantenimiento y reorganización, mismo que permite la formación de una estructura fisiológicamente activa. De manera simultánea, su integridad es preservada a través de una relación muy estrecha entre las distintas capas que la integran. En enterobacterias como *E. coli*, se sabe que las interacciones entre las proteínas del complejo Tol-Pal, OmpA y la lipoproteína de Braun, aseguran la estabilidad de la envoltura celular (Silhavy *et al.*, 2010).

2.1 Lipoproteína de Braun.

La lipoproteína de Braun o Lpp es la proteína más abundante en *E. coli*, con aproximadamente 7.2×10^5 copias por célula (Shu *et al.*, 2010). Se une por un enlace covalente a la pared celular de PG y se asocia con la ME a través de una modificación lipídica en su extremo N-terminal. De esta manera, establece una unión física entre la ME y la pared celular (Bosch y Braun, 1973). Es una proteína pequeña, que una vez madura consta de 58 residuos. Tiene un diseño repetitivo, que sugiere una evolución muy conservada a partir de un gen pequeño de 15 residuos y duplicaciones posteriores que llevaron a su longitud actual de 58aa (Braun y Bosch, 1972). Esta estructura modular se refleja también en la conservación de la estructura primaria en las diferentes especies bacterianas (Shu *et al.*, 2000).

Tras ser producida en el citoplasma como pre-lipoproteína, Lpp es procesada en la MI, en donde se corta el péptido señal y se agregan de forma covalente tres moléculas de ácido palmítico en el residuo de Cys N-terminal (Braun y Wolf, 1972; Suzuki *et al.*, 2002). Esta porción lipídica permite la integración de la lipoproteína madura en la cara interna de la ME. Por otra parte, la unión de esta lipoproteína con el peptidoglicano ocurre entre el residuo de Lys C-terminal de Lpp y el centro óptico L del residuo *meso*-DAP del PG (Braun y Wolff, 1970), y ocasiona la pérdida del residuo D-Ala que estaba

unido a *meso*-DAP. En *E. coli*, la formación de este enlace es catalizada por la actividad de las L,D-transpeptidasas ErfK, YcfS y YbiS, que a diferencia de otras transpeptidasas como las PBPs, no son inhibidas por beta-lactámicos (**Figura 5**) (Magnet *et al.*, 2007; Magnet *et al.*, 2008).

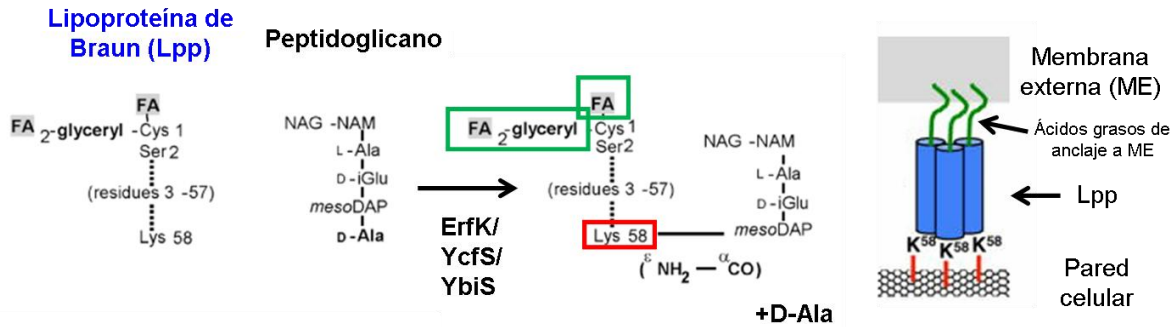


Figura 5. Mecanismo de unión de la Lpp con la pared celular y la ME. La unión de Lpp con el PG es catalizada por las transpeptidasas ErfK, YcfS o YbiS, que forman un enlace covalente entre el residuo Lys58 de Lpp y el residuo *meso*DAP del pentapéptido que entrecruza cadenas adyacentes de PG, el cual pierde el residuo D-Ala después de la reacción. A la derecha se muestra un trómero de Lpp interactuando con el PG y la ME a través de tres cadenas de ácido palmítico presentes en el N-terminal de la proteína (representadas en verde). Modificado de Dramsi *et al.*, 2008.

La inserción de Lpp a la red de PG no es un proceso azaroso, pues conserva un espaciamiento periódico de 103Å (cada diez disacáridos de PG) (Braun *et al.*, 1970) y ocurre en regiones con pared recién sintetizada, en donde las hebras de glicano tienen un entrecruzamiento bajo (Braun y Bosch, 1973). Se calcula que sólo un tercio de las moléculas de Lpp están unidas a la pared celular (Braun y Hantke, 1975), constituyendo el 40% del peso seco del polímero (Braun y Rehn, 1969). Las dos terceras partes restantes están en forma libre, atraviesan la ME y quedan expuestas en la superficie celular (Cowles *et al.*, 2011). Esta topología alterna no se debe a diferencias estructurales respecto a la forma unida a la pared, pues ambas versiones son idénticas tanto en secuencia como en la porción lipídica. La población de moléculas de Lpp que están unidas al PG inhibe la actividad de antibióticos como la lisozima, posiblemente a través de impedimentos estéricos (Braun y Hantke, 1975).

Los primeros estudios sobre la estructura de Lpp mostraron que el 90% de la proteína adopta una conformación de alfa-hélice (Braun *et al.*, 1976). La cristalización de Lpp de *E. coli* y la determinación de su estructura tridimensional por difracción de rayos X a una resolución de 1.9Å, mostró que tres hélices de Lpp se asocian de forma paralela

en un cilindro de 83Å de longitud y 21-24Å de diámetro. El homotrímero está compuesto por tres regiones: 1) una cremallera de alaninas en la porción central, mantenida por interacciones tipo *coiled-coil* entre las tres hélices, 2) un motivo “cap” N-terminal con un plegamiento en forma de sombrilla que constituye una red bien definida de enlaces de H; y 3) un motivo hidrofóbico de terminación de hélice, en el que los anillos aromáticos de los residuos de tirosina interactúan entre sí. Estas tres regiones de la estructura cuaternaria de Lpp contribuyen a la elevada estabilidad termodinámica reportada en los trabajos pioneros de Braun (**Figura 6**) (Shu *et al.*, 2000).

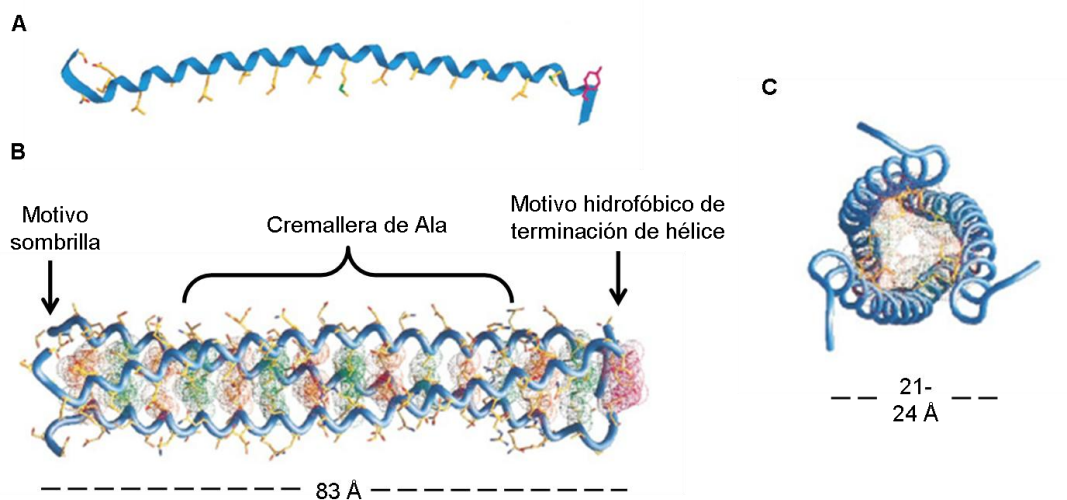


Figura 6. Características estructurales de la lipoproteína de Braun. **A)** La estructura secundaria de Lpp consiste en 90% hélice alfa. **B)** Lpp se auto-asocia en trimeros cilíndricos de 83Å longitud, con las hélices estabilizadas por una cremallera central rica en Alanina, un motivo sombrilla en el extremo N-terminal y uno hidrofóbico de terminación de hélice en el C-terminal. **C)** Vista aérea del cilindro cuyo diámetro es de 21 a 24Å. Modificado de Shu *et al.*, 2010.

El mecanismo de asociación de Lpp con la ME no ha sido bien elucidado, pero el modelo más aceptado propone su interacción a través de la porción lipídica de la proteína. Dado que la distancia entre la ME y la pared celular es de 25Å (DiRienzo *et al.*, 1978) y la longitud de Lpp es de 83Å, el modelo implica que una gran parte del trímero podría estar inmersa en la bicapa (Inoye, 1974) o que la interacción de Lpp con la ME y la pared ocasiona un cambio conformacional en la lipoproteína así como una reducción de su longitud (Samsudin *et al.*, 2017).

A pesar de que Lpp es la proteína más abundante en *E. coli*, no es una proteína esencial, puesto que es posible obtener una mutante nula de este gen. En ausencia de

Lpp, las células forman colonias más pálidas y translúcidas que las de la cepa silvestre y mediante microscopía electrónica se observó la formación de vesículas de membrana externa (VME) (Sonntag *et al.*, 1978), así como un fenotipo de filamentación mínimo debido a un retraso en la separación de las células hijas (Fung *et al.*, 1978) y a defectos en la invaginación de la ME en condiciones limitantes de Mg^{2+} (**Figura 7**) (Suzuki *et al.*, 1978) Aunque esto sugiere un posible papel de Lpp en el proceso de división celular, su distribución homogénea en la envoltura celular la descarta como un componente específico de la maquinaria de división (**Figura 8**). (Hiemstra *et al.*, 1986 y 1987).

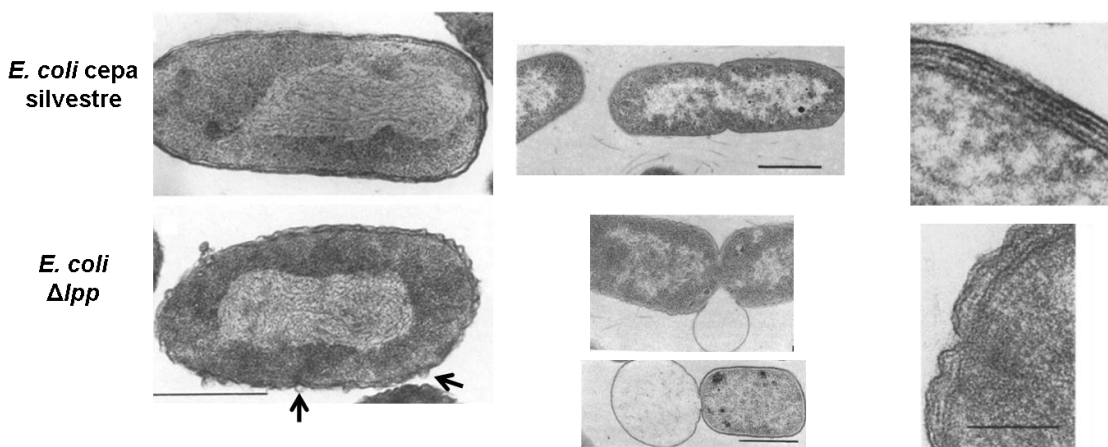


Figura 7. Fenotipos de células carentes de Lpp en *E. coli*. Microscopías electrónicas de transmisión de la cepa silvestre y la mutante en *lpp*. La ausencia de Lpp ocasiona la formación de VME en todo el cuerpo celular (flechas, izquierda), pero de mayor tamaño en el sitio de la división y los polos celulares (centro), así como disrupción de la envoltura celular (derecha). Modificado de Suzuki *et al.*, 1978; Fung *et al.*, 1977.

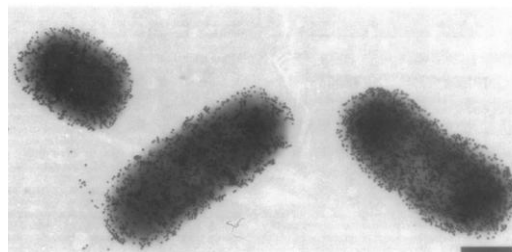


Figura 8. Distribución de Lpp en la ME de *E. coli*. Microscopía electrónica de células expresando Lpp, cuya localización fue determinada usando suero contra la lipoproteína y un anticuerpo secundario acoplado a partículas de oro de 16nm de diámetro. La barra corresponde a 0.5 μ m. Tomado de Hiemstra *et al.*, 1986.

2.2 Proteínas del complejo Tol-Pal.

Este complejo de proteínas parece ser exclusivo de las bacterias didermas, puesto que está ausente en bacterias monodermas y Archaea. Aún dentro de las bacterias didermas, se encuentran algunas excepciones como *Treponema pallidum*, *Borrellia burgdorferi*, *Rickettsia prowazeki* y *Neisseria meningitidis* en las que no es posible encontrar dicho complejo proteico; estas bacterias son generalmente parásitos intracelulares obligados y sobreproductoras de VME (Sturgis, 2001).

El complejo *tol-pal* está codificado por un grupo de siete genes organizados en un operón, que incluye además un promotor interno. De esta forma, el primer transcrito deriva de los genes *ybgC*, *tolQ*, *tolR*, *tolA*, *tolB*, *pal* y *ybgF*; mientras que el segundo corresponde a *tolB*, *pal* y *ybgF* (Sturgis, 2001; Vianney *et al.*, 1996) (**Figura 9**). Las proteínas de este complejo se localizan en diversos compartimentos de la envoltura celular: YbgC en el citoplasma, TolQ, TolR y TolA en la MI, mientras que las proteínas codificadas por el segundo transcrito son exportadas, de tal forma que TolB y YbgF son proteínas solubles de periplasma y Pal es una lipoproteína asociada a la ME. Los cálculos de abundancia de las proteínas de este complejo indican que TolA y TolR son proteínas menores con 400-800 y 2000-3000 copias por célula, respectivamente, mientras que TolQ es tres veces más abundante que TolR. Para el caso de Pal, se calcula que existen hasta 10,000-30,000 copias por célula (Lloubés *et al.*, 2001).

Este complejo ha sido propuesto como una conexión física entre las tres capas que forman la envoltura celular de las bacterias didermas, pues varios de sus componentes residen en dichos compartimentos o interactúan directamente con ellos. Esta idea es reforzada por la caracterización de diversas interacciones entre los componentes del complejo, como se detalla a continuación.

TolQ es una proteína de MI que tiene tres cruces transmembranales y un dominio citoplásmico (Vianney *et al.*, 1994; Vianney *et al.*, 1996), mientras que TolR y TolA poseen sólo un cruce transmembranal y dominios periplásmicos grandes. Se ha demostrado que estas tres proteínas interactúan entre sí a través de sus cruces transmembranales (Derouiche *et al.*, 1995; Lazzaroni *et al.*, 1995; Germon *et al.*, 1998). A su vez, el dominio periplásmico de TolA es capaz de interactuar con TolB y Pal; esta última interacción (TolA-Pal) requiere de la fuerza motriz de protones de la MI (Germon *et al.*, 2001). Pal es una proteína asociada a la ME mediante tres cadenas acilo unidas covalentemente en el extremo N-terminal, mientras que en su extremo C-

terminal posee un dominio tipo OmpA, el cual permite la unión no-covalente con la pared celular (Bouveret *et al.*, 1999). Por su parte, TolB consta de dos dominios, uno N-terminal α/β y uno C-terminal β -propela (Carr *et al.*, 2000). Se ha mostrado que el dominio N-terminal de TolB es importante para la dimerización de TolB consigo misma y para la interacción con TolA, mientras que el dominio β -propela le permite interactuar con Pal (Ray *et al.*, 2000). También se han descrito diversas interacciones de Tol-Pal con proteínas que no forman parte del complejo, de particular importancia entre TolB-Pal con OmpA y Lpp (lipoproteína de Braun), las cuales son proteínas que se asocian no covalente y covalentemente con la pared celular, respectivamente (Cascales y Lloubès, 2004; Clavel *et al.*, 1998). Así, las proteínas del complejo Tol-Pal se encuentran formando subcomplejos funcionales dentro de la célula: TolQRA, TolA-TolB-Pal, Pal-TolB-OmpA y Pal-Lpp, así como Pal-PG, manteniendo a la ME, pared celular y MI en una estrecha cercanía (**Figura 9**).

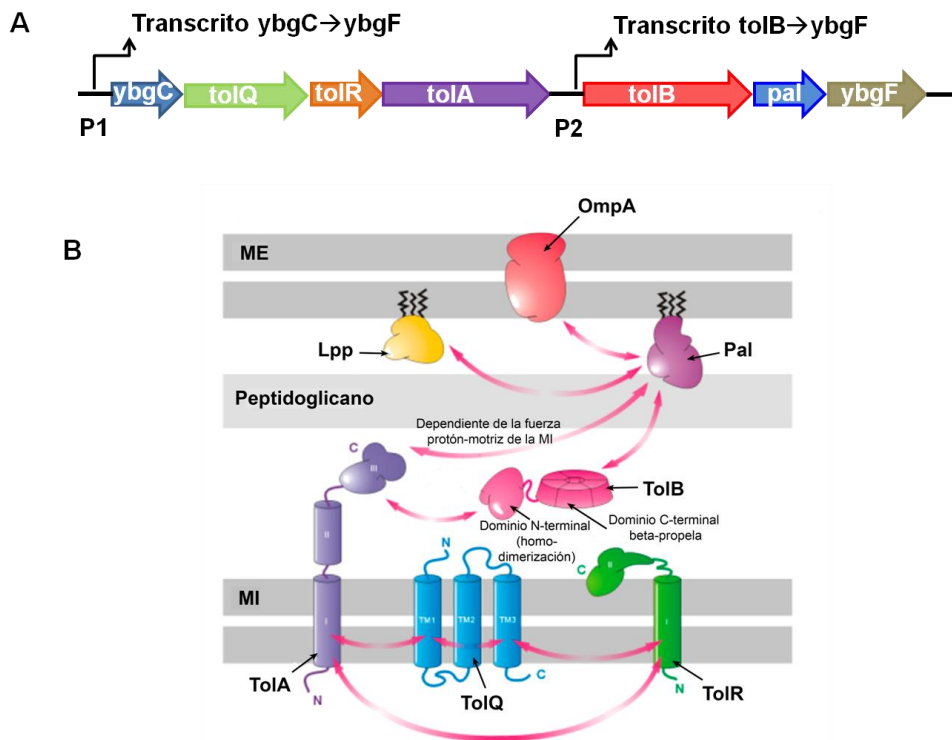


Figura 9. Representación de la estructura de las proteínas del complejo Tol-Pal y sus interacciones. A) Esquema del operón *tol-pal* en *E. coli*. **B)** Las proteínas que forman el complejo Tol-Pal están presentes en la MI (TolA, TolQ y TolR), como proteínas solubles de periplasma (TolB) o asociadas a la ME (Pal). La interacción entre ellas, con el peptidoglicano o con otras proteínas como Lpp u OmpA, mantienen en una estrecha cercanía las tres capas de la envoltura celular en las bacterias didermas. Modificado de Sturgis J., 2001; Godlewska *et al.*, 2009.

La función principal del complejo Tol-Pal es la preservación de la integridad de la envoltura celular, ya que los fenotipos de cepas mutantes en estos genes son hipersensibilidad a antibióticos y detergentes (Berstein *et al.*, 1972), capacidad de crecimiento normal en condiciones limitadas de sales (Meury y Devilliers, 1999), formación de VME (Bernadac *et al.*, 1998), liberación de enzimas periplásmicas al medio extracelular (Lazzaroni y Portalier, 1981;Kowata *et al.*, 2016) y activación de la respuesta de estrés de membrana mediada por el factor RpoE extracitoplásmico, misma que ocasiona un defecto en el ensamblaje del antígeno O del LPS (Vines *et al.*, 2005). Pal desempeña un papel crucial, puesto que es capaz de estabilizar cepas carentes de Lpp o TolA, aunque de manera inversa, la sobre-expresión de Lpp o TolA no compensa la ausencia de Pal. Esto muestra que Pal es requerida de manera específica para mantener la integridad de la ME a través de su interacción con las proteínas Tol (**Figura 10**) (Cascales *et al.*, 2002).

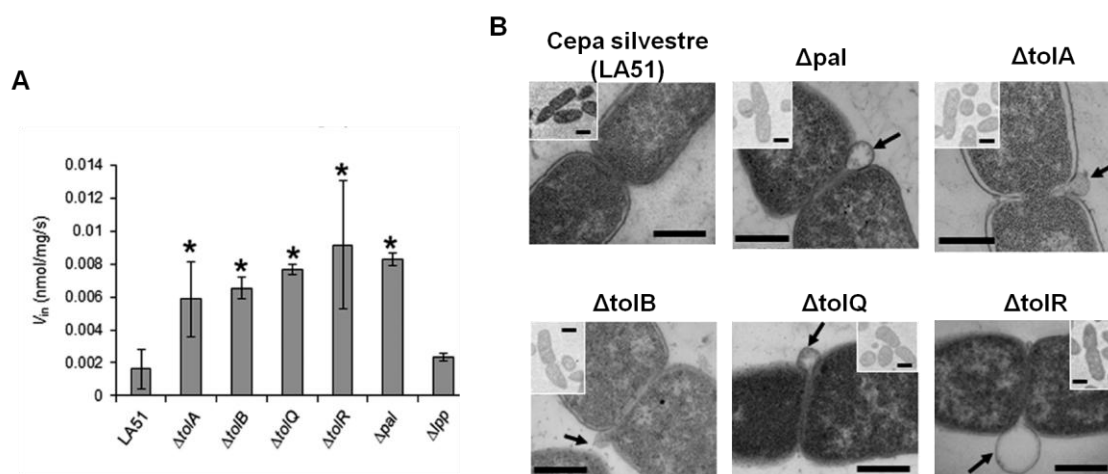


Figura 10. Características fenotípicas de células carentes de proteínas del complejo Tol-Pal en *E. coli*. **A)** Gráfica que muestra la velocidad de ingreso (en nmol/mg/s) de bencilpenicilina al interior de la célula en las diferentes cepas referidas. Los asteriscos señalan diferencias significativas con respecto a la cepa silvestre LA51. **B)** Microscopías electrónicas de la cepa silvestre así como las mutantes sencillas en cualquiera de los genes del complejo *tol-pal*. Las flechas indican VME en los sitios de la división celular. Longitud de la barra igual a 500nm. Modificado de Kowata *et al.*, 2016.

No todas las mutaciones en los genes del complejo *tol-pal* provocan inestabilidad de la envoltura celular. Tal es el caso de *ybgC* y *ybgF* (recientemente nombrado *cpoB* en *E. coli*). La actividad hipotética de YbgC es como acil-transferasa en el metabolismo de

lípidos, mientras que CpoB interactúa con TolA para modular la actividad de PBP1B, una enzima encargada de la síntesis del peptidoglicano (Gray *et al.*, 2015).

Otras interacciones de las proteínas del complejo Tol-Pal ocurren con porinas de ME, que no confieren estabilidad a la envoltura celular, pero que tienen la función de transportar diversos sustratos y por otro lado, son parasitadas como receptores de bacteriófagos y ciertos tipos de colicinas, las cuales actúan como péptidos antimicrobianos (Walburger *et al.*, 2002).

Además de contribuir a la integridad de la envoltura, las proteínas de este complejo participan en la división celular. Cepas carentes de TolA en *E. coli*, *Pseudomonas putida* y *Vibrio cholerae*, presentan un fenotipo de filamentación cuando crecen en medios con baja osmolaridad o fuerza iónica alta. De manera adicional, la formación de VME ocurre en los polos celulares y en los sitios de constricción. Versiones fluorescentes de las proteínas del complejo, mostraron que éstas se localizan en el sitio de constricción durante la división celular y que su reclutamiento no ocurre en ausencia de FtsN, una proteína que forma parte de la maquinaria de división (**Figura 11**) (Gerding *et al.*, 2007; Teleha *et al.*, 2013).

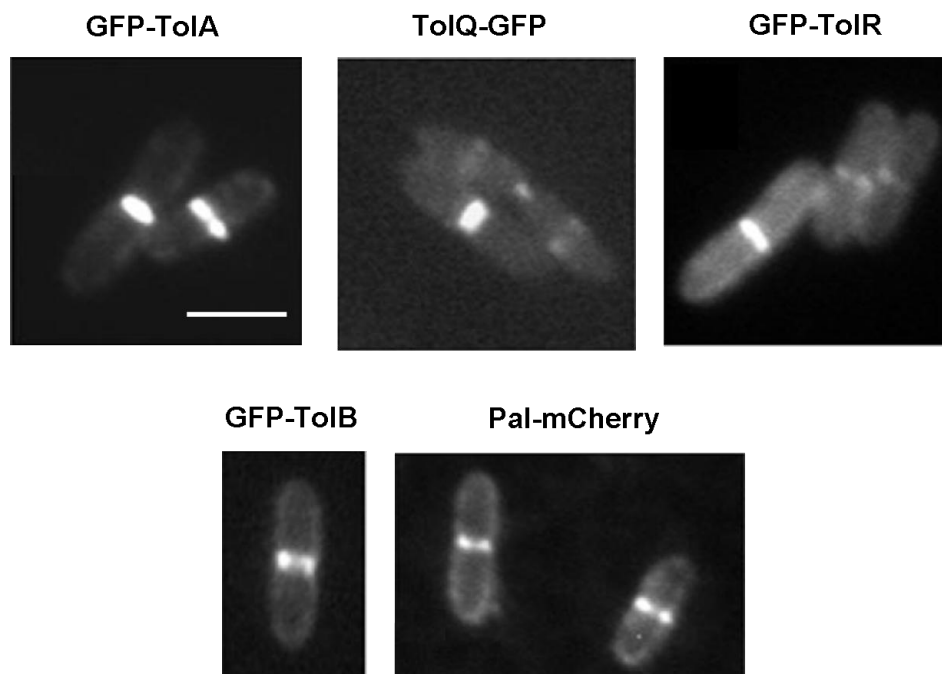


Figura 11. Distribución de las proteínas del complejo Tol-Pal en el cuerpo celular de *E. coli*. Microscopías de fluorescencia de cepas que expresan a las proteínas del complejo fusionadas con GFP (para el caso de TolA, TolQ, TolR o TolB) o con m-Cherry (para Pal). Barra= 2µm. Modificado de Gerding *et al.*, 2007.

2.3 OmpA: estructura, expresión y función.

- **Estructura.**

OmpA es una proteína de ME muy abundante en *E. coli*, con hasta 100, 000 copias por célula. Consta de 325 residuos organizados en dos dominios estructurales separados por una región rica en residuos de prolina. En la porción N-terminal, posee un barril beta que se integra en la ME y en el extremo C-terminal tiene un dominio tipo OmpA de unión a la pared celular de peptidoglicano (Bremer *et al.*, 1982; Sugawara *et al.*, 1996) (**Figura 12**).

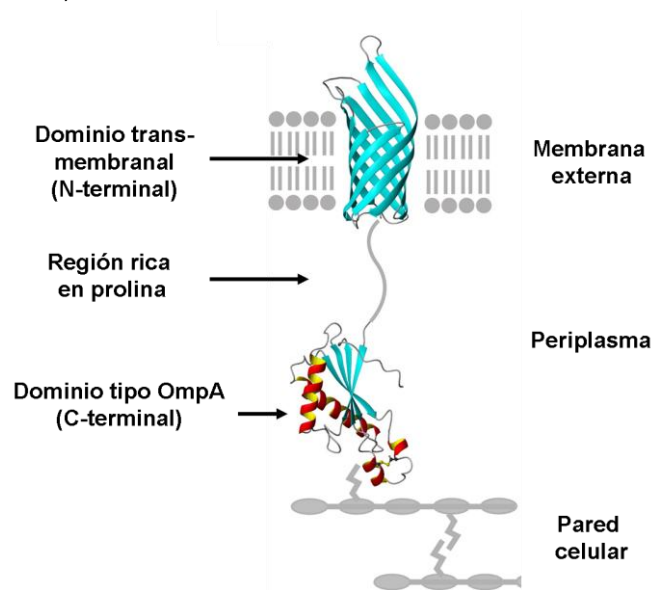


Figura 12. Estructura e interacciones de OmpA con la pared celular y la membrana externa. Modelo de la estructura terciaria de OmpA basado en los datos cristalográficos depositados en el PDB (*Protein Data Bank*): PDB ID 1QJP (para la porción transmembranal) y PDB ID 4ERH (para el dominio periplásmico). Modificado de Ishida *et al.*, 2014.

El barril beta está compuesto por 171 residuos organizados en ocho hebras beta anfipáticas dispuestas en forma antiparalela en la ME, las cuales están conectadas entre sí por cuatro asas en la porción extracelular y por tres giros en el espacio periplásmico. Estas regiones en ambos lados de la membrana no poseen información topogénica significativa, al igual que las de otras OMPs como PhoE, LamB y FhuA (Koebnik y Braun, 1993; Ried *et al.*, 1994).

La reconstitución de OmpA en proteoliposomas mostró que el barril beta de esta proteína tiene un tamaño de poro de 1 nm, y que sólo el 3% tiene una conformación de

canal abierto con una permeabilidad inespecífica a moléculas pequeñas (Sugawara y Nikaido, 1992). La primera estructura cristalográfica de OmpA en 1998, mostró que no existe un flujo continuo de agua o solutos a través del barril beta de la proteína, a pesar de tener una región central de naturaleza polar estabilizada por enlaces de H y varias cavidades grandes cubiertas de agua (Pautsch y Shulz, 1998 y 2000). Experimentos de resonancia magnética nuclear (NMR) dinámica, han revelado que existe un cierto grado de flexibilidad a lo largo del eje del barril, lo cual podría hacer posible la función de canal. Esta última evidencia está apoyada también por estudios de dinámica molecular que sugieren un mecanismo de compuerta, cuya apertura está dada por la conversión del puente salino entre los residuos Glu52-Arg138 a una interacción Arg138-Lys82. La existencia de una población mínima de OmpA con función de canal, podría ser un mecanismo para la supervivencia bajo condiciones de estrés osmótico (Hong *et al.*, 2006), mientras que la mayor parte de la proteína se encuentra en una conformación cerrada, tal como sugieren los datos cristalográficos.

Por otro lado, el dominio periplásmico de OmpA consta de los residuos 172-325 y es de naturaleza soluble. Su estructura secundaria, confirmada mediante cristalografía de rayos X, es un conjunto alternado de hélices alfa y hebras beta en un orden topológico $\beta/\alpha/\beta/\alpha/\beta/\alpha/\beta$. La capacidad de este dominio de asociarse de forma no-covalente con la pared celular, reside en una región de carga positiva compuesta por los aminoácidos Lys238, Arg276, Lys277, Arg281, Lys320, Lys322, Arg325 y Arg329 y de manera muy importante en los residuos Asp271 y Arg286, los cuales establecen puentes salinos y de H con el aminoácido *m*-DAP del peptidoglicano. Estos dos últimos residuos están conservados en todos los dominios tipo OmpA conocidos y son esenciales para su unión con el peptidoglicano. Experimentos *in vitro* medidos por calorimetría de titulación isotérmica, mostraron que el dominio periplásmico de OmpA de *Acinetobacter baumannii* perdió por completo su afinidad por el PG cuando los residuos conservados Asp271 y Arg286 fueron sustituidos por Ala (**Figura 13**). Esta interacción es específica con peptidoglicano tipo DAP, característico de bacterias Gram-negativas, pues dichos residuos son capaces de discriminar peptidoglicano tipo Lys o modificado por amidación (característicos en bacterias Gram-positivas) (Park *et al.*, 2012). Estudios recientes usando modelado molecular, han propuesto que el dominio periplásmico de OmpA permite la formación de dímeros, los cuales a diferencia de OmpA monomérica, pueden unirse al PG aún en ausencia de la lipoproteína de Braun (Samsudin *et al.*, 2017). La presencia de dímeros de OmpA podría ser un medio por el cual se estabiliza su interacción con la pared celular a pesar de interactuar de forma débil con este componente de la envoltura celular.

El plegamiento de OmpA *in vitro* se ha estudiado mediante difracción de rayos X, sedimentación diferencial y espectroscopía de fluorescencia, en un gran número de ambientes hidrofóbicos y composiciones lipídicas. Estos análisis muestran que el dominio transmembranal (TM) de OmpA tiene una fuerte tendencia a agregarse y que su plegamiento comienza sólo en presencia de un ambiente hidrofóbico. Por otra parte, el dominio periplásmico se comporta como una unidad independiente de plegamiento, pero reduce la tendencia a la agregación del dominio TM y aumenta su velocidad de plegamiento. Estas dos actividades hacen del dominio periplásmico de OmpA una chaperona, propiedad que puede ser relevante para la función de la proteína *in vivo* (Danoff y Fleming, 2011). Sin embargo *in vivo*, la inserción de OmpA en la membrana externa, requiere de un mecanismo asistido por chaperonas periplásmicas (como SurA y Skp), que permiten la formación sincronizada de estructuras secundaria y terciaria hasta su inserción como barril β en la ME (Kleinschmidt, 2003; Patel *et al.*, 2009; Patel y Kleinschmidt, 2013).

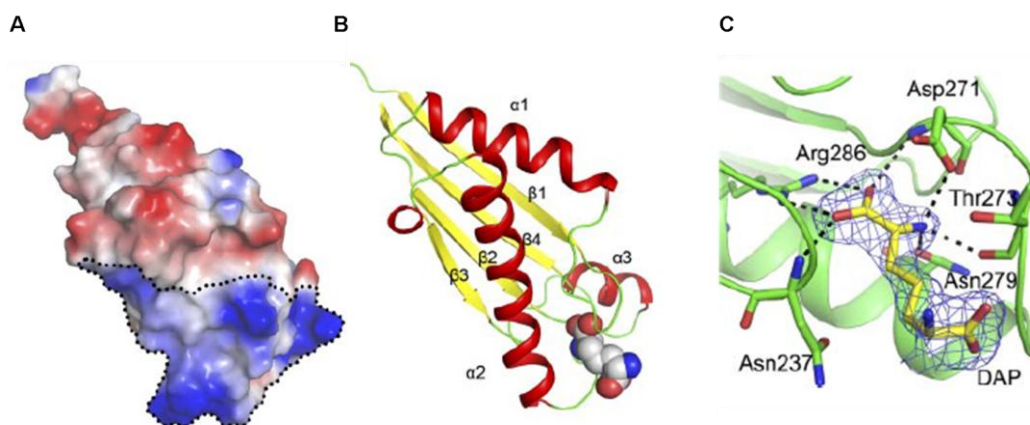


Figura 13. Mecanismo de anclaje de OmpA a la pared celular. A) Vista tridimensional del dominio tipo OmpA mostrando el potencial electrostático de superficie, en rojo las cargas negativas y en azul las positivas. El área punteada enmarca los residuos que podrían interactuar con el PG. **B)** Representación de la estructura secundaria del dominio periplásmico de OmpA en conjunción con una molécula de *m-DAP*. **C)** Mapa de las interacciones electrostáticas establecidas entre los residuos Asp271 y Arg286 con *m-DAP*. Tomado de Park *et al.*, 2012.

Una propiedad inusual de OmpA que la distingue de otras OMPs de *E. coli* es su modificación por temperatura. Cuando la proteína es calentada a 100°C en presencia de detergentes aniónicos como dodecil sulfato de sodio (SDS), experimenta un cambio conformacional y su peso molecular aparente pasa de 28 a 35kDa. Además, aún tras

tiempos largos (10min) de calentamiento a 100°C, se observan diferentes grados de desnaturalización de la proteína (Nakamura y Mizushima, 1976; Beher *et al.*, 1980). Una posible explicación a este fenómeno es la presencia del barril β y la interacción entre los lípidos y las proteínas de ME, que limitan el acceso del SDS.

Otra propiedad particular de OmpA es que, de acuerdo con evidencia estructural *in vitro*, existe en dos conformaciones. Una de ellas es la reportada en los estudios cristalográficos, mientras que la conformación alternativa consta de un barril de 16 láminas beta, de los cuales ocho son proporcionados por el dominio C-terminal. La presencia de dos barriles de diferente diámetro coincide con los datos de conductancia de la proteína reconstituida en bicapas lipídicas. La formación de un barril más grande parece ser dependiente de la presencia del dominio periplásmico, puesto que una versión de OmpA carente de este dominio, da lugar a un único valor de conductancia (Stathopoulos, 1996). Estos dos estados conformacionales son interconvertibles, aunque en temperaturas fisiológicas, el barril grande es la forma predominante. Se ha mostrado que la transición entre ambos estados es dependiente de la temperatura y que dicha modificación es irreversible (Zakharian y Reusch, 2003). Estos datos sugieren una función dual de OmpA, en la que una cierta proporción de la proteína, cuyo barril beta es más grande y su conductancia es mayor, podría tener función de porina, mientras que la otra población de OmpA mantiene la integridad de la envoltura celular al interactuar con la pared de peptidoglicano a través de su dominio periplásmico.

- **Expresión.**

OmpA es una de las proteínas de superficie más abundantes y su expresión responde a una amplia variedad de estímulos y factores ambientales. En *E. coli*, la anaerobiosis, acidez, limitación de nitrógeno y presencia de poliaminas incrementan la expresión de OmpA, mientras que el crecimiento reducido en fase estacionaria, la presencia de urea y defectos en el lipopolisacárido la disminuyen (Smith *et al.*, 2007). Además de los factores ambientales, la expresión de OmpA está regulada a nivel transcripcional, post-transcripcional y traduccional.

En *E. coli*, la expresión del gen *ompA* es mantenida a partir de dos promotores superpuestos y aunque cerca del 90% de la expresión depende sólo de uno de ellos, se ha propuesto que este arreglo asegura un abasto constante de RNA polimerasa para conservar los niveles altos de transcripción observados (Stewart *et al.*, 1982).

La expresión de OmpA depende de la velocidad de crecimiento puede ser explicada por un incremento proporcional de la vida media del mRNA. En condiciones óptimas de crecimiento, la vida media del transcrito es inusualmente alta (~15min), pero en temperaturas más bajas, donde la velocidad de crecimiento es menor, la vida media de este intermediario es de sólo 4min. La estabilidad y longevidad del mRNA de *ompA* depende de su región 5' no traducida (5'-UTR), que en *E. coli* consta de 134 nucleótidos, una longitud poco común (Emory y Belasco, 1990; Emory *et al.*, 1992). Esta región tiene una estructura secundaria particular, en la que dos zonas de cadena sencilla son reconocidas por RNasaE (Hansen *et al.*, 1994), mientras que la secuencia Shine-Dalgarno de unión al ribosoma es un blanco de *micA*, un RNA regulatorio pequeño. La interacción de *micA* con el mRNA de *ompA* es favorecida y estabilizada por la proteína Hfq y resulta en la inhibición de la traducción y la degradación del mensajero (Rasmussen *et al.*, 2005). Los niveles de *micA* incrementan en el inicio de la fase estacionaria en respuesta al factor sigma E extracitoplásmico, esto explica la expresión reducida de OmpA cuando la velocidad de crecimiento es lenta (Udekwa y Wagner, 2007).

- **Función.**

De acuerdo con su localización en la superficie celular y su alto nivel de expresión, OmpA es una proteína con múltiples funciones. Desde el punto de vista clínico, es una proteína muy importante, pues diversas especies patógenas la involucran en procesos de invasión, adhesión, evasión de la respuesta inmune y de forma paradójica, como un blanco del mismo. Por ejemplo, en *E. coli* K1, una cepa capaz de atravesar la barrera hemato-encefálica y de causar sepsis y meningitis, las asas extracelulares de OmpA permiten la adhesión de las fimbrias de esta bacteria con una glicoproteína receptora en las células endoteliales de la barrera. Esto muestra la afinidad de OmpA por ciertos carbohidratos y coincide con los modelos de *docking* molecular, que proponen su interacción con quitobiosa, un disacárido estructural de la quitina presente en la pared celular de hongos. Cepas entero-hemorrágicas de *E. coli* serotipo O157:H7 median su interacción con células epiteliales HeLa a través de OmpA, misma que le sirve a la bacteria para adherirse a la superficie de las plantas que coloniza y usa como vehículo para llegar a su hospedero final (Smith *et al.*, 2007).

Su papel como una evasina del sistema inmune se atribuye al hecho de que cepas que expresan OmpA pueden unirse, entrar y multiplicarse dentro de macrófagos y monocitos e inhibir la apoptosis de estas células inmunitarias. Además, es capaz de

evitar la respuesta inmune del hospedero interfiriendo con la activación de las respuestas inflamatorias clásicas (Smith *et al.*, 2007).

La capacidad de OmpA de burlar el sistema inmune se ve compensada por el hecho de ser un blanco para éste en ciertos casos, lo cual hace de OmpA un arma de doble filo. Sus asas extracelulares son un blanco específico para la proteína elastasa de neutrófilos, células del sistema inmune que mediante procesos no-oxidantes son capaces de permeabilizar las bacterias que expresan OmpA (Belaouaj *et al.*, 2000).

Otra característica que hace relevante a OmpA en el aspecto clínico, aparte de su papel como factor de virulencia, es que cepas patógenas carentes de OmpA muestran una capacidad reducida para adherirse a superficies y formar biopelículas, las cuales hacen ineficiente la acción de múltiples antibióticos en el tratamiento de infecciones bacterianas, además de constituir un mecanismo de defensa ante las respuestas inmunes del hospedero (Smith *et al.*, 2007).

En el contexto de la ecología microbiana, OmpA es una molécula que pone en riesgo constante la supervivencia de la célula, puesto que es reconocida por distintos bacteriófagos (Morona *et al.*, 1984) y bacteriocinas, las cuales son péptidos antimicrobianos que inducen la despolarización de las membranas. Este fenómeno ha sido documentado en *E. coli* con la bacteriocina JF246 y la colicina L, en *Serratia marcescens* con la bacteriocina 28b, así como en *Shigella boydii* con la colicina U (Smith *et al.*, 2007). Por otra parte, también se conoce que la presencia de OmpA incrementa la eficiencia de conjugación, a través de su interacción con la proteína TraN de membrana externa, codificada por el plásmido F (Klimke *et al.*, 2005).

Más allá de su papel en diversos procesos infecciosos, a nivel fisiológico OmpA es una proteína que le confiere estabilidad a la envoltura celular bacteriana. Esta capacidad se debe a que interactúa de forma directa con la ME y la pared celular de peptidoglicano. Cepas carentes de OmpA son más sensibles a antibióticos, detergentes y agentes que desestabilizan la estructura de la ME como el EDTA. Cepas dobles mutantes de OmpA y Lpp en *E. coli* muestran una morfología esférica y disrupción de la interacción ME-pared celular, que se manifiesta en la formación de vesículas de ME y liberación de contenido periplásmico al medio extracelular (Sonntag *et al.*, 1978; Marvin *et al.*, 1989). En este sentido, el barril β de ME parece ser el dominio más importante de OmpA, puesto que una cepa carente del dominio carboxilo

terminal de OmpA, confiere todos los fenotipos y funciones de OmpA completa (**Figura 14**) (Smith *et al.*, 2007).

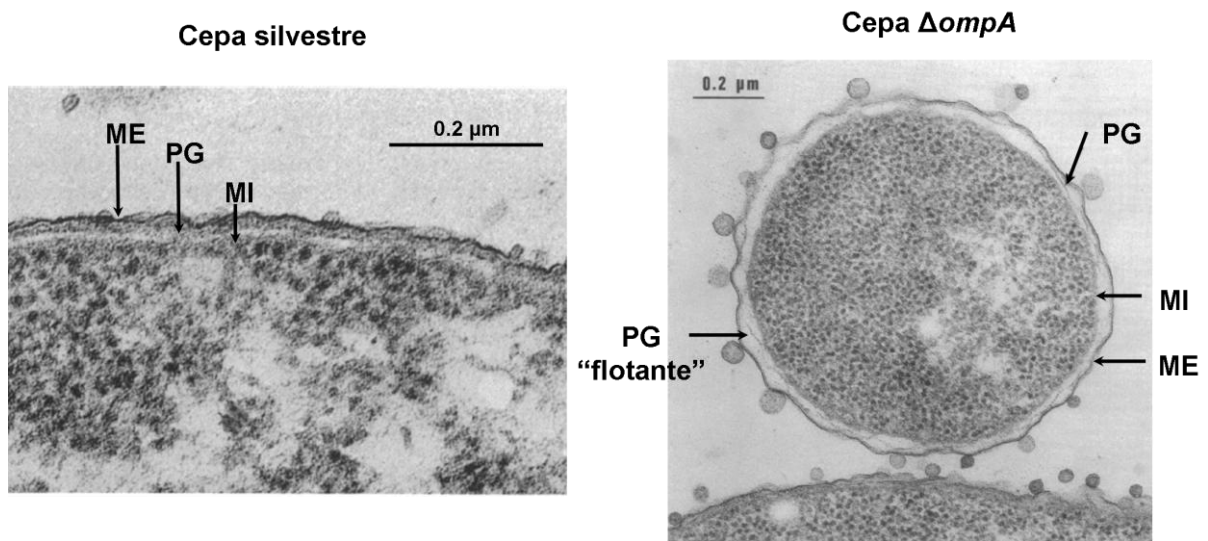


Figura 14. Fenotipo de la cepa carente de OmpA en *E. coli*. Microscopías electrónicas de transmisión de una sección delgada de células silvestres de *E. coli* (izquierda) o carentes de la lipoproteína de Braun y de OmpA (derecha). Éstas últimas muestran una extensa formación de vesículas de ME y peptidoglicano "flotante" como resultado de la interrupción de la interacción entre la MI, la ME y la pared celular. Estos fenotipos son más acentuados que los exhibidos por la cepa mutante sencilla en *lpp* (ver figura 7). Modificado de Sonntag *et al.*, 1978.

2.4 Mecanismos globales que mantienen la integridad de la envoltura celular.

A pesar de que la integridad de la envoltura celular en las bacterias didermas es mantenida por la lipoproteína de Braun, las proteínas del complejo Tol-Pal y OmpA, cuyas interacciones entre ellas y con los componentes de la envoltura ya fueron descritas, las condiciones cambiantes a las cuales se encuentran expuestas las bacterias inducen la activación de respuestas globales reguladas a nivel transcripcional, principalmente por el factor sigma alternativo RpoE y por el sistema de dos componentes CpxR/A, cuyas respuestas están moduladas a su vez por RNAs pequeños (Gracjana y Raina, 2017).

El factor sigma RpoE está especializado en mantener la homeostasis de la ME. Su regulón incluye factores que promueven la síntesis y plegamiento de OMPs, así como el remodelaje, ensamblaje y transporte de LPS. Cuando hay un exceso de componentes de ME o defectos en su biosíntesis, se activa la expresión de RNAs pequeños como *rybB*, *micA* y *micL*, que se unen a la proteína Hfq y reprimen la

síntesis de las OMPs más abundantes (OmpA, LamB, OmpX) así como de la lipoproteína de Braun. De manera conjunta, permite la redirección de las chaperonas mediadas por RpoE, para facilitar el plegamiento de proteínas en el periplasma (Gracjana y Raina, 2017).

El conjunto de genes regulados por RpoE se sobrelapa de manera parcial con el regulón Cpx, el cual es un sistema que responde a defectos en el plegamiento de proteínas en el periplasma así como a defectos en la síntesis de peptidoglicano causados por la exposición a antibióticos (Delhaye *et al.*, 2016). Este sistema es inducido también por otros tipos de estrés, como pH y osmolaridad altos y alteraciones en la composición lipídica de la MI. El sistema de dos componentes Cpx consta de CpxA que actúa como cinasa, CpxR que es el regulador de respuesta de unión a DNA, CpxP proteína periplásmica que retroalimenta de manera negativa al sistema y por CpxQ un RNA regulatorio pequeño que en conjunto con Hfq modula la expresión de factores que contrarrestan la pérdida de potencial de membrana en condiciones de estrés (Gottesman, 2017).

La percepción de defectos en la envoltura celular y su comunicación hacia el citoplasma, mediadas por los sistemas anteriores, parece depender del acoplamiento entre las membranas y el PG. En *E. coli*, se ha descrito que el incremento artificial en la longitud de la lipoproteína Lpp resulta en una mayor separación entre ambas membranas y la ausencia de transmisión de las señales de estrés. Esto muestra la importancia fisiológica del tamaño del periplasma en la homeostasis de la envoltura y la protección de la célula (Asmar *et al.*, 2017).

3. Características de *Caulobacter crescentus*.

Caulobacter crescentus es una alfa-proteobacteria diderma (Gram-negativa) con un ciclo celular complejo, al final del cual se producen dos células morfológica y fisiológicamente distintas: una célula flagelada libre nadadora y una célula sésil, que es capaz de adherirse a distintas superficies a través de una mezcla de polisacáridos presente en una estructura conocida como prosteca. Estas características del desarrollo de *C. crescentus*, son completamente distintas a las de organismos como *E.coli*, pero son compartidas con otras bacterias del orden Caulobacterales, que también viven en ambientes marinos o de agua dulce limitados en nutrientes, en los que podrían constituir adaptaciones muy conservadas que mejoran su fisiología. Otras características que hacen de *C. crescentus* un excelente sistema de estudio es la facilidad con la que se puede modificar genéticamente y la posibilidad de separar poblaciones con el ciclo celular sincronizado. La morfología diferencial de esta bacteria hace posible también, identificar de manera clara la polaridad celular. Estas propiedades facilitan el estudio sobre la localización subcelular de proteínas, el seguimiento espacio-temporal de la expresión génica y de procesos complejos como la segregación del cromosoma, el crecimiento y la división a través del ciclo celular (Hughes *et al.*, 2012).

3.1 Ciclo celular.

El ciclo celular de *C. crescentus* puede ser dividido en cuatro fases. La fase G1 consta de células nadadoras que poseen un flagelo de posición polar y en las que está inhibida la replicación del cromosoma. Posteriormente ocurre una transición hacia la fase S, caracterizada por la pérdida del flagelo y su reemplazo por la prosteca, la cual es una extensión tubular delgada de la envoltura celular. Las células con prosteca se adhieren a través de ella a superficies, por lo que se convierten en células sésiles y adquieren la capacidad de replicar el cromosoma. La replicación del cromosoma va acompañada del crecimiento y el inicio de la división celular, por lo que las células al final de la fase S son conocidas como pre-divisionales. La división celular progresa rápidamente durante la fase G2, generando células madre-hija a punto de separarse, conocidas como células divisionales. La separación de estas células ocurre durante la fase M del ciclo celular, generando dos progenies: células prostecadas y células flageladas libre nadadoras. Ambas retoman el ciclo celular en fases diferentes, las células prostecadas en fase S, mientras que las nadadoras en G1 (**Figura 15**) (Laub *et al.*, 2007).

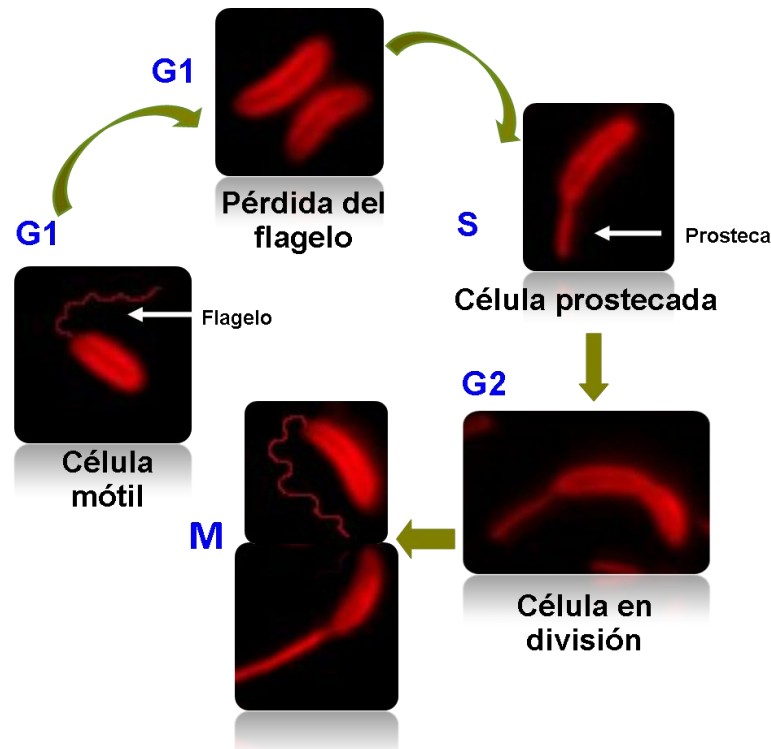


Figura 15. Ciclo celular de *C. crescentus*. El proceso de diferenciación comienza con células nadadoras en fase G1. Tras perder el flagelo y sintetizar la prosteca, las células replican el cromosoma y crecen (fase S). El crecimiento es acompañado del inicio de la división durante G2. Después de la citocinesis (fase M), se forman dos células hijas diferentes en morfología y fisiología, que retoman el ciclo celular en fases distintas. Fuente: elaboración propia.

El proceso de diferenciación celular en *C. crescentus* es resultado de perfiles transcripcionales distintos en las células hijas, que se generan a partir de redes complejas y que culminan en la localización diferencial de factores regulatorios a través del ciclo celular (Jensen *et al.*, 2002). A través de microarreglos se ha mostrado que cerca de 533 genes, que representan el 19% del genoma, son transcritos de forma diferencial a través del ciclo celular (Laub *et al.*, 2000). El control de este fenómeno es jerárquico y está orquestado por la dinámica entre cuatro proteínas regulatorias maestras CtrA, GcrA, DnaA y CcrM, así como por varios sistemas de dos componentes.

3.2 Organización lineal del cromosoma.

C. crescentus posee un cromosoma circular de ~4 millones de pares de bases, que se encuentra inmerso en el citoplasma en una estructura conocida como nucleoide. Al igual que otras bacterias como *E. coli* y *Bacillus subtilis*, en *C. crescentus* la disposición del cromosoma dentro del cuerpo celular no es azarosa (Toro y Shapiro, 2010). En esta bacteria, el origen de replicación (*oriC*) se encuentra cerca del polo

celular prostecado o polo viejo, mientras que el término de replicación (*ter*) en el polo nuevo de la célula. Como ambos loci están en polos celulares opuestos, el resto de los genes en el cromosoma mantienen una relación lineal con respecto al cuerpo celular. De esta forma, si un locus está a la mitad de distancia entre *oriC* y *ter* dentro del cromosoma, dicho locus tendrá la misma posición entre el polo viejo y el nuevo, es decir, cerca de la mitad de la célula (Viollier *et al.*, 2004). Este orden es mantenido durante la replicación y heredado después de la división celular mediante la segregación del cromosoma. Uno de los primeros locus en ser duplicado es *parS*, que se ubica muy cerca del origen de replicación *oriC*, y que es reconocido por la proteína de partición ParB (Bowman *et al.*, 2008). El complejo *parS*-ParB es capturado por el factor PopZ, una proteína multimérica que media la unión del cromosoma con la membrana interna en el polo prostecado (**Figura 16**) (Ebersbach *et al.*, 2008). El nuevo locus *parS* recién duplicado no está asociado a la membrana, pero sí es reconocido por ParB que a su vez se asocia con la proteína de segregación ParA. Ésta es una ATPasa que mueve el nuevo cromosoma hacia el polo opuesto de la célula conforme avanza la replicación (Schebelut *et al.*, 2010). Así, los loci recién copiados se mueven en un orden cronológico hasta alcanzar su localización subcelular final dentro de la célula. La correcta segregación del cromosoma permite el inicio de la división celular, ya que ambos focos de ParB interactúan con MipZ, proteína que forma un gradiente de concentración en ambos polos e inhibe la polimerización de FtsZ. Éste último proceso ocurre cerca de la mitad del cuerpo celular (donde la cantidad de MipZ es nula) y es esencial para el inicio de la división (Thanbichler y Shapiro, 2006).

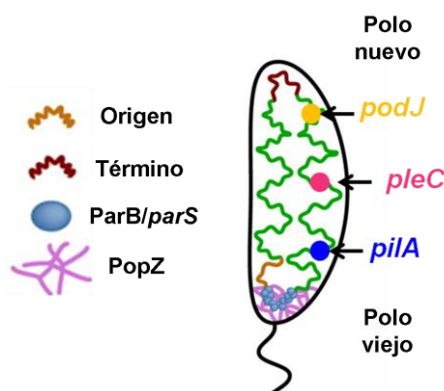


Figura 16. Arreglo lineal del cromosoma en *C. crescentus*. Esquema de la disposición del cromosoma en *C. crescentus*, en el que el origen y término de replicación están asociados a la membrana en polos celulares opuestos. De esta forma, todos los genes en el cromosoma mantienen una relación lineal con respecto al cuerpo celular. Modificado de Toro y Shapiro, 2010.

3.3 Adaptaciones a condiciones limitadas en nutrientes.

C. crescentus es una bacteria oligotrófica de vida libre que crece en ambientes acuáticos limitados en nutrientes, condiciones a las que debe adaptar su ciclo de vida y morfología. Uno de los factores limitantes para su supervivencia es el fósforo, el cual está presente en el suelo y el agua tanto en forma orgánica como inorgánica. La fuente preferencial de este elemento es el fósforo inorgánico (Pi), el cual es aprovechado rápidamente cuando está disponible (Wagner *et al.*, 2006). Sin embargo, en los ambientes oligotróficos, la cantidad de Pi es muy limitada, por lo que la bacteria ha desarrollado mecanismos para aprovechar fosfatos orgánicos como fuente de este elemento. El más evidente es la elongación de la prosteca, estructura que llega a medir hasta 30µm, lo cual es equivalente a 15 veces la longitud del cuerpo celular (**Figura 17**) (Schmidt y Stanier, 1966). La prosteca, a diferencia de los flagelos o los pili, es una extensión de la envoltura celular, ya que posee tanto peptidoglicano como membranas. Esta estructura está presente en un grupo morfológicamente diverso de bacterias Gram-negativas y su función en *C. crescentus*, es facilitar la adquisición de fosfatos y otros nutrientes a través de la optimización de la relación superficie-volumen y la acumulación de proteínas como PstS y PhnD, que se unen a fosfatos y fosfonatos, respectivamente (Wagner *et al.*, 2006). La elongación de la prosteca en respuesta a la limitación de fosfatos es mantenida por una vía de transducción de señales que involucra a las proteínas PstSCAB y el regulador de respuesta PhoB (Gonin *et al.*, 2000). En ausencia de estrés por nutrientes, el crecimiento de la prosteca es dependiente del factor sigma 54 (RpoN) y del regulador de respuesta TacA, que dirigen la transcripción de los genes necesarios para su biogénesis.

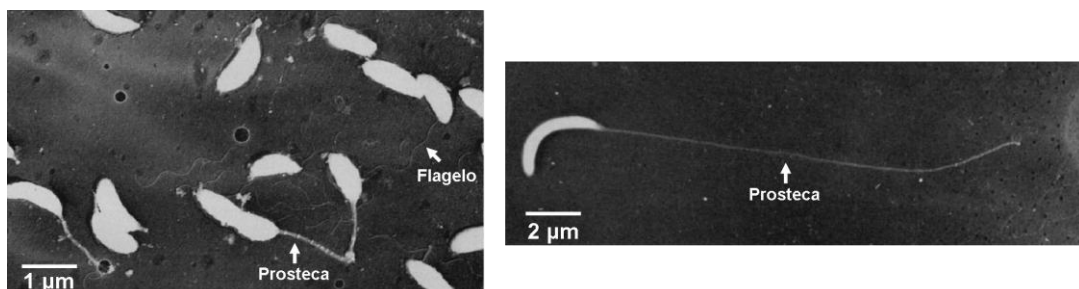


Figura 17. Elongación de la prosteca de *C. crescentus* en condiciones limitadas de fósforo. Microscopías electrónicas de transmisión de células de *C. crescentus* crecidas en medio rico en fósforo (izquierda) o en condiciones limitantes de este ion (derecha). Se indican el flagelo y la prosteca. Tomado de Schmidt y Stanier, 1966.

Para obtener Pi, *C. crescentus* es capaz de capturar, modificar, degradar y asimilar sustratos orgánicos a través de enzimas degradativas localizadas en la superficie celular o liberadas al medio extracelular. Ejemplo de esto es la lipoproteína ElpS, presente en la cara externa de la membrana externa, que mediante un sistema de secreción tipo II es liberada al medio extracelular. La expresión de ElpS está favorecida por condiciones de bajo fosfato y se ha mostrado que está involucrada en la movilización de este ion, pues estimula la actividad de una fosfatasa alcalina extracelular hasta ahora desconocida (Le Blastier *et al.*, 2010).

3.4 Características de la envoltura celular.

La envoltura celular de *C. crescentus* está constituida por la MI, la pared celular, la ME y una estructura adicional conocida como capa S. Ésta última, es constituida por la proteína RsaA de 98kDa capaz de formar celdas unitarias hexagonales con un espaciamiento de 22nm. Los primeros 225 residuos de RsaA permiten su interacción y anclaje con el antígeno-O del LPS presente en la cara externa de la ME (Awram y Smit, 2001). En la región central de RsaA se encuentran seis motivos de unión a calcio, catión que en altas concentraciones estabiliza a los monómeros de RsaA y permite su transición a un estado cristalino bidimensional (Herrmann *et al.*, 2017). Por último, en el C-terminal de RsaA está presente una secuencia que permite la secreción de la proteína a través de un transportador tipo ABC dependiente de ATP, proceso que ocurre en conjunción con dos proteínas de ME que evitan la acumulación de RsaA en el citoplasma (Overton *et al.*, 2016). El arreglo periódico de la capa S produce poros de 2.5-3.5nm de diámetro regularmente espaciados, los cuales actúan como un tamiz molecular que protege a la célula contra agentes de peso molecular alto, como los péptidos antimicrobianos y frente a la predación epibiótica por bacterias del género *Bdellovibrio* (Herrmann *et al.*, 2017).

Las condiciones oligotróficas en las que prospera *C. crescentus* se ven reflejadas también en la composición lipídica de sus membranas, las cuales están más enriquecidas en glicolípidos con respecto a otras bacterias como *E. coli* (**Tabla 1**) (De Siervo y Homola, 1980). En el caso de la ME, se ha mostrado que los LPS de *C. crescentus* carecen del grupo fosfato terminal característico de estas moléculas (Smit *et al.*, 2008). Además codifica y expresa un conjunto distintivo de OMPs, entre ellos once receptores dependientes de TonB (Ireland *et al.*, 2002), los cuales median el transporte de sideróforos, cobalamina, maltodextrinas y sacarosa. La presencia de dichos transportadores en esta bacteria, puede ser importante para el crecimiento en

ambientes diluidos en nutrientes y para compensar la ausencia de porinas generales (Wagner *et al.*, 2006).

Tabla 1. Comparación de la composición lipídica de las membranas de *E. coli* y *C. crescentus*. Datos tomados de De Siervo y Homola, 1980.

Lípido	<i>E. coli</i>		<i>C. crescentus</i>	
	MI	ME	MI	ME
Fosfatidil-etanolamina	75%	90%	ND	ND
Fosfatidil-glicerol	20%	Otros FL con ácidos grasos más saturados.	78%	84%
Cardiolipina	5%	ND	10.1%	3.5%

ND= No detectado.

3.5 Mantenimiento de la integridad de la envoltura celular.

En *E. coli*, el mantenimiento de la integridad de la envoltura celular está mediado por la interacción entre las proteínas del sistema Tol-Pal, OmpA y Lpp entre ellas mismas y con la pared de peptidoglicano y las membranas celulares. Aunque la presencia de Lpp en enterobacterias (como *E. coli*) es muy importante para la homeostasis de la envoltura celular, la detección de esta lipoproteína en otras bacterias a través de métodos bioinformáticos es muy difícil dada su longitud reducida de 78 residuos (Yeh *et al.*, 2010). Este es el caso de *C. crescentus*, donde se ha mostrado experimentalmente que carece de Lpp o cualquier otra proteína unida covalentemente con la pared celular. Dicha aseveración se sustenta en el análisis de los muropéptidos obtenidos tras la digestión de sáculos de PG con celosil (una muramidasa de *Streptomyces coelicolor*), resueltos mediante HPLC e identificados por espectrometría de masas. En éste, sólo pudieron caracterizarse los péptidos que entrelazan cadenas laterales de PG, concluyendo así que *C. crescentus* carece de proteínas unidas covalentemente con la pared celular (Takacs *et al.*, 2010). Otra diferencia con las enterobacterias, es que en *Caulobacter* el sistema Tol-Pal es esencial (Christen *et al.*, 2011). Mediante crio-microscopías electrónicas se ha mostrado que una disminución en los niveles de TolA, TolB o Pal, resulta en células incapaces de concluir la división y con problemas en la envoltura celular (**Figura 18**) (Yeh *et al.*, 2010).

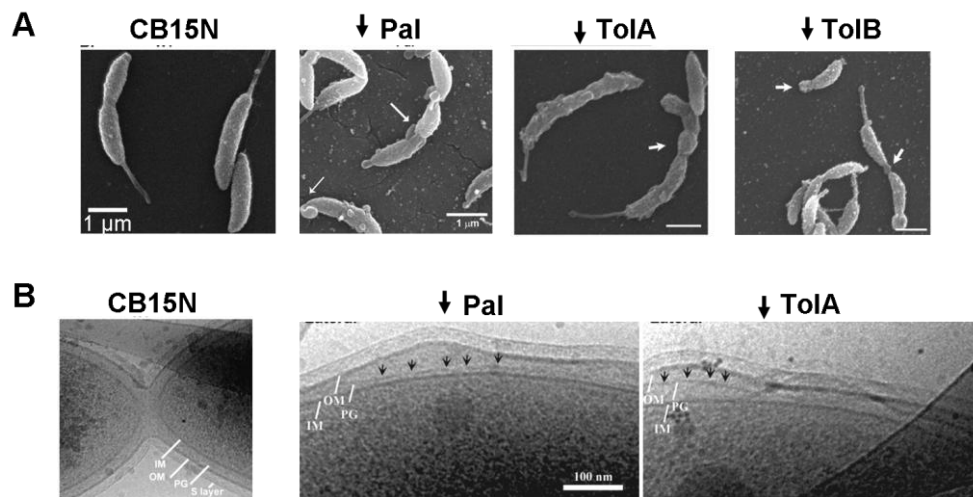


Figura 18. Fenotipos de las cepas de *C. crescentus* con niveles reducidos de las proteínas del complejo Tol-Pal. A) Microscopías electrónicas de barrido de la cepa silvestre (CB15N) y de cepas disminuidas de Pal, Tol A o TolB, expresadas a partir de un promotor inducible. Las flechas señalan VME en los sitios de la división o los polos celulares, así como células que comienzan a formar filamentos. **B)** Crio-microscopías electrónicas de la cepa silvestre, ↓Pal y ↓TolA. En ↓Pal, las flechas indican la disociación de la ME (OM) y el PG y en la cepa ↓TolA, la disociación de la membrana interna (IM) y el PG. Modificado de Yeh *et al.*, 2010.

Al igual que en *E. coli*, las proteínas del complejo Tol-Pal se localizan en el sitio de la división, donde participan en la invaginación de la ME como uno de los pasos finales de la citocinesis. Después de la división, una pequeña cantidad de las proteínas del complejo permanece en los polos nuevos de ambas células hijas, donde son requeridas para mantener la posición del factor polar TipN y de manera indirecta a la histidín cinasa PleC, la cual es importante en la regulación del ciclo celular (**Figura 19**) (Yeh *et al.*, 2010).

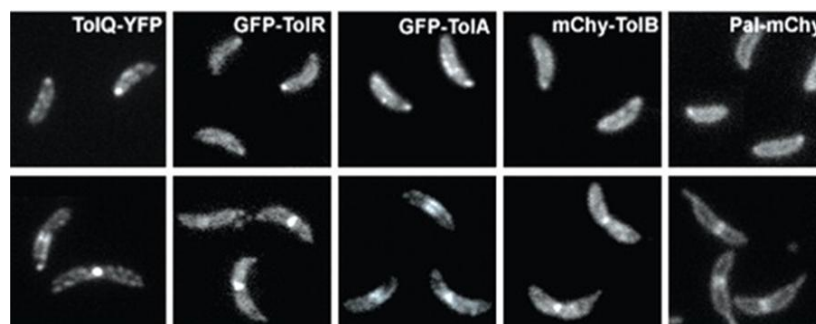


Figura 19. Localización de las proteínas Tol-Pal en *C. crescentus*. Células nadadoras (arriba) o células en proceso de división (abajo) que expresan las proteínas del complejo Tol-Pal fusionadas con proteínas fluorescentes (YFP, GFP o mCherry). Tomado de Yeh *et al.*, 2010.

Aunque *C. crescentus* codifica para un homólogo de OmpA (Montero-Llopis *et al*, 2010), no se ha caracterizado la contribución de esta proteína en el mantenimiento de la estabilidad de la envoltura ni su localización en la célula.

HIPÓTESIS

Si en *Caulobacter crescentus* existen proteínas con similitud estructural a OmpA, entonces su localización será relevante para su función en el mantenimiento de la estabilidad de la envoltura celular.

OBJETIVOS

General.

Caracterizar la localización de las proteínas tipo OmpA en *C. crescentus*, así como su contribución en el mantenimiento de la estabilidad de la envoltura celular.

Particulares.

Identificar por métodos bioinformáticos a las proteínas tipo OmpA en *Caulobacter crescentus*.

Obtener cepas mutantes nulas de los genes *ompA* para determinar la participación de estas proteínas en la fisiología de *C. crescentus*.

Obtener fusiones de las proteínas OmpA con una proteína fluorescente para caracterizar su localización y dinámica a través del ciclo celular de esta bacteria.

RESULTADOS

1. El genoma de *Caulobacter crescentus* codifica para dos proteínas con similitud estructural a OmpA de *E. coli*.

Con el objetivo de identificar a las proteínas tipo OmpA en *Caulobacter crescentus*, se realizó un alineamiento de tipo local (BLAST) contra el genoma de esta bacteria usando como secuencia de búsqueda a OmpA de *E. coli* (GenBank BAA35715.1). Esta herramienta bioinformática reveló que en *C. crescentus* existen seis proteínas semejantes a OmpA de *E. coli*, que corresponden a los productos codificados por los siguientes genes: CC_0201, CC_2845, CC_3229, CC_1573, CC_0747 y CC_3494. Para las seis secuencias identificadas como homólogos de OmpA se hizo una predicción de dominios conservados usando la base de datos de NCBI (*National Center for Biotechnology Information*; Marchler-Bauer et al., 2015). En la **figura 20** se compara la composición de dominios de estas seis proteínas con respecto a OmpA de *E. coli*, la cual consta de dos dominios: uno amino terminal (N-terminal) que pertenece a la superfamilia de barriles β de proteínas de ME (OMP_b-brl superfamily), y uno C-terminal tipo OmpA de interacción con la pared celular de peptidoglicano. Aunque las seis proteínas identificadas poseen un dominio C-terminal tipo OmpA, sólo CC_0747 (GenBank NP_419564.1) y CC_3494 (Gen Bank NP_422288.1), poseen una región N-terminal que se pliega formando un barril β en la ME, aunque no es el mismo dominio OmpA de membrana presente en OmpA de *E. coli*. Como en *E. coli* la integridad de los dominios de OmpA es esencial para la función de esta proteína (Koebnik, 1996; Koebnik, 1999; Wang, 2002), entonces CC_0747 y CC_3494 en *C. crescentus* son probablemente las dos proteínas con una función similar a la de OmpA. Con estas evidencias bioinformáticas, se decidió nombrar a CC_0747 como *ompA1* y a CC_3494 como *ompA2*, con el fin de mantener congruencia con un trabajo previo en el que se refirió a CC_0747 como *ompA* (Montero-Llopis et al., 2010).

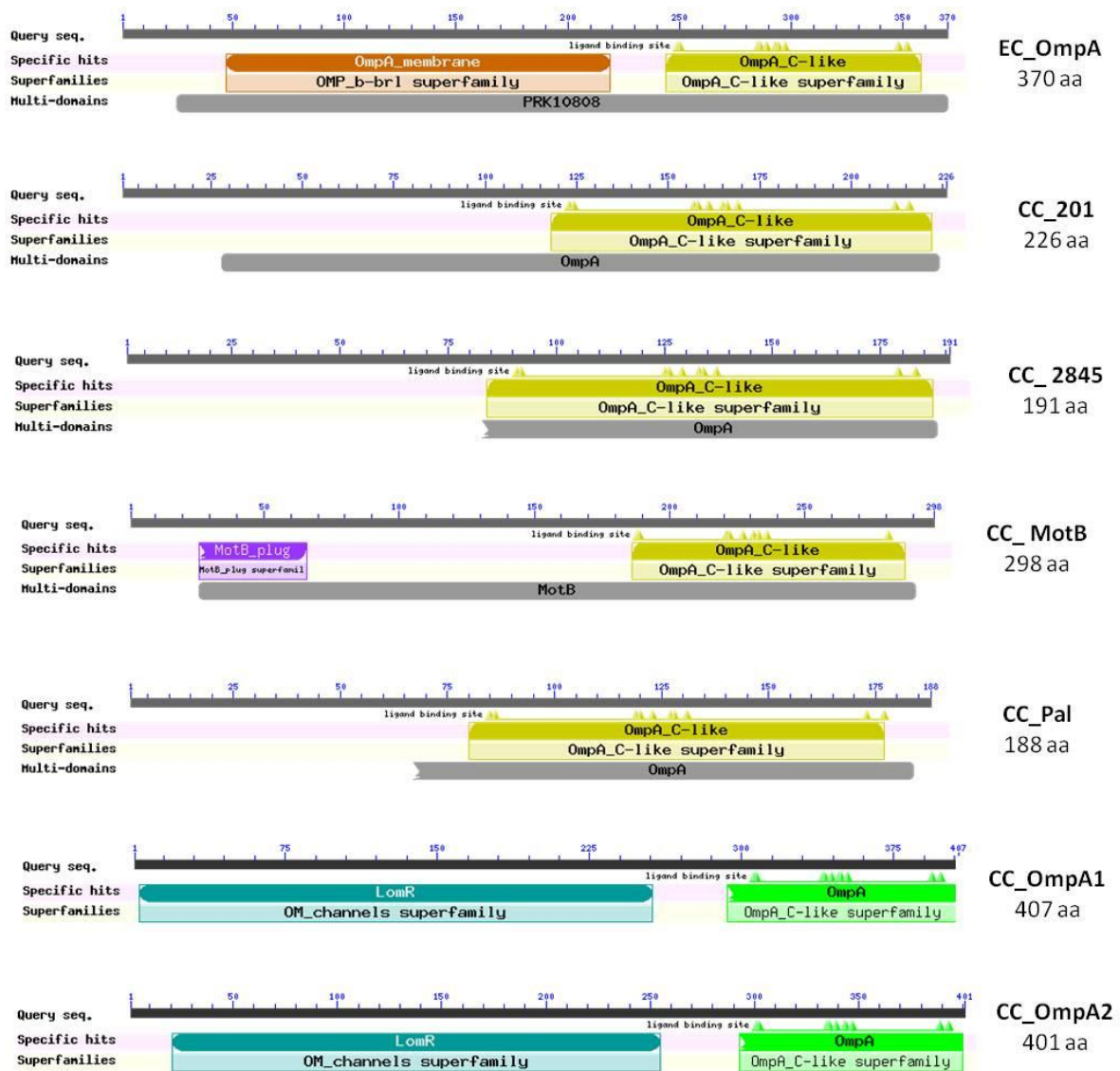


Figura 20. Dominios presentes en las seis proteínas identificadas mediante BLAST como homólogos de OmpA en *Caulobacter crescentus*. Se compara la estructura de estas proteínas contra la composición de dominios de OmpA de *E. coli* (EC_OmpA) así como su tamaño (número de residuos). En *C. crescentus*, CC_0747 y CC_3494, nombradas OmpA1 y OmpA2 respectivamente, son las únicas que poseen un dominio barril beta y un dominio de unión al peptidoglucano, al igual que OmpA de *E. coli*.

Otro hecho importante es que en *E. coli*, OmpA es una de las proteínas más abundantes (Koebnik *et al.*, 2000), por ello se decidió verificar el nivel de expresión de *ompA1* y *ompA2* en *C. crescentus*. Para esto se usaron datos de expresión global obtenidos mediante secuenciación de RNA mensajero (Fang *et al.*, 2013) y los provenientes de un microarreglo (McGrath *et al.*, 2007). En la **figura 21** se muestran los perfiles de expresión de *ompA1* y *ompA2* a través del ciclo celular de *C.*

crenscentus. Aunque ambos genes son transcritos, el nivel de expresión de *ompA2* es aproximadamente quince veces mayor que el de *ompA1*. Por este motivo, es probable que OmpA2 sea la principal proteína tipo OmpA en *C. crescentus*. Con el objetivo de determinar si la expresión de *ompA1* y *ompA2* es dependiente del ciclo celular, se incluyeron en el análisis de expresión, los perfiles transcripcionales de los genes *ctrA*, *ccrM*, *dnaA* y *gcrA*, reguladores maestros del ciclo celular de *C. crescentus* (**Figura 21**). Este análisis mostró que la expresión de ambos homólogos de *ompA* muestra un perfil similar a los de *dnaA* y *gcrA* y uno inverso a los de la expresión de los reguladores *ctrA* y *ccrM*, por lo que es posible asumir que son regulados por el ciclo celular.

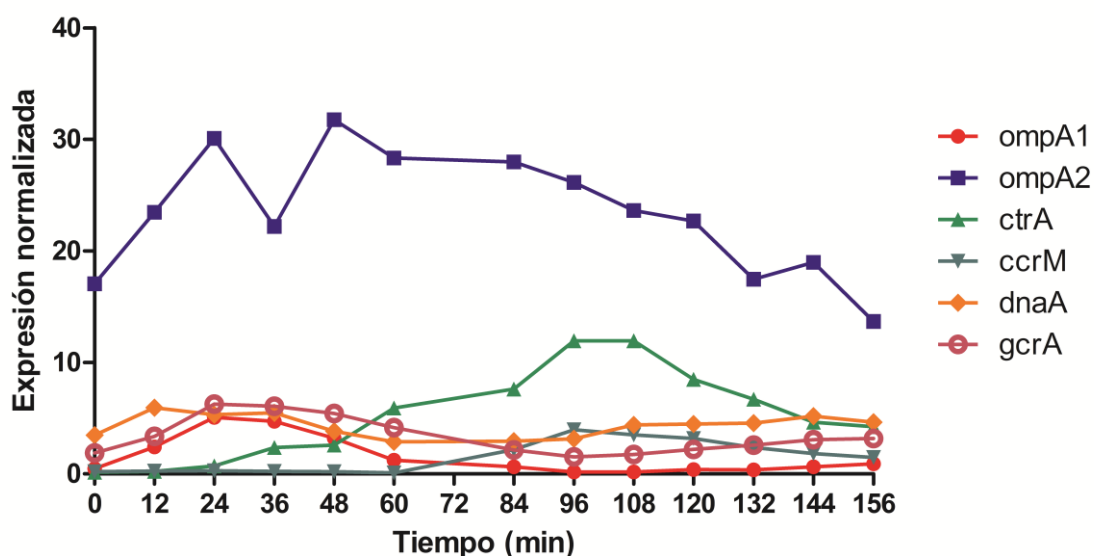


Figura 21. Perfiles de expresión de *ompA1* y *ompA2* a través del ciclo celular en *C. crescentus*. Datos de expresión normalizados de los genes tipo *ompA* así como de genes codificantes para proteínas reguladoras maestras del ciclo celular. Esta información proviene de microarreglos de expresión tomada del trabajo de McGrath *et al.*, 2007.

2. OmpA1 y OmpA2 son proteínas secretadas a través de la membrana interna.

Un evento clave para todas las proteínas de ME es su translocación a través de la membrana interna (MI) hacia el periplasma. Este fenómeno es dirigido por el sistema de secreción Sec, que reconoce de manera específica una secuencia conocida como péptido señal, presente en el extremo N-terminal de todas las proteínas de secreción (Kudva *et al.*, 2013). Esta secuencia ha sido determinada experimentalmente para OmpA de *E. coli* así como para otras OMPs, y dicha información ha permitido desarrollar algoritmos de predicción como PrediSi, Phobius y SignalP 4.0, los cuales

fueron empleados para la predicción del péptido señal de las proteínas tipo OmpA de *C. crescentus* (**Figura 22**) (Hiller *et al.*, 2004; Käll *et al.*, 2007; Petersen *et al.*, 2011). La presencia de estas secuencias en OmpA1 y OmpA2, sugiere que son proteínas secretadas a través de la MI.

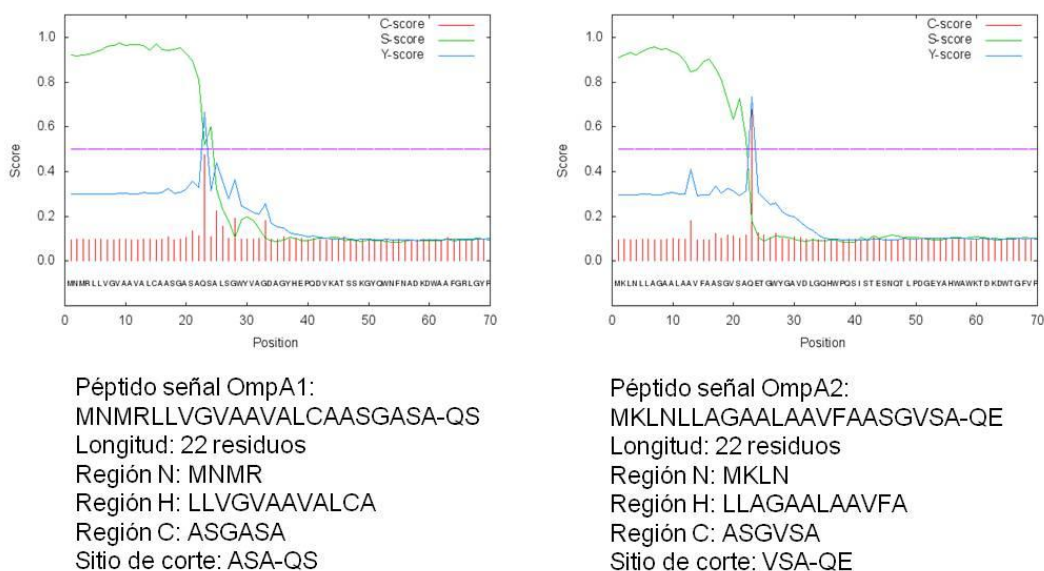


Figura 22. Identificación del péptido señal de las proteínas tipo OmpA en *C. crescentus*. Gráficos obtenidos mediante SignalP 4.0, a través de algoritmos de redes neurales para la predicción de péptidos señal. Esta predicción consta de tres análisis: *C-score*, que reconoce el sitio de corte; *S-score*, que discrimina entre proteínas secretadas y proteínas sin péptido señal; y *Y-score* que es un promedio geométrico de *C-score* y la pendiente de *S-score*, lo cual resulta en una predicción más confiable. También, se presenta la secuencia primaria de los péptidos señal de ambas proteínas, así como las regiones N, H, C y los sitios de corte de acuerdo con Phobius.

3. Predicción de las características estructurales de OmpA1 y OmpA2.

Aunque el análisis de dominios conservados de OmpA1 y OmpA2 de *C. crescentus* mostró que estas proteínas presentan un dominio tipo OmpA en el extremo C-terminal, también reveló que difieren en el dominio de membrana con respecto a OmpA de *E. coli*. Este hecho podría tener consecuencias importantes en la topología y función de dichas proteínas. Por este motivo se decidió analizar su estructura secundaria y terciaria y compararla con su homólogo en *E. coli*.

En las tres proteínas, después del péptido señal se encuentra el dominio barril beta de ME y en el C-terminal el dominio tipo OmpA, los cuales están conectados por una

región rica en prolina. Este hecho es particularmente notable en OmpA2 de *C. crescentus*, donde se encuentran 31 residuos consecutivos de prolina.

Una de las diferencias más importantes entre las tres proteínas es el dominio barril beta, cuya longitud es de 172 residuos para OmpA de *E. coli*, 255 para OmpA1 y 228 para OmpA2. Los dos últimos, han sido agrupados dentro de la superfamilia de proteínas de opacidad LomR (ver figura 20), superfamilia de dominios que carece de caracterización bioquímica y estructural. Por estos motivos, se decidió hacer un análisis más detallado del dominio barril beta. Una primera aproximación fue comparar su estructura secundaria, la cual se predijo mediante PORTER, PredictProtein y PSIPRED (McGuffin *et al.*, 2000; Pollastri G. y McLysaght A., 2005; Yachdav *et al.*, 2014). Posteriormente se obtuvo una estructura secundaria consenso al comparar las predicciones individuales y aceptando como estructura real aquella que estuviera presente en al menos dos de las tres predicciones. En algunos casos hubo discrepancia entre hélice alfa y lámina beta. La distinción entre ambas estructuras se hizo después de la predicción de los cruces transmembranales, asumiendo que estos corresponden a láminas beta en todos los barriles beta que han sido cristalizados y cuya estructura tridimensional ha sido resuelta (Silhavy *et al.*, 2010). La predicción de los segmentos transmembranales fue hecha mediante TransFold, PRED-TMBB, BOCTOPUS y Membrane Protein Explorer, especializados en modelado de barriles beta (Bagos *et al.*, 2004; Waldispühl *et al.*, 2006; Snider *et al.*, 2009; Hayat S. y Elofsson A., 2012). La **figura 23** muestra el consenso de estos análisis. Al igual que OmpA de *Escherichia coli*, OmpA1 y OmpA2 de *Caulobacter crescentus* poseen ocho láminas beta transmembranales, las cuales están flanqueadas por aminoácidos aromáticos (Y, F y W), característico de los barriles beta. PRED-TMBB y BOCTOPUS señalan además la orientación de dichos segmentos, es decir, indican cuáles son los aminoácidos que quedan expuestos hacia el lado extracelular y cuáles hacia el lado periplásmico. Los cruces transmembranales están conectados entre sí a través de tres giros periplásmicos y cuatro asas extracelulares. Los primeros son de una longitud reducida, de entre tres y seis residuos, mientras que las asas extracelulares son de mayor longitud y es en éstas en las que difieren OmpA1 y OmpA2 de *C. crescentus* con respecto a los de OmpA de *E. coli* (**Tabla 2**).

EC_OmpA

MKKT**AIAI**AVALAGFATVA**Q**AAPKDNTW**YT**GA**KL**GWSQ**Y**HDTGF**INN**NGP
 TH**EN**QLGAGAFGG**Y**Q**VN**P**Y**VGF**EM**GYDWLGRMP**Y**KGS**V**ENGAYKA**Q**G
 VQLTA**KL**G**Y**PITDDLD**I**YTRLG**M**VWRAD**T**KS**N**VY**G**KNHDTG**V**SP**V**FAG**G**
 V**E**Y**A**IT**PE**IATR**LE**Y**Q**WT**NN**IGDAHTIG**TR**PD**NG**ML**S**L**G**V**S**Y**R**F**G**QGE**A**AP
 VV**A**P**A**P**A**P**A**PEVQTKHF**T**LKSD...

CC_OmpA1

M**N**M**R**LLV**G**V**A**A**V**AL**C**A**S**GA**S**A**Q**S**A**LS**G**W**Y**V**A**G**D**AG**Y**HEP**Q**D**V**KT**S**SK
 G**Y**Q**W**N**F**N**A**DK**D**WA**A**F**G**R**L**G**Y**R**F**SP**N**WR**V**E**A**E**Y**G**R**PS**D**L**Q**G**V**R**G**AG**L**
 S**G**A**Q**P**I**T**A**G**V**G**R**T**S**AS**P**G**C**G**E**P**N**GE**L**KA**S**T**L**MA**N**L**I**F**D**M**G**G**D**S**R**L**S**P**F**I**G**
 V**G**AG**T**A**W**V**H**N**K**V**Y**G**Q**L**S**G**V**P**A**GA**I**Y**Q**N**T**GF**D**D**V**D**Q**A**F**A**M**Q**G**LL**G**V**A**W
 N**F**AD**N**W**S**MD**L**T**G**R**Y**L**R**SS**K**L**D**W**G**S**V**T**Q**N**A**G**P**AG**S**I**T**D**V**G**T**F**S**G**R**Y**K**D**T**
 S**V**T**L**G**L**R**Y**T**F**G**A**PP**P**PL**P**P**A**PT**P**TP**T**P**Q**PP**P**LE**P**T**P**PP**I**PP**V**Q...

CC_OmpA2

M**K**L**N**LLAGA**A**LA**V**FA**S**GV**S**A**Q**ET**G**W**Y**GA**V**DL**G**Q**H**W**P**Q**S**I**S**T**E**S**N**Q**T**L
 PD**G**E**Y**A**H**W**A**W**K**TD**K**D**W**T**G**F**V**R**L**G**Y**Q**F**N**K**N**W**RA**E**V**E**GG**Y**R**P**G**D**L**K**A**V**R
 G**N**A**V**R**Q**Q**P**VA**L**CT**P**G**V**TR**T**SS**S**Q**R**C**G**SP**D**GS**I**DS**W**SL**M**A**N**V**I**Y**D**F**A**P**D**S
 W**L**N**P**F**V**G**A**G**V**N**R**LD**V**KT**L**G**Q**F**S**G**V**G**A**VT**P**G**N**V**A**V**Q**N**L**T**V**DD**D**DM**A**V**A**
 W**Q**A**I**AG**A**S**I**K**A**T**D**K**L**K**V**D**V**T**Y**R**Y**L**T**G**S**D**H**S**W**Q**S**S**G**S**G**LL**Q**P**G**A**F**S**G**Q**Y**T
 D**Q**S**L**T**V**G**L**R**Y**S**F** P**P...

Figura 23. Comparación de la estructura secundaria y los cruces transmembranales del barril beta de OmpA en *E. coli* y *C. crescentus*. Consenso de los análisis de estructura secundaria y de predicción de cruces transmembranales presentes en los barriles beta de OmpA en ambas bacterias. Ver detalles en el texto. Verde= péptido señal; rojo=cruces transmembranales; azul= asas extracelulares; amarillo= giros periplásmicos.

Tabla 2. Comparación de la longitud de las asas extracelulares de las proteínas OmpA de *C. crescentus* respecto a OmpA *E. coli*.

Asa extracelular	EC_bbOmpA	CC_bbOmpA1	CC_bbOmpA2
1	27	22	27
2	13	41	43
3	17	30	37
4	16	34	29

Posteriormente se hizo el modelo tridimensional por homología de las proteínas OmpA mediante SWISS-MODEL, ocupando como templado la estructura del barril beta de OmpA de *Shigella flexneri* (PDB ID: 3nb3.1) y la estructura del dominio periplásmico de OmpA de *E. coli* (PDB ID: 2MQE), obtenidas mediante microscopía electrónica y resonancia magnética nuclear en solución, respectivamente. Ambos fueron los templados con mayor cobertura y similitud a las proteínas OmpA de *C. crescentus*. Para el caso de OmpA de *E. coli*, el modelo obtenido mediante SWISS-MODEL, empleando los templados antes citados, es muy parecido al procedente de la información experimental (Ishida *et al.*, 2014). Estas predicciones mostraron que el barril beta de OmpA1 y OmpA2 tienen un diámetro similar al de OmpA de *E. coli*. Sin embargo, una diferencia notable es la longitud transmembranal del barril beta, que en el caso de OmpA2 y OmpA de *E. coli* es cercana a 30Å, mientras que para OmpA1 es de 22Å. También, difiere la estructura secundaria de la región de las asas extracelulares, que en el caso de OmpA1 y OmpA de *E. coli* corresponde a regiones no estructuradas, mientras que OmpA2 se organiza en tres hélices alfa. Las diferencias anteriores podrían ser las razones por las cuales el análisis BLAST no los agrupa con los barriles OmpA de ME (**Figura 24**).

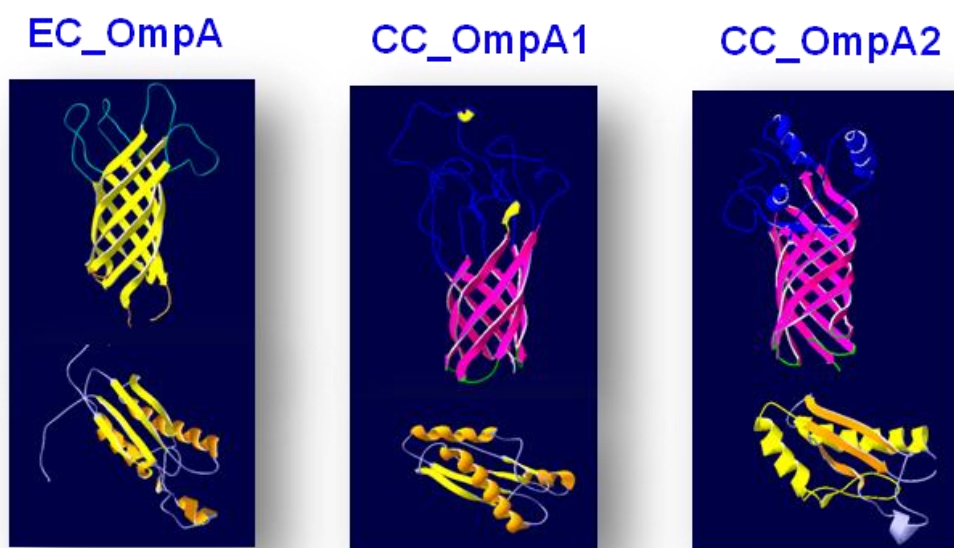


Figura 24. Predicción de la estructura terciaria de las proteínas OmpA de *C. crescentus*. Modelo tridimensional de las proteínas OmpA de *E. coli*, y de OmpA1 y OmpA2 de *C. crescentus*, obtenidos mediante SWISS-MODEL.

Después del barril beta de los tres homólogos OmpA, se encuentra la región rica en prolina, la cual no pudo ser modelada por SWISS-MODEL. En el caso del dominio C-terminal tipo OmpA, se observa que la longitud es similar en las tres proteínas

(aproximadamente 115 residuos), por lo que está mejor conservado que el dominio N-terminal (ver figura 20). El modelo de estructura terciaria mostró que los tres dominios C-terminal poseen el arreglo $\beta/\alpha/\beta/\alpha/\beta/\alpha/\beta$ (**Figura 24**) y fue posible identificar dos residuos (un ácido aspártico D y una arginina R) que podrían ser responsables del reconocimiento y unión del dominio OmpA con la pared celular, de acuerdo con los datos cristalográficos del dominio periplásmico de OmpA de *A. baumannii* en presencia de sustrato (**Figura 25**) (Park *et al.*, 2012).

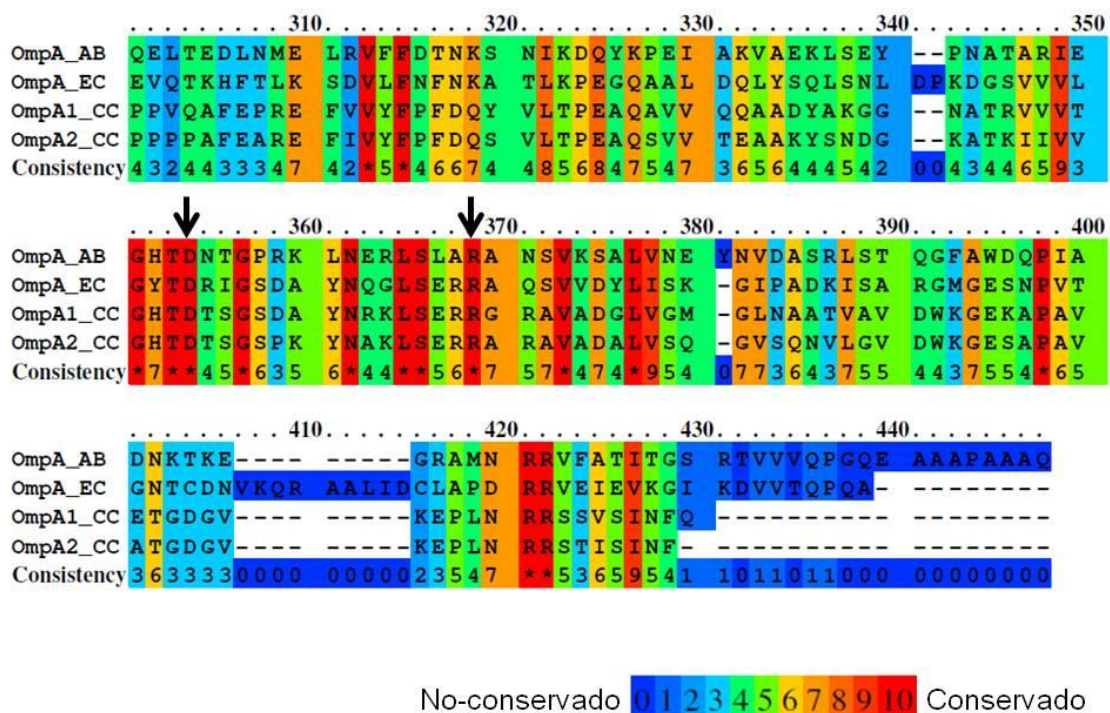


Figura 25. Identificación de los aminoácidos que podrían permitir la unión de OmpA1 y OmpA2 con la pared celular. Alineamiento múltiple de los dominios periplásmicos de OmpA de *A. baumannii* (OmpA_AB), de *E. coli* (OmpA-EC), y de *C. crescentus* (OmpA1_CC y OmpA2_CC) mediante PRALINE Multiple Sequence Alignment. La gama de colores indica el grado de conservación en cada posición. Las flechas señalan los residuos conservados que establecen una interacción no-covalente entre el dominio periplásmico OmpA_AB y el peptidoglicano.

4. OmpA1 y OmpA2 son importantes en el mantenimiento de la estabilidad de la envoltura celular en *C. crescentus*.

Para determinar la función de las proteínas OmpA1 y OmpA2 en *C. crescentus*, se generaron cepas mutantes sencillas de estos genes reemplazando su secuencia codificante por un módulo de resistencia a espectinomicina. Debido a la similitud

estructural entre OmpA1 y OmpA2 es muy probable la existencia de redundancia funcional, motivo por el que se generó también una cepa carente de ambos genes. El genotipo de estas cepas mutantes fue verificado mediante PCR (datos no mostrados). Las cepas obtenidas ($\Delta ompA1$, $\Delta ompA2$ e incluso, $\Delta ompA1/\Delta ompA2$) fueron viables, lo cual está en concordancia con resultados previamente publicados sobre mutagénesis global del genoma de *C. crescentus*, donde se identificaron los genes esenciales para esta bacteria (Christen *et al.*, 2011).

Estas cepas mutantes, así como la silvestre se crecieron en medio rico PYE y medio mínimo M5GG suplementado con 10mM o 50 μ M de fosfatos y se observaron en fase exponencial mediante microscopía óptica. No se detectaron cambios morfológicos en ninguna de las cepas mutantes en las condiciones de crecimiento usadas. Sin embargo, en la cepa doble mutante crecida en medio mínimo, se observaron algunas células con protuberancias en la periferia, y con menor frecuencia, células con opacidad reducida, característica de células muertas o en proceso de lisis (**Figura 26**).

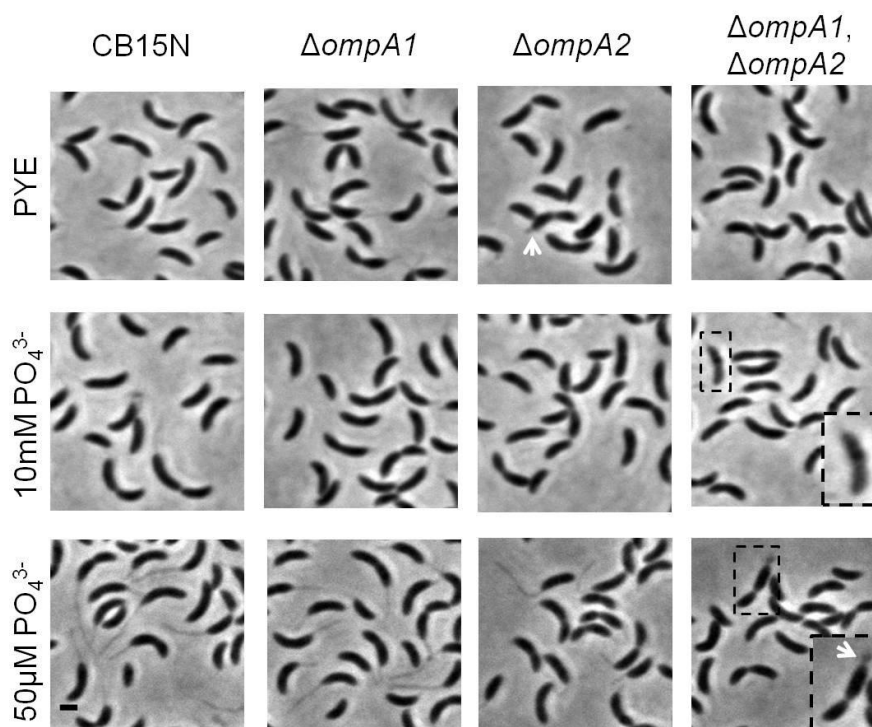


Figura 26. Morfología celular de las cepas mutantes en OmpA. Microscopías de campo claro de la cepa silvestre y de las mutantes sencillas y doble en *ompA1* y *ompA2*, creciendo en fase exponencial en medio rico PYE y medio mínimo M5GG con 10mM o 50 μ M de fosfatos. Las flechas señalan posibles protuberancias de la envoltura celular. La amplificación en $\Delta ompA1, ompA2$ en la condición 10mM de fosfatos, muestra una célula con menor opacidad y una protuberancia cercana a la mitad de la célula. La barra representa 1 μ m.

Estos resultados sugieren que la ausencia de las proteínas OmpA podría resultar en inestabilidad de la ME. Para evaluar este efecto, se tiñeron dichas cepas con el colorante lipofílico FM4-64X. Se observaron las células mediante microscopía de fluorescencia justo después de la tinción. Esto reveló que tanto la cepa $\Delta ompA2$ como la $\Delta ompA1/\Delta ompA2$, liberan vesículas de membrana externa (VME) en todas las condiciones de crecimiento. En algunos casos fue posible observar parches de fluorescencia borrosa cerca de las células, los cuales posiblemente corresponden a porciones desprendidas de ME. Aunque el número de vesículas liberadas por las cepas mutantes $\Delta ompA2$ y $\Delta ompA1/\Delta ompA2$ es similar, existe una mayor diversidad de tamaño en la cepa doble mutante (**Figura 27**). Estos datos muestran que las proteínas OmpA1 y OmpA2 contribuyen al mantenimiento de la estabilidad de la ME y su ausencia provoca pérdida de membrana a través de la formación de vesículas.

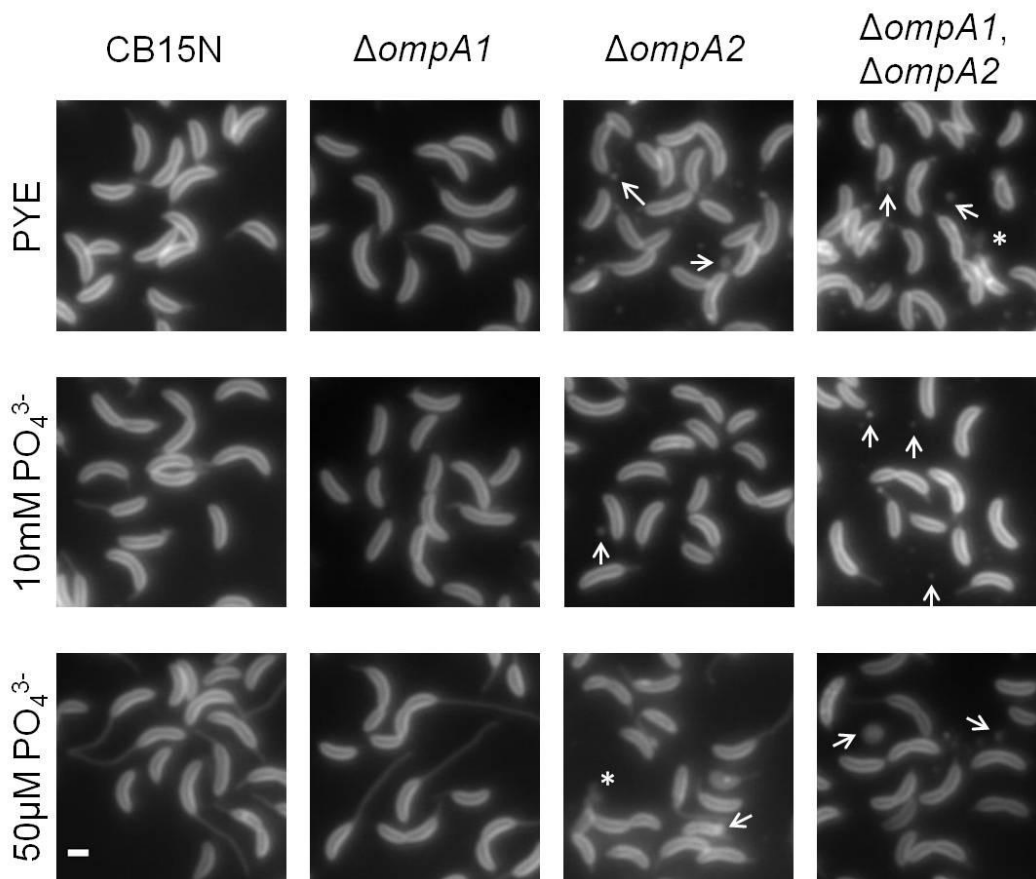


Figura 27. Inestabilidad de la envoltura celular en cepas carentes de OmpA. Microscopías de fluorescencia de células teñidas con el colorante FM4-64X de las cepas silvestre y las mutantes de *ompA1*, *ompA2* y *ompA1,2* en diferentes medios de cultivo. Las flechas señalan algunas de las múltiples vesículas de membrana externa, mientras que los asteriscos, fluorescencia borrosa que podría indicar pérdida de ME en las cepas $\Delta ompA2$ y en la $\Delta ompA1, ompA2$. La barra representa 1 μm .

Se caracterizó también la cinética de crecimiento de estas mutantes con respecto a la cepa silvestre CB15N en distintos medios de cultivo. No se observaron diferencias en la fase lag de crecimiento ni en la densidad óptica máxima a 660nm, pero el tiempo de duplicación de la cepa $\Delta ompA2$ y el de la doble mutante, fue mayor que el de la cepa silvestre en medio rico PYE y en medio mínimo M5GG suplementado con 50 μ M de fosfatos (**Figura 28**).

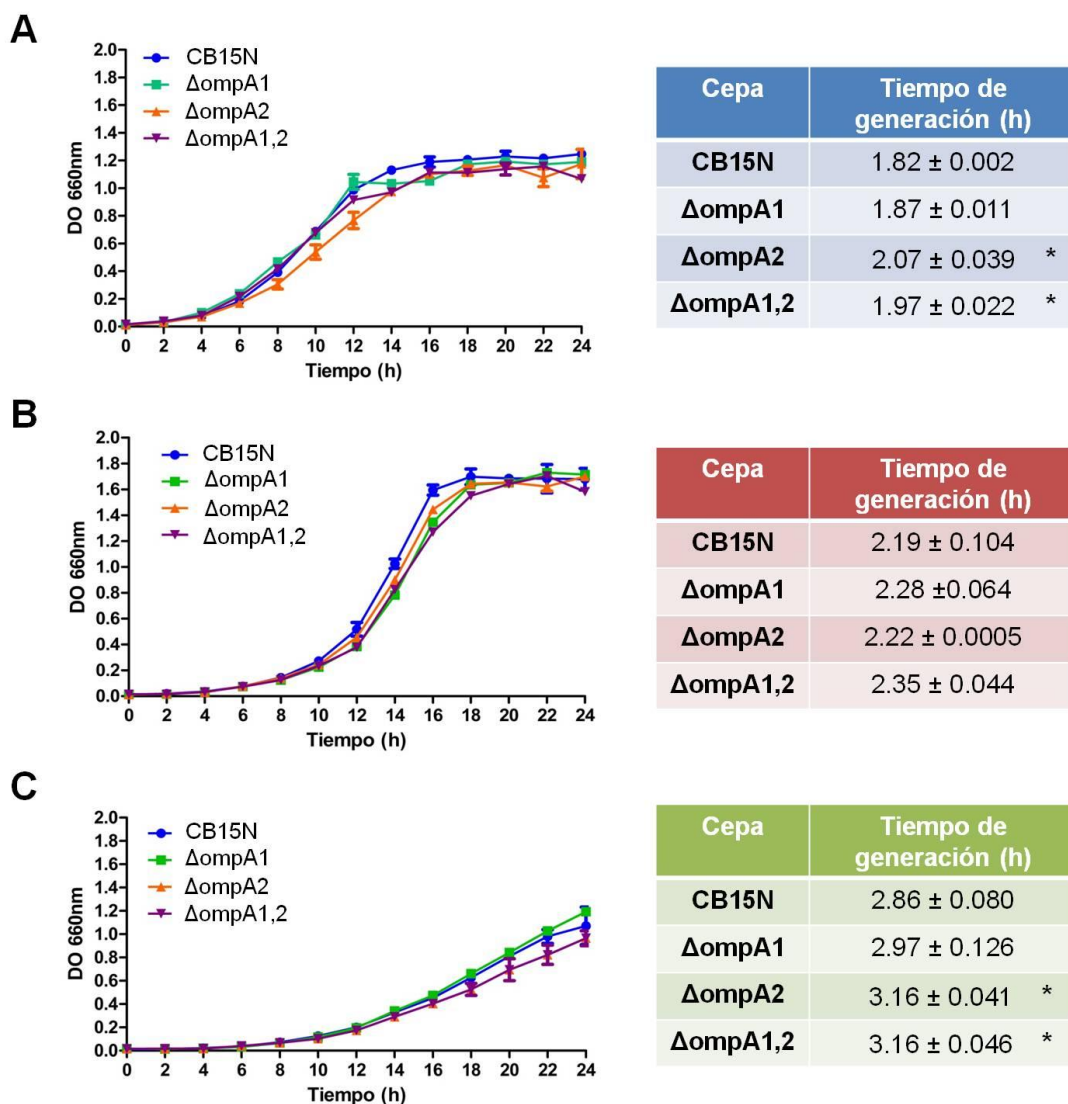


Figura 28. Caracterización de la cinética de crecimiento de cepas carentes de OmpA.

Curvas de crecimiento y tiempos de generación de las cepas silvestre, $\Delta ompA1$, $\Delta ompA2$ y $\Delta ompA1,2$ en medio rico PYE (**A**), y en medio mínimo M5GG 10mM de fosfatos (**B**) o 50 μ M de fosfatos (**C**). El crecimiento fue evaluado en unidades de densidad óptica medida por espectrofotometría a 660nm. Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0.05$) del tiempo de generación promedio con respecto al de la cepa silvestre, de acuerdo con una prueba t de Student. Los datos son el promedio de tres experimentos independientes y las barras de error corresponden a la desviación estándar.

Para enterobacterias se ha descrito que cepas mutantes afectadas en la estabilidad de la envoltura celular son más susceptibles a diferentes tipos de sustancias en el medio de crecimiento. Dado que se espera que OmpA sea relevante para el mantenimiento de la ME, se evaluó la sensibilidad de las mutantes sencillas y la doble mutante ante diferentes antibióticos (ácido nalidíxico y cloranfenicol), detergentes (SDS, deoxicolato de sodio (DCS) y Tween-20) o lisozima en un ensayo de difusión en placa. En esta prueba se detectó un halo de inhibición de crecimiento mayor en las tres cepas mutantes con respecto a la silvestre, sólo en presencia de cloranfenicol (**Figura 29**). Este resultado muestra que la integridad de la ME en las mutantes de *ompA* no se afectó de manera severa.

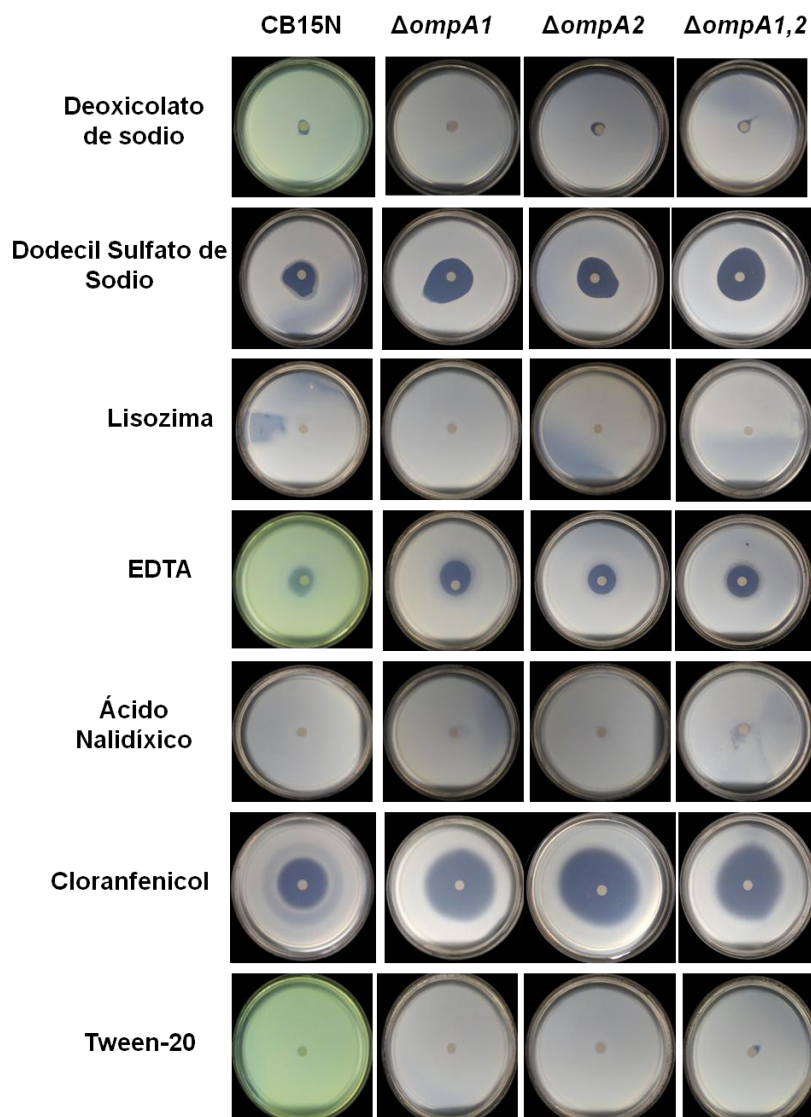


Figura 29. Ensayo de inhibición en placa de las cepas mutantes en *ompA* ante diferentes retos químicos. Halos de inhibición de crecimiento causado por las diferentes sustancias en las cepas indicadas. El experimento fue repetido tres veces de forma independiente.

Aunque el ensayo de difusión en placa mostró que las cepas mutantes no son más sensibles a los distintos tipos de retos, se evaluó este parámetro en cultivo líquido con agitación constante en presencia de diferentes concentraciones de SDS, EDTA y DCS y se registró la densidad óptica a 660nm tras 8h de crecimiento; sólo se observó una diferencia en la condición con DCS (datos no mostrados). Una curva de crecimiento en medio rico PYE mostró que en presencia de esta sal biliar, el crecimiento de la cepa silvestre y las mutantes era similar y con tiempos de generación prácticamente iguales. Sin embargo, todas las cepas arrestaron el crecimiento en un cierto punto de la curva, aunque este arresto ocurrió más temprano y fue más pronunciado en la cepa mutante $\Delta ompA1$ y $\Delta ompA2$ que en la cepa silvestre. De manera sorprendente, la cepa doble mutante se comportó como la silvestre, a pesar de carecer de cualquier homólogo de OmpA (**Figura 30**).

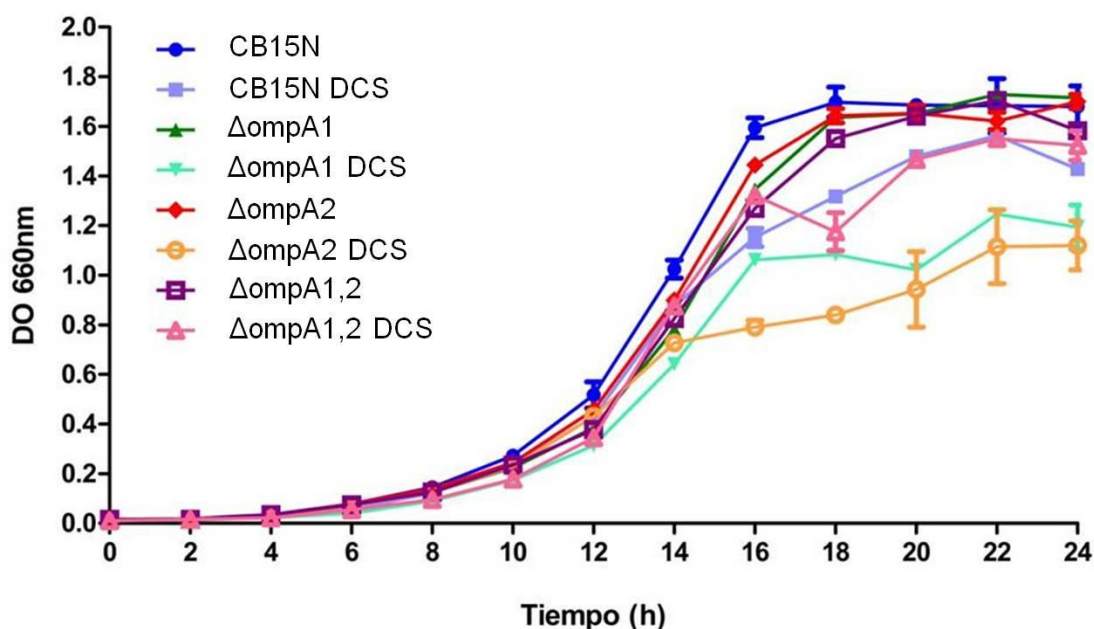


Figura 30. Cinética de crecimiento de las cepas mutantes en *ompA* en presencia de deoxicolato de sodio. Curva de crecimiento en medio rico PYE de las cepas mutantes en *ompA* así como de la cepa silvestre, en ausencia y presencia de deoxicolato de sodio (DCS) a una concentración de 0.5mg/mL desde el inicio del cultivo. El crecimiento fue cuantificado en unidades de densidad óptica a 660nm por 24h continuas. Los datos son el promedio de al menos tres experimentos independientes y las barras de error corresponden a la desviación estándar.

El estrés por temperatura es otro tipo de reto al que pueden ser sometidas estas cepas para acentuar sus fenotipos. Para ello, se incubaron cultivos líquidos de las cepas carentes de OmpA a 37°C por 24h en medio rico PYE. En el caso de la cepa silvestre,

$\Delta ompA1$ e incluso en la doble mutante, el tiempo de generación fue menor con respecto al calculado cuando las mismas cepas crecían a 30°C. Únicamente se registró un retraso de aproximadamente 50min en el tiempo de generación de la cepa que carece de OmpA2 con respecto a la cepa silvestre (**Figura 31**).

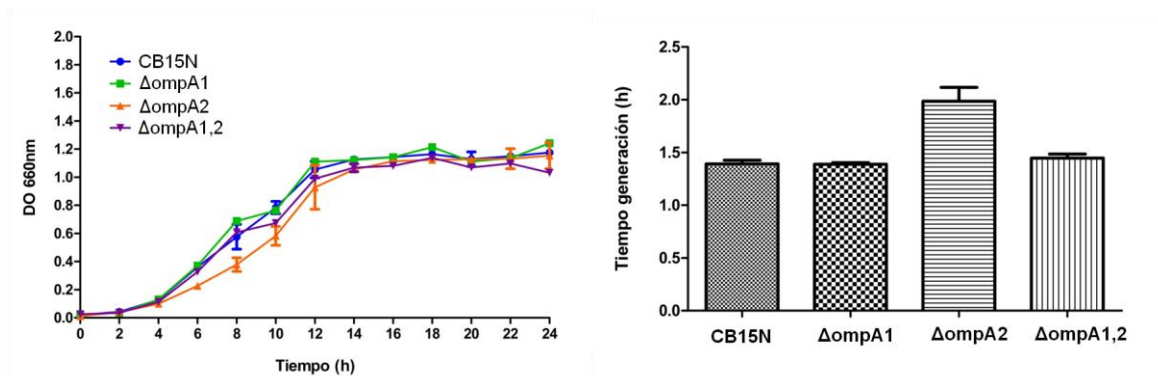


Figura 31. Crecimiento de las cepas carentes de *ompA* sometidas a estrés por temperatura a 37°C. A la izquierda se muestra la curva de crecimiento en medio rico PYE y a la derecha los tiempos de generación (en horas) calculados para cada cepa a partir de los datos correspondientes a la fase exponencial de crecimiento. Los datos son el promedio de tres experimentos independientes y las barras de error corresponden a la desviación estándar. De acuerdo con una prueba t de Student, sólo hay diferencia significativa entre los tiempos de generación de la cepa $\Delta ompA2$ y la silvestre ($p < 0.05$).

5. Participación de OmpA1 y OmpA2 en el crecimiento de la prosteca de *C. crescentus*.

La observación inicial de las cepas mutantes en los genes *ompA* creciendo en medio líquido con limitación de fosfato, mostró que estas células tenían prostecas más cortas que la cepa silvestre. Para facilitar la observación y medición de esta estructura, las cepas fueron teñidas con el colorante FM4-64X. Se determinó el porcentaje de células prostecadas así como la longitud promedio de la prosteca de células creciendo exponencialmente en limitación de fosfato. El porcentaje de células con prosteca en la cepa silvestre y la mutante en *ompA1* fue similar, mientras que la cepa $\Delta ompA2$ y la doble mutante mostraron una disminución cercana al 20% y 40% respectivamente, en comparación con la cepa silvestre. Aunque el número de células prostecadas no disminuyó en la cepa mutante $\Delta ompA1$, la longitud de la prosteca fue en promedio 1 μm menor que las de la cepa silvestre. Para las cepas $\Delta ompA2$ y doble mutante, dicha reducción fue ligeramente mayor (**Figura 32**). Estas diferencias no estuvieron presentes en cultivos estacionarios, sugiriendo que la ausencia de las proteínas OmpA

produce un retraso en la aparición y probablemente en el crecimiento de la prosteca, mismo que es compensado por la reducción de la velocidad de crecimiento en la fase estacionaria.

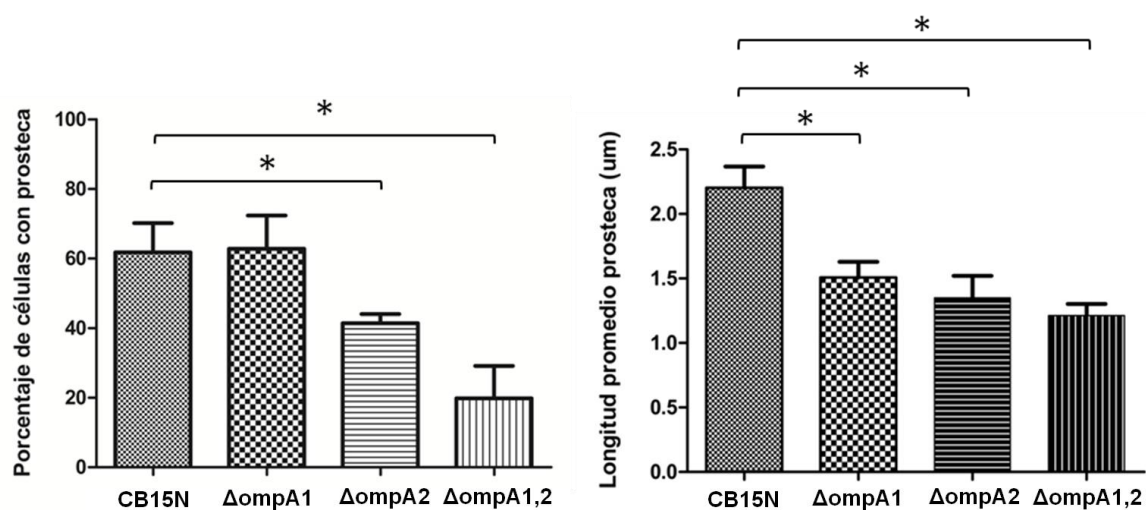


Figura 32. Crecimiento de la prosteca en cepas mutantes de *ompA*. El crecimiento de la prosteca fue evaluado en cepas creciendo en medio mínimo M5GG suplementado con 50μM de fosfatos en fase exponencial. A la izquierda se muestra el porcentaje de células prostecadas, y a la derecha la longitud promedio de la prosteca (en μm) para todas las cepas. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de los datos de tres experimentos independientes. Los asteriscos representan la existencia de diferencias significativas con respecto a la cepa silvestre CB15N de acuerdo con una prueba t de Student ($p < 0.05$).

6. Distribución de OmpA1 y OmpA2 en el cuerpo celular de *C. crescentus*.

Para continuar con la caracterización de las proteínas homólogas a OmpA en *C. crescentus*, se decidió determinar su localización en el cuerpo celular. Para ello, los genes *ompA1* y *ompA2* se fusionaron en fase con el gen *m-Cherry*, que codifica para la proteína roja fluorescente. Tras recombinar con el cromosoma de *C. crescentus*, ambas fusiones se expresaron como única copia del gen y quedaron reguladas por su promotor nativo correspondiente. La localización de estas proteínas de fusión se visualizó mediante microscopía de fluorescencia.

a) OmpA1 se localiza de forma dispersa en *C. crescentus*.

La microscopía de fluorescencia mostró que la fusión de OmpA1 con mCherry se localiza de forma dispersa en la ME de *C. crescentus*, aunque existen algunas regiones de la célula donde la proteína parece acumularse. El crecimiento de esta

cepa en medio mínimo M5GG suplementado con 50 μ M de fosfatos, condición que promueve el crecimiento de la prosteca, mostró que OmpA1-mCherry se distribuye también a lo largo de esta estructura. Este resultado corrobora la localización predicha de OmpA1 en la envoltura celular, ya que la prosteca es una estructura que carece de contenido citoplásmico (ver figura 22). La estabilidad de esta proteína de fusión fue verificada mediante Western-Blot α -mCherry, en el que fue posible detectar una única banda de ~68kDa, que corresponde a la proteína procesada, es decir, en la que el péptido señal fue removido en la MI antes de ser translocada al periplasma. Peso esperado de OmpA1-mCherry no procesada: ~70kDa; péptido señal: ~2kDa; mCherry: ~27kDa; OmpA1: 41kDa (**Figura 33**).

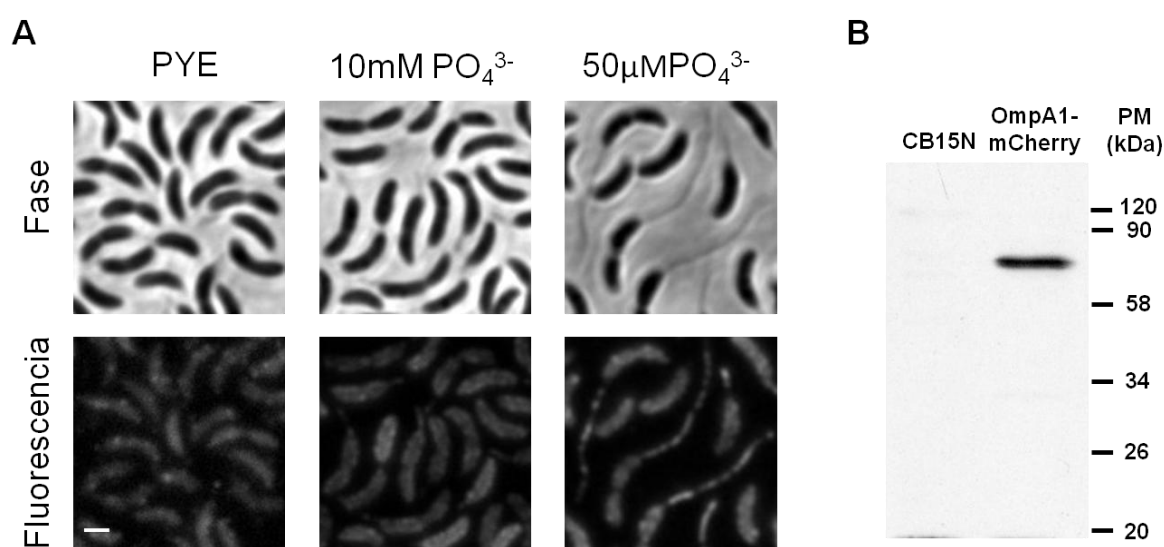


Figura 33. Localización y estabilidad de la fusión OmpA1-mCherry en *C. crescentus*. **A)** Microscopías de fluorescencia de la cepa que expresa OmpA1-mCherry como única copia del gen y desde su promotor nativo. Las células mostradas son representativas de cultivos creciendo en fase exponencial en los medios líquidos indicados. La barra representa 1 μ m. **B)** Western-Blot α -mCherry a partir de extractos totales de la cepa silvestre y OmpA1-mCherry. En esta última, se detectó una única banda de aproximadamente 68kDa.

Para determinar la dinámica de localización de esta proteína a lo largo del ciclo celular, se procedió a hacer un *time-course*, experimento en el cual la población de células nadadoras fue separada de las células prostecadas y tras ser cultivadas nuevamente, fueron visualizadas por microscopía de fluorescencia a través del tiempo a lo largo de un ciclo celular. Este experimento mostró que OmpA1 se distribuye de manera homogénea en el cuerpo de la bacteria, con excepción de la fase divisional (120min

después de la sincronía), donde se observan puntos discretos de fluorescencia con mayor intensidad que el resto del cuerpo celular. Dicho estadio corresponde a células avanzadas en el proceso de división, en las que es posible identificar el sitio de constricción y al menos dos de estos puntos de fluorescencia, uno para cada célula hija. Estos puntos de fluorescencia desaparecieron veinte minutos después y una vez concluida la división celular estuvieron ausentes en células nadadoras, tal como al principio de la sincronía (**Figura 34**).

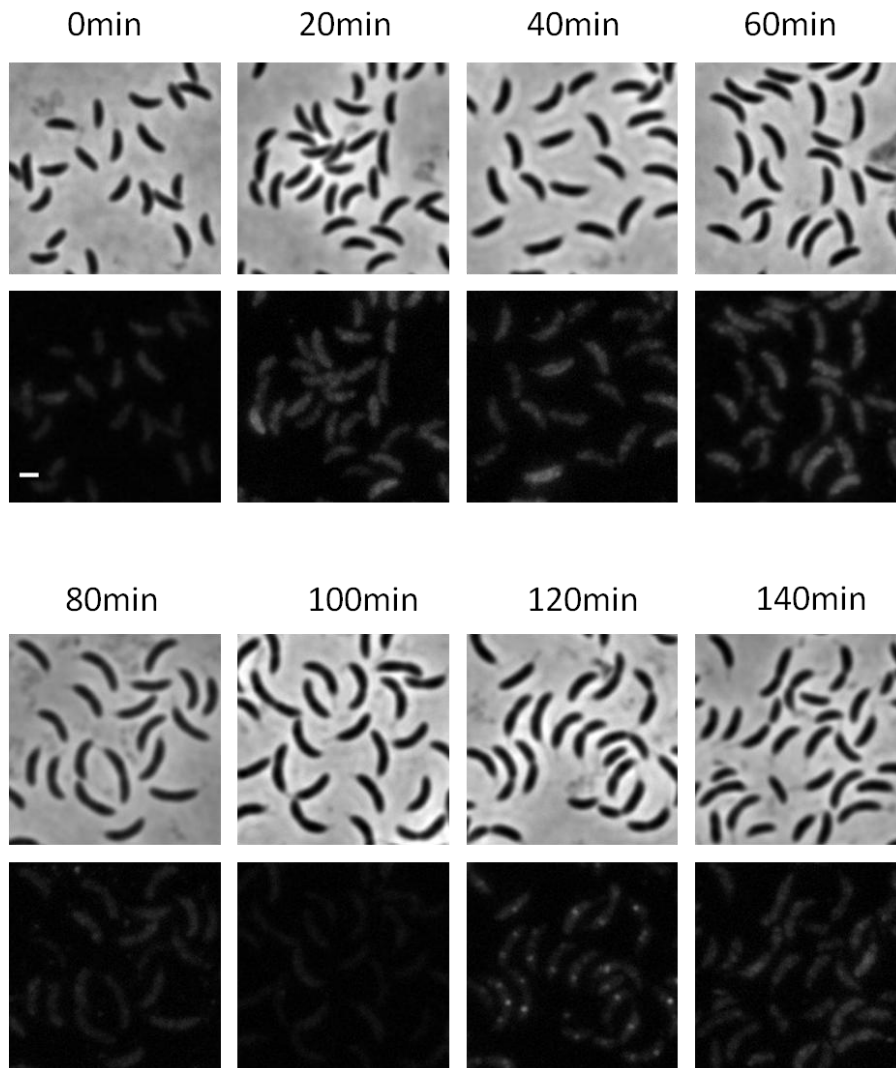


Figura 34. Localización de OmpA1-mCherry a través del ciclo celular. Microscopías de fluorescencia de células que expresan la fusión génica *ompA1-mCherry* como única copia del gen bajo el control del promotor nativo. Las células fueron crecidas en medio mínimo M5GG con 10mM de fosfatos, y tras la sincronía se reinocularon las células nadadoras en el mismo medio y se cultivaron a 30°C. Las imágenes corresponden a alícuotas tomadas del cultivo cada 20min. La barra representa 1µm.

b) OmpA2 forma un gradiente de concentración a partir del polo celular prostecado.

Un trabajo previo realizado por nuestro grupo de trabajo inició la caracterización de la distribución de la proteína codificada por el gen CC_3494 en *C. crescentus* (Díaz-Rentería, 2013). Como ya se mencionó en la primera sección de resultados, decidimos nombrar a este gen como *ompA2*. Al igual que la fusión OmpA1-mCherry, la fusión de OmpA2 con esta proteína fluorescente en el extremo C-terminal fue funcional. Mediante microscopía de fluorescencia se encontró que OmpA2-mCherry es una proteína muy abundante que se localiza en la ME de *C. crescentus*. En comparación con la localización dispersa de OmpA1-mCherry, la proteína OmpA2-mCherry se distribuye de forma heterogénea en la ME, ya que forma un gradiente de concentración. La mayor acumulación de OmpA2-mCherry comienza en la prosteca y el polo celular viejo y disminuye hacia el polo celular nuevo. El gradiente de concentración es más evidente en células crecidas en medio mínimo M5GG suplementado con 50µM de fosfatos, sobretodo en aquellas células en las que la prosteca es de mayor longitud, lo cual es un indicador de la edad relativa de la célula. Este resultado muestra que el gradiente de OmpA2 se acentúa conforme la célula envejece (**Figura 35**).

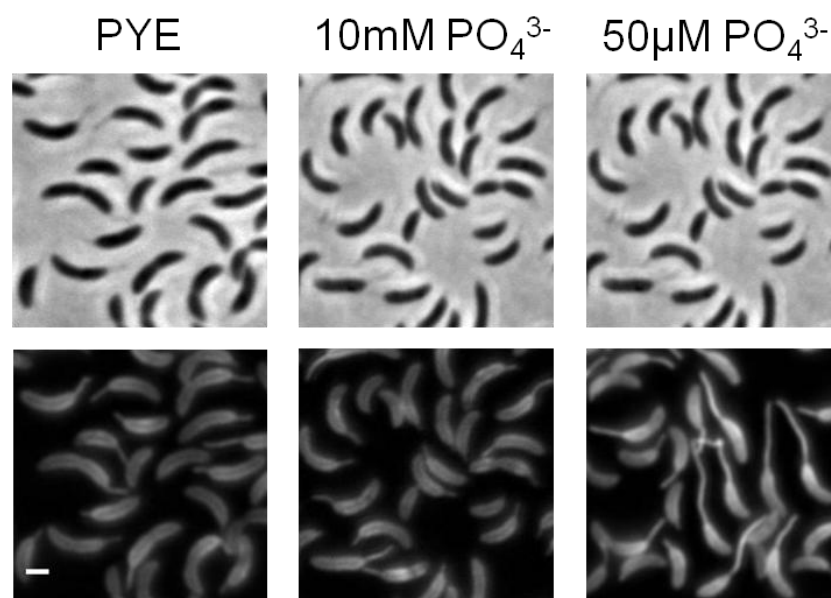


Figura 35. Localización de la proteína de fusión fluorescente OmpA2-mCherry en *C. crescentus*. Microscopías de fluorescencia de la cepa que expresa OmpA2 fusionada con mCherry en el extremo C-terminal, creciendo en fase exponencial en medio rico PYE y medio mínimo M5GG con 10mM o 50µM de fosfatos. La longitud de la barra corresponde a 1µm.

La estabilidad de la fusión OmpA2-mCherry fue corroborada mediante Western-Blot a partir de extractos totales hervidos a 100°C por 15min, en el cual se detectaron dos bandas de un peso mayor al de la proteína completa (~67kDa). Esto puede ser explicado por una migración anómala de la proteína durante la electroforesis aún en condiciones desnaturizantes y a grados incompletos de desnaturalización. Dichos comportamientos son similares a los de OmpA de *E. coli*, la cual además presenta modificación dependiente por temperatura, interpretada como un indicador de su presencia en la ME (Nakamura y Mizushima, 1976; Beher *et al.*, 1980; Verhoeven *et al.*, 2013). Para probar esto, evaluamos mediante Western-Blot la desnaturalización de OmpA2-mCherry a diferentes temperaturas. En esta proteína de fusión existen dos barriles β , uno de los cuales es proporcionado por la proteína fluorescente. A 45°C se detectaron tres poblaciones, la de menor peso y mayor intensidad corresponde a la fracción de proteína completamente nativa. A 60°C ocurrió la transición de mCherry de nativa a desnaturalizada y esta conversión fue completa a 80°C, condición en la que se detectaron sólo dos bandas. Fue a 100°C que el barril β de OmpA2 comenzó a desnaturalizarse, aunque esta conversión no fue completa (**Figura 36**). Este resultado sugiere que OmpA2-mCherry es estable y está ensamblada en la ME. Otro hecho que indica la funcionalidad de la proteína de fusión es la ausencia de VME, las cuales se forman en ausencia de OmpA2 (ver figura 27).

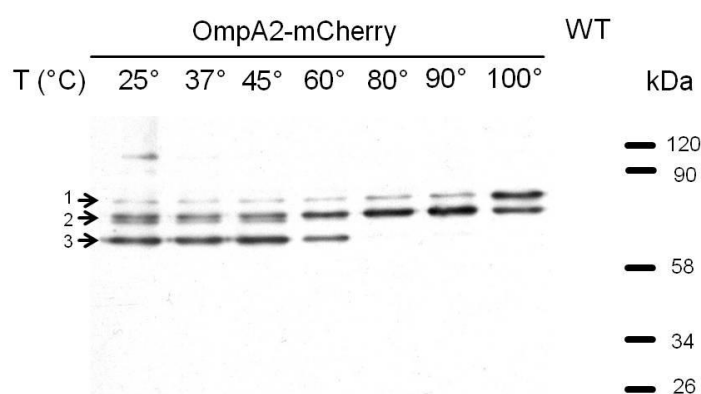


Figura 36. Estabilidad de la fusión OmpA2-mCherry y comportamiento anómalo en SDS-PAGE. Western-Blot α -mCherry a partir de extractos totales de la cepa que expresa OmpA2-mCherry. Como control negativo se incluye el extracto total de la cepa silvestre (WT). Los extractos fueron desnaturizados a diferentes temperaturas (25, 37, 45, 60, 80, 90 y 100°C) en presencia de SDS y β -mercaptoetanol por 15min y sonicados para completar la lisis. La cantidad de proteína cargada (3 μ g) en cada pozo fue cuantificada mediante Bradford. Las flechas indican los diferentes grados de desnaturalización de OmpA2-mCherry: 1) señala a la proteína completamente desnaturalizada, 2) la población en la que el barril beta de mCherry está desnaturalizado y 3) la fracción de proteína completamente nativa.

Debido a que se conocen pocos casos de proteínas de ME con un patrón de localización similar, se decidió caracterizar con mayor detalle la formación del gradiente de OmpA2 en *C. crescentus*.

7. La formación del gradiente de OmpA2 comienza en etapas tempranas del ciclo celular.

Para determinar en qué momento del ciclo celular comenzaba a formarse el gradiente de OmpA2-mCherry, se llevó a cabo un *time-lapse* a partir de células sincronizadas expresando OmpA2-mCherry. Este método nos permitió aislar células nadadoras e inspeccionar su progresión a través del ciclo celular. En estas células, la replicación y la segregación del cromosoma se siguieron como marcadores del final de la fase nadadora del ciclo celular. Para ello se co-expresó en estas células una fusión de la proteína MipZ con YFP, que permitió determinar aquellas células en las cuales la segregación del cromosoma había comenzado, pues esta proteína se asocia con un locus cercano al origen de replicación del cromosoma. La localización de MipZ-YFP también permitió la identificación de los polos celulares nuevo y viejo en las fases tempranas del ciclo celular. Las imágenes de *time-lapse* mostraron que el gradiente de concentración de OmpA2-mCherry se hace más definido conforme las células progresan a través del ciclo celular. Usando MicrobeTracker y MATLAB, se obtuvieron perfiles individuales de intensidad de fluorescencia para cien células de cada punto después de la sincronía. Estos perfiles mostraron que existen dos poblaciones de células con diferente localización de OmpA2-mCherry: una en la que la proteína se distribuye de manera homogénea, y otra en la que OmpA2 forma un gradiente de concentración. Se cuantificó el número de células que mostraban un gradiente polar en los distintos tiempos después de la sincronía. De acuerdo con este análisis, el número de células con un gradiente polar comenzó a incrementarse desde el inicio del ciclo celular (**Figura 37**).

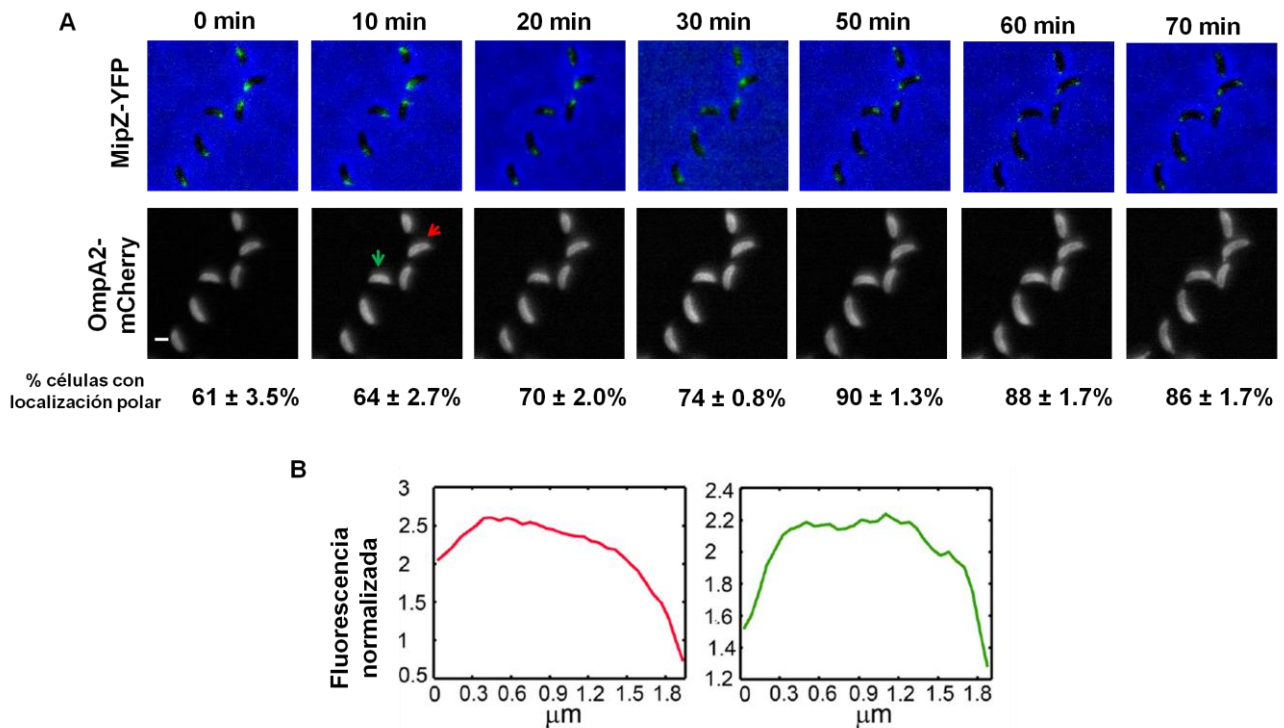


Figura 37. Formación del gradiente de OmpA2-mCherry en *C. crescentus* a través del ciclo celular. A) Microscopías de fluorescencia de la cepa que co-expresa MipZ-YFP (arriba) y OmpA2-mCherry (abajo), a través del ciclo celular. El tiempo indicado es con respecto al inicio de la sincronía. La flecha roja indica una célula con un gradiente polar de OmpA2-mCherry y la verde, una célula con fluorescencia homogénea. Los porcentajes debajo de las microscopías indican el número de células con gradiente polar. **B)** Ejemplos de perfiles de intensidad de fluorescencia de OmpA2-mCherry a lo largo del cuerpo celular como los mostrados por las células señaladas en A) con flecha verde y roja.

8. OmpA2 se distribuye de manera homogénea cuando se expresa a partir de un plásmido.

Con el objetivo de caracterizar el mecanismo que le permite a OmpA2 formar un gradiente de concentración, el alelo *ompA2-mCherry* se clonó en un plásmido replicativo de bajo número de copias y se expresó a partir de un promotor inducible por ácido vanílico. El nivel de fluorescencia de las células portadoras de este plásmido fue menor que el de las células expresando la misma fusión génica a partir del promotor nativo desde el cromosoma de *C. crescentus*; dicha observación fue confirmada mediante Western-Blot. Aunque en el extracto total de la cepa que expresa OmpA2-mCherry desde el plásmido se observó la proteína de fusión completa, también se

detectaron proteínas con un peso molecular menor, mismas que podrían corresponder a productos de degradación de OmpA2-mCherry. Esto indica que la proteína expresada a partir del plásmido es menos estable que la expresada desde el cromosoma, aunque ambos alelos sean los mismos. A pesar de esto, la fracción de OmpA2-mCherry que permanece estable es funcional, ya que es capaz de abatir la sensibilidad de la ME de la cepa mutante $\Delta ompA2$ (datos no mostrados).

Aunque este resultado sugiere que OmpA2-mCherry expresada desde el plásmido se inserta correctamente en la ME, esta proteína no formó el patrón de localización previamente observado, aún en ausencia de la proteína silvestre y no se distribuyó por completo en las prostecas (Figura 38). Ya que la fusión alélica (*ompA2-mCherry*) expresada desde el plásmido y el cromosoma es la misma, la ausencia de gradiente en las células expresando OmpA2-mCherry desde el plásmido sugiere que la proteína no reconoce ninguna señal particular en el polo prostecado.

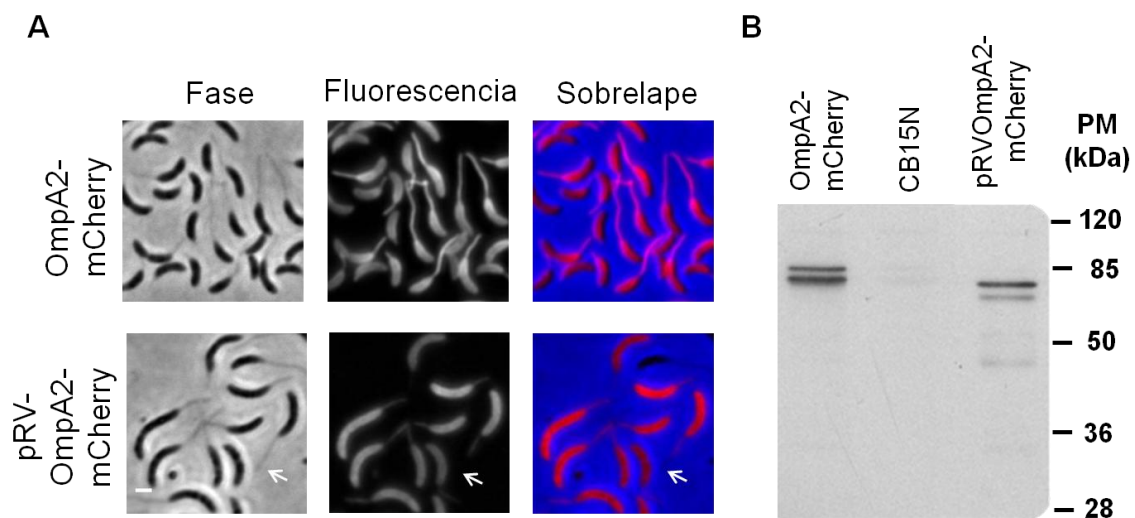


Figura 38. Localización celular y estabilidad de OmpA2-mCherry expresada a partir de un plásmido multicopia. A) Microscopías de campo claro, de fluorescencia y su sobrelape, de células expresando OmpA2-mCherry desde el locus cromosomal nativo (arriba) o a partir de un plásmido (abajo). Las flechas señalan una prosteca con marcaje incompleto por la proteína de fusión. **B)** Western-Blot α -mCherry a partir de extractos totales de la cepa silvestre (CB15N) y las que expresan la fusión OmpA2-mCherry desde el locus nativo o desde un plásmido. En esta última, se detectaron varias bandas de peso molecular menor al de la proteína completa de ~ 67 kDa.

9. La localización de OmpA2 en *C. crescentus* depende de la posición del gen en el cromosoma.

El cromosoma de *C. crescentus* está organizado longitudinalmente con respecto al cuerpo celular, con el origen de replicación ubicado en el polo viejo o prostecado y el término de replicación cerca del polo nuevo. Dado que el gen *ompA2* está cerca del origen de replicación, se espera que su ubicación espacial sea cercana al polo prostecado, el cual es el polo con la mayor concentración de OmpA2. Esta observación sugería que la posición del gen en el cromosoma y por lo tanto en la célula, podrían ser relevantes para la localización de la proteína. Para evaluar esta idea, el gen *ompA2-mCherry* se movió de lugar en el cromosoma de *C. crescentus*, para que quedase ubicado aproximadamente a la mitad de la célula (en locus *xyIR*) o cercano al polo celular nuevo (en locus *vanR*). Esta fusión génica se expresó como única o como segunda copia del gen (condición merodiploide) y siempre estuvo regulada por su promotor nativo. El patrón de localización de la proteína fue evaluada en condiciones de alto y bajo fosfato.

La expresión de la fusión fluorescente desde el locus *xyIR* como única o como segunda copia resultó en una población mezclada de células con una distribución homogénea de la proteína y células con un gradiente invertido, es decir, con mayor acumulación de OmpA2-mCherry en el polo celular nuevo. Cuando OmpA2-mCherry se expresó desde el locus *vanR*, la mayoría de las células mostraron un gradiente invertido. Estas observaciones se corroboraron cuantificando el número de células con gradiente silvestre, con gradiente invertido o con una distribución homogénea de la fluorescencia (**Figura 39**).

Sin importar si OmpA2-mCherry era expresada desde el locus *xyIR* o *vanR*, como única o como segunda copia, la acumulación de proteína en la prosteca fue menor que cuando se expresaba desde el locus silvestre. Mediante Western-Blot se mostró que los niveles de OmpA2-mCherry fueron los mismos en todas las cepas en las que dicha fusión génica era la única copia del gen, sin importar el locus cromosomal desde el cual se expresara. Estos resultados muestran que la localización de OmpA2 en *C. crescentus* depende de la posición del gen en el cromosoma (**Figura 39**).

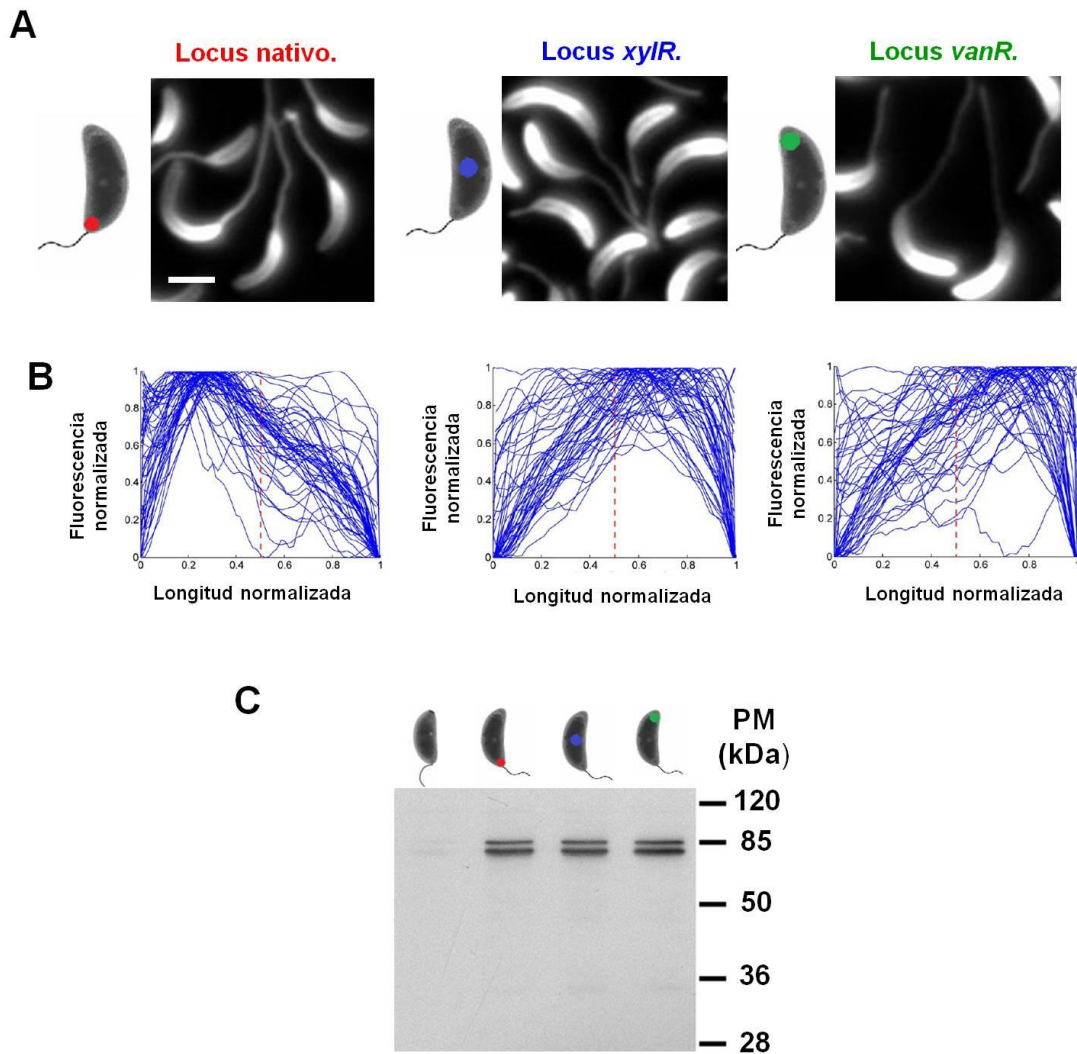


Figura 39. La posición de *ompA2* en el cromosoma determina la localización de la proteína. **A)** Microscopías de fluorescencia de las cepas que expresan OmpA2-mCherry desde el locus nativo, *xyIR* o *vanR*, creciendo en fase exponencial en medio mínimo limitado en fosfatos. Longitud de la barra= 1µm. A la izquierda de cada micrografía, se muestra un esquema de la ubicación aproximada de *ompA2* en el cromosoma y respecto al cuerpo celular. **B)** Superposición de los perfiles de intensidad de fluorescencia de cien células de cada una de las cepas indicadas en A). **C)** Western-Blot α-mCherry a partir de extractos totales de las tres cepas anteriores. Se incluye como control negativo el extracto total de la cepa silvestre CB15N.

10. La localización de OmpA2 es relevante para la función de la proteína.

La mutante nula de *ompA2* mostró que una de las funciones de esta proteína es participar en el mantenimiento de la estabilidad de la ME, por ello se decidió averiguar si la localización de OmpA2 era importante para dicha función. Para probar esta hipótesis, todas las cepas que expresaban OmpA2-mCherry como única o segunda copia desde los loci nativo, *xyIR* o *vanR* fueron teñidas con el colorante de membrana FM4-64X. En ninguno de los casos se encontraron diferencias, lo cual sugiere que la acumulación de OmpA2 en el polo prostecado no es necesaria para la función de la proteína en la estabilización de la ME (datos no mostrados).

Dado que la expresión de OmpA2-mCherry desde el locus cromosomal nativo produce una acumulación de esta proteína en el polo celular viejo y la prosteca, es posible que OmpA2 este involucrada en el crecimiento de dicha estructura. Como ya se mostró, la expresión de la proteína desde los loci *xyIR* o *vanR* redujo la cantidad de OmpA2 en el polo viejo, por lo que el crecimiento de la prosteca podría estar afectado. Para probar esta hipótesis, se determinó la longitud promedio de la prosteca en estas cepas a partir de cultivos exponenciales en bajo fosfato. En comparación con la cepa silvestre, que expresa OmpA2 desde el locus nativo, las cepas que expresaban la proteína desde el locus *xyIR* o *vanR* mostraron un porcentaje menor de células prostecadas, así como una reducción significativa en la longitud promedio de la prosteca. Este fenotipo es similar al descrito en la cepa mutante $\Delta ompA2$. El resultado sugiere que la correcta localización de OmpA2 es relevante para el crecimiento de la prosteca. Por otra parte, en la cepa merodiploide que expresa OmpA2-mCherry desde los loci nativo y *vanR*, también hubo una disminución en el crecimiento de la prosteca (**Figura 40**). Esto indica que la presencia de un gradiente adicional en el polo nuevo compite con el gradiente silvestre de OmpA2 en el crecimiento de la prosteca.

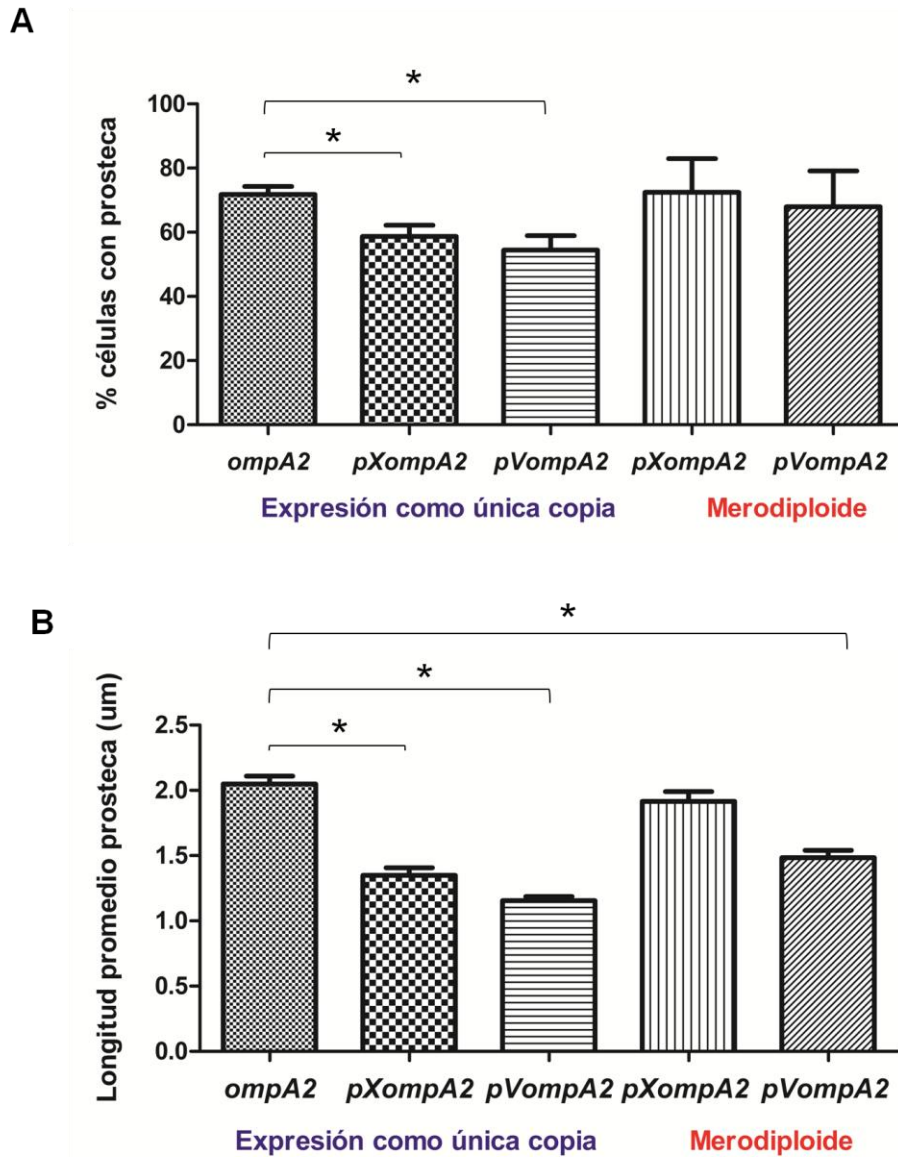


Figura 40. Crecimiento de la prosteca dependiendo de la localización de OmpA2. Gráficas que muestran el porcentaje de células prostecadas (**A**), así como de la longitud promedio de la prosteca (**B**) en células que expresan OmpA2 desde el locus nativo, desde *xylR* o *vanR* como única o segunda copia (condición merodiploide). Los datos representan el promedio de al menos cien células de tres experimentos independientes. Las barras de error corresponden a la desviación estándar y los asteriscos representan la existencia de diferencias significativas de acuerdo con una prueba t de Student ($p < 0.0001$).

DISCUSIÓN

- **Participación de OmpA1 y OmpA2 en la estabilidad de la envoltura celular.**

La integridad de la envoltura celular en las bacterias didermas (Gram-negativas) ha sido estudiada ampliamente en enterobacterias como *E. coli*. En esta bacteria modelo, la lipoproteína de Braun (Lpp), las proteínas del complejo Tol-Pal y OmpA, interactúan entre sí y con los componentes de la envoltura celular, de tal forma que mantienen en una estrecha cercanía a las dos membranas y a la pared celular de peptidoglicano (PG). Lpp tiene una participación muy importante en esta función ya que es la proteína más abundante en *E. coli* y es capaz de unirse al PG a través de un enlace covalente. Sin embargo, esta pequeña lipoproteína parece estar presente sólo en un grupo restringido de bacterias. Por ello, es factible suponer que en bacterias donde Lpp está ausente, la estrategia para asegurar la homeostasis de la envoltura celular podría ser diferente, posiblemente a través de nuevas relaciones funcionales entre las proteínas del complejo Tol-Pal y OmpA o mediante otras proteínas que interactúen con la envoltura celular.

Caulobacter crescentus es una bacteria dimórfica con un ciclo celular finamente regulado, en la que se ha mostrado experimentalmente la ausencia de Lpp o cualquier otra proteína unida de forma covalente a la pared celular. De manera consistente, en *C. crescentus* las proteínas del complejo Tol-Pal son esenciales (a diferencia de *E. coli*) y una reducción en su abundancia se refleja en serios problemas en la envoltura celular y la división, fenotipos que conducen a la muerte. Sin embargo, en su genoma están codificadas otras proteínas cuya composición de dominios sugiere un papel en la estabilidad de la membrana externa (ME). En este trabajo investigamos la relevancia de las dos proteínas tipo OmpA (OmpA1 y OmpA2) en *C. crescentus* para el mantenimiento de la estabilidad de la envoltura y caracterizamos su localización en el cuerpo celular. De acuerdo con nuestros análisis bioinformáticos, OmpA1 y OmpA2 son proteínas translocadas a través de la membrana interna (MI), ensambladas en la ME mediante un dominio barril beta y posiblemente, son capaces de interactuar con el PG a través de su dominio periplásmico bastante conservado. Esta composición de dominios es semejante a la de OmpA de *E. coli* (EC_OmpA), de la cual difieren principalmente en el dominio transmembranal. El análisis de dominios conservados agrupa a los barriles beta de OmpA1 y OmpA2 dentro de la superfamilia LomR de canales de ME. Sin embargo, hasta la fecha no se conocen datos bioquímicos ni

estructurales de este tipo de dominios. Las predicciones de la estructura secundaria y terciaria de OmpA1 y OmpA2 revelaron que las principales diferencias respecto al barril beta de EC_OmpA residen en las regiones extracelulares. Dichas regiones son relevantes para la interacción de OmpA con otros agentes biológicos, como péptidos antimicrobianos, bacteriófagos, células del sistema inmune y bacterias. Las diferencias encontradas podrían sugerir la existencia de otro tipo de interacciones mediadas por las proteínas OmpA de *C. crescentus* y su entorno como resultado de la adaptación de esta bacteria a medios oligotróficos.

Por otra parte, la presencia de dos homólogos de OmpA en *C. crescentus*, podría asegurar el mantenimiento de la estabilidad de la envoltura celular dada la ausencia de Lpp. Aunque ambas proteínas podrían desempeñar la misma función, los eventos de duplicación génica tienen como consecuencia la neo o sub-funcionalización. Estas últimas se deben en gran medida a modificaciones que ocurren en la secuencia del gen tras el evento de duplicación. Dado que OmpA1 y OmpA2 comparten 52% de identidad en secuencia primaria, ambos panoramas son posibles.

En términos generales, nuestros resultados sugieren que la integridad de la envoltura celular en las cepas mutantes sencillas en *ompA* no fue afectada de forma severa, puesto que la ME fue impermeable a la mayoría de antibióticos y detergentes probados. Los fenotipos presentes en la cepa carente de OmpA1, muestran que esta proteína está implicada en mantener la impermeabilidad de la ME ante compuestos como el cloranfenicol, además de influir en la velocidad de crecimiento de la prosteca. Por su parte, OmpA2 además de dichas funciones, participa en el mantenimiento de la estabilidad de la envoltura celular, sobretodo en condiciones de estrés - mayor velocidad de crecimiento, carencia de fosfatos o la presencia de agentes que desestabilizan la ME (deoxicolato de sodio)-. Un fenotipo adicional observado en la cepa carente de OmpA2 fue la formación de vesículas de membrana externa (VME), lo cual es un resultado esperado tras la interrupción de las interacciones entre la ME y el PG como ha sido reportado en otras bacterias. Aunque no se detectaron VME en la cepa mutante *ompA1*, esta proteína podría estar implicada de manera secundaria en la integridad de la envoltura celular, puesto que la ausencia de cualquiera de las proteínas OmpA en la cepa doble mutante resultó en la formación de VME con mayor diversidad de tamaño. También de forma consistente, en esta cepa se observó menor número de células con prosteca y prostecas de menor tamaño que en cualquiera de las mutantes sencillas, lo cual parece ser el efecto conjunto de la ausencia de ambas proteínas. Sin embargo, de manera inesperada, esta cepa doble mutante se comportó

igual que la cepa silvestre en cuanto a la sensibilidad frente a factores de estrés como la presencia de deoxicolato de sodio o temperatura de crecimiento elevada.

En conjunto, nuestros resultados muestran que en *C. crescentus* la integridad de la envoltura celular es mantenida principalmente por las proteínas del complejo Tol-Pal. Mientras que OmpA2 tiene una participación importante en dicha función, así como en el crecimiento de la prosteca, OmpA1 parece tener una contribución secundaria en ambas funciones. Esto constituye un claro ejemplo de sub-funcionalización por parte de OmpA1, y podría ser explicado por el nivel reducido de expresión de esta proteína con respecto a OmpA2. En ausencia de OmpA2 y en presencia de factores de estrés externos, es posible suponer que la célula es capaz de modular la expresión y actividad de OmpA1 para hacer frente a la inestabilidad de la envoltura celular. Sin embargo, esta respuesta podría resultar perjudicial, quizá interfiriendo con las interacciones de las proteínas del sistema Tol-Pal entre ellas y con el PG. Este efecto nocivo de OmpA1 en ausencia de OmpA2 podría explicar la mayor inestabilidad de la envoltura celular en la cepa mutante sencilla en OmpA2 con respecto a la doble mutante. Dicha hipótesis puede ser esclarecida estudiando las interacciones de ambas proteínas OmpA consigo mismas, con los componentes del sistema Tol-Pal o con otras proteínas que podrían interactuar con la pared celular. De igual forma, la sobreexpresión de OmpA1 (mediante biología molecular) en la cepa $\Delta ompA2$ acentuaría el posible efecto nocivo de esta proteína.

- **Localización de las proteínas tipo OmpA en *C. crescentus*.**

La fusión estable de OmpA1 y OmpA2 con mCherry nos permitió determinar su localización en el cuerpo celular. Ambas proteínas se distribuyen en toda la célula, se ensamblan en la ME y son funcionales, ya que no confieren ninguno de los fenotipos de inestabilidad en la envoltura celular como las cepas mutantes. Mientras que la localización de OmpA1 es dispersa, OmpA2 forma un gradiente de concentración a partir de la prosteca y el polo celular viejo. Ambos patrones de localización han sido descritos para otros barriles beta de ME. En *E. coli*, las proteínas BtuB y Cir, encargadas del transporte de vitamina B-12 y complejos de Fe^{2+} respectivamente, se distribuyen de manera homogénea en el cuerpo celular (Rassam *et al.*, 2015). Al igual que OmpA2, ciertos factores de virulencia forman un gradiente polar de concentración en el patógeno intracelular *Shigella flexneri* (Jain *et al.*, 2006). Por otro lado, también se han descrito patrones de localización más complejos como el de LamB, un

transportador de maltosa en *E. coli*, que forma una espiral extendida a lo largo de la ME (Gibbs *et al.*, 2004).

De acuerdo con el modelo del mosaico fluido, todos los componentes de las membranas celulares intercambian posiciones continuamente, de tal forma que su distribución es homogénea. Este podría ser el caso para algunas proteínas integrales de ME como OmpA1, BtuB y Cir. Sin embargo, la localización característica de OmpA2 en *C. crescentus*, la de los factores de virulencia en *S. flexneri* y la de LamB en *E. coli*, son ejemplos de la organización interna que exhiben las bacterias. Dado que estos organismos poseen dimensiones celulares reducidas (de 1 a 10µm), hasta hace dos décadas eran consideradas de manera errónea como “bolsas con enzimas” carentes de cualquier arquitectura interna (Murat *et al.*, 2010). El uso de marcadores fluorescentes para determinar la localización subcelular de biomoléculas *in vivo* así como técnicas nuevas de microscopía óptica y electrónica, han llevado al descubrimiento de una localización dinámica y regulada de diversos complejos moleculares en bacterias (Thanbichler *et al.*, 2005).

Aunque se ha estudiado extensivamente la función de OmpA en *E. coli* y otras bacterias, se conoce muy poco acerca de la localización de la proteína en el cuerpo celular. El único reporte sobre este aspecto es la distribución homogénea de OmpA-mCherry en *E. coli* cuando la proteína se expresa a partir de un plásmido disperso en la célula (Verhoeven *et al.*, 2014). En este sentido, el presente trabajo es el primero en caracterizar la localización de OmpA en una bacteria y en particular, en *C. crescentus*. Nuestros resultados sugieren que la localización de OmpA en *E. coli* podría ser diferente a la reportada. Por un lado, podría ser homogénea como la de OmpA1 o bien, podría formar un gradiente de concentración como OmpA2, la cual perdió su localización cuando se expresó a partir de un plásmido. Este último sería el escenario más probable, puesto que OmpA de *E. coli* y OmpA2 de *C. crescentus* son proteínas muy abundantes y desempeñan una función similar.

De manera interesante, la localización de OmpA2 en la ME de *C. crescentus* depende de la posición del gen en el cromosoma. En la cepa silvestre, el gen *ompA2* está localizado cerca del origen de replicación del cromosoma y del polo celular prostecado. Esto coincide con la mayor acumulación de la proteína en el polo viejo y la prosteca. La translocación del alelo *ompA2* a una posición opuesta del cromosoma, resultó en una acumulación de la proteína en el polo nuevo de la célula y la formación de un gradiente inverso al de la cepa silvestre. Estos datos sumados a la distribución

homogénea de OmpA2 expresada a partir de un plásmido, implican que esta proteína no reconoce ninguna señal particular que dirija su localización al polo viejo de la célula. Sugieren además que el cromosoma y la ubicación del gen *ompA2* sirven como un andamio para permitir la localización de la proteína en la célula. Esto constituye una estrategia nunca antes descrita en bacterias para dirigir la localización de proteínas (Laloux y Jacobs-Wagner, 2014).

- **Requerimientos para la formación del gradiente de concentración de OmpA2 en *C. crescentus*.**

Los gradientes de concentración de proteínas contribuyen a la organización intracelular en bacterias, restringiendo la actividad de una proteína a un espacio confinado (Kiekeleybusch y Thanbichler, 2014). En el nivel unicelular, el establecimiento y la preservación de un gradiente de concentración requiere 1) la movilidad (difusión) restringida de la proteína, 2) la proteólisis específica y elevada en una dirección opuesta a la fuente del gradiente ó 3) la combinación de ambos procesos. Sin embargo, de acuerdo con varios modelos matemáticos y evidencias experimentales, el principal factor para la formación de un gradiente es la difusión limitada, ya que la proteólisis es un proceso muy lento (Tropini *et al.*, 2012).

Como ya se mencionó anteriormente, se conocen muy pocos ejemplos de proteínas de ME que, al igual que OmpA2 formen gradientes de concentración en uno de los polos celulares. Hasta la fecha, el mejor caracterizado es el gradiente del auto-transportador IcsA en *S. flexneri*. Esta proteína se exporta al espacio periplásmico en uno de los polos celulares y se ensambla formando un barril beta en la ME, donde difunde hacia todo el cuerpo celular. IcsA se degrada de manera específica por la proteasa IcsP, la cual se localiza en el polo opuesto de la célula (Steinhauer *et al.*, 1999; Robbins *et al.*, 2001). Esta relación entre difusión limitada y degradación específica, crea el gradiente de concentración de IcsA en la ME, el cual es relevante para la función de la proteína durante la invasión a su célula hospedera.

En el caso de OmpA2 en *C. crescentus*, el principal factor para la formación del gradiente de concentración debe ser la difusión limitada de la proteína. Las evidencias experimentales que sugieren esto son 1) la dependencia de la localización de OmpA2 con respecto a la posición del gen en el cromosoma, 2) la ausencia de gradiente cuando la proteína se expresa a partir de múltiples copias desde un plásmido disperso

en la célula y 3) la ausencia de degradación específica de OmpA2 en alguno de los polos celulares.

La formación del gradiente de OmpA2 a través de un mecanismo basado únicamente en la difusión limitada de la proteína, implica la movilidad restringida de la proteína madura, así como la de alguno de los posibles intermediarios que intervienen en su maduración. Para OmpA2 estos intermediarios son (**Figura 41**):

- el RNA mensajero (2),
- la pre-proteína en el citoplasma (3),
- la proteína siendo procesada y translocada a través de la membrana interna (MI), (4),
- la proteína madura en el periplasma iniciando el proceso de plegamiento e integración a la envoltura celular (4) y
- la proteína madura estabilizando su posición a través de interacciones con la pared celular y los demás componentes de la ME (5).

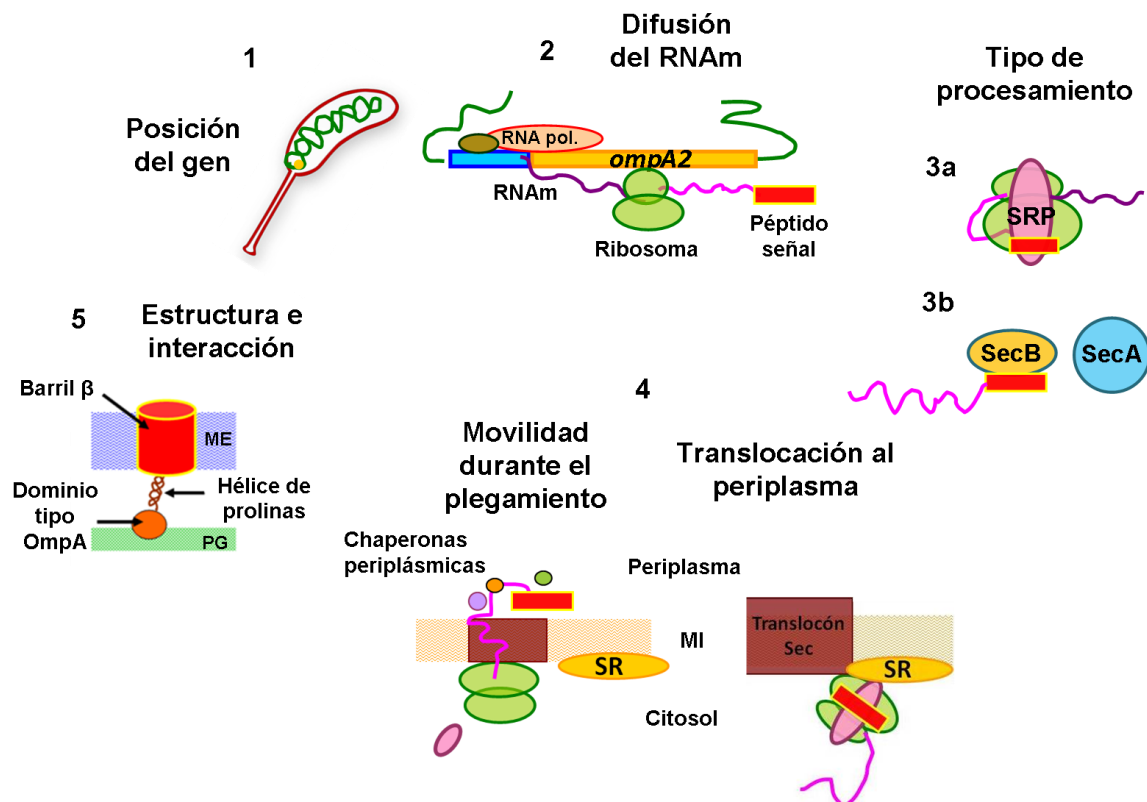


Figura 41. El establecimiento del gradiente de OmpA2 debe depender de la difusión limitada de la proteína y sus diferentes intermediarios. Esquema del procesamiento de OmpA2 desde su transcripción hasta la integración de la proteína en la envoltura celular. RNA pol= RNA polimerasa; SRP= *Signal Recognition Particle*/Partícula de reconocimiento de señales; SR= Receptor asociado a membrana (FtsY).

Caracterizar cuáles son los mecanismos implicados en la formación del gradiente de concentración de OmpA2 brindará una perspectiva sobre su integración en la fisiología celular y permitirá comprender las estrategias usadas por *C. crescentus* para dirigir la localización de proteínas a sitios específicos del cuerpo celular. Se conocen ciertas evidencias generales y otras particulares, sobre la forma en que podría ocurrir la restricción de la difusión de los intermediarios de OmpA2 o como tal, de la proteína madura.

1. En *C. crescentus* se determinó que al menos 120 RNAs mensajeros (entre ellos el de *ompA1*) no difunden del sitio donde se encuentra el gen que los codifica (Montero-Llopis *et al.*, 2010).
2. Una contribución importante para la formación del gradiente de OmpA2 sería si su translocación a través de la MI ocurre con rapidez, de tal forma que se impida la difusión libre de la pre-proteína en el citoplasma. Este fenómeno debe ser orquestado por la maquinaria SecA/SecB dado que OmpA2 es una proteína de secreción. En *E. coli* se ha descrito que el acoplamiento de SecA al ribosoma y al péptido señal de las proteínas de secreción, incrementa la eficiencia de la traducción y su procesamiento. Esta es una perspectiva nueva, en la cual SecA/SecB son capaces de dirigir la translocación de proteínas de forma co-traducciona l en la vía “postraducciona l” (Huber *et al.*, 2011). Aunque menos probable, OmpA2 podría ser procesada por la vía SRP de forma co-traducciona l, impidiendo la libre difusión de la pre-proteína en el citoplasma.
3. El gradiente de OmpA2 resultaría favorecido además, si la proteína se exportara de forma específica en el polo celular viejo. Aunque en *E. coli* se ha mostrado que la inserción de nuevas proteínas de ME ocurre en regiones aledañas al sitio de la división celular (Rassam *et al.*, 2015), esto podría no ser universal. De hecho, se sabe que la translocación de IcsA en *S. flexneri* ocurre en el polo donde esta proteína se acumula (Steinhauer *et al.*, 1999).
4. Una vez en el periplasma, la movilidad de OmpA2 podría ser restringida si el plegamiento y la integración de la proteína en la envoltura celular ocurren de forma rápida. Recientemente, en *E. coli* se describió que existe una interacción física estable entre el complejo de translocación SecYEG (en la MI), la chaperona periplásmica SurA y el complejo BAM (encargado de la inserción de barriles beta en la ME). De esta forma, se crean zonas donde la distancia entre las dos membranas es menor y dada la presencia de SurA, el plegamiento de las OMPs es favorecido (Wang *et al.*, 2016).

5. Por último, la interacción estable de OmpA2 con la ME y con la pared celular deberían favorecer la preservación de un gradiente de concentración. Mientras que en *S. flexneri* IcsA es capaz de difundir lateralmente a través de la ME, en *E. coli* la mayoría de las OMPs estudiadas (incluida OmpA) son proteínas inmóviles (Gibbs *et al.*, 2004; Verhoeven *et al.*, 2014; Rassam *et al.*, 2015). Esta ausencia de difusión puede ser atribuida al estado semicristalino de la ME (Silhavy *et al.*, 2010) o bien, al establecimiento de interacciones inespecíficas entre barriles beta (Rassam *et al.*, 2015). Por otra parte, la posible difusión limitada de OmpA2 podría deberse a la unión rápida y estable de la proteína con el peptidoglicano (PG). Aunque los parámetros termodinámicos del dominio periplásmico de OmpA de *Acinetobacter baumannii* sugieren que su unión con el PG es de moderada a débil, la formación de complejos multiméricos podría aumentar su afinidad por el sustrato. La oligomerización de OmpA en *E. coli* puede establecerse a través del dominio barril beta o bien, a través del dominio periplásmico (Nagano *et al.*, 2005; Samsudin *et al.*, 2017).
- **La presencia y correcta localización de OmpA2 son relevantes para la función de la proteína.**

De acuerdo con nuestros resultados, la presencia de OmpA2 y su localización en el polo celular viejo son necesarias para el crecimiento adecuado de la prosteca. Esta estructura requiere de la síntesis *de novo* de todos los componentes de la envoltura celular, entre ellos el peptidoglicano. La acumulación de OmpA2 en este polo celular podría servir de manera directa o indirecta para localizar factores implicados en la síntesis de PG. Este podría ser el caso de las bactofilinas A y B, proteínas que forman filamentos asociados a la MI en el polo celular prostecado. La localización de estas dos proteínas es esencial para el reclutamiento de PBP-C, una enzima encargada de sintetizar PG en la base de la prosteca (Kühn *et al.*, 2010). Es posible que la ausencia de OmpA2 o una cantidad disminuida de esta en el polo celular viejo, afecte la localización de la maquinaria de síntesis de PG en la prosteca.

CONCLUSIONES

En *C. crescentus*:

1. OmpA1 y OmpA2 son proteínas de ME con similitud estructural y funcional a OmpA de *E. coli*.
2. La proteína OmpA2 tiene una participación importante en el mantenimiento de la estabilidad de la envoltura celular (sobretudo en condiciones de estrés), así como en el crecimiento de la prosteca. Por su parte, OmpA1 tiene una contribución secundaria en ambas funciones.
3. OmpA1 tiene una distribución dispersa en la ME.
4. OmpA2 forma un gradiente de concentración a partir de la prosteca y el polo celular viejo, que se acentúa con la edad de la célula.
5. OmpA2 no reconoce ninguna señal particular en el polo prostecado que determine su localización.
6. La localización de OmpA2 depende de la ubicación del gen en el cromosoma.
7. La presencia del gradiente de concentración de OmpA2 en el polo celular viejo es importante para el inicio del crecimiento de la prosteca, pero no es relevante para la función de la proteína en estabilizar la envoltura celular.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Cepas bacterianas, plásmidos, medios de cultivo y condiciones de crecimiento.

Las cepas y los plásmidos empleados en este trabajo se enlistan en la tabla 3 y su construcción se detalla en el anexo 1. Para el mantenimiento y la purificación de los plásmidos se usaron las cepas de *E. coli* DH5 α o TOP10, las cuales se crecieron en medio LB con el antibiótico apropiado a 37°C. Las cepas de *C. crescentus* se crecieron a 30°C en medio rico PYE (peptona-extracto de levadura) o medio mínimo M5GG amortiguado con Tris y suplementado con 10mM o 50 μ M de fosfatos. Los antibióticos se usaron en las siguientes concentraciones, para *E. coli*: gentamicina 20 μ g/mL, kanamicina 50 μ g/mL, espectinomicina 50 μ g/mL, ácido nalidíxico 20 μ g/mL, tetraciclina 10 μ g/mL y cloranfenicol 30 μ g/mL; para *C. crescentus*, para medio líquido y sólido, respectivamente: gentamicina, 2 y 5 μ g/mL, kanamicina, 5 y 20 μ g/mL, espectinomicina, 15 y 100 μ g/mL, tetraciclina 2.5 y 3 μ g/mL y cloranfenicol 2 y 5 μ g/mL. Cuando fue necesario y como se indica en el texto, se indujo la expresión de OmpA2-mCherry en *C. crescentus* a partir del promotor *vanA*, agregando a los cultivos (DO a 660nm de ~0.1) 1/100 (v/v) de una solución de ácido vanílico 30mM.

Medio LB. Para 1L: 10g de triptona, 5g de extracto de levadura y 1g de NaCl. Para medios de cultivo sólidos, se agregó 15g/L de Bacto-Agar.

Medio PYE. Para 1L: 2g de peptona, 1g de extracto de levadura, 1mL de MgSO₄ 1M y 0.5mL de CaCl₂ 1M. Para medios de cultivo sólidos, se agregó 15g/L de Bacto-Agar.

Medio mínimo M5GG. Para 1L: 20mL de Tris 1M pH 7.0, 1mL de NaCl 1M, 1mL de KCl 1M, 0.25mL de sales de fosfatos 0.2M, 6.25mL de NH₄Cl al 8%, 0.84mL de glutamato de sodio al 20%, 0.5mL de MgSO₄ 1M, 10mL de glucosa al 20%, 1mL de FeSO₄-EDTA y 0.5mL de CaCl₂.

2. Métodos de genética y biología molecular.

a) Diseño de oligonucleótidos.

Todos los oligonucleótidos empleados se diseñaron con el software DNAMAN con los siguientes criterios: 1) longitud de 19 a 24 nucleótidos, 2) temperaturas de desnaturalización (T_m) similares para cada par de oligos, 3) ausencia de estructura secundaria, 4) ausencia de complementariedad entre par de oligos y 5) adición de la

secuencia de restricción así como de tres nucleótidos (CAA) en el extremo 5'. Las secuencias de los oligonucleótidos usados se enlistan en la tabla 4.

b) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Todas las reacciones de PCR contenían lo siguiente: 18µL de H₂O estéril, 25µL de GC Buffer 2X (útil para genomas con alto contenido de GC), 1µL de cada oligonucleótido a 10pmol/µL, DNA molde (100ng de DNA cromosomal o 100pg de DNA plasmídico), 4µL de dNTPs 2mM cada uno y 0.2µL de DNA polimerasa HS PRIME STAR (Takara). El programa de amplificación constó de tres fases:

- 1) Desnaturalización del DNA: 95°C por 3min.
- 2) *Desnaturalización* del DNA: 95°C por 30s.
- 3) *Alineamiento* del DNA molde con los oligonucleótidos: 58° por 30s.
- 4) *Elongación* a 72°C un minuto por cada 1000 pares de bases a amplificar.
- 5) Un paso final a 72°C por 10min.

Los pasos 2, 3 y 4 constituyen un ciclo que fue repetido 30 veces.

c) Purificación de productos de PCR a partir de geles de agarosa.

QIAquick gel extraction.

Después de la electroforesis, se corta la región del gel de agarosa que contiene el fragmento de interés, cuya visualización se logra por tinción con bromuro de etidio y exposición a luz UV de onda larga. Se agregan 10µL Buffer de captura por cada 10µg de gel y se calienta a 75°C por 15-30min para disolver la agarosa. Después, se coloca la solución en una columna QIAquick, se mantiene por 1min a temperatura ambiente y se centrifuga a 13000rpm por 30s. Se agregan 500µL de Buffer de lavado y se centrifuga por un minuto a 14000rpm. Se desecha el sobrenadante y se centrifuga otra vez. Esto permite la adhesión del DNA a la resina de la columna de purificación y para eluirlo, se agregan de 30-50µL de agua en el centro de la columna por 2min y se centrifuga a máxima velocidad por un minuto. El DNA se cuantifica por espectrofotometría y se corrobora su integridad por electroforesis en geles de agarosa.

d) Digestión enzimática de productos de PCR y plásmidos puros.

Las reacciones de restricción incluyen H₂O, un buffer específico para cada enzima y el DNA a ser digerido y se incuban a la temperatura indicada para cada enzima (generalmente 37°C) por al menos 4h. Después de la digestión, se comprueba nuevamente la integridad del DNA.

e) Fusión de dos o más fragmentos de DNA.

Las reacciones de ligación incluyen: 4.5µL de H₂O, 1µL de Buffer 10X con Mg²⁺, 1.5µL de ATP 10mM, vector 1µL, 2µL de inserto y 0.5µL de T4-DNA Ligasa; esta mezcla se incuba a 16°C por al menos 1.5h. El vector de DNA, por lo general hace referencia a un plásmido y el inserto a una región del DNA genómico de *C. crescentus* amplificado por PCR. Es recomendable mantener una relación estequiométrica 1:3 entre el vector y el inserto en las reacciones de ligación.

f) Transformación por electroporación.

Se requieren células electrocompetentes preparadas previamente, las cuales están libres de sales, resuspendidas en glicerol y congeladas a -70°C, así como una celda de electroporación con una distancia de 1.0mm entre electrodos, misma que se pone a enfriar al menos 10min. Se agrega el DNA cuidadosamente a las células competentes descongeladas. Esta mezcla se vierte en la celda procurando no formar burbujas de aire para que la transformación sea eficiente y se da un pulso de 1.8kV en un equipo de electroporación. Inmediatamente se permite la recuperación de las células, agregando 1mL de medio de cultivo e incubando a la temperatura de crecimiento indicada para cada organismo por una hora. Después, se concentran las células mediante centrifugación y se dispersan con una espátula en una caja Petri con el medio y el antibiótico de selección indicados. Todo este proceso se realiza en un ambiente estéril. El DNA incorporado puede ser producto de una reacción de ligación o un plásmido puro. En el primer caso, se ocupó como hospedero a las cepas TOP10 o DH5α de *E. coli*, y la cantidad de DNA empleada es 1µL de la reacción de ligación. En el segundo caso, el hospedero fue *C. crescentus*, que fue transformada con 500ng de plásmido puro.

g) Extracción de plásmidos mediante mini-preparaciones hervidas.

Se crecen las cepas de interés en el medio de cultivo con el antibiótico adecuado durante toda la noche con agitación constante de 200rpm. Se concentran las células mediante centrifugación por un minuto a 14000rpm y se desecha el sobrenadante. Se resuspenden las células mediante agitación con vórtex y se agregan 300µL de una solución de STET (8% de sacarosa, Tris-HCl 50mM pH 8.8, 50mM de EDTA, 5% de Tritón X-100) y 30µL de lisozima 10mg/mL. Esta mezcla se agita con vórtex durante dos segundos y se hierve durante 45s. Se centrifuga durante 15min a 14000rpm a temperatura ambiente y se transfiere el sobrenadante a un tubo limpio de 1.5mL. Se precipita el DNA con 300µL de isopropanol y se incuba en hielo por 10min. Posteriormente, se centrifuga por 20min a 14000rpm a 4°C. Se desecha el

sobrenadante, mientras que la pastilla se lava con 500µL de etanol al 70% frío y se deja secar por 10min a 75°C, se resuspende con 40µL de H₂O y se calienta por 10 min a 75°C. Estas mini-preparaciones se corren en un gel de agarosa al 1% y se comparan con el vector vacío para elegir aquellos que posiblemente tengan el inserto de interés. Los candidatos se digieren con enzimas de restricción para corroborar su identidad.

h) Purificación de plásmidos con el Kit QIprep Spin Miniprep (QIAGEN).

Este método permite extraer y purificar plásmidos mediante lisis alcalina a partir de cultivos en fase estacionaria. Se concentran 10mL de estos cultivos por centrifugación a 4000rpm durante 8min. Se desecha el sobrenadante, se agregan 750µL de Buffer P1 (Buffer de resuspensión) y 30µL de RNasa 10mg/mL. Se resuspende con agitación suave y este volumen se divide en tres partes iguales. A cada una se agregan 250µL de Buffer P2 (Buffer de lisis) y se agitan suavemente por inversión constante durante máximo 4min. Posteriormente, se agregan 350µL de Buffer N3 (Buffer de neutralización) y se mezcla completamente. Se centrifuga por 15min a temperatura ambiente. El DNA presente en el sobrenadante se recupera a través de una columna QIAGEN, centrifugando por 30s. Se precipita el DNA añadiendo 500µL de Binding Buffer y después de 1min se centrifuga nuevamente. Se agregan 750µL de PE (Elution Buffer, con etanol) y se mantiene a temperatura ambiente por 2min, después se centrifuga por 1min a 14000rpm, se desecha el sobrenadante y se repite el paso de centrifugación para eliminar por completo los residuos de etanol. Finalmente, en un tubo nuevo, el DNA se eluye con 50-80µL H₂O o con una solución de Tris 5mM pH 8.0 y tras 1min de reposo, se centrifuga a 14000rpm por 1min. Se cuantifica el plásmido purificado y se verifica su pureza e integridad por electroforesis.

3. Ensayo de inmunodetección por Western-Blot.

Se obtienen extractos totales a partir de cultivos de *C. crescentus* creciendo en fase exponencial, a una densidad óptica (a 660nm) de 0.3. Para ello, se concentra 1mL de cultivo por centrifugación y tras ser removido el sobrenadante, se resuspende en buffer de fosfatos M2 1X y se sonica dos veces por 10s a 13 micrones de amplitud. Todos los extractos proteicos se cuantificaron mediante ensayo Bradford (BioRad) y la cantidad de proteína corrida en cada carril fue ajustada siempre a 3µg. Se agrega un volumen de solución Magic Mix 2X (para 10mL: 1mL de Tris 1M pH 6.8, 2mL de glicerol anhidro, 2mL de SDS al 10%, 80µL de EDTA 0.5M, 4.5mL de H₂O, 400µL de 2-mercaptoetanol y trazas de azul de bromo-fenol), y se hierven las muestras por 15min a 100°C. Los extractos proteicos se resuelven mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (Gel separador al 12%: 2mL de Acrilamida (30%)–Bis-Acrilamida (0.8%),

1.875mL de Tris 1M pH 8.8, 50 μ L de SDS al 10%, 40 μ L de Persulfato de amonio al 10%, 1mL de H₂O y 3 μ L de TEMED. Gel concentrador al 4%: Acrilamida–Bis-Acrilamida 335 μ L, 312 μ L de Tris 1M pH 6.8, 25 μ L de SDS al 10%, 25 μ L de Persulfato de amonio al 10%, 1.8mL de H₂O y 1.5 μ L de TEMED) aplicando una corriente eléctrica de 25mA en Buffer de Proteínas (para 1L: 14.4g de Glicina, 3g de Tris-Base y 10mL de SDS al 10%).

Las proteínas resueltas en el gel se transfieren a una membrana de nitrocelulosa aplicando una corriente eléctrica de 250mA en buffer de transferencia (para 1L: 0.32g de carbonato de sodio, 0.84g de bicarbonato de sodio, 200mL de metanol absoluto, agua fría para aforar a 1L). Posteriormente, se bloquea la membrana con una solución de TBS-Tween 20-2% de leche por al menos una hora con agitación constante. (TBS-Tween 1X, 1L: 100mL de TBS 10X, 900mL de H₂O y 1mL de Tween-20). Después del bloqueo, se lava la membrana cuatro veces con TBS-Tween durante una hora. Se expone la membrana al anticuerpo primario y después al secundario. Como anticuerpo primario se usó un anticuerpo policlonal α -RFP generado contra mCherry fusionada a un epítipo de seis residuos de histidina; a una dilución de 1:30,000 en TBS-Tween. Para la fase de detección se empleó un anticuerpo secundario α -mouse (1:30,000) acoplado a la enzima fosfatasa alcalina, así como una mezcla de sustrato Tropix CDP-STAR/Nitroblock (20:1), la cual se esparció sobre la membrana durante 5min. La luminiscencia producida en esta reacción se reveló sobre placas de rayos-X.

4. Propagación de bacteriófagos y transducciones en *C. crescentus*.

Una alícuota de 200 μ L de un cultivo en PYE y fase estacionaria de la cepa donadora de *C. crescentus*, se infecta por 30min con diferentes cantidades de bacteriófago \emptyset CR30, desde 10⁻² hasta 10⁻⁴. Estas diluciones se mezclan con PYE-0.3% de agar (fundido y luego enfriado a 45-50°C), el cual se vierte por inversión sobre una caja con medio sólido PYE y se incuba a 30°C. Al día siguiente se selecciona la dilución en la que la formación de placas es confluyente. Se retira el PYE-agar suave y se lava con 4mL de PYE y 100 μ L de cloroformo con agitación constante por una hora. Se recupera el sobrenadante después de centrifugar y se agregan 100 μ L más de cloroformo. El DNA viral se inactiva por irradiación con luz UV por un minuto. Éstos bacteriófagos se ocupan para transducir diferentes alelos de interés en cepas receptoras. Para ello, una alícuota de 200 μ L en medio rico PYE de la cepa receptora se mezcla con 50 μ L del bacteriófago por 30min a temperatura ambiente y luego se dispersa con una espátula sobre una caja con PYE y el antibiótico de selección.

5. Sincronización de cultivos de *C. crescentus*.

Mediante este método es posible separar la población de células nadadoras de las prostecadas a partir de un cultivo de *C. crescentus* creciendo en fase exponencial (densidad óptica a 660nm de ~0.3). El cultivo debe ser mantenido en hielo durante 10 minutos antes de comenzar la sincronía. Asimismo, tubos de ensayo de 15mL, buffer de fosfatos M2 1X y una solución de Ludox pH 7.0 filtrada, deben ser puestos en hielo. Todo el procedimiento deberá realizarse en frío sin esterilidad requerida. En un tubo se mezclan 6mL de Ludox y 450µL de HCl 1M, y se incorporan por inversión. En otro tubo se colocan 3mL de la mezcla anterior y 12mL del cultivo frío, mezclando por inversión. Se centrifuga a 8500rpm durante 30min a 4°C. Después de este paso, se forman dos bandas, la más cercana a la superficie contiene a las células prostecadas, mientras que la cercana al fondo a las flageladas. Se remueve el sobrenadante por aspiración con vacío y se recupera la banda con las células de interés. Éstas son colocadas en un tubo limpio y se les agregan 10mL de buffer de fosfatos M2 1X y se mezcla por inversión. Se vuelve a centrifugar por 5min a 9000rpm en frío. Ahora, en el fondo del tubo se forma un paquete celular, el cual se resuspende suavemente y se agregan 10mL de medio de cultivo previamente enfriado. Se repite el paso de centrifugación anterior. Se retira el sobrenadante y las células se resuspenden en 1mL de medio nuevo precalentado a 30°C.

Para ensayos *time-course*, las células nadadoras recuperadas se incuban en 15mL de medio de cultivo a 30°C. Se toma y concentra una alícuota de 1mL cada cierto tiempo y se analiza en el microscopio. Para ensayos *time-lapse*, las células flageladas se inmovilizan sobre una placa de agarosa al 1.5% disuelta en medio de cultivo. Los bordes libres del cubreobjetos se sellan con una mezcla de parafina-vaselina-aceite mineral para evitar la desecación y permitir el crecimiento y reproducción de las células mientras son visualizadas en el microscopio.

6. Microscopía de fluorescencia.

Las imágenes de microscopía de fluorescencia se obtuvieron mediante un microscopio Nikon E600 acoplado a una cámara Hamamatsu ORCA-ER. Las células se inmovilizaron sobre una película de agarosa al 1.5% disuelta en un buffer de sales M2 1X y se observaron a 1000 aumentos con contraste de fases. La fluorescencia de las diferentes proteínas marcadas se detectó mediante filtros especiales a las longitudes de onda de absorción y emisión siguientes: para mCherry 587nm/610nm; para FM4-64X 515nm/740nm y para YFP a 514nm/527nm. Las imágenes se procesaron con ImageJ y los perfiles de intensidad de fluorescencia se obtuvieron mediante

MicrobeTracker usando MATLAB. Las imágenes comparadas se adquirieron y procesaron con los mismos parámetros (tiempo de excitación y relación brillo-contraste iguales).

7. Cálculo de perfiles de intensidad de fluorescencia.

Para determinar el número de células en las que OmpA2-mCherry formaba un gradiente de concentración, se analizaron cultivos sincronizados de células expresando OmpA2-mCherry y MipZ-YFP. El análisis de las imágenes se hizo con el *software* MicrobeTracker. Primero, se detectaron las células con el algoritmo E.coli_4.set y se descartaron manualmente del análisis aquellas células mal detectadas. Posteriormente, se les asignó polaridad ocupando como referencia el foco de fluorescencia de MipZ-YFP en el polo prostecado cerca del origen de replicación. Aquellas células nadadoras con un solo foco de MipZ-YFP pero con una longitud de más de 2.5µm, se descartaron del análisis debido a posible filamentación ocasionada por problemas de replicación y segregación del cromosoma. Se empleó la herramienta “int profile all” de MATLAB para obtener las gráficas de los perfiles de intensidad de fluorescencia a lo largo de cada célula. Se determinó la presencia de un gradiente tras examinar visualmente al menos 100 gráficas en cada uno de los tiempos después de la sincronía. Se consideró que OmpA2-mCherry formaba un gradiente si en la gráfica se observaba un pico en el primer cuarto de la longitud celular y si esta señal disminuía constantemente hacia el polo opuesto.

8. Determinación de tiempos de generación.

Se realizaron curvas de crecimiento para determinar los tiempos de generación de las diferentes cepas mutantes de *ompA*. Éstas se hicieron inoculando 15mL de medio de cultivo con 150µL de un cultivo en fase estacionaria de toda la noche. Los cultivos se crecieron en matraces Erlenmeyer de 125mL y se incubaron en una cámara de agua a 30°C con una agitación constante de 200rpm. Para resaltar las diferencias fenotípicas entre ambas cepas, éstas se expusieron a 37°C o a deoxicolato de sodio (a partir de una solución 50mg/mL en agua) desde el inicio de la curva de crecimiento y se incubaron en las mismas condiciones. Se tomaron alícuotas cada 2h por 24h y se midió la absorbancia por espectrofotometría a 660nm. Para visualizar las diferencias en la cinética de crecimiento de las cepas, se graficaron los promedios de al menos tres experimentos independientes. Para calcular los tiempos de generación, los datos de absorbancia se convirtieron a valores logarítmicos y se graficaron. Se consideró sólo la parte exponencial de esas gráficas para calcular una pendiente, que corresponde al periodo en que los cultivos crecen realmente de manera exponencial.

El tiempo de generación se obtuvo con la siguiente ecuación $t = \log(2)/k$, donde t es el tiempo de generación y k la pendiente.

9. Determinación del crecimiento de la prosteca.

Se determinó la longitud de la prosteca de células creciendo exponencialmente (a una densidad óptica a 660nm de 0.25) o de cultivos estacionarios en medio mínimo con limitación de fosfatos. Para visualizar íntegramente esta estructura en las cepas carentes de los homólogos de OmpA, se tiñeron las células con el colorante FM4-64X a una concentración final de 17ng/ μ L y se lavaron con medio de cultivo para remover el exceso de colorante. En el caso de las cepas que expresan OmpA2 desde el locus silvestre, un plásmido o un locus diferente, la longitud de la prosteca se determinó a través de la fluorescencia emitida por la fusión de esta proteína con mCherry. El tamaño de la prosteca así como el porcentaje de células prostecadas se determinó manualmente usando Image J.

10. Ensayos de inhibición por difusión en placa.

Este ensayo permitió evaluar la sensibilidad de las cepas mutantes en *ompA* ante distintos tipos de estrés, con respecto a la cepa silvestre. Las cepas se crecieron en medio líquido PYE a 30°C, se tomó una alícuota de 200 μ L y se mezcló con PYE-0.3% de agar (fundido y luego enfriado a 45-50°C), el cual fue vertido por inversión sobre una caja con medio sólido PYE. Después de la solidificación, se colocó un círculo de papel filtro estéril de 0.5mm de diámetro en el centro de la caja, y sobre éste 10 μ L de los siguientes compuestos previamente esterilizados: deoxicolato de sodio al 5%, SDS al 10%, lisozima 10mg/mL, EDTA 0.5M, ácido nalidíxico 5mg/mL, cloranfenicol 10mg/mL o Tween 20 al 10%. Las cajas se incubaron a 30°C por una noche, tras lo cual se midieron los halos de inhibición de crecimiento.

Tabla 3. Cepas y plásmidos.

Cepa o plásmido.	Descripción y/o genotipo.	Fuente o referencia.
Cepas		
CB15N	Cepa sincronizable de <i>C. crescentus</i> derivada de CB15.	Evinger M. y Agabian N., 1977.
LDG1	Cepa mutante nula de ompA1. CB15N $\Delta ompA1::\Omega Spc$.	Este trabajo.
LDG2	Cepa mutante nula de ompA2. CB15N $\Delta ompA2::\Omega Spc$.	Este trabajo.
LDG3	Cepa doble mutante de <i>ompA1</i> y <i>ompA2</i> . CB15N $\Delta ompA1, \Delta ompA2::\Omega Spc$.	Este trabajo.
LDG4	Cepa que expresa OmpA1 fusionada a mCherry en el C-terminal. CB15N <i>ompA1::pompA1-mCherry</i> .	Este trabajo.
SP OmpA2-mCherry	Cepa que expresa OmpA2 fusionada a mCherry en el C-terminal. CB15N <i>ompA2::pompA2-mCherry</i>	Díaz Rentería, 2013.
LDG5	Cepa que expresa OmpA2-mCherry y MipZ-YFP. SP OmpA2-mCherry, <i>mipZ::pmipZ-YFP</i>	Este trabajo.
LDG6	Cepa que expresa OmpA2-mCherry a partir de un plásmido replicativo de bajo número de copias regulado por un promotor inducible por ácido vanílico. CB15N <i>pRVompA2-mCherry</i>	Este trabajo.
LDG7	Cepa merodiploide que expresa OmpA2-mCherry regulada por su promotor nativo desde el locus <i>xyIR</i> . CB15N <i>xyIR::pXompA2-mCherry</i>	Este trabajo.
LDG8	Cepa merodiploide que expresa OmpA2-mCherry regulada por su promotor nativo desde el locus <i>vanR</i> . CB15N <i>vanR::pVompA2-mCherry</i>	Este trabajo.

LDG9	Cepa que expresa como única copia a OmpA2-mCherry regulada por su promotor nativo desde el locus <i>xyIR</i> . LDG2 <i>xyIR</i> ::pXompA2-mCherry	Este trabajo
LDG10	Cepa que expresa como única copia a OmpA2-mCherry regulada por su promotor nativo desde el locus <i>vanR</i> . LDG2 <i>vanR</i> ::pVompA2-mCherry	Este trabajo
DH5- α	Cepa de <i>Escherichia coli</i> usada para clonación.	Invitrogen.
XL1-Blue	Cepa de <i>Escherichia coli</i> usada para clonación.	Invitrogen.
Plásmidos.		
pNPTS Δ ompA1 Ω Spc	Vector suicida pNPTS138 que integra un módulo de resistencia a espectinomicina entre las regiones flanqueantes de ompA1.	Este trabajo.
pNPTS Δ ompA2 Ω Spc	Vector suicida pNPTS138 que integra un módulo de resistencia a espectinomicina entre las regiones flanqueantes de ompA2.	Este trabajo.
pompA1-mCherry	pCHYC4 que incorpora un fragmento de ~600pb correspondientes al extremo 3' de ompA1	Este trabajo.
pompA2-mCherry	pCHYC2 que incorpora un fragmento de ~600pb correspondientes al extremo 3' de ompA2.	Este trabajo.
pRV-ps-mCherry-ompA1	pRV-ps-CHYN6 que incorpora el gen completo ompA1.	Este trabajo.
pRV-ps-mCherry-ompA2	pRV-ps-CHYN6 que incorpora el gen completo ompA2.	Este trabajo.
pRV-ompA2-mCherry	pRVCHYC6 que incorpora el gen completo ompA2 fusionado a mCherry bajo el control del promotor inducible por ácido vanílico.	Este trabajo.
pXompA2-mCherry	pXTCYC5 que incluye el gen ompA2 completo así como ~600pb río arriba del gen.	Este trabajo.
pVompA2-mCherry	pVTCYC5 que incluye el gen ompA2	Este trabajo.

	completo así como ~600pb río arriba del gen.	
pNPTS138	Plásmido derivado de pLitmus, que incluye <i>oriT</i> y <i>sacB</i> .	MRK Alley.
pCHYC2	Replicón pMB1 que incluye <i>mCherry</i> .	Thanbichler <i>et al</i> , 2007.
pRVCHYC6	Vector con <i>oriT</i> , <i>oriV</i> , <i>vanAp</i> y <i>mCherry</i> .	Thanbichler <i>et al</i> , 2007.
pRV-ps-CHYN6	Vector con <i>oriT</i> , <i>oriV</i> , <i>vanAp</i> y <i>mCherry</i> . Incluye el péptido señal de la proteína periplásmica DipM de <i>C. crescentus</i> , que permite la exportación de la proteína fusionada hacia el periplasma	Poggio-Ghilarducci, datos no publicados.
pXTCYC5	Replicón pMB1 que incluye <i>xyIR</i> , <i>xyIXp</i> y una etiqueta de tetracisteínas.	Thanbichler <i>et al</i> , 2007.
pVTCYC5	Replicón pMB1 que incluye <i>vanR</i> , <i>vanAp</i> y una etiqueta de tetracisteínas.	Este trabajo.
pCR2.1 TOPO-TA	Vector de clonación.	Invitrogen.

Tabla 4. Oligonucléotidos.

Nombre	Secuencia
ompA1 delF1 EcoRI	5'- caa <i>gaattc</i> cctggcccacgcggacaaagg-3'
ompA1 delR1 BamHI	5'- caa <i>ggatcc</i> ccgcgacgccgaccagcaacc-3'
ompA1 delF2 BamHI	5'- caa <i>ggatcc</i> tgatcgctggaattgggggctgg-3'
ompA1 delR2 HindIII	5'- caa <i>aagctt</i> tgttcggcgccacgcatgacc-3'
ompA2 delF1 EcoRI	5'- caa <i>gaattc</i> acgcgcccgcccaattctgc-3'
ompA2 delR1 BamHI	5'- caa <i>ggatcc</i> caagaccgcccctcagaatcagc-3'
ompA2 delF2 BamHI	5'- caa <i>ggatcc</i> tgaaccgctgacgatctcg-3'
ompA2 delR2 HindIII	5'- caa <i>aagctt</i> tcagcagggcgctcgcgagc-3'
ompA1 F1 SacI	5'- caa <i>gagctc</i> gtcgctacctgcgagctcaaagc-3'
ompA1 R1 EcoRI	5'- caa <i>gaattc</i> tc ttggaagttgatcgagaccgagc-3'
ompA2 F1 SacI	5'- caa <i>gagctc</i> ctcgatcaaggcgaccgacaag-3'
ompA2 R1 EcoRI	5'- caa <i>gaattc</i> ac gaagttgatcgagatcgatcgaacg-3'
ompA1 F2 SacI	5'caaa <i>gagctc</i> cgccaagcgcttgagcggctgg-3'

ompA1 R2 EcoRI	5'caa <i>gaattc</i> gcccccaattccagcgatcaagg-3'
ompA2 F2 SacI	5'caa <i>gagctc</i> cggcccaagagaccggctggtacg-3'
ompA2 R2 EcoRI	5'caa <i>gaattc</i> gccgggccctccaagtcgtc-3'
ompA2 F3 NdeI	5'- caa <i>catatg</i> aaactcaacctcctgg-3'
ompA2 R3 EcoRI	5'- caa <i>gaattc</i> tccaagttgatcgagatcgtcg-3'
mCherry R1 KpnI	5'- caa <i>ggtacc</i> ttactgtacagctcgtccatgc-3'

Anexo 1. Construcción de plásmidos y obtención de cepas.

Para obtener el plásmido pNPTSΔompA1ΩSpc, se amplificó por PCR la región río arriba y río abajo de *ompA1* a partir de DNA cromosomal de *C. crescentus* y empleando los oligos ompA1 delF1 EcoRI con ompA1 delR1 BamHI y ompA1 delF2 BamHI con ompA1 delR2 HindIII, respectivamente. Los productos de PCR se digirieron con BamHI y se ligaron con T4 Ligasa. Usando como DNA molde la fusión de ambas regiones, se hizo un nuevo PCR con los oligos externos ompA1 delF1 EcoRI y ompA1 delR2 HindIII. El producto fue purificado, digerido con las enzimas EcoRI y HindIII y ligado con el plásmido pNPTS digerido con las mismas enzimas de restricción. El nuevo plásmido se digirió con BamHI para integrar el módulo de resistencia a espectinomicina.

La estrategia anterior se usó también para obtener el plásmido pNPTSΔompA2ΩSpc, pero empleando los oligos: ompA2 delF1 EcoRI con ompA2 delR1 BamHI y ompA2 delF2 BamHI con ompA2 delR2 HindIII.

El plásmido pompA1-mCherry se obtuvo por ligación del plásmido pCHYC4 con la región 3' de *ompA1* (~600pb), ambos digeridos con EcoRI y SacI. La región 3' de *ompA1* se amplificó por PCR usando los oligos ompA1 F1 SacI y ompA1 R1 EcoRI.

Para obtener el plásmido pompA2-mCherry, se fusionó con T4 Ligasa el plásmido pCHYC2 con el producto de PCR correspondiente a la región 3' de *ompA2*, ambos digeridos con EcoRI y SacI. Los oligos usados para amplificar el fragmento de ~600pb de *ompA2* fueron: ompA2 F1 SacI y ompA2 R1 EcoRI.

Los plásmidos pRV-ps-mCherry-ompA1 y pRV-ps-mCherry-ompA2 se obtuvieron ligando el plásmido pRV-ps-CHYN6 con el producto de PCR que incluía el gen *ompA1* u *ompA2* carentes de la región correspondiente al péptido señal (~1200pb), ambos

digeridos previamente con *SacI* y *EcoRI*. Las regiones correspondientes a *ompA1* y *ompA2* clonadas se amplificaron con los oligos: *ompA1* F2 *SacI* con *ompA1* R2 *EcoRI* y *ompA2* F2 *SacI* con *ompA2* R2 *EcoRI*, respectivamente.

El plásmido pRV-*ompA2*-CHYC6 se obtuvo por ligación del plásmido pRVCHYC6 con el producto de PCR que incluye *ompA2* completo (~1250pb), ambos digeridos previamente con *NdeI* y *EcoRI*. Los oligonucleótidos usados para amplificar *ompA2* fueron: *ompA2* F3 *NdeI* y *ompA2* R3 *EcoRI*.

Para obtener el plásmido pXompA2-mCherry, se amplificó el alelo *ompA2-mCherry* junto con su región río arriba, usando como molde el DNA cromosomal de la cepa SP OmpA2-mCherry y los oligos *ompA2* delF1 *EcoRI* y mCherry R1 *KpnI*. El producto de PCR de ~2.6kb se clonó en el plásmido pCR2.1 TOPO-TA, se liberó por restricción con *KpnI* y se clonó en pXTCYC5 digerido con *KpnI*. Se verificó que su orientación fuera opuesta a la del promotor *xyIX*.

El plásmido pVompA2-mCherry se obtuvo con la misma estrategia anterior, fusionando el fragmento de ~2.6kb con el plásmido pVTCYC5. Éste se obtuvo por intercambio entre la región que alberga el promotor *xyIX* presente en pXTCYC5 con la que alberga el promotor *vanA* presente en pRVCHYC6, las cuales fueron liberadas por restricción con *HindIII* y *NdeI*.

Las cepas mutantes sencillas LDG1 y LDG2 se obtuvieron introduciendo por electroporación los plásmidos pNPTSΔ*ompA1*ΩSpc o pNPTSΔ*ompA2*ΩSpc en *C. crescentus*. A las clonas kanamicina y espectinomicina resistentes, se les introdujo el plásmido multicopia pRV-ps-mCherry-*ompA1* o pRV-ps-mCherry-*ompA2* y se seleccionó la resistencia a cloranfenicol. Para promover el reemplazo del gen silvestre por el módulo de resistencia a espectinomicina, las cepas anteriores se crecieron sobre placas de PYE con 3% de sacarosa. Se aislaron las clonas kanamicina sensibles y espectinomicina resistentes, las cuales se crecieron en cultivos líquidos en ausencia de cloranfenicol para promover la pérdida del plásmido multicopia. Posteriormente, se infectaron con el bacteriófago Ø CR30 y los fagos resultantes de la lisis celular se ocuparon para transferir la mutación de *ompA1* u *ompA2* a la cepa silvestre CB15N mediante transducción y selección de clonas resistentes a espectinomicina.

Para la obtención de la cepa doble mutante LDG3, primero se introdujo a la cepa silvestre CB15N el plásmido pNPTS Δ ompA1 (carente de módulo de resistencia a espectinomicina) así como el plásmido pRV-ps-mCherry-ompA1. En aquellas clonas que resultaron kanamicina/cloranfenicol sensibles, se corroboró la pérdida del alelo cromosomal *ompA1* mediante PCR usando los oligos ompA1 delF1 EcoRI y ompA1 delR2 HindIII. Posteriormente, por transducción se integró la mutación nula de *ompA2* seleccionando la resistencia a espectinomicina.

La cepa LDG4 se obtuvo transformando el plásmido pompA1-mCherry en la cepa silvestre CB15N y por selección de clonas resistentes a gentamicina.

La cepa SP OmpA2-mCherry se obtuvo por transformación de la cepa silvestre CB15N con el plásmido pompA2-mCherry y seleccionando la resistencia a kanamicina.

La cepa LDG5 se obtuvo por integración del alelo OmpA2-mCherry mediante transducción en una cepa que expresa una fusión cromosomal de *mipZ* con *yfp*, obtenida previamente por nuestro grupo de trabajo.

La cepa LDG6 se obtuvo por transformación de la cepa silvestre con el plásmido pRVompA2-mCherry, que confiere resistencia a cloranfenicol.

Las cepas LDG7 y LDG8 se obtuvieron por transformación de la cepa silvestre con el plásmido pXompA2-mCherry o pVompA2-mCherry, respectivamente, que confieren la resistencia a tetraciclina.

Las cepas LDG9 y LDG10 se obtuvieron por transducción de las cepas LDG7 y LDG8 con el bacteriófago que lleva la mutación nula en *ompA2* y el módulo de resistencia a espectinomicina.

REFERENCIAS

- Alberts B., Bray D., Hopkin K., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. y Walter P. (2006). Introducción a la Biología Celular, 2da edición. México, Editorial Médica Panamericana.
- Asmar A., Ferreira J., Cohen E., Cho S., Beeby M., Hughes K. y Collet J. (2017). Communication across the bacterial cell envelope depends on the size of the periplasm. *Public Library of Science, Biology*, **15**(12): e2004303.
- Awram P. y Smit J. (2001). Identification of lipopolysaccharide O antigen synthesis genes required for the attachment of the S-layer of *Caulobacter crescentus*. *Microbiology*, **147** (Pt 6): 1451-1460.
- Babu MM., Priya ML., Selvan AT., Madera M., Gough J., Aravind L. y Sankaran K. (2006). A database of bacterial lipoproteins (DOLOP) with functional assignments to predicted lipoproteins. *Journal of Bacteriology*, **188** (8): 2761-2773.
- Bagos P., Liakopoulos T., Spyropoulos I. y Hamodrakas S. (2004). PRED-TMBB: a web Server for predicting the topology of b-barrel outer membrane proteins. *Nucleic Acids Research*, **32** (2): 400-404.
- Behr M., Schnaitman C. y Pugsley A. (1980). Major heat-modifiable outer membrane protein in Gram-negative bacteria: comparison with the OmpA protein of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, **143** (2): 906-913.
- Belaouaj A., Kim KS y Shapiro SD. (2000). Degradation of outer membrane protein A in *Escherichia coli* killing by neutrophil elastase. *Science* **289**: 1185-1188.
- Bernadac A., Gavioli M., Lazzaroni J.C., Raina S. y Lloubés R. (1998). *Escherichia coli* tol-pal mutants form outer membrane vesicles. *Journal of Bacteriology*, **180**: 4872-4878.
- Bernstein A., Rolfe B. y Onodera K. (1972). Pleiotropic properties and genetic organization of the tolA, B locus of *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, **112**: 74-83.
- Beveridge, T.J. (2001). Use of the Gram stain in microbiology. *Biotechnic & Histochemistry*, **76**: 111-118.
- Bosch V. y Braun V. (1973). Distribution of murein lipoprotein between the cytoplasmic and outer membrane of *Escherichia coli*. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, **34** (2): 301-310.
- Bouveret E., Benédetti H., Rigal A., Loret E. y Lazdunski C. (1999). In vitro characterization of peptidoglycan-associated-lipoprotein (PAL)-Peptidoglycan and PAL-TolB interactions. *Journal of Bacteriology*, **181** (20): 6306-6311.
- Bowman G., Comolli L., Zhu J., Eckart M., Koenig M., Downing K., Moerner W. Earnest T. y Shapiro L. (2008). A polymeric protein anchors the chromosomal origin/ParB complex at a bacterial cell pole. *Cell*, **134** (6): 945-55.

- Brass, J. M., Higgins CF., Foley M., Rugman PA., Birmingham J., y Garland PB. (1986). Lateral diffusion of proteins in the periplasm of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, **165**: 786-795.
- Braun V. y Bosch V. (1972). Sequence of the murein lipoprotein and the attachment site of the lipid. *European Journal of Biochemistry*, **28**: 51-69.
- Braun V. y Bosch V. (1973). In vivo biosynthesis of murein lipoprotein of the outer membrane of *E. coli*. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, **34** (2): 302-206.
- Braun V. y Hantke K. (1975). Characterization of the free form of murein lipoprotein from the outer membrane of *Escherichia coli*. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, **60**(1): 26-28.
- Braun V. y Rehn K. (1969). Chemical characterization, spatial distribution and function of a lipoprotein (murein-lipoprotein) of the *E. coli* cell wall. The specific effect of trypsin on the membrane structure. *European Journal of Biochemistry*, **10**: 426-438.
- Braun V. y Sieglin U. (1970). The covalent murein-lipoprotein structure of the *Escherichia coli* cell wall. The attachment site of the lipoprotein on the murein. *European Journal of Biochemistry*, **13**: 336-346.
- Braun V. y Wolf H. (1970). The murein-lipoprotein linkage in the cell wall of *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry*, **14**: 387-391.
- Braun V. y Wolf H. (1972). Degradation of the murein-lipoprotein complex of *Escherichia coli* cell walls by *Dictyostelium amoebae*. *European Journal of Biochemistry*, **27**: 116-125.
- Braun V., Rotering H., Ohms P. y Hagenmaier H. (1976). Conformational studies on the murein lipoprotein from the outer membrane of *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry*, **70**: 601-610.
- Bremer E., Cole ST, Hindennach I., Henning U., Beck E., Kurz C. y Schaller H. (1982). Export of a protein into the outer membrane of *Escherichia coli* K-12. Stable incorporation of the OmpA protein requires less than 193 amino-terminal amino-acid residues. *European Journal of Biochemistry*, **122**: 223-231.
- Brokx, S. J., Ellison, M., Locke, T., Bottorff, D., Frost, L. y Weiner, J. H. (2004). Genome-wide analysis of lipoprotein expression in *Escherichia coli* MG1655. *Journal of Bacteriology*, **186**, 3254-3258.
- Carr S., Penfold N., Bamford V., James R. y Hemmings A. (2000). The structure of TolB, an essential component of the tol-dependent translocation system, and its protein-protein interaction with the translocation domain of colicin E9. *Structure*, **8** (1): 57-66.
- Cascales E. y Lloubès R. (2004). Deletion analyses of the peptidoglycan-associated lipoprotein Pal reveals three independent binding sequences including a TolA box. *Molecular Microbiology*, **51** (3), 873-885).
- Cascales E., Bernadac A., Gavioli M., Lazaroni J. y Lloubes R. (2002). Pal lipoprotein of *Escherichia coli* plays a major role in outer membrane integrity. *Journal of Bacteriology*, **184** (3): 754-759.

Cava F. y de Pedro M. (2014). Peptidoglycan plasticity in bacteria: emerging variability of the murein sacculus and their associated biological functions. *Current Opinion in Microbiology*, **18**: 46-53.

Chintalapi, S., Kiran M. y Shivaji S. (2004). Role of membrane lipid fatty acids in cold adaptation. *Cellular and Molecular Biology*, **50**(5):631-642.

Ciesielski F., Griffin D., Rittig M., Moriyón I. y Bonev B. (2013). Interactions of lipopolysaccharide with lipid membranes, raft models-A solid state NMR study. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, **1828** (8): 1731-1742.

Christen B., Abeliuk E. Collier J., Kalogeraki V., Passarelli B., Collier J., Fero M., McAdams H. y Shapiro L. (2011). The essential genome of a bacterium. *Molecular Systems Biology*, **7**: 528.

Clavel., Germon P., Vianney A., Portallier R. y Lazzaroni J-C. (1998). TolB protein of *E. coli* K-12 interacts with the outer membrane peptidoglycan associated proteins Pal, Lpp and OmpA. *Molecular Microbiology*, **29**: 359-367.

Cowles C., Yongfeng L., Semmelhack M., Cristea I. y Silhavy T. (2011). The free and bound forms of Lpp occupy distinct subcellular locations in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, **79** (5): 1168-1181.

Danoff E. y Fleming K. (2011). The soluble, periplasmic domain of OmpA folds as an independent unit and displays chaperone activity by reducing the self-association propensity of the unfolded OmpA transmembrane β -barrel. *Biophysical Chemistry*, **159**: 194-204.

Davydova L., Bakholdina S., Barkina M., Velansky P., Bogdanov M. y Sanina N. (2016). Effects of elevated growth temperature and heat shock on the lipid composition of the inner and outer membranes of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Biochimie*, **123**: 103-109.

De Pedro M. y Cava F. (2015). Structural constraints and dynamics of bacterial cell wall architecture. *Frontiers in Microbiology*, **6**: 449.

De Siervo AJ y Homola AD. (1980). Analysis of *Caulobacter crescentus* lipids. *Journal of Bacteriology*, **143**: 1215-1222.

Delhaye A., Collet JF. y Laloux G. (2016). Fine tuning of the Cpx envelope stress response is required for cell wall homeostasis in *Escherichia coli*. *mBio*, **23**; **7**(1): e00047-16.

Derouiche R., Benedetti H., Lazzaroni J-C., Lazdunski C. y Llobès R. (1995). Protein complex within *Escherichia coli* inner membrane TolA N-terminal domain interacts with TolQ and TolR proteins. *Journal of Biological Chemistry*, **270**: 11078-11084.

Díaz-Mejía J., Babu M. y Emili A. (2009). Computational and experimental approaches to chart the *Escherichia coli* cell-envelope-associated proteome and interactome. *Federation of European Microbiological Societies, Microbiology Reviews*, **33**, 66-97.

Díaz Rentería P. (2013). Localización y caracterización de la proteína análoga a OmpA (Outer membrane protein A) en *Caulobacter crescentus*. (Tesis de Licenciatura), Universidad Nacional Autónoma de México.

- DiRienzo, J.M., Nakamura, K. e Inouye M. (1978). The outer membrane proteins of Gram-negative bacteria: biosynthesis, assembly and functions. *Annual Review of Biochemistry*, **47**: 481-532.
- Dmitriev B., Toukach F. y Ehlers S. (2005). Towards a comprehensive view of the bacterial cell wall. *Trends in Microbiology*, **13** (12): 569-574.
- Dramsi S., Magnet S., Davison S. y Arthur M. (2008). Covalent attachment of proteins to peptidoglycan. *Federation of European Microbiological Societies, Microbiology Reviews*, **32** (2): 307-320.
- Ebersbach G., Briegel A. Jensen G. y Jacobs-Wagner C. (2008). A self-associating protein critical for chromosome attachment, division and polar organization in *Caulobacter*. *Cell*, **134** (6): 956-968.
- Ehrmann M. (2007). The periplasm. ASM Press, Washington, D.C.
- Emory SA. y Belasco JG. (1990). The *ompA* 5'-untranslated RNA segment functions in *Escherichia coli* as a growth-rate-regulated mRNA stabilizer whose activity is unrelated to translational efficiency. *Journal of Bacteriology*, **172**: 4472-4481.
- Emory SA., Bouvet P. y Belasco JG. (1992). A 5'- terminal stem loop structure can stabilize mRNA in *Escherichia coli*. *Genes Development*, **6**: 135-148.
- Errington, J., Murray, H. y Wu, L. (2005). Diversity and redundancy in bacterial chromosome segregation mechanisms. *Philosophical Transactions of the Royal Society of Biological Sciences*, **360**: 497-505.
- Evinger M. y Agabian N. (1977). Envelope-associated nucleoid from *Caulobacter crescentus* stalked and swarmer cell. *Journal of Bacteriology*, **132**: 294-301.
- Fagan RP. y Fairweather NF. (2014). Biogenesis and functions of bacterial S-layers. *Nature Reviews of Microbiology*, **12** (3): 211-222.
- Fang G., Passalacqua K. D., Hocking J., Montero Llopis P., Gerstein M., Bergman N. H. y Jacobs-Wagner C. (2013). Transcriptomic and phylogenetic analysis of a bacterial cell cycle reveals strong associations between gene co-expression and evolution. *BioMed Central Genomics*, **14**: 450-465.
- Fukuda, A., Matsuyama S., Hara, T., Nakayama, J. y Tokuda, H. (2002). Aminoacylation of the N-terminal cysteine is essential for Lol-dependent release of lipoproteins from membranes but does not depend on lipoprotein sorting signals. *Journal of Biological Chemistry*, **277** (45): 43512-43518.
- Fung J., MacAllister TJ. y Rothfield LI. (1978). Role of murein-lipoprotein in morphogenesis of the bacterial division septum: phenotypic similarity of lkyD and lpo mutants. *Journal of Bacteriology*, **133**: 1467-1471.
- Gan L., Chen S. y Jensen G. (2008). Molecular organization of Gram-negative peptidoglycan. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **105** (48): 18953-18957.
- Gennity, J. M. e Inouye, M. (1991). The protein sequence responsible for lipoprotein membrane localization in *Escherichia coli* exhibits remarkable specificity. *Journal of Biological Chemistry*, **266**: 16458-16464.

- Gerding M., Ogata Y., Pecora N., Niki H., y de Boer P. (2007). The trans-envelope Tol-Pal complex is part of the cell division machinery and required for proper outer-membrane invagination during cell constriction in *E. coli*. *Molecular Microbiology*, **63** (4): 1008-1025.
- Germon P., Clavel T., Vianney A., Portalier R. y Lazzaroni J-C. (1998). Mutational analysis of the *Escherichia coli* K-12 TolA N-terminal región and characterization of its TolQ-interacting domain by genetic supression. *Journal of Bacteriology*, **180**: 6433-6439.
- Germon P., Ray M., Vianney A. y Lazzaroni J. (2001). Energy-dependent conformational change in the TolA protein of *Escherichia coli* involves its N-terminal domain, TolQ and TolR. *Journal of Bacteriology*, **183** (14): 4110-4114.
- Godlewska R., Wisniewska K., Pietras Z. y Jagusztyn-Krynicka E. (2009). Peptidoglycan-associated lipoprotein (Pal) of Gram-negative bacteria: function, structure, role in pathogenesis and potential application in immunoprophylaxis. *Federation of European Microbiological Societies, Microbiology Letters*, **298** (1): 1-11.
- Gonin M., Quardokus EM., O'Donnol D., Maddock J. y Brun Y. (2000). Regulation of stalk elongation by phosphate in *Caulobacter crescentus*. *Journal of Bacteriology*, **182**(2): 337-347.
- Gorter E. y Grendel F. (1925). On bimolecular layers of lipoids on the chromocytes of the blood. *Journal of Experimental Medicine*, **41**: 439-443.
- Gottesman S. (2017). Stress Reduction, Bacterial Style. *Journal of Bacteriology*, **199**: e00433-17.
- Gracjana K. y Raina S. (2017). Small regulatory bacterial RNAs regulating the envelope stress response. *Biochemical Society Transactions*, **45** (2): 417-425.
- Gray AN, Egan AJ, Van't Veer IL, Verheul J, Colavin A, Koumoutsis A, Biboy J, Altelaar AF, Damen MJ, Huang KC, Simorre JP, Breunink E, den Blaauwen T, Typas A, Gross CA y Vollmer W. (2015). Coordination of peptidoglycan syntehesis and outer membrane constriction during *Escherichia coli* cell división. *e-Life*, **7**: 4. doi: 10.7554/eLife.07118.
- Greenawalt J. y Whiteside T. (1975). Mesosomes: Membranous bacterial organelles. *Bacteriological Reviews*, **39** (4): 405-463.
- Gibbs K., Isaac D., Xu J., Hendrix R., Silhavy T. y Theriot J. (2004). Complex spatial distribution and dynamics of an abundant *Escherichia coli* outer membrane protein, LamB. *Molecular Microbiology*, **53**: 1771-1783.
- Gumbart, J. C., Beeby, M., Jensen, G. J. y Roux, B. (2014). *Escherichia coli* peptidoglycan structure and mechanics as predicted by atomic-scale simulations. *Public Library of Science, Computational Biology*, **10**:e1003475. doi:10.1371/journal.pcbi.1003475.
- Gupta, S. R. (1998). What are the Archaeobacteria: life's third domain or monoderm prokaryotes related to Gram-positive bacteria? A new proposal for the classification of prokaryotic organisms. *Molecular Microbiology*, **29**: 695.707.

Gupta, S.R. (2011). Origin of diderm (Gram-negative) bacteria: antibiotic selection pressure rather than endosymbiosis likely led to the evolution of bacterial cells with two membranes. *Antonie van Leeuwenhoek*, **100**: 171-182.

Hansen MJ., Chen LH., Fejzo ML. y Belasco JG. (1994). The *ompA* 5'-untranslated region impedes a major pathway for mRNA degradation in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, **12**: 707-716.

Hayat S. y Elofsson A. (2012). BOCTOPUS: improved topology prediction transmembrane beta barrel proteins. *Bioinformatics*, **28** (4): 516-522.

Henderson J., Zimmerman S., Crofts A., Boll J., Kuhns L., Herrera C. y Trent S. (2016). The power of asymmetry: architecture and assembly of the Gram-negative outer membrane lipid bilayer. *Annual Reviews of Microbiology*, **70**: 255-278.

Herrmann J., Jabbarpour F., Bargar P. Nomellini J., Li P., Lane T., Weiss T., Smit J., Shapiro L. y Wakatsuki S. (2017). Environmental calcium controls alternate physical states of the *Caulobacter* surface layer. *Biophysical Journal*, **112**: 1841-1851.

Hiemstra H., de Hoop MJ, Inouye M. y Witholt B. (1986). Induction kinetics and cell surface distribution of *Escherichia coli* lipoprotein under lac promoter control. *Journal of Bacteriology*, **168**: 140-151.

Hiemstra H., Nanninga N., Woldringh CL., Inouye M. y Witholt B. (1987). Distribution of newly synthesized lipoprotein over the outer membrane and the peptidoglycan sacculus of an *Escherichia coli* lac-lpp strain. *Journal of Bacteriology*, **169**: 5434-5444.

Hiller K., Grote A., Scheer M., Münch R. Y Jahn D. (2004). PrediSi: prediction of signal peptides and their cleavage positions. *Nucleic Acids Research*, **32**: 375-379.

Hong H., Szabo G. y Tamm L. (2006). Electrostatic couplings in OmpA channel-gating suggest a mechanism for pore opening. *Nature Chemical Biology*, **2**: 627-635.

Huang K., Mokhopadhyay R., Wen B., Gitai Z. y Wingreen N. (2008). Cell shape and cell-wall organization in Gram-negative bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **105** (49): 19282-19287.

Huber D., Rajagopalan N., Preissler S., Rocco M., Merz F., Kramer G. Y Bukau B. (2011). SecA interacts with ribosomes in order to facilitate postranslational translocation in bacteria. *Molecular Cell*, **41**: 343-353.

Hughes V., Jiang C. y Brun Y. (2012). *Caulobacter crescentus*. *Current Biology*, **22** (13): R507-9.

Inouye, M. (1974). A three-dimensional molecular assembly model of a lipoprotein from the *Escherichia coli* outer membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **71**, 2396-2400.

Ireland M., Karty J., Quardokus E., Reilly J. y Brun Y. (2002). Proteomic analysis of the *Caulobacter crescentus* stalk indicates competence for nutrient uptake. *Molecular Microbiology*, **45**: 1029-1041.

Ishida H., García-Herrero A. y Vogel H. (2014). The periplasmic domain of *Escherichia coli* outer membrane protein A can undergo a localized temperature dependent

structural transition. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, **1838** (12): 3014-3024.

Jain S., van Ulsen P., Benz I., Schmidt F., Fernandez R., Tommassen J. y Goldberg M. (2006). Polar localization of the autotransporter family of large bacterial virulence proteins. *Journal of Bacteriology*, **188**: 4841-4850.

Jensen R., Wang S. y Shapiro L. (2002). Dynamic localization of proteins and DNA during a bacterial cell cycle. *Nature Reviews*, **3**: 167-176.

Juncker, A. S., Willenbrock, H., von Heijne, G., Brunak, S., Nielsen, H. y Krogh, A. (2003). Prediction of lipoprotein signal peptides in Gram-negative bacteria. *Protein Science*, **12**, 1652-1662.

Kabanov D. y Prokhorenko I. (2010). Structural analysis of lipopolysaccharides from Gram-negative bacteria. *Biochemistry*, **75** (4): 383-404.

Käll L., Krogh A. y Sonnhammer E. (2007). Advantages of combined transmembrane topology and signal peptide prediction – the Phobius web server. *Nucleic Acids Research*, **35**: 429-432.

Kiekebusch D. y Thanbichler M. (2014). Spatiotemporal organization of microbial cells by protein concentration gradients. *Trends in Microbiology*, **22**: 65-73.

Kleinschmidt JH. (2003). Membrane protein folding on the example of outer membrane protein A of *Escherichia coli*. *Cell and Molecular Life Sciences*, **60**(8): 1547-58.

Koebnik R. y Braun V. (1993). Insertion derivatives containing segments of up to 16 amino acids indentify surface- and periplasm-encoded regions of the FhuA outer membrane receptor of *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, **175**: 826-839.

Koebnik R., Locher K.P. y Van Gelder P. (2000). Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Molecular Microbiology*, **37**: 239-253.

Koebnik, R. (1999). Structural and functional roles of the surface-exposed loops of the beta-barrel membrane protein OmpA from *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, **181** (12): 3688-3694.

Kowata H., Tochigi S., Kusano T. y Kojima S. (2016). Quantitative measurement of the outer membrane permeability in *Escherichia coli* lpp and tol-pal mutants defines the significance of Tol-Pal function for maintaining drug resistance. *The Journal of Antibiotics*: 1-8.

Kudva R., Denks K., Kuhn P., Vogt A., Müller M. y Koch H. (2013). Protein translocation across the inner membrane of Gram-negative bacteria: the Sec and Tat dependent protein transport pathways. *Research in Microbiology*, **164** (6): 505-534.

Kühn J., Briegel A., Mörschel E., Kahnt J., Leser K., Wick S., Jensen G. Y Thanbichler M. (2010). Bactofilins, a ubiquitous class of cytoskeletal proteins mediating polar localization of a cell wall synthase in *Caulobacter crescentus*. *The European Molecular Biology Organization Journal*, **29**: 327-339.

Klimke WA., Rypien CD., Klinger B., Kennedy RA., Rodríguez-Maillard JM. y Frost LS. (2005). The mating pair stabilization protein, TraN, of the F plasmid is an outer-

membrane protein with two regions that are important for its function in conjugation. *Microbiology*, 151 (Pt 11): 3527-3540.

Laub M., McAdams H., Feldblyum T., Fraser C. y Shapiro L. (2000). Global analysis of the genetic network controlling a bacterial cell cycle. *Science*, **290**: 2144-2148.

Laub M., Shapiro L. y McAdams H. (2007). Systems Biology of *Caulobacter*. *Annual Review of Genetics*, **41**:429-41.

Laloux G. y Jacobs-Wagner C. (2014). How do bacteria localize proteins to the cell pole? *Journal of Cell Sciences*, **1**; 127 (Pt 1): 11-9.

Lazzaroni J.C. y Portalier R.C. (1981). Genetic and biochemical characterization of periplasmic-leaky mutants of *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, **145**: 1351-1358.

Lazzaroni J-C, Vianney A., Popot L., Benedetti H., Samatey F., Lazdunski R., Portalier R. y Geli V. (1995). Transmembrane alpha-helix interactions are required for the functional assembly of the *Escherichia coli* Tol complex. *Journal of Molecular Biology*, **246**: 1-7.

Le Blastier S., Hamels A., Cabeen M., Schille L., Tilquin F., Dieu M., Raes M. y Matroule JY. (2010). Phosphate starvation triggers production and secretion of an extracellular lipoprotein in *Caulobacter crescentus*. *Public Library of Science*, **5**(12): e14198.

Lee H. y Kim H. (2014). Membrane topology of transmembrane proteins: determinants and experimental tools. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **453** (2): 268-76.

Leyton D., Belousoff M. y Lithgow T. (2015). The β -barrel Assembly Machinery Complex. Pp. 1-17. En "The Bam Complex", editado por Buchanan S. y Nionaj N. Series Editor, UK.

Lloubés R., Cascales E., Walburger A., Bouveret E. Lazdunski C. Bernadac A. y Journet L. (2001). The Tol-Pal proteins of the *Escherichia coli* cell envelope: an energized system required for outer membrane integrity? *Research in Microbiology*, **152**: 523-529.

Lugtenberg E. y Peters R. (1976). Distribution of lipids in cytoplasmic and outer membranes of *Escherichia coli* K12. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Lipids and Lipid Metabolism*, **441** (1): 38-47.

Lyu Z. y Zhao X. (2015). Periplasmic quality control in biogenesis of outer membrane proteins. *Biochemical Society Transactions*, **43** (2): 133-138.

Madigan M., Martinko M. y Parker J. (2002). Brock Biology of Microorganisms. 10th ed., USA, Prentice Hall.

Magalhaes P., Lopes A., Mazzola P., Rangel-Yagui C., Penna T. y Pessoa A. (2007). Methods of endotoxin removal from biological preparations: a review. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, **10** (3): 388-404.

- Magnet S., Dubost L., Marie A., Arthur M. y Gutmann L. (2008). Identification of the L, D-transpeptidases for peptidoglycan cross-linking in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, **190** (13): 4782-4785.
- Magnet S., S. Bellais, I. Dubost, M. Fourgeaud, J. L. Mainardi, S. Petit-Frere, A. Marie, D. Mengin-Lecreux, M. Arthur y L. Gutmann. (2007). Identification of the L, D-transpeptidases responsible for attachment of the Braun lipoprotein to *Escherichia coli* peptidoglycan. *Journal of Bacteriology*, **189**: 3927-3931.
- Malinverni JC. y Silhavy TJ. (2009). An ABC transport system that maintains lipid asymmetry in the Gram-negative outer membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **106**(19): 8009-8014.
- Marchler-Bauer A., Derbyshire MK, Gonzales NR, Lu S, Chitsaz F., Geer LY, Geer RC, Gwadz M, Hurwitz DI, Lanczycki CJ, Lu F, Marchler GH, Song JS, Thanki N, Wang Z, Yamashita RA, Zhang D, Zheng C y Bryant SH. (2015). CDD: NCBI's conserved domain database. *Nucleic Acids Research*, **28** (43): 222-226.
- Marvin HJ., Beest MB. y Witholt B. (1989). Release of outer membrane fragments from wild-type *Escherichia coli* and from several *E. coli* lipopolysaccharide mutants by EDTA and heat shock treatments. *Journal of Bacteriology*, **171** (10): 5262-5267.
- McGrath P. T., Lee H., Zhang L., Iniesta A. A., Hottes A. K., Tan M. H., Hillson N. J., Hu P., Shapiro L. y McAdams H. H. (2007). High-throughput identification of transcription start sites conserved promoter motifs and predicted regulons. *Nature Biotechnology*, **25** (5): 584-592.
- McGuffin L., Bryson K. y Jones D. (2000). The PSIPRED: protein structure prediction server. *Bioinformatics*, **16** (4): 404-405.
- Meury J. y Devilliers G. (1999). Impairment of cell division in tolA mutants of *Escherichia coli* at low and high medium osmolarities. *Biology of the Cell*, **91**: 67-75.
- Miller S. y Salama R. (2018). The gram-negative bacterial periplasm: Size matters. *Public Library of Science, Biology*, **16**(1): e2004935.
- Montero-Llopis, P., Jackson, F. A., Sliusarenko, O., Surovtsev, I., Heinritz, J., Emonet, T. y Jacobs-Wagner, C. (2010). Spatial organization of the flow of genetic information in bacteria. *Nature*; **466** (7302): 77-81.
- Morona R., Klose M. y Henning U. (1984). *Escherichia coli* K-12 outer membrane protein (OmpA) as a bacteriophage receptor: analysis of mutant genes expressing altered proteins. *Journal of Bacteriology*, **159**: 570-578.
- Mullineaux CW, Nenniger A, Ray N y Robinson C. (2006). Diffusion of green fluorescent protein in three cell environments in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, **188**: 3442-3448.
- Murat, D., Byrne, M. y Komeili A. (2010). Cell biology of prokaryotic organelles. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, **2**: a000422.
- Nagano K., Reaf E., Yukitaka M., Takahi M. Toshihide N. y Fuminobu Y. (2005). Trimeric structure of major outer membrane proteins homologous to OmpA in *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of Bacteriology*, 902-911.

Nakamura K. y Mizushima S. (1976). Effects of heating in dodecyl sulfate solution on the conformation and electrophoretic mobility of isolated major outer membrane proteins from *Escherichia coli* K-12. *Journal of Biochemistry*, **80** (6): 1411-1422.

Nakayama H., Kurokawa K. y Lee BL. (2012). Lipoproteins in bacteria: structures and biosynthetic pathways. *Federation of European Biochemical Societies Journal*, **279** (23): 4247-4268.

Narita S. (2011). ABC transporters involved in the biogenesis of the outer membrane in Gram-negative bacteria. *Biosciences, Biotechnology and Biochemistry*, **75** (6): 1044-1054.

Narita, S., Tanaka, K., Matsuyama, S. y Tokuda, H. (2002). Disruption of lolCDE encoding an ATP-binding-cassette transporter is lethal for *Escherichia coli* and prevents the release of lipoproteins from the inner membrane. *Journal of Bacteriology*, **184**: 1417-1422.

Nikaido H. (2003). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **67**: 593-656.

O'Neil P., Rollauer S. Noinaj N. y Buchanan S. (2015). Fitting the pieces of the β -Barrel Assembly Machinery Complex. *Biochemistry*, **54**(41):6303-6311.

Overton K., Park D., Yung M., Dohnalkova A., Smit J. y Jiao Y. (2016). Two outer membrane proteins contribute to cellular fitness in *Caulobacter crescentus* by preventing intracellular S-layer protein accumulation. *Applied and Environmental Microbiology*, **82** (23): 6961-6972.

Papanikou, E., Karamanou, S. y Economou, A. (2007). Bacterial protein secretion through the translocase nanomachine. *Nature Reviews in Microbiology*, **5**, 839-851.

Park JS, Lee WC, Yeo KJ, Ryu KS, Kumarasiri M, Hesek D, Lee M, Mobashery S, Song JH, Kim SI, Lee JC, Cheong C, Jeon YH y Kim HY. (2012). Mechanism of anchoring of OmpA protein to the cell wall peptidoglycan of the gram-negative bacterial outer membrane. *The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*, **26**:219-228.

Patel GJ., Behrens-Kneip S., Holst O. y Kleinschmidt JH. (2009). The periplasmic chaperone Skp facilitates targeting, insertion, and folding of OmpA into lipid membranes with a negative membrane surface potential. *Biochemistry*, **48**(43): 10235-10245.

Patel GJ. Y Kleinschmidt JH. (2013). The lipid bilayer-inserted membrane protein BamA of *Escherichia coli* facilitates insertion and folding of outer membrane protein A from its complex with Skp. *Biochemistry*, **52**(23): 3974-3986.

Pautsch A y Schultz GE. (1998). Structure of the outer membrane protein A transmembrane domain. *Nature Structural Biology*, **5** (11): 1013-1017.

Petersen T., Brunak S., von Heijne G. Y Nielsen H. (2011). SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods*, **8**: 785-786.

Pollastri G. y McLysaght A. (2005). Porter: a new, accurate server for protein secondary structure prediction. *Bioinformatics*, **21** (8): 1719-1720.

- Polissi A. y Sperandeo P. (2014). The lipopolysaccharide export pathway in *Escherichia coli*: structure, organization and regulated assembly of the Lpt machinery. *Marine Drugs*, **12** (2): 1023-1042.
- Rasmussen A., Eriksen M., Gilany K., Udesen C., Franch T., Petersen C. y Valentin-Hansen P. (2005). Regulation of ompA mRNA stability: the role of a small regulatory RNA in growth phase-dependent control. *Molecular Microbiology*, **58** (5): 1421-1429.
- Rassam P., Copeland N., Birkholz O., Tóth C., Chavent M., Duncan A., Cross S., Housden N., Kaminska R., Seger U., Quinn D., Garrod T., Sansom M., Piehler J., Baumann C. y Kleantous C. (2015). Supramolecular assemblies underpin turnover of outer membrane proteins in bacteria. *Nature*, **523**: 333-336.
- Raetz C. (1978). Enzymology, genetics and regulation of membrane phospholipid synthesis in *Escherichia coli*. *Microbiology Reviews*, **42**: 614-659.
- Ray M., Garmon P., Vianney A., Portalier R. y Lazzaroni J. (2000). Identification by genetic suppression of *Escherichia coli* TolB residues important for TolB-Pal interaction. *Journal of Bacteriology*, **182** (3): 821-824.
- Ried G., Koebnik R., Hindennach I., Mutschler B. y Henning U. (1994). Membrane topology and assembly of the outer membrane protein OmpA of *Escherichia coli* K-12. *Molecular and General Genetics*, **243**: 127-135.
- Robbins J., Monack D., McCallum S., Vegas A., Pham E., Goldberg M. y Theriot J. (2001). The making of a gradient: IcsA (VirG) polarity in *Shigella flexneri*. *Molecular Microbiology*, **41**: 861-872.
- Robinson, C. y Bolhuis, A. (2004). Tat-dependent protein targeting in prokaryotes and chloroplasts. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1694**: 135-147.
- Rollauer SE, Soorshjani MA, Noinaj N. y Buchanan SK. (2015). Outer membrane protein biogenesis in Gram-negative bacteria. *Philosophical Transactions of the Royal Society of Biological Sciences*, **370**: 20150023.
- Rowlett V., Mallampalli V., Karlstaedt A., Dowhan W., Taegtmeier H., Margolin W. y Vitrac H. (2017). Impact of membrane phospholipid alterations in *Escherichia coli* on cellular function and bacterial stress adaptation. *Journal of Bacteriology*, **199** (13): e00849-16.
- Saier J. y Bogdanov M. (2013). Membranous organelles in bacteria. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, **23**: 5-12.
- Samsudin F., Boags A., Piggot T. y Khalid S. (2017). Braun's lipoprotein facilitates OmpA interaction with the *Escherichia coli* cell wall. *Biophysical Journal*, **113**: 1496-1504.
- Sankaran, K. y Wu, H.C. (1994). Lipid modification of bacterial prolipoprotein. Transfer of diacylglycerol moiety from phosphatidylglycerol. *Journal of Biological Chemistry*, **269**, 19701-19706.
- Santhana R., Hing H., Baharudin O., Teh Hamidah Z., Aida Suhana R., Nor Asih C., Vimala B., Paramsarvaran S., Sumarni G. y Hanjeet K. (2007). Mesosomes are a definite event in antibiotic-treated *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. *Tropical Biomedicine*, **24** (1): 105-109.

- Schleifer, K. H. y Kandler, O. (1972). Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriology Reviews*, **36**: 407-477.
- Schmidt J. y Stanier R. (1966). The development of cellular stalks in bacteria. *The Journal of Cell Biology*, **28**(3): 423.
- Shu W., Liu J., Ji H. y Lu M. (2000). Core structure of the outer membrane lipoprotein from *Escherichia coli* at 1.9Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, **299**: 1101-1112.
- Silhavy TJ., Hahne D. y Walker S. (2010). The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, **2** (5): a000414.
- Singer SJ. y Nicholson. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, **175** (4023): 720-731.
- Smit J., Kaltashov IA, Cotter RJ, Vinogradov E, Perry MB, Haider H, Qureshi N. (2008). Structure of a novel lipid A obtained from the lipopolysaccharide of *Caulobacter crescentus*. *Innate Immunity*, **14**: 25-37.
- Smith S., Mahon V., Lambert M. y Fagan R. (2007). A molecular swiss army knife: OmpA structure, function and expression. *Federation of European Microbiological Societies, Microbiology Letters*, **273**: 1-11.
- Snider C., Jayasinghe S., Hristova K. y White S. (2009). MPEX: A tool for exploring membrane proteins. *Protein Science*, **18** (12): 2624-2628.
- Sonntag I., Schwarz H., Hirota Y. y Heng U. (1978). Cell envelope and shape of *Escherichia coli*: multiple mutants missing the outer membrane lipoprotein and other major outer membrane proteins. *Journal of Bacteriology*, **136** (1): 280-285.
- Stathopoulos, C. (1996). An alternative topological model for *Escherichia coli* OmpA. *Protein Science*, **5**: 170-173.
- Steinhauer J., Agha R., Pham T., Varga A. y Goldberg M. (1999). The unipolar Shigella surface protein IcsA is targeted directly to the bacterial old pole: IcsP cleavage of IcsA occurs over the entire bacterial surface. *Molecular Microbiology*, **32**: 367-377.
- Stewart C., Bremer E., Hindennach I. y Henning U. (1982). Characterisation of the promoters for the ompA gene which encodes a major outer membrane protein of *Escherichia coli*. *Molecular and General Genetics*, **188**: 472-479.
- Sturgis N. J. (2001). Organisation and Evolution of the tol-pal Gene Cluster. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, **3** (1): 113-122.
- Sugawara E. y Nikaido H. (1992). Pore forming activity of OmpA protein of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, **267**: 2507-2511.
- Sutcliffe, C. I. (2010). A phylum level perspective on bacterial cell envelope architecture. *Trends in Microbiology*, **18** (10): 464-470.
- Sutterlin HA., Shi H., May KL., Miguel A., Khare S., Huang KC y Silhavy TJ. (2016). Disruption of lipid homeostasis in the Gram-negative cell envelope activates a novel cell death pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **113** (11): E1565-74.

- Suzuki M., Hara H. y Matsumoto K. (2002). Envelope disorder of *Escherichia coli* cells lacking phosphatidylglycerol. *Journal of Bacteriology*, **184**: 5418-5425.
- Suzuki H., Nishimura Y., Yasuda S., Nishimura A., Yamada M. e Hirota Y. (1978). Murein-lipoprotein of *Escherichia coli*: a protein involved in the stabilization of bacterial cell envelope. *Molecular and General Genetics*, **167**: 1-9.
- Szewczyk J. y Collet J. (2016). The Journey of Lipoproteins through the cell: one birthplace, multiple destinations. *Advances in Microbial Physiology*, **69**: 1-50.
- Takacs C., Poggio S., Charbon G., Pucheault M., Vollmer W. y Jacobs-Wagner C. (2010). MreB drives de novo rod morphogenesis in *Caulobacter crescentus* via remodeling of the cell wall. *Journal of Bacteriology*, **192**: 1671-1684.
- Teleha M., Miller A. y Larsen R. (2013). Overexpression of the *Escherichia coli* TolQ protein leads to a null FtsN-like division phenotype. *Microbiology Open*, **2** (4): 618-632.
- Thanbichler, M., Wang, S. y Shapiro, L. (2005). The bacterial nucleoid: a highly organized and dynamic structure. *Journal of Cellular Biochemistry*, **96**:506-521.
- Thanbichler, M. y Shapiro, L. (2006). MipZ, a Spatial Regulator Coordinating Chromosome Segregation with Cell Division in *Caulobacter*. *Cell*, **126**: 147-162.
- Thanbichler M., Iniesta A. y Shapiro L., (2007). A comprehensive set of plasmids for vanillate- and xylose-inducible gene expression in *Caulobacter crescentus*. *Nucleic Acids Research*, **35**: e137.
- Tocheva E., Ortega D. y Jensen G. (2016). Sporulation, bacterial cell envelopes and the origin of life. *Nature Reviews Microbiology*, **14**, 535-542.
- Tokuda, H., Matsuyama, S. y Tanaka-Masuda, K. (2007). Structure, funtion and transport of lipoproteins in *Escherichia coli*. In "The Periplasm", ed. Ehrmann, M., ASM Press, Washington DC,
- Toro E. y Shapiro L. (2010). Bacterial Chromosome Organization and Segregation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. Doi: 10.1101.
- Tropini C., Rabbani N. y Huang K. (2012). Physical constraints on the establishment of intracellular spatial gradients in bacteria. *BioMed Central Biophysics*, **5**:17.
- Typas, A., Banzhaf, M., Gross, C. A. y Vollmer, W. (2012). From the regulation of peptidoglycan synthesis to bacterial growth and morphology. *Nature Reviews Microbiology*, **10**: 123-136. doi:10.1038/nrmicro2677.
- Udekwi K. y Wagner E. (2007). Sigma E controls biogenesis of the antisense RNA MicA. *Nucleic Acids Research*, **35** (4): 1279-1288.
- Verhoeven G., Dogterom M. y denBlaauwen T. (2013). Absence of long-range diffusion of OmpA in *E. coli* is not caused by its peptidoglycan binding domain. *BioMed Central Microbiology*, **13**: 66.
- Vianney A., Lewin T., Beyer W., Lazzaroni J-C, Portallier R. y Webster R. (1994). Membrane topology and mutational analysis of the TolQ protein of *E. coli* required for the uptake of the macromolecules and cell envelope integrity. *Journal of Bacteriology*, **176**: 822-829.

- Vianney A., Müller M., Clavel T., Lazzaroni J-C, Portallier R. y Webster R. (1996). Characterisation of the tol-pal region of *E. coli* K-12: translational control of the tolR expression by tolQ and identification of a new open reading frame downstream of pal encoding a periplasmic protein. *Journal of Bacteriology*, **178**: 4031-4038.
- Vines ED., Marolda CL., Balachandran A. y Valvano MA. (2005). Defective O-antigen polymerization in tolA and pal mutants of *Escherichia coli* in response to extracytoplasmic stress. *Journal of Bacteriology*, **187**: 3359-3368.
- Viollier P., Thanbichler M., McGrath P., West L., Meewan M. McAdams H. y Shapiro L. (2004). Rapid and sequential movement of individual chromosomal loci to specific subcellular locations during bacterial DNA replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **101** (25): 9257-62.
- Vollmer W. y Seligman S. (2009). Architecture of peptidoglycan: more data and more models. *Cell Press*, 59-66.
- Vollmer W., Blanot D. y de Pedro M. (2008). Peptidoglycan structure and architecture. *Federation of European Microbiological Societies, Microbiology Reviews*, **32**: 149-167.
- Wagner J., Setayeshgar S., Sharon L., Reilly J. y Brun Y. (2006). A nutrient role for bacterial cell envelope extensions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **103** (31): 11772-11777.
- Walburger A., Lazdunski C. y Corda Y. (2002). The Tol/Pal system function requires an interaction between the C-terminal domain of TolA and the N-terminal domain of TolB. *Molecular Microbiology*, **44** (3): 695-708.
- Waldispühl J., Berger B., Clote P. y Steyaert J. (2006). transFold: a web server for predicting the structure and residue contacts of transmembrane beta-barrels. *Nucleic Acid Research*, **34**: 189-193.
- Wang, Y. (2002). The function of OmpA in *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **292** (2): 396-401.
- Wang Y., Wang R., Jin F., Liu Y., Yu J., Fu X. y Chang Z. (2016). A supercomplex spanning the inner and outer membranes mediates the biogenesis of b-barrel outer membrane proteins in bacteria. *Journal of Biological Chemistry*, **291**(32): 16720-16729.
- Wientjes, F. B., Woldringh, C. L. y Nanniga, N. (1991). Amount of peptidoglycan in cell walls of Gram-negative bacteria. *Journal of Bacteriology*, **173**: 7684-7691.
- Yachdav G., Kloppmann E., Kajan L., Hecht M., Goldberg T., Hamp T., Hönigschmid P., Schafferhans A., Roos M., Bernhofer M., Richter L., Ashkenazy H., Punta M., Schlessinger A., Bromberg Y., Schneider R., Vriend G., Sander C., Ben-Tal N. y Rost B. (2014). PredictProtein- an open resource for online prediction of protein structural and functional features. *Nucleic Acid Research*, **42** (1): 337-343.
- Yakushi, T., Masuda, K., Narita, S., Matsuyama, S. y Tokuda, H. (2000). A new ABC transporter mediating the detachment of lipid-modified proteins from membranes. *Nature Cell Biology*, **2**: 212-218.
- Yeh YC, Comolli LR, Downing KH, Shapiro L y McAdams HH. (2010). The caulobacter Tol-Pal complex is essential for outer membrane integrity and the positioning of a polar localization factor. *Journal of Bacteriology*, **192** (19): 4847-4858.

Yokota, N., Kuroda, T., Matsuyama, S. y Tokuda, H. (1999). Characterization of the LolA-LolB system as the general lipoprotein localization mechanism of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, **274**, 30995-30999.

Zakharian E. y Reusch R. (2003). Outer membrane protein A of *Escherichia coli* forms temperature-sensitive channels in planar lipid bilayers. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, **555**: 229-235.