



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

Localización y caracterización de la proteína análoga a
OmpA (Outer membrane protein A) en
Caulobacter crescentus

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

Laura Paulina Díaz Rentería

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Sebastián Poggio Ghilarducci

Junio 2013





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

1. Datos del alumno

Díaz
Rentería
Laura
Paulina
22 91 19 62
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
306109557

2. Datos del Tutor

Dr
Sebastian
Poggio
Ghilarducci

3. Datos del sinodal 1

Dr
George
Dreyfus
Cortés

4. Datos del sinodal 2

M. en I.B.B.
Saúl
Cano
Colín

5. Datos del sinodal 3

M. en C.
María Concepción
Moreno
Zenteno

6. Datos del sinodal 4

M. en C.
Gabriela
González
Cerón

7. Datos del trabajo

Localización y caracterización de la proteína análoga a OmpA (Outer membrane protein A) en *Caulobacter crescentus*

54 p

2013

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México, a la Facultad de Ciencias y al Instituto de Ciencias Biomédicas por permitir que mi formación como científico comenzara en sus instalaciones, con apoyo de sus docentes y materiales.

A la QFB Aurora Ventura Osorio Aurora a quién le agradezco los conocimientos que me brindó y el apoyo recibido durante el desarrollo de este trabajo.

Este trabajo fue financiado por el donativo IN02511 de PAPIIT-UNAM.

Agradecimientos personales

A mi tutor, el Dr. Poggio, quien a su modo muy particular, brillante y determinante, me guió para concluir este trabajo a pesar de mis tropiezos. Significa mucho más que una tesis y un grado para mí ¡gracias Sebastián!

A la técnico del laboratorio Aurora Ventura Osorio, por guiarme de regreso al camino correcto y preocuparse por mí.

A la Dr. Laura Camarena, por aceptarme en su laboratorio y siempre tener una amable sonrisa y amplia disposición para ayudarme.

Al Dr. Servín, por aceptarme en el taller y ser el primer contacto con el laboratorio de la Dra. Camarena.

A mis sinodales, la M. en C. Concepción, a la M. en C. Gabriela, al M. en I.B.B Cano y al Dr. Dreyfus por su tiempo, disposición aportaciones para el desarrollo final de la tesis.

A mis compañeros de laboratorio: Diego, Luis David (por su amable donación), Ana Laura, Anet, Salvador, Clelia, Mauricio, Iván, Sandra, José Cruz, Benjamín.

A Leonora, Sará y Danna y por su paciencia y consejos.

Dedicatorias

	Página
A. Resumen	8
B. Introducción	
1. Membranas celulares en bacterias Gram negativas	9
1.1. Membrana interna (MI)	10
1.2. Pared de peptidoglicanos (PP)	11
1.3. Membrana externa (ME)	13
2. Proteínas y sistemas de estabilidad de membrana externa	15
2.1. OmpA: estructura y dominios	15
2.1.1. Funciones	17
2.1.2. Regulación	20
2.1.3. Dominios conservados y relaciones filogenéticas	22
3. Breve descripción de <i>Caulobacter crescentus</i> como modelo de bacteria dimórfica prostecada	22
3.1. Sistema Tol-Pal y proteínas implicadas para la integridad de las envolturas celulares en <i>Caulobacter crescentus</i>	24
3.2. La prosteca como órganos especializado	25
3.3. Ciclo celular dimórfico de <i>Caulobacter crescentus</i>	27
C. Hipótesis	32
D. Objetivos	32
E. Metodología	33
1. Búsqueda bioinformática	33
2. Cepas bacterianas empleadas	33
3. Medios de cultivo	34
4. Métodos de cultivo	34
5. Purificación de plásmido	35
6. Diseño de la construcción de un plásmido viable gen-fluoróforo	36
7. Transformación en cepas bacterianas	36
8. Preparación de las muestras para su observación en el microscopio	38
F. Resultados	39
G. Discusión	49
H. Conclusiones	50
I. Literatura citada	51

A. Resumen

OmpA (Outer membrane protein A) es la proteína de membrana externa más abundante en *Escherichia coli*. En conjunto con la lipoproteína de Braun y el sistema Tol-PaL, OmpA brinda estabilidad a las envolturas celulares a lo largo del ciclo de vida de bacterias Gram negativas de división simétrica y asimétrica. *Caulobacter crescentus*, organismo idóneo para el estudio de división celular en bacterias dimórficas, carece de la lipoproteína de Braun y su sistema Tol-Pal presenta características funcionales diferentes al de *Escherichia coli*. El sistema Tol-pal de *Caulobacter crescentus* participa en la división celular mediante la constricción de la membrana en las etapas finales de la división celular. Debido a que no existe información respecto a la existencia de una proteína análoga a OmpA en *C. crescentus*, la hipótesis de este trabajo se basa en la caracterización de proteínas relacionadas con OmpA con funciones y estructuras similares, que podrían participar en la regulación de la estabilidad membranal.

En este trabajo, establecimos la existencia de dos genes que codifican para proteínas en *Caulobacter crescentus* con dominios estructurales equivalentes a los de OmpA de *Escherichia coli* a través de una búsqueda bioinformática. Además, determinamos experimentalmente que la localización de una de estas proteínas tiene un patrón conspicuo y consistente con su acumulación en el polo viejo y de manera condicional en la prosteca. La ubicación de esta proteína a lo largo del cuerpo de la célula cambia durante el ciclo celular. El patrón de expresión se acentúa cuando la célula se va a dividir. La expresión de la proteína aumenta cuando la prosteca es más larga, por ejemplo, en condiciones de bajas concentraciones de fosfatos (10 μ M o 50 μ M). La estructura de dominios de la proteína sugiere que ésta tiene un papel estructural en *Caulobacter crescentus*.

B. Introducción

1. Membranas celulares en bacterias Gram negativas

La envoltura celular en bacterias Gram negativas está caracterizada por la presencia de tres componentes estructurales básicos (Figura 1). Del interior hacia el exterior de la célula los componentes son: membrana interna (MI), dentro del espacio periplasmático (EP) la pared de peptidoglicanos (PP) y la membrana externa (ME).

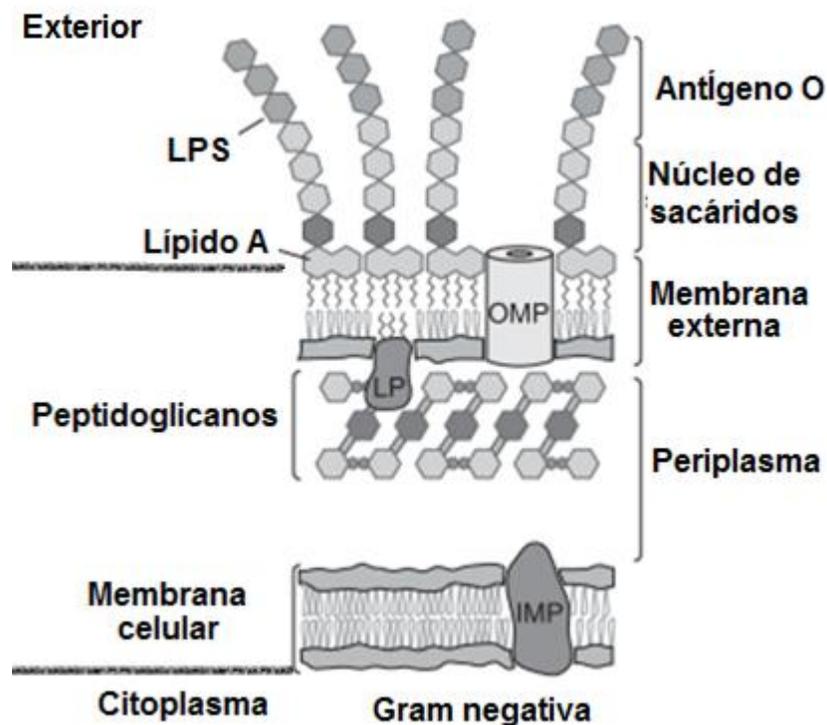


Figura 1. Capas que envuelven a las bacterias Gram negativas. La imagen muestra la localización de la membrana externa y sus interacciones con la pared de peptidoglicanos y el medio exterior. En la membrana externa se observan a lipoproteínas (LP), a los lipopolisacáridos (LPS) y a las proteínas de membrana externa (OMP). Adicionalmente se observa la membrana interna, la cual hace contacto directo con el citoplasma y donde las proteínas de membrana interna (IMP) se encuentran embebidas. Tomada y modificada de Silhavy T., Kahne D. y Walker S., 2010.

Las envolturas celulares no sólo limitan al contenido celular, sino que además, en ellas se anclan proteínas que realizan funciones esenciales. El mantenimiento y manejo de la envoltura celular requiere de mecanismos especiales que permitan su presencia y función. Un ejemplo notorio se da durante la división celular, en la que se requiere un complejo multiprotéico que forma un anillo (anillo FtsZ) capaz de ejercer una fuerza mecánica para permitir la constricción de las envolturas

celulares (Martin M. E. y Brun, Y. V., 2000). Por otro lado, las capas lipídicas de la envoltura celular (ME y MI), contienen elementos cuya función es mantener la integridad estructural de las membranas.

1.1 Membrana interna (MI)

La membrana interna (MI) o membrana plasmática es una bicapa compuesta generalmente por fosfolípidos, principalmente fosfatidil-dietanolamina (70-80% de su composición total), fosfatidil-glicerol y cardiolipina (Koebnik, R., Locher, K. P. y Van Gelder, P., 2000).

Las proteínas que se encuentran asociadas a ésta pueden ser proteínas integrales que atraviesan la membrana (conocidas como IMP por sus siglas en inglés), proteínas unidas covalentemente a lípidos modificados de la membrana y proteínas periféricas solubles (Figura 2). Las IMP tienen dominios de hélices α embebidas en esta membrana y varias de ellas participan como componentes de complejos protéicos. Por su parte, las lipoproteínas se unen a esta membrana por medio de una modificación del amino terminal (Luirink, J., Yu, Z., Wagner, S., y De Gier, J.W., 2012).

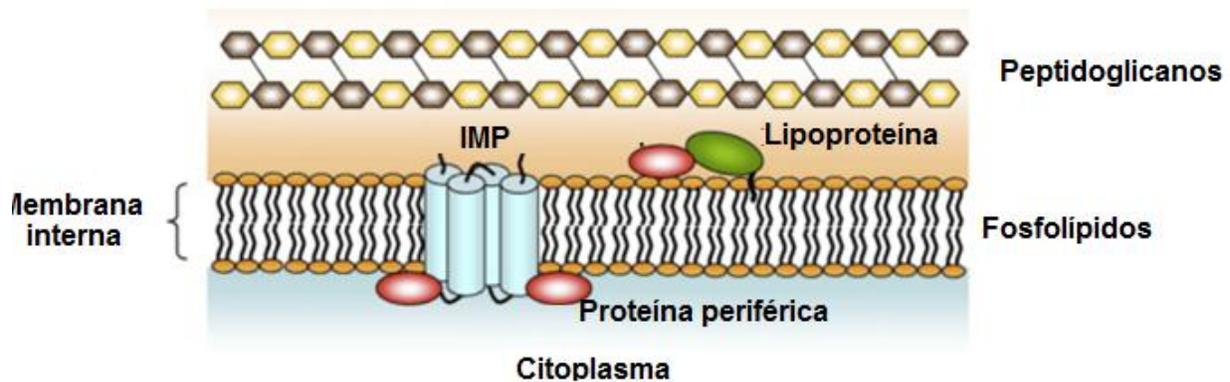


Figura 2. Membrana interna. Esquema de la composición general de la membrana interna: proteínas integrales con dominios de hélices α embebidos en la membrana, lipoproteínas las cuales, presentan una modificación en el extremo amino terminal y las proteínas periféricas. Tomado y modificado de Sperandeo, P., Dehò, G., y Polissi, A., 2009.

Su función principal es limitar el contenido celular. Las bacterias carecen de organelos como los eucariontes. La MI también lleva a cabo algunas funciones

análogas a los organelos subcelulares de organismos eucariontes (Michael T., John M., Martinko, J. P., 2003). En esta membrana se lleva a cabo la biosíntesis de algunos lípidos, se produce energía y se secretan y transportan otras proteínas (Silhavy et al., 2010).

1.2 Pared o sáculo de peptidoglicanos (PP)

La pared de peptidoglicanos es una red que envuelve a la célula, que se encuentra entre la membrana externa y la membrana interna de la célula rodeando toda la superficie. Es responsable de la rigidez y da forma a la bacteria. Su función es proveer un soporte físico contra el estrés osmótico y contra las fluctuaciones de presión (Dramsi S., Magnet, S., Davison, S., y Arthur, M., 2008). Está compuesta por cadenas formadas por los disacáridos de ácido N-acetil murámico y N-acetil glucosamina. Las cadenas de disacáridos se entrecruzan entre sí por medio de péptidos cortos (Figura 3). En ausencia de la pared de peptidoglicanos, la célula pierde su forma produciendo esferoplastos (Vollmer, W., y Bertsche, U., 2008).

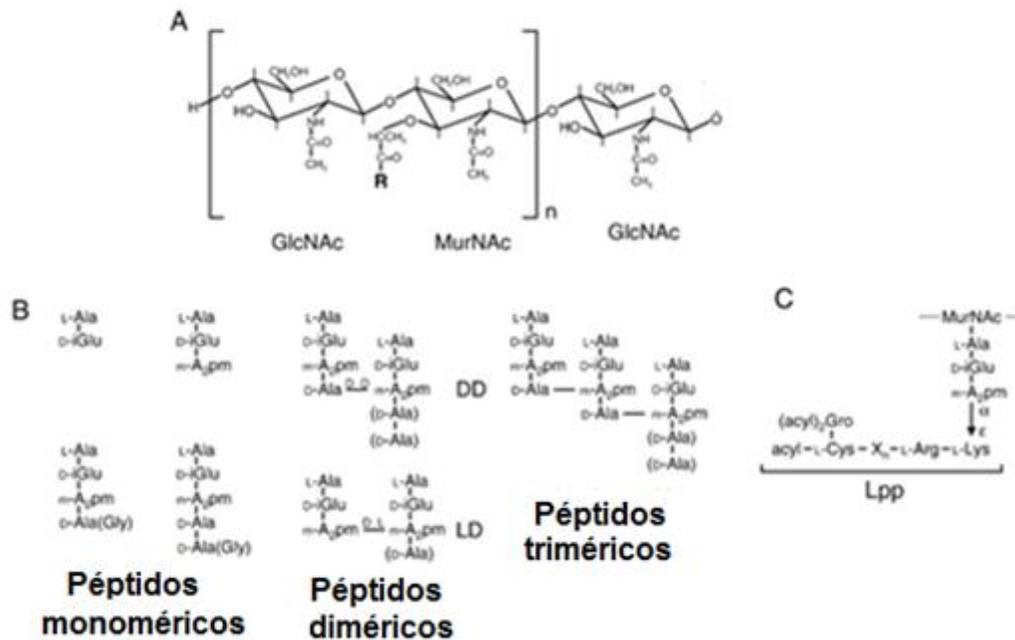


Figura 3. Componentes estructurales de la pared de peptidoglicanos. Disacárido de N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico (A). Este disacárido forma cadenas que a su vez se entrecruzan con cadenas de péptidos de diferentes longitudes a través de las uniones de las unidades de ácido diaminopimélico (mA₂pm) con la primera D-alanina (D-Ala) (enlace DD) o con otro mA₂pm (enlace LD) (B). Modificación de los muropéptidos ocasionada por el enlace covalente de la Lpp (C). Tomada y modificada de Vollmer et al., 2008.

En *E. coli* los péptidos están formados por cadenas de L-Ala₁-D-Glu₂-meso DAP₃¹-D-Ala₄-D-Ala₅. El enlace más común ocurre entre el α-carboxilo del D-ala₄ y el grupo D- central del meso DAP₃ (ácido diaminopimérico) de la unidad siguiente, es decir, ocurre un enlace entre las posiciones 4-3 de cada unidad (Enlace tipo DD), este es el enlace más común entre los péptidos de la PP. Otro enlace, menos común es el que se da entre las posiciones 3-3, es decir entre los grupos D-centrales del meso DAP₃ de la unidad siguiente (Enlace tipo LD) . (Vollmer et al., 2008).

En *E. coli* y otras bacterias Gram negativas el PP está unido covalentemente a la ME por medio de la lipoproteína Braun o Lpp. La Lpp es la lipoproteína más abundante en *E. coli* con cinco millones de copias por célula aproximadamente. La porción proteica de esta lipoproteína está en el espacio periplasmático (Figura 4) y está unida a la PP por medio de un enlace entre un residuo de lisina de su extremo carboxilo terminal al meso DAP del SP (Dramsí et al., 2008).

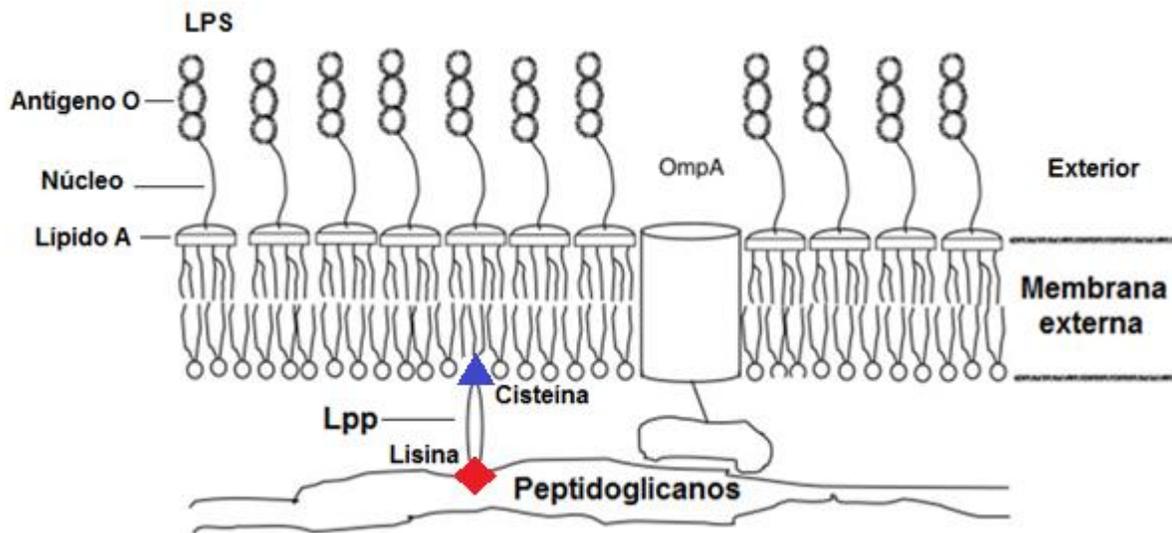


Figura 4. Posición de la lipoproteína de Braun y los LPS. La lipoproteína de Braun o Lpp se une a la membrana externa a través de un lípido adicionado a un residuo de cisteína en el extremo amino terminal de la proteína (triángulo azul) y a la pared de peptidoglicanos a través de un residuo de lisina (rombo rojo). Por otro lado, los lipopolisacáridos o LPS presentes en la cara externa de la membrana externa, están conformados por tres partes: El antígeno O, el núcleo y el lípido A. Tomado y modificado de Schaechter M. 2009.

1.3 Membrana externa (ME)

La membrana externa es uno de los caracteres distintivos entre las bacterias Gram negativas y las bacterias Gram positivas, ya que éstas últimas carecen de esta membrana. La superficie interna presenta una composición similar a la de la MI, mientras que en la superficie externa presenta principalmente lipopolisacáridos (LPS) (Michael T. et al., 2003).

Los LPS se dividen estructuralmente en tres partes: el lípido A, el núcleo o centro y el antígeno O. El lípido A, es la parte hidrofóbica de esta molécula; el núcleo o centro es una región de estructura constante formada por un oligosacárido, por ejemplo Kdo (ácido 3-desoxy-d-mano-oct-2-ulosónico) y heptosas; el antígeno O está formado por un polisacárido de longitud variable (Figura 4). Los LPS son esenciales para la mayoría de bacterias Gram negativas (Sperandeo et al., 2009).

La principal función de la ME es brindar una barrera que proteja a la bacteria contra sustancias potencialmente nocivas que puedan encontrarse en el ambiente. En conjunto con las proteínas que están insertadas en ella, cumple funciones cruciales para la célula como son el intercambio de solutos y regulación de la síntesis de la pared de peptidoglicanos (Koebnik et al., 2000).

Con algunas excepciones, las proteínas de la ME se dividen en dos clases principales:

Lipoproteínas: son proteínas asociadas a la ME por medio de un grupo lipídico en el extremo amino terminal. Este grupo lipídico es agregado a la proteína en un residuo de cisteína que es modificado durante el proceso de exportación de la proteína (Koebnik et al., 2000). Se han identificado más de 275 tipos de lipoproteínas, algunas se encuentran ancladas a la MI y algunas otras a la ME (Babu M. M., Priya, M. L., Selvan, A. T., Madera, M., Gough, J., Aravind, L., y Sankaran, K., 2006). Existen cerca de 100 tipos de lipoproteínas en *E.coli*, de las cuales la mayoría tiene una función aún desconocida (Vollmer et al., 2008). Las lipoproteínas de la ME se encuentran asociadas a la cara interna de ésta.

Proteínas integrales de ME: son proteínas que tienen una conformación de barril β el cual se compone de hebras con conformación β plegada que se enrollan formando cilindros embebidos en la ME (Figura 5) (Koebnik et al., 2000). Estas proteínas son conocidas como OMP (Outer membrane protein por sus siglas en inglés). Los barriles β , exponen la superficie hidrofóbica a la membrana. Estos barriles β contienen un gran número de residuos de aminoácidos que forman puentes de hidrógeno. Varias de estas proteínas son porinas, tales como OmpF y

OmpC, las cuales permiten la difusión de pequeñas moléculas como: aminoácidos, mono y disacáridos. Por otro lado, porinas como LamB o PhoE, tienen afinidad por cierto tipo de moléculas y permiten la difusión exclusivamente de compuestos particulares como maltosa o maltodextrina y aniones como el fosfato, respectivamente. Su expresión es inducida por escasez de fosfatos en el medio o presencia de maltosa. Es común encontrar barriles β unidos a hélices α . Las hélices α están restringidas al periplasma. En algunos casos, las OMP tienen un dominio adicional que les permite interactuar de forma no covalente con el SP, aumentando la estabilidad de la ME (Wimley W., 2003). Dentro de las OMP importantes por su rol estructural y abundancia en la ME, se encuentra OmpA (Vollmer et al., 2008). Estructuralmente las OMP pueden ser clasificadas por el número de hebras (n) y por la inclinación de éstas respecto al eje del barril (*shear number* en inglés), por ejemplo OmpA es 8n10S (Koebnik R., Locher, K. P., y Van Gelder, P., 2000) lo que indica que esta proteína cruza ocho veces la ME y que las hebras tienen una inclinación de 10 grados.

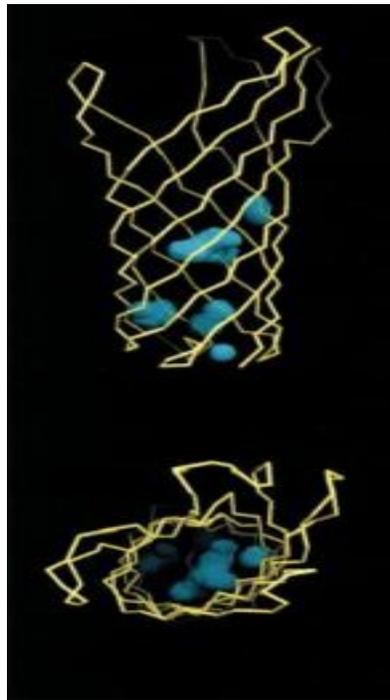


Figura 5. Estructura de barril β de OmpA. La proteína de membrana externa más abundante en *E. coli*. Vista lateral y vista superior de la porción amino terminal. Tomada de Koebnik et al., 2000.

2 Proteínas y sistemas de estabilidad de la membrana externa

En enterobacterias, la proteína probablemente más importante para la estabilidad de la ME es la Lpp o lipoproteína de Braun. La interacción de la Lpp y la PP se da de manera covalente entre un residuo de la lisina del carboxilo terminal de la Lpp y el ácido diaminopimérico de la red de peptidoglicanos. La interacción con la pared de peptidoglicano contribuye a la integridad de la estructura de la superficie (Yakushi T., Tajima, T., Matsuyama, S., Tokuda, H., Yakushi, T., Tajima, T., y Matsuyama, S., 1997).

Otra lipoproteína relevante en la estabilidad de la ME es Pal. Esta lipoproteína es parte del sistema Tol-Pal. Además de estabilizar la interacción entre la ME y el SP, el sistema Tol-Pal está involucrado en la división celular (Gerding A., Ogata, Y., Pecora, N. D., Niki, H., y De Boer, P. J., 2007).

El sistema Tol-Pal engloba proteínas de ME y de MI. TolA, TolQ y TolR son las proteínas de MI. TolA presenta un dominio transmembranal que interactúa con el dominio transmembranal de TolQ y TolR. Pal, es una lipoproteína abundante de ME, se piensa que interactúa con el SP a través de un dominio similar al presente en el carboxilo terminal de OmpA. TolB es una proteína periplasmática que interactúa con Pal, Lpp y OmpA. El sistema Tol-Pal mantiene unidas las tres envolturas celulares.

Como ya se mencionó, además de la Lpp y del sistema Tol-Pal la ME es estabilizada por OmpA. Esta proteína se describe con más detalle en la siguiente sección.

La conservación de proteínas que brindan estabilidad a las envolturas celulares de bacterias Gram negativas no es absoluta, por ejemplo, *C. crescentus* carece de la Lpp. Se piensa que la Lpp sólo se encuentra en bacterias entéricas de ambientes ácidos. La sobreproducción de Pal o TolA en *E. coli* compensa la integridad de la ME en mutantes de Lpp. Esto sugiere que Pal y TolA desempeñan un papel similar al de la Lpp (Yeh Y.C., Comolli, L. R., Downing, K. H., Shapiro, L., y McAdams, H. H., 2010).

2.1 OmpA: Estructura y dominios

Pertenciente a las OMP antes descritas, OmpA es la proteína más abundante de este tipo en *E. coli* (Wang Y., 2002). Está compuesta por 325 residuos y presenta dos dominios. El primer dominio, correspondiente a la porción amino

terminal abarca del residuo 1 al 171 formando un barril β de 8 hebras antiparalelas conectadas por cuatro vueltas en la superficie exterior y tres vueltas cortas en la superficie periplasmática. Este barril anfipático se encuentra embebido en la ME (Pautsch A. y Schulz G. 1998). Los residuos del 172 al 325 del carboxilo terminal forman una estructura globular en el espacio periplasmático (Figura 6) (Debnath D. K., y Otzen, D. E., 2010).

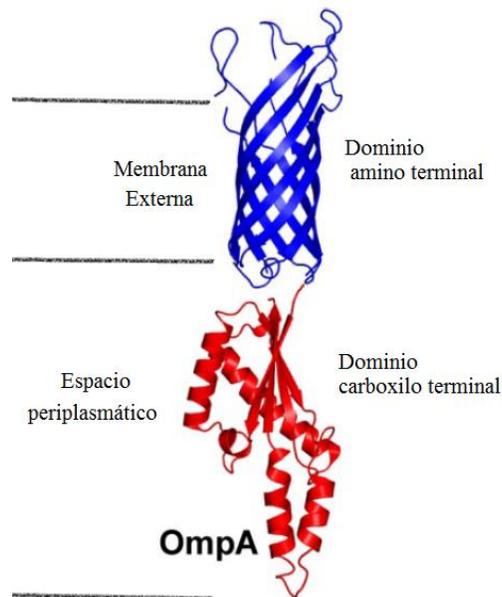


Figura 6. Dominios de OmpA. La proteína OmpA se compone de dos dominios. El primer dominio, el amino terminal, del aminoácido 1 al 171 se encuentra en forma de barril β en la membrana externa. El segundo dominio, del dominio 172 al 325 corresponde al dominio periplasmático.

Su estructura a nivel atómico, y flexibilidad a lo largo del eje del barril, se ha descrito a través de resonancia magnética nuclear (NMR por sus siglas en inglés) y difracción de rayos X (Debnath et al., 2010) (Figura 7). Es un excelente modelo de estudio de plegamiento de proteínas dentro de las membranas, que se ha descrito tanto *in vivo* como *in vitro*. (Koebnik et al., 2000).

En el trabajo de Negoda et al., (2010) se recalca que, dadas las funciones como receptor de bacteriófagos, OmpA debería de presentar una forma lo suficientemente grande para permitir el paso de DNAss. Un poro suficientemente grande implica en este caso, un barril β de 16 hebras transmembranales.

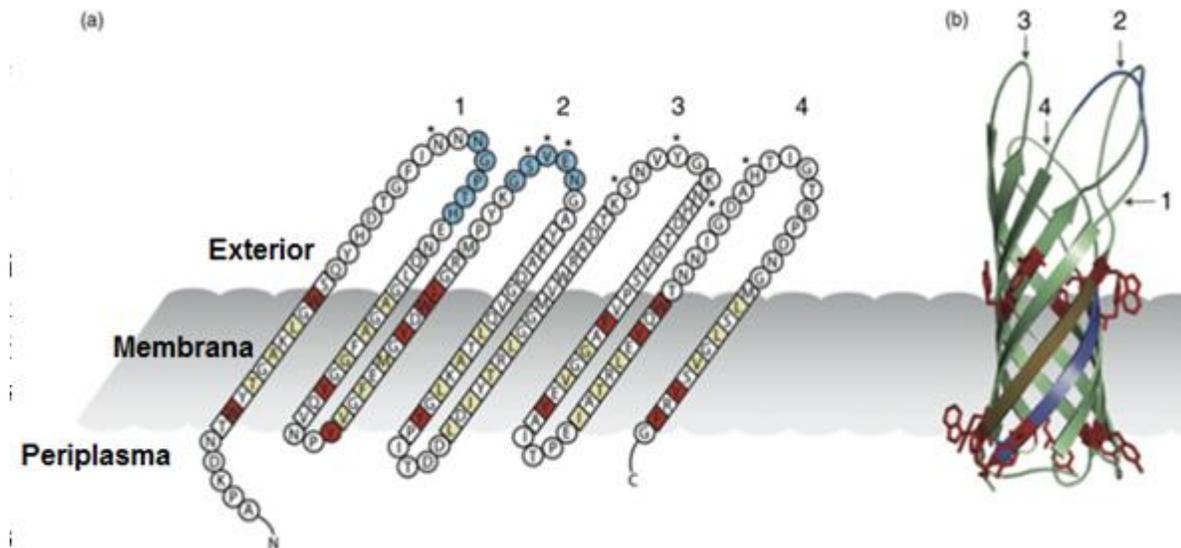


Figura 7. Barril β de OmpA. Se muestran los ocho segmentos que constituyen el barril beta de la proteína. Los residuos en amarillo representan residuos aromáticos, los de color rojo representan residuos hidrofóbicos. De lado derecho, la imagen representa un modelo en tercera dimensión embebida en la membrana. Tomado de (Smith et al., 2007)

Esto es posible a través de varios intermediarios. Se considera que los cOHBs (oligo- (R)- 3- hidroxibutiratos), moléculas de poliéster insolubles y anfifílicas, son los responsables de incrementar la hidrofobicidad de algunos segmentos del extremo carboxilo terminal de OmpA, facilitando su incorporación a la bicapa lipídica. En este artículo, se observa inicialmente a OmpA como un barril β de 8 segmentos transmembranales en el extremo amino terminal y un extremo carboxilo terminal periplasmático. Esta conformación se modifica al ser incubada a 40 °C y posteriormente enfriada a temperatura ambiente (22°C). De un barril de 8 segmentos transmembranales, cambia a un barril más amplio de 16 hebras. Los residuos del 171 al 325 correspondientes al carboxilo terminal de OmpA se insertan en la membrana externa a través de las modificaciones de los residuos S63 y S169. A partir de la observación de una gran actividad de OHB polimerasa en el espacio periplasmático, se explora la posibilidad de que las modificaciones críticas por cOHB se den en el periplasma.

2.1.1 Funciones

La función principal de OmpA es su contribución a la integridad estructural a lo largo de la membrana externa junto con la Lpp y el sistema Tol-Pal (Wang Y., 2002).

Su función como poro permeable ha sido expuesta con varios artículos. Experimentalmente en el trabajo de Sugawara E. y Nikaido H. (1992), a través de la construcción de proteoliposomas con moléculas embebidas de OmpA, demostraron que esta proteína tiene propiedades de poro permeable pero no es específica, además de atribuirle características homólogas a OmpF. *In silico*, en el trabajo de Bond J.P., Feraldo-Gómez J.D. y Sansom M.S. (2002), modelaron una conformación estable del dominio amino terminal a través de ensayos de dinámica molecular. Se determinó que a pesar de la estabilidad, el interior del barril β cambia. En este caso, el residuo Arg138 al ser isomerizado, interactúa y forma puentes salinos (iónicos) con el residuo Glu138 y Glu128. La segunda interacción, Arg138-Glu128 determina una conformación de poro abierto, el cual permite pasar moléculas de agua. Estas interacciones del residuo Arg138 son experimentalmente comprobadas en el trabajo de Arora A., Rinehart D., Szabo G., y Tamm L.K. (2000), donde además propone la formación de dos tipos de canales de OmpA: un poro pequeño de 50-80 pS y otra conformación de poro grande de 260-320 pS. A partir de esto, Hong H., Szabo G. y Tamm L.K (2006) identificaron que los puentes salinos entre el Glu52 y la Arg138 podían cambiar de interacción con la Lys82. De esta manera ocurriría la transición de un poro pequeño no permeable a iones, a un poro amplio y permeable (Figura 8). Este mecanismo podría ser parte fundamental en la supervivencia de la bacteria en condiciones de estrés osmótico.

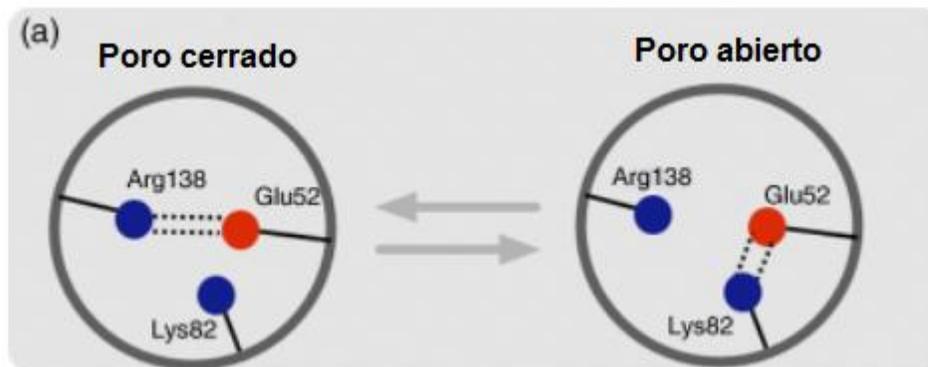


Figura 8. Transición de la conformación de poro abierto a poro cerrado de OmpA. La interacción entre la Arg138 y Glu52 representa un poro cerrado. Si la interacción cambia a Glu52 con Lys82, entonces, la conformación será de poro abierto Tomado de Smith, S. G. J (2007).

En el trabajo de Smith et al., 2007 se habla de funciones diferentes a las de estabilidad y permeabilidad y se describen a continuación:

-Se le han atribuido otras propiedades que no siempre benefician a la bacteria. OmpA ha sido reconocida por actuar como receptor de bacteriófagos como K3, O_x2 y M1.

-Se han caracterizado dos alelos para OmpA: *OmpA 1* y *OmpA 2*. Estas dos expresiones de OmpA, se diferencian en la secuencia de nucleótidos en la segunda y tercer vuelta (Figura 9). Esencialmente, *OmpA 2* es menos sensible a una larga lista de bacteriófagos, pero su estructura es básicamente la misma.

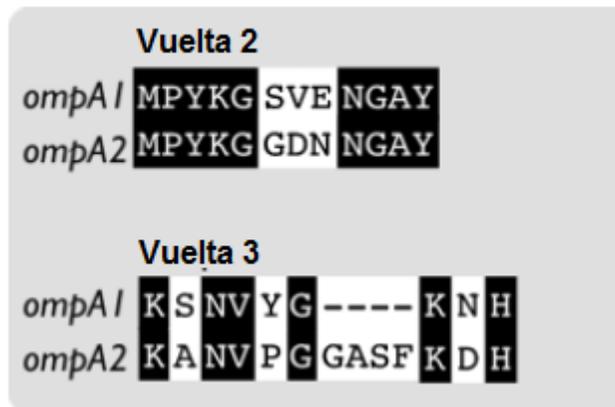


Figura 9. Alelos *ompA 1* y *ompA 2* para las vueltas 2 y 3 del barril β . Se muestran las diferencias en los aminoácidos de las vueltas 2 y 3 correspondientes a la secuencia expresada por el primer alelo de OmpA, *ompA1* y el segundo alelo *ompA2*. Esta variación tiene repercusiones en cuanto a sensibilidad por un panel de 24 bacteriófagos, siendo el alelo *ompA2* menos sensible a ellos. Tomada y modificada de Smith et al. (2007).

-También se ha demostrado experimentalmente que la sustitución del aminoácido Gly144 por Asp144 en la vuelta extracelular número 4, implica un decremento en la frecuencia de conjugación, si la secuencia es modificada, la conjugación no ocurre de manera adecuada o simplemente no ocurre.

-Cepas patógenas de *E. coli* K1 causante de meningitis, tienen la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica del cerebro. Esta barrera está compuesta por células endoteliales (con muy baja permeabilidad) y epiteliales. En este caso OmpA es esencial para la invasión. Cepas mutantes que carecen de OmpA son 25 a 50 veces menos invasivas a las células epiteliales, que es donde se encuentra el receptor de OmpA.

-Por otro lado, OmpA tiene un papel en la formación de biopelículas. OmpA es requerido para la adhesión a superficies abióticas. Las biopelículas formadas por

mutantes de OmpA son más delgadas. Esto es clínicamente relevante pues forman colonias en material quirúrgico.

Adicionalmente las mutantes que carecen del gen que codifica para OmpA, demostraron ser más sensibles al estrés causado por el detergente aniónico dodecil sulfato de sodio (SDS, por sus siglas en inglés), a ambientes ácidos y a una alta osmolaridad. Por otro lado, si además de carecer de OmpA también carecen de Lpp, la célula adquiere una forma esferoide (Sonntag, I., Schwarz, H., Hirota, Y., y Henning, U. L. F., 1978). Finalmente, mutantes en las vueltas extracelulares que conectan las hebras β de OmpA, aparentemente no cambian la viabilidad en *E. coli*. En contraste, inserciones intracelulares en hebras del barril β , producen una formación deficiente del barril. Esta deficiencia produce inestabilidad para toda la ME (Negoda A., Negoda, E., y Reusch, R. N., 2011). Estos estudios demuestran la relevante función de OmpA para brindar estabilidad a las envolturas celulares.

2.1.2 Regulación

Con aproximadamente 100 000 copias por célula, OmpA se considera como una proteína abundante y en enterobacterias, un antígeno predominante en las membranas externas (Koebnik, Locher, & Van Gelder, 2000).

La síntesis de OmpA es dependiente del crecimiento de la bacteria. Factores como la etapa de crecimiento bacteriano, el cultivo de las células en medio acidificado y condiciones anaeróbicas y escasas de nitrógeno incrementan su expresión. Dentro de los factores que producen un decremento en su expresión se encuentra el tiempo que abarca la fase estacionaria de la célula y adhesión de antibióticos a la superficie celular. En el trabajo de Smith S. G. J., Mahon, V., Lambert, M. a, y Fagan, R. P. (2007) se describen dos mecanismos de expresión de OmpA en *E.coli* bajo condiciones de estrés, a continuación descritos.

La vida media del RNA mensajero de de OmpA es de 15 minutos en condiciones óptimas de crecimiento. Esta estabilidad está dada por región 5'ÚTR del transcrito (Figura 10). Esta región no traducida del transcrito se encuentra altamente plegada. La región cuenta con dos sitios marcados: ss1 y ss2. El sitio de anclaje del ribosoma o RBS (por sus siglas en inglés ribosomal binding site) corresponde al sitio marcado ss2. La proteína Hfq es requerida para desestabilizar el transcrito de *ompA*. Si Hfq se encuentra cercano a ss2, causa un incremento en la estabilidad del transcrito. Hfq es una proteína esencial para la interacción de MicA (RNA pequeño) . Cuando el mRNA de *ompA* y MicA presentan apareamiento de bases, la traducción se inhibe. Hfq favorece esta interacción. La expresión de

MicA es regulada positivamente a su vez, por el factor σ SigmaE en respuesta a estrés. Esto disminuye los niveles de OmpA a través de SigmaE y MicA en función del estrés producido. El transcrito de *ompA* también se encuentra marcado por RNasaR, una exorribonucleasa que es sobre regulada en respuesta a condiciones de estrés y la entrada a fase estacionaria. En ausencia de RNasaR, la fase estacionaria muestra niveles altos del transcrito de *ompA*. (Smith et al. 2007)

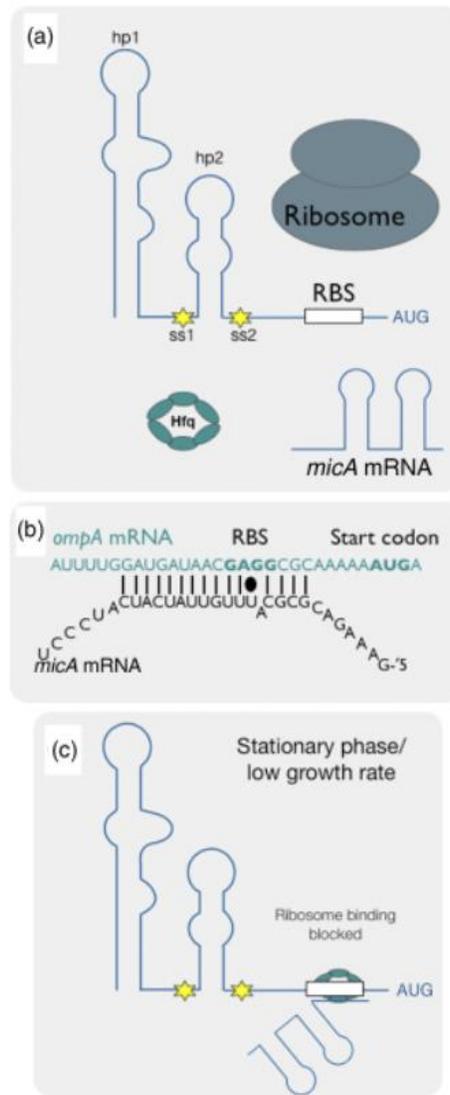


Figura 10. Regulación de OmpA. El panel A, la secuencia del mRNA de *ompA*, contiene dos asas: hp1 y hp2, el sitio de unión del ribosoma. La RNasaE se ancla en el mRNA en las regiones ss1 y ss2 (estrellas amarillas). El panel B muestra a *micA* el cual puede hibridarse con el mRNA de *ompA* facilitando el anclaje de Hfq. En el panel C, en la fase estacionaria o bajo condiciones de crecimiento lento de la célula, las copias de *micA* se une al RBS de mRNA de *ompA*. Esto previene que le ribosoma se una. Tomado de Smith, S. G. J et al. 2007.

2.1.3 Dominios conservados y relaciones filogenéticas

OmpA se encuentra ampliamente conservada como proteína integral de membrana (Behr M.G., Schnaitmas C.A., y Pugsley A.P., 1980). Proteínas tipo OmpA están presentes a lo largo del linaje de las bacterias Gram negativas. Una comparación entre los homólogos de OmpA (Figura 11) de 5 géneros de bacterias indica que las hebras β que comprenden al amino terminal se encuentran ampliamente conservadas a diferencia de las vueltas extracelulares, las cuales presentan grandes variaciones en la secuencia de aminoácidos (Pautsch, A., & Schulz, G. E., 1998).

De manera similar, una comparación realizada por Ying Wang (2002) entre el homólogo de OmpA de *S. typhimurium* y *S. flexneri*, mostró 92% de similitud para la primera y 93% para la segunda. Ambas comparaciones fueron realizadas respecto al extremo amino terminal de OmpA de *E.coli*. Este hallazgo demuestra que, además del barril β , las vueltas periplasmáticas están ampliamente conservadas (similitud de 85%). En contraste, las vueltas extracelulares tienen un índice de similitud menor (48%), respecto al de las vueltas periplasmáticas, especialmente las vueltas intermedias.

3 Breve descripción de *Caulobacter crescentus* como bacteria dimórfica prostecada

Caulobacter crescentus es una bacteria de vida libre de medios oligotróficos (medios acuáticos con bajas concentraciones de nutrientes) (Poindexter, 2006). Se le ha atribuido la mineralización de material orgánico disuelto cuando la concentración de nutrientes y temperatura ambiental son bajas. Pertenece a la división de las α -proteobacterias (Nierman et al., 2001). Algunas α -proteobacterias presentan una o más extensiones en la superficie celular llamadas prostecas o tallos (Sly et al., 1997). Además de la clasificación taxonómica de α -proteobacteria, *C.crescentus* pertenece al grupo de las bacterias dimórficas prostecadas o *DPB* (*Dimorphic prosthecat bacteria*).

Los géneros pertenecientes a esta clasificación, entre ellos *Caulobacter*, se definen por la presencia de dos tipos de células durante su ciclo celular. Los dos tipos de células que presenta *C. crescentus* son diferentes tanto en su morfología, como en su capacidad de iniciar el ciclo celular.

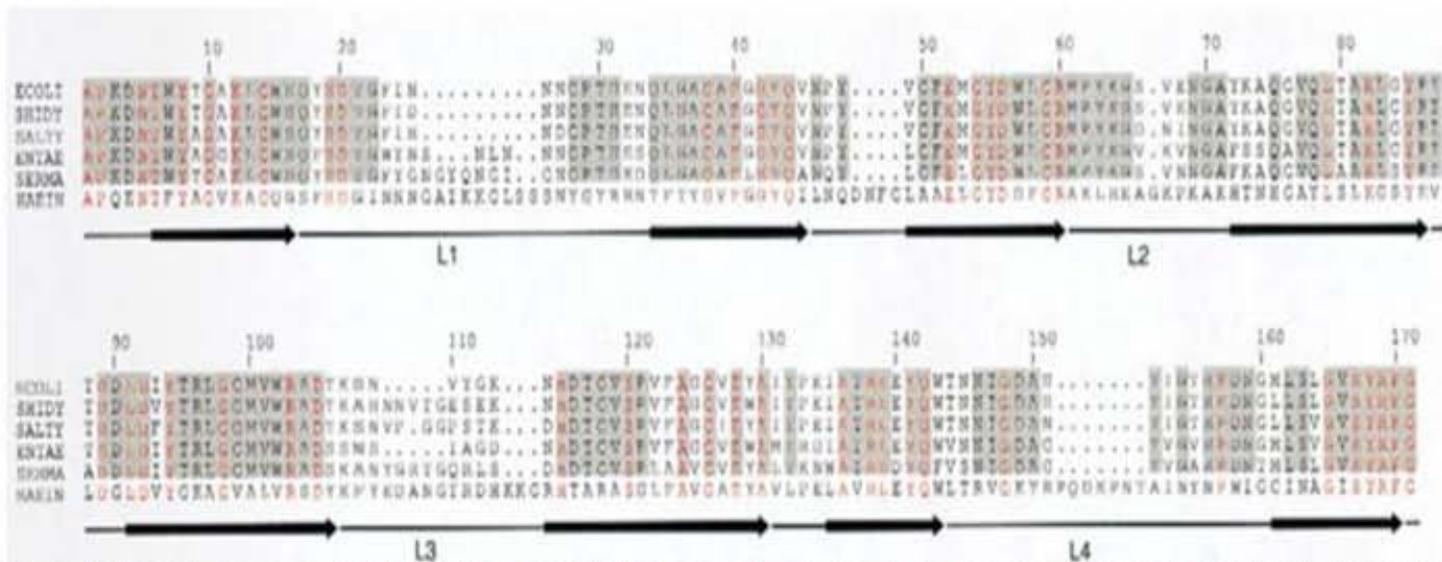


Figura 11. Dominio conservado en el Barril β de secuencias homólogas a Omp A. Se muestran los alineamientos de la porción amino terminal de homólogos de OmpA de varias especies de bacterias: *Shigella dysenteriae* (SHIDY), *Salmonella typhimurium* (SALTY), *Enterobacter aerogenes* (ENTAE), *Serratia marcescens* (SERMA) y *Haemophilus influenzae* (HAEIN). La porción del barril β está señalada con flechas negras. Los residuos conservados se encuentran en color rojo. La parte sombreada (solor gris) representa los residuos en común, excepto en HAEIN, el género que demostró tener solo 33% de identidad respecto a *E. coli* (ECOLI). (Tomada y modificada de Pautsch et al., 1998.)

El primer tipo de célula es una célula flagelada y móvil. Esta célula desarrollará una estructura de anclaje al sustrato llamada prosteca dando lugar al segundo tipo de célula. El segundo tipo celular es capaz de iniciar una nueva ronda de replicación y división celular. La longitud de la prosteca depende de la concentración de nutrientes (Poindexter, 2006). Precisamente, el ciclo de vida dimórfico hace que *C. crescentus* sea diferente de bacterias que se dividen simétricamente como *E.coli* donde la morfología celular se mantiene constante a lo largo del ciclo celular (Figura 14).

3.1 Sistema Tol-Pal y proteínas implicadas para la integridad de las envolturas celulares en *C. crescentus*

Debido a que *C. crescentus* puede crecer en medios diluidos, su ME no sólo funciona como barrera para la difusión de moléculas, sino también como trampa para la captura de nutrientes. Esto se ve reflejado en la cantidad importante de proteínas de alto peso molecular embebidas en la ME (Poindexter, 2006). A pesar de este doble papel de la ME en *C. crescentus*, esta bacteria carece de Lpp (Takacs, C.N., Poggio S., Charbon G., Pucheault M., Vollmer W., y Jacobs-Wagner C., 2010), la principal proteína de estabilización de la ME en enterobacterias.

A diferencia de *E.coli*, en *C. crescentus* el sistema Tol-Pal es esencial (Yeh et al., 2010). El complejo Tol-Pal es requerido para el desarrollo en orden del ciclo celular. Es esencial en la invaginación de la ME en las últimas etapas del ciclo celular. Se ha sugerido que el sistema Tol-Pal de *C.crescentus* cumple también con las funciones de Lpp (Gerding M. A., et al., 2007).

En mutantes de *C. crescentus* de TolA, TolB o Pal, las células muestran una ME desorganizada o células incapaces de completar la división celular. En cepas silvestres de *C. crescentus* el complejo Tol-Pal está situado en el plano de división temprano, en células predivisionales. El sistema se expresa y se mantiene en los polos de la nueva célula incluso después del término de la división celular (Yeh et al., 2010).

En un estudio sobre las diferencias estructurales entre los sistemas Tol-Pal de *C. crescentus* y *E.coli* (Figura 12) se describe la importancia del sistema en la localización de las proteínas de polaridad TipN en *C. Crescentus* (Yeh et al., 2010). TipN es una proteína de MI que sirve como marcador de polaridad celular y que está implicada en la localización de estructuras extracelulares como el flagelo

y la prosteca y en la segregación del cromosoma (Lam H., Schofield W.B., y Jacobs-Wagner C., 2006)



Figura 12. Diferencias entre los sistemas Tol-Pal de *E.coli* y *C. crescentus*. En el panel izquierdo el sistema Tol-Pal de *E. coli* con presencia de Lpp. En el panel derecho el sistema Tol-Pal de *C. crescentus* con ausencia de Lpp y presencia de la proteína TipN. Tomada y modificada de Yeh et al., 2010.

Es importante resaltar que en esta bacteria dimórfica, el sistema Tol-Pal es requerido para mantener la posición de TipN a lo largo del ciclo celular. Las proteínas TolA y Pal son necesarias para la correcta localización de TipN. TolA y Pal interactúan con TipN (Yeh et al., 2010).

3.2 La prosteca como órgano especializado

La célula de *C. crescentus* que se encuentra en la fase del ciclo celular donde tiene la capacidad de iniciar la replicación del DNA, se caracteriza por la presencia de una estructura llamada comúnmente prosteca. Esta estructura, en el caso de *C. crescentus* mide menos de 0.2 μm de diámetro (no es visible con microscopia de campo claro). Este apéndice tiene la función de adherencia al sustrato (Poindexter et al., 2006). La prosteca no contiene ribosomas, DNA o proteínas citoplasmáticas (Wagner et al., 2007).

A nivel estructural, la prosteca es una extensión cilíndrica unida a la célula a través de las envolturas celulares antes descritas: ME, MI y PP (Figura 13) (Curtis, P. D., y Brun, Y. V., 2010). La prosteca está interrumpida en intervalos irregulares por bandas periplásmicas sensibles a lisozima llamadas bandas transectantes (crossbands). Cada una de estas bandas consiste de material electrodensito que pueden o no contener un poro central. Probablemente ellas estabilizan y/o compartimentan la estructura de la prosteca (Wagner et al., 2007).

La síntesis de la prosteca comienza después de la generación del disco adhesivo aunque no depende de este. La elongación de la prosteca lleva a la célula a alejarse de la superficie donde se encuentre anclada, siendo ventajoso cuando se desarrolla en biopelículas brindando una mayor capacidad para la adquisición de nutrimentos a diferentes niveles. Sin embargo, incluso en medios ricos no limitados en fosfatos, se presentan células con prosteca. Lo cual sugiere que el desarrollo de la prosteca a velocidad basal es parte integral del desarrollo de la célula (Wagner et al., 2007).

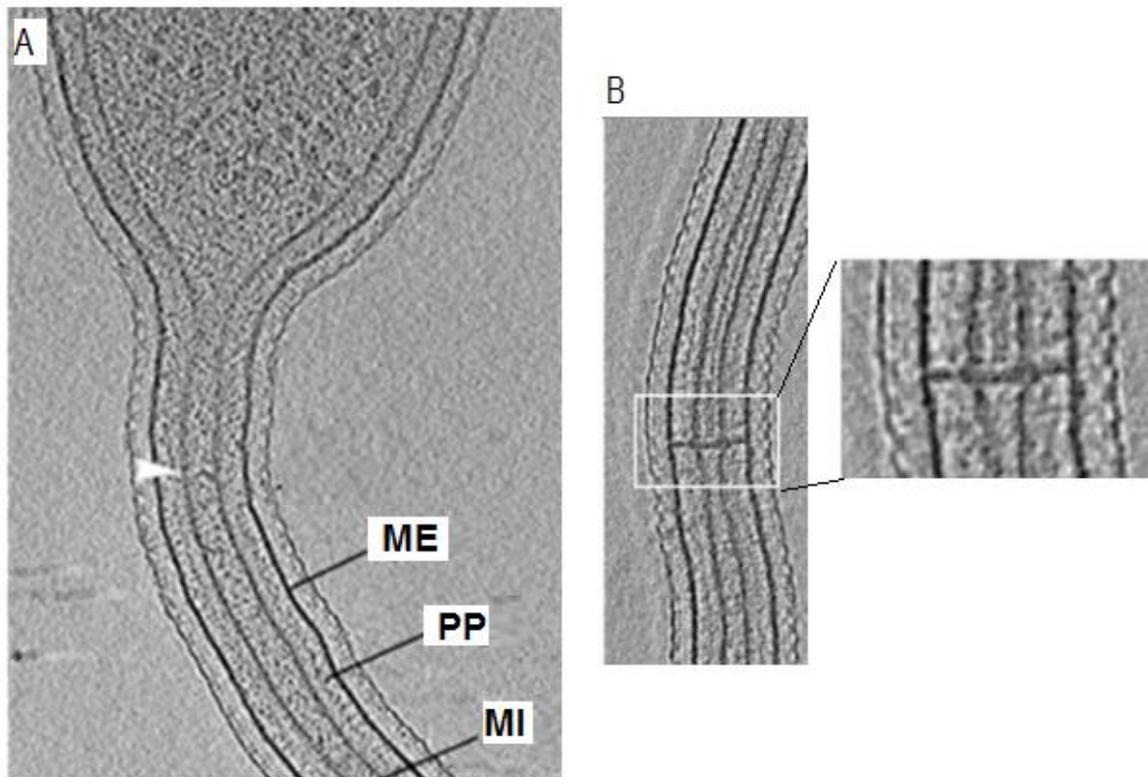


Figura 13. Estructura general de la prosteca de *Caulobacter crescentus*. Panel A: Estructura de la prosteca. ME: membrana externa; PP: pared de pared peptidoglicanos; MI: Membrana interna. Panel B: sección de prosteca donde se encuentra una banda transectante o “crossband”. Tomada de (Schlimpert S., Klein, E. A., Briegel, A., Hughes, V., Kahnt, J., Bolte, K. y Maier, U. G., 2012)

En general las bacterias dimórficas prostecadas pueden ser divididas en dos grupos basados en la función de la prosteca. El primer grupo involucra a la prosteca en funciones de reproducción (por ejemplo: *Hyphomonas* e *Hyphomicrobium*). El segundo grupo, que incluye a *C. crescentus* involucra a la prosteca únicamente en la función de adhesión al sustrato favoreciendo su papel en la toma de fosfatos (Ireland .M. E., Karty, J. a, Quardokus, E. M., Reilly, J. P., y

Brun Y., 2002). La prosteca de *C. crescentus* siempre se adhiere al sustrato por la parte distal a través de un disco adherente (Bodenmiller et al., 2004).

En el caso de *C. crescentus*, el polo de la prosteca secreta un adhesivo que está compuesto en parte por N-acetil glucosamina (Bodenmiller et al., 2004). La formación de la prosteca requiere del cambio de síntesis de las proteínas de la superficie celular en dirección perpendicular al eje original, en tiempo y localización específica. La morfogénesis y elongación de la prosteca emplea proteínas en común con la elongación del cuerpo celular como son la proteína 2 de anclaje a penicilina o PBP 2 (penicillin-binding protein 2). De esta manera, su delección o inactivación conduce al incremento del diámetro y defectos de longitud de la prosteca y del cuerpo celular. Los mecanismos que determinan la localización, forma y tamaño de la prosteca no pueden ser completamente inherentes a las proteínas de elongación de la pared celular, por lo que deben de existir proteínas específicas de la síntesis de la pared celular de la prosteca (Wagner et al., 2007).

La elongación de la prosteca responde a la baja concentración de fosfatos dentro del medio donde se desarrolle la célula (Wagner, 2007 & Ireland et al., 2002). La estimulación de la elongación de la prosteca está relacionada con la toma de fosfatos de la célula. La disponibilidad de fosfatos es un factor limitante de crecimiento para varios microorganismos. En ambientes oligotróficos (con baja productividad primaria y por lo tanto poco contenido de nutrimentos), las prostecas pueden medir 20 veces el tamaño del cuerpo celular. La elongación incrementa la proporción de la superficie celular contra volumen. Lo anterior sugiere que la prosteca desempeña un papel importante en la incorporación de toma de nutrimentos (Wagner, J. K., & Brun, Y. V. 2007).

Ireland y colaboradores (2002) determinaron y clasificaron 64 proteínas dentro de la prosteca de *C. crescentus*. De éstas 64, 39 dipeptidasas, fosfatasas alcalinas, sensores de histidina-cinasa, homólogos de TolC y proteínas relacionadas con OmpA.

4 Ciclo celular dimórfico de *C. crescentus*

C. crescentus es un modelo representativo del desarrollo y división celular en procariontes con ciclo celular dimórfico y un modelo para el estudio de los principios de la diferenciación celular (Martin et al., 2000).

Un ciclo celular de *C. crescentus* siempre generará una célula prostecada sésil y una célula flagelada móvil (Figura 14). La morfología, la motilidad y la capacidad

de continuar hacia un nuevo ciclo celular son completamente distintas de acuerdo al tipo celular.

Por un lado, las células flageladas móviles son incapaces de iniciar la replicación del cromosoma y tienen como función principal la motilidad dentro del medio acuoso a través del flagelo polar (Bodenmiller et al., 2004). Estas células se encuentran en la fase G1 del ciclo celular. La célula nadadora se diferencia hacia un tipo celular con prosteca, perdiendo el flagelo y el pili, ambos son reemplazados por la prosteca (entre las fases G1 y S del ciclo celular). Una vez prostecada, la célula puede iniciar la replicación del DNA (Ireland et al., 2002). La célula prostecada (en fase G2) crece, se elonga y forma dos compartimentos predivisionales: el compartimento de la célula prostecada (el polo que se encuentra anclado) y el compartimento distal a la prosteca, donde comienza a sintetizarse el flagelo, aunque éste no tenga función rotacional hasta que las últimas etapas de división celular concluyan. Una vez finalizado el ciclo, a partir de estos dos compartimentos se forman células independientes. La célula prostecada puede iniciar una nueva replicación del cromosoma (Judd et al., 2005)

C. crescentus presenta expresiones diferenciales de proteínas en cada etapa del ciclo celular (Figura 15). El ciclo celular está regulada por tres reguladores maestros: CtrA, DnaA y GcrA (Martin et al., 2000).

La proteína CtrA es una proteína perteneciente a la superfamilia de reguladores de respuesta. CtrA actúa a través de un sistema de dos componentes (una histidin-kinasa recibe una señal de entrada, se autofosforila en el residuo de histidina y transfiere el fosfato a un residuo de aspartato en el regulador de respuesta). La forma fosforilada de CtrA actúa como factor de transcripción, regulando genes del ciclo celular como formación del flagelo o metilación del DNA. CtrA tiene la capacidad de unirse al sitio de inicio de la replicación (*oriC*) y reprimir el inicio de la replicación, por lo que al inicio de cada ciclo celular, las células presentan altas concentraciones de la proteína CtrA que inhiben la replicación del DNA (Martin et al., 2000).

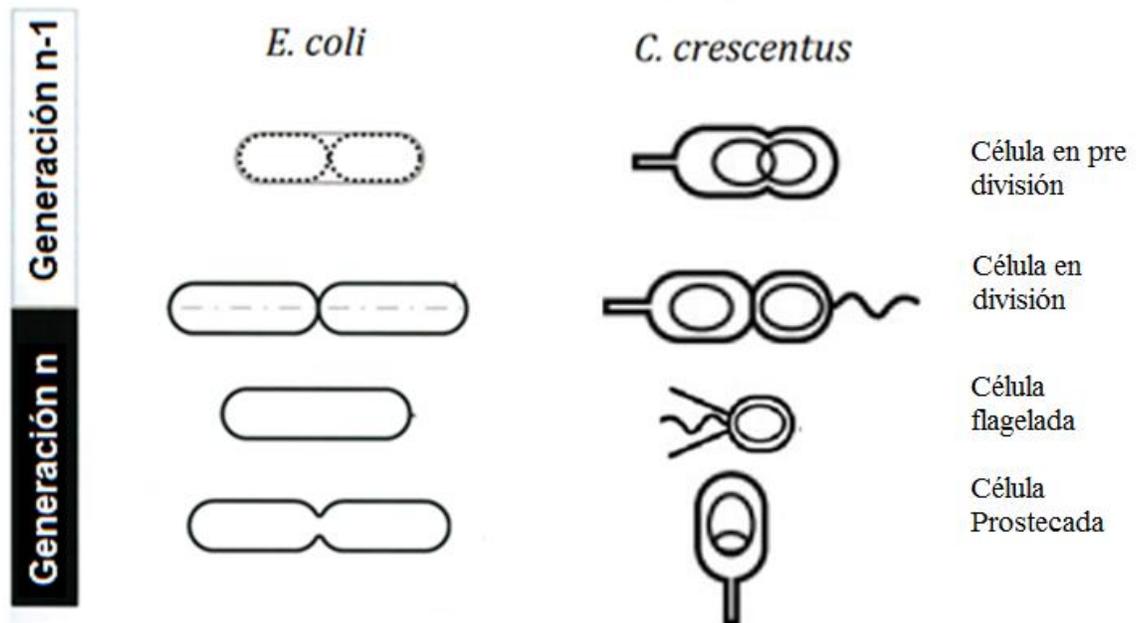


Figura 14. Diferencias morfológicas del ciclo celular de bacterias con división simétrica y asimétrica. Las células de lado izquierdo pertenecientes a *E. coli* presentan un ciclo de vida simétrico donde las células no desarrollan apéndices ni cambian su forma básica de bacilo entre generaciones. Las células de lado derecho, de *C. crescentus*, cambian radicalmente su morfología, presencia de apéndices, capacidades motoras y capacidades de replicación y división. En el caso de *C. crescentus*, sólo la célula flagelada tiene la capacidad de nadar, mientras que en la célula prostecada es sésil. Las células hijas en el caso de *E. coli* no necesitan desarrollar algún apéndice para iniciar la replicación y división a diferencia de *C. crescentus*, quien necesita anclarse a un sustrato a través de una prosteca y disco adhesivo para comenzar la replicación y división celular.

El momento de transición entre célula flagelada a célula sésil es determinado por la replicación de DNA de la célula. En este momento, los niveles de CtrA en su forma fosforilada disminuyen. La disminución es producto de la desfosforilación de la proteína (Martin et al., 2000).

DnaA, es un regulador transcripcional que se comienza a sintetizar en el momento de la transición de célula flagelada a célula prostecada. Esta proteína se une a sitios proximales del origen de replicación del cromosoma y lo relaja. DnaA también activa la transcripción de *gcrA*, la polimerasa III, la DNA helicasa y las proteínas de división celular. La concentración más alta de DnaA se presenta en la transición de célula flagelada a sésil, es decir en el periodo entre G1 y S. Su regulación depende de los cambios en la metilación de su promotor: es activado cuando se encuentra metilado y desactivado cuando se encuentra hemimetilado, después de la replicación (Bowers, L., Shapland E. y Ryan K., 2008).

La transcripción de *gcrA*, otro regulador maestro, es activada por DnaA. GcrA se acumula mientras la célula se encuentre en la fase S. La acumulación de GcrA también permite la acumulación de CtrA después de que el promotor P1 de este gen se hemimetila por el paso de la horquilla de replicación. La transcripción de GcrA es reprimida por CtrA (Bowers, L., Shapland E., Ryan K., 2008).

Por otro lado, la acumulación de CtrA permite la transcripción de la proteína FtsZ. La proteína FtsZ es una GTPasa tipo tubulina que al polimerizarse forma una estructura similar a un anillo que proporcionan la fuerza mecánica requerida para la constricción de las membranas celulares. Esta proteína es importante para la determinación de la división en bacterias pues determina la sincronización y localización de las proteínas que llevarán a cabo la división celular (Judd et al., 2005). El cromosoma bacteriano de *C. crescentus* tiene una organización espacial: el origen de replicación del cromosoma se encuentra en el polo viejo de la célula y en el polo opuesto, el sitio de terminación.

En células nadadoras de *C. crescentus*, la proteína FtsZ está ausente y es detectable cuando ésta se empieza a diferenciarse en célula sésil. Entonces es cuando la concentración de FtsZ incrementa rápidamente. Una vez que la constricción de las membranas ha comenzado, la concentración de FtsZ disminuye precipitadamente. En células separadas y autónomas una de otras, FtsZ sólo se encuentra en las células prostecadas. Los modelos de FtsZ describen al anillo y las proteínas asociadas ancladas a la MI. En *E. coli*, FtsA y ZipA tienen la función de anclar a FtsZ a la membrana. El anclaje de FtsZ es continuo pero probablemente está unido a la MI en puntos discretos. (Judd et al., 2005).

En las últimas etapas de constricción las membranas de *C. crescentus*, la MI y ME de las células hijas se separan en distintos momentos. La constricción de la MI ocurre antes de la constricción de la ME. En un inicio, la distancia entre la MI y la ME se mantiene constante pero conforme la división avanza, la MI se constriñe más rápido. La MI termina su constricción separando al citoplasma en dos compartimentos. La ME continúa constriñéndose por un tiempo más largo. La constricción de la ME continúa hasta que sólo existe una pequeña conexión entre las dos células existentes. La ME se parte completamente y la citocinesis es completada (Curtis, P. D., & Brun, Y. V., 2010).

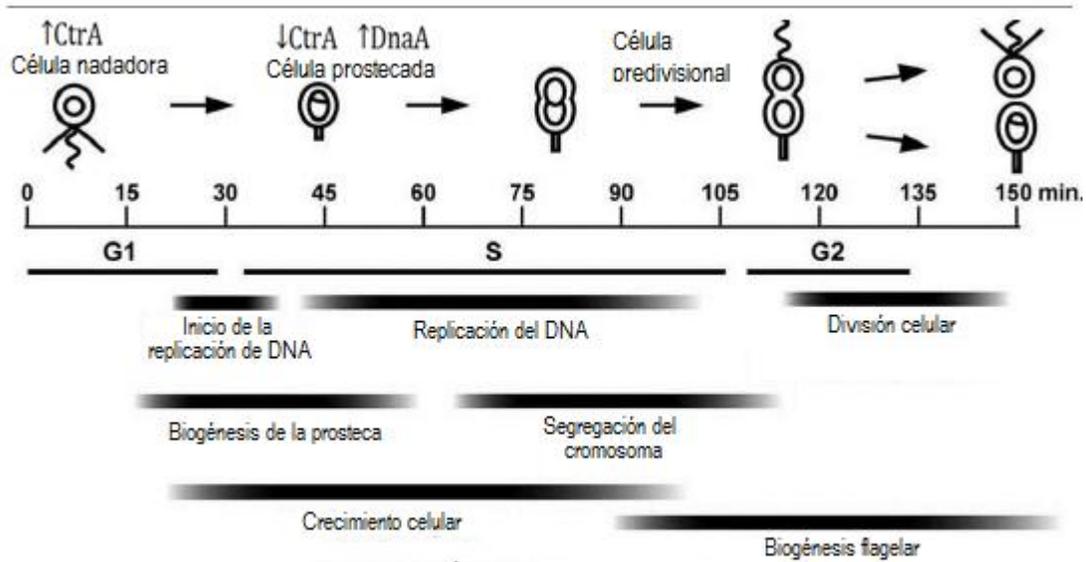


Figura 15. Eventos principales del ciclo celular de *C. crescentus*. Los eventos de diferenciación están ligados al tipo celular, la cantidad de proteínas expresadas, los órganos que se están biosintetizando o degradando.

C Hipótesis

En *Caulobacter crescentus* existen proteínas relacionadas con OmpA de *Escherichia coli* con una estructura de dominios similar a ella y que participan en la estabilización de la ME.

D Objetivos

Objetivo general

Determinar las proteínas de *Caulobacter crescentus* con una estructura de dominios similar a OmpA de *Escherichia coli* y determinar la localización de estas proteínas con características de OmpA.

Objetivos particulares

1. Realizar una búsqueda bioinformática para determinar qué genes de *C. crescentus* codifican para proteínas con dominios similares dentro de la familia de OmpA.
2. Analizar por métodos bioinformáticos las características de las proteínas codificadas por los genes putativos identificados, esto incluye determinar la longitud y secuencia del gen de interés, realizar los alineamientos de la secuencia de aminoácido de las proteínas resultantes y generar un modelo topológico de la proteína.
3. Diseñar una fusión viable del gen de interés asociado a un marcador fluorescente en *C. crescentus*.
4. Caracterizar la localización de la proteína codificada por el gen de interés a lo largo del ciclo celular de *C. crescentus*, a través de la fluorescencia emitida por el marcador.

E Metodología

1. Búsqueda bioinformática

PFAM

Éste es un programa desarrollado por el Instituto Sanger. Contiene las secuencias de diferentes familias de proteínas. Permite comparar las secuencias de aminoácidos de diferentes proteínas, buscar grupos relacionados y encontrar dominios y proteínas conservadas. En este proyecto se empleó para determinar la existencia de un gen (o más) con características similares al gen que codifica para OmpA de *E.coli* en *C. crescentus*. Su interfaz puede ser consultada en www.pfam.sanger.ac.uk/.

NCBI

Para afinar la búsqueda del gen de interés, se consultó esta base de datos. Se empleó de diferentes maneras: para determinar la similitud entre las proteínas identificadas utilizando el programa BlastP y para encontrar dominios conservados utilizando la herramienta de CDSearch. La dirección electrónica de esta base de datos puede ser consultada en: www.ncbi.nlm.nih.gov

PRED-TMBB

Es un programa gratuito en línea desarrollado por la Universidad de Atenas en el laboratorio de Biofísica y Bioinformática. Este servidor ejecuta un proceso de discriminación en cualquier secuencia de aminoácidos, localiza las hebras en conformación β plegada e integra un modelo topológico de la secuencia. Su método de predicción está basado en modelos ocultos de Markov, capaces de predecir la topología de las proteínas de membrana externa tipo barril β de bacterias Gram negativas y de discriminarlas de otro tipo de proteínas. Emplea como datos de entrada la secuencia de amino ácidos, sin la necesidad de información evolutiva. La dirección electrónica puede ser consultada en www.biophysics.biol.uoa.gr/PRED-TMBB/

2. Cepas bacterianas empeladas

-*Caulobacter crescentus*: Cepa silvestre CB15N

-*Escherichia coli*: cepa TOP10 células competentes de INVITROGEN (F- *mcrA* $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ $\Phi80lacZ\Delta M15$ $\Delta lacX74$ *recA1* *araD139* $\Delta(araleu)$ 7697 *galU galK rpsL* (StrR) *endA1 nupG*).

3. Medios de cultivo

-Medio Luria Bertani (LB): 10gr de NaCl al 1%, 10gr de Bacto triptona al 1%, 5gr de extracto de levadura al 0.5%

-Medio de extracto de levadura y peptona o PYE por sus siglas en inglés: (para un litro) 2g de peptona, 1g de extracto de levadura, 1.0ml de $MgSO_4(20\%)$, 1.0 ml de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (10%).

-Medio M5GG (Medio de bajos fosfatos): En 90ml de agua: 100 μ l de NaCl al 1M, 100 μ l de KCl al 1M, 625 μ l de NH_4Cl_2 al 0.05%, 84.6 μ l de glutamato de sodio. Suplemento: μ l de $MgSO_4$ 1M, glucosa 10% 1ml, $FeSO_4$ 10mM 100 μ l, $CaCl_2$ 1M 50 μ l. Buffer: 2ml tris-HCl pH 7.0 200mM 10ml. Para medio de bajos fosfatos adicionar: 10 μ M o 50 μ M de $MgPO_4$.

-Medio M2G: para un litro, 25mL de sales M2 a 40x, 500 μ l de $MgSO_4$ a 1M, 500 μ l 1M, 1mL de $FeSO_4$, 10Mm de EDTA, 10Ml de glucosa al 20%.

4. Métodos de cultivo

-Cultivos de toda la noche (Overnight: ON por sus siglas en inglés): Se inocula en 3ml de medio líquido (PYE con kanamicina al 0.5%, 10 μ l/ml para *C. crescentus* o LB para *E. coli*) una colonia de la cepa de interés previamente crecida de medio sólido. Los tubos se incubaron a 30°C en el caso de *C. crescentus* o 37°C en el caso de *E.coli* con agitación constante durante toda la noche.

-Sincronización:

1) Un día antes de la sincronización: se inoculó con la cepa p3494-CHYC-2-mCherry un matraz con capacidad de 100ml con 30ml de medio M5GG con 1 μ l/ml de kanamicina al 0.05%.

2) La sincronización: El cultivo de 30ml se creció hasta llegar a una densidad entre $DO_{560} = 0.3$ y 0.4. Una vez alcanzada esta densidad, se colocó en hielo para evitar que siguiera proliferando. Simultáneamente, manteniendo la cadena de frío a 4°C, se colocaron en el hilo: 4 tubos corex de 15ml, el medio de cultivo M5GG y la

solución LUDOX (Solución coloidal que ayudará a separar las fases de células nadadoras y células prostecadas de *C. crescentus*) y si son necesarios, los fosfatos 1x. Posteriormente, en un tubo corex se preparó una solución de 6ml de LUDOX y 450 µl de HCl 1M y se mezcló por inversión. De la anterior solución se traspasaron 3.225ml en otro tubo corex. A cada uno se le agregaron 12ml del cultivo crecido de la cepa con la construcción p3494-CHYC-2-mCherry previamente y se mezclaron por inversión. Se centrifugaron ambos tubos a 9000 rpm (rotor corvall 5534) durante 30 min a 4°C. De las dos bandas que se formaron, se rescató la banda inferior (células nadadoras) aspirándolas en círculos suavemente con una micropipeta estéril. Las células rescatadas se colocaron en un nuevo tubo corex y se agregaron 10ml de cultivo M5GG. Nuevamente se mezclaron por inversión y se centrifugaron a 8000 rpm durante 5 min a 3-4 °C. Se aspiró el sobrenadante y se rescató el botón formado. Al botón se le agregaron 10 ml del medio empleado y se mezcló por inversión de nuevamente. Esta vez se centrifugaron a 8000 rpm durante 5 min a 3-5 °C. El sobrenadante resultante se aspiró y se resuspendió el botón. Este botón se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5ml y se centrifugó a 8000 rpm durante 1 min a 3-4 °C. El botón resultante se inoculó en 3ml del medio seleccionado y se dejó crecer.

-Parches: De un cultivo con colonias aisladas previamente sembrado, se recolectó una muestra de la colonia con un palillo de madera estéril y se esparció en una nueva caja petri con medio sólido en forma de zig-zag en un área pequeña en forma de cuadrado (Figura 16). Cada parche quedó separado de todos los restantes, usualmente se hacen de 10 a 20 parches por caja de medio sólido (PYE para *C. crescentus* o LB para *E.coli*).

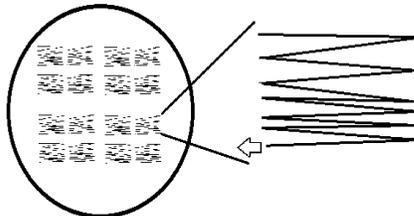


Figura 16. Parche inoculado con palillo estéril, estriando pequeños cuadros en forma de zig-zag.

5. Purificación de plásmido

Método por minipreps hervidos: se inició con la centrifugación de 1.5 ml de cultivo tipo ON a 15000 rpm durante 1min en una microcentrífuga modelo Eppendorf 5415C. El botón resultante se resuspendió y se agregaron 300 µl de STET y 30 µl

de lisozima. Se colocaron en el vórtex durante 5 segundos aproximadamente e inmediatamente se colocaron en agua hirviendo durante 45 segundos. Se centrifugaron a 15000 rpm y el sobrenadante se traspasó a un tubo eppendorf estéril con 300 µl de isopropanol. Se dejó reposar 10 minutos en hielo. Posteriormente se centrifugó por 20 minutos en frío a 15000 rpm y se descartó el sobrenadante. El botón resultante se lavó con 500 µl de etanol al 70% y se mezcló por inversión suave. El botón lavado se dejó secando a 47°C hasta que seco completamente, cuando esto ocurrió se agregaron 40 µl de agua y se dejó reposar 5 min a 65°C. Se colocó en el vortex y se centrifugó una vez más. Este último botón se resuspendió y de éste se cargaron 5µl en el gel de agarosa para su análisis bajo luz UV de onda corta.

6. Diseño de la construcción de un plásmido viable gen-fluoróforo

El tamaño total del gen putativo CC3494 es de 1350 pb. A partir de este gen, se amplificó por PCR un fragmento flanqueado por los oligonucleótidos nombrados 3494f1 Sacl (caagagctcCTCGATCAAGGCGACCGACAAG) y 3494r1 EcoRI (caagaattcacgaagttgatcgagatcgatcgaacg) diseñados con el programa DNAMAN. El fragmento resultante de este PCR fue un fragmento de 581pb correspondiente al extremo 3'OH terminal del gen. Posteriormente este producto de PCR se digirió con las enzimas de restricción EcoRI y Sacl al igual que el plásmido purificado pCHYC-2. Éste es un vector de integración que permite la fusión del fragmento del gen clonado de interés en el extremo 3'OH con el gen que codifica para la proteína fluorescente m-Cherry (Thanbichler M., Iniesta, A. a, y Shapiro, L., 2007). El fragmento y plásmido fueron ligados para dar lugar a la construcción p3494-CHYC-2-mCherry.

7. Transformación en cepas bacterianas

La electroporación consiste en aumentar la permeabilidad de la membrana plasmática para permitir la introducción de la construcción a través de un campo eléctrico externo. En este caso se aplicó un campo de 1.6 mV a una celda de electroporación de 0.1cm previamente enfriada y con las células competentes en el fondo de la celda. Una vez aplicado el campo eléctrico, se agregó inmediatamente 1mL de medio de cultivo a la celda y se recolectaron las células transformadas para traspasarlas a un tubo eppendorf donde se incubaron 1 hora a 30°C para *C. crescentus* y 37°C para *E.coli* con agitación constante para ambos casos.

Para determinar si la clonación en las células competentes de *E.coli TOP10* fue exitosa, se realizaron minipreps hervidos los cuales se digirieron con las mismas

enzimas que se usaron para digerir el inserto y el vector. La presencia del fragmento se verificó por medio de electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Una vez verificada la clonación del fragmento, se purificó el plásmido resultante utilizando el kit de miniprep de Qiagen. El plásmido obtenido se electroporó en células de *C. crescentus* y se plateo en cajas PYE-Kan.

La permanencia de la resistencia al antibiótico kanamicina depende de la recombinación del plásmido con el cromosoma a través de la región de homología consistente en el fragmento clonado. La recombinación sencilla entre el plásmido y el cromosoma bacteriano resulta en la sustitución del extremo 3'OH del gen nativo por el del gen fusionado al gen de la proteína fluorescente. Por otro lado el extremo 3' del gen silvestre es recorrido al final del plásmido en el cointegrado sin un promotor. Como resultado la única copia potencialmente funcional es la que esta fusionada con el gen de la proteína fluorescente (Figura 17).

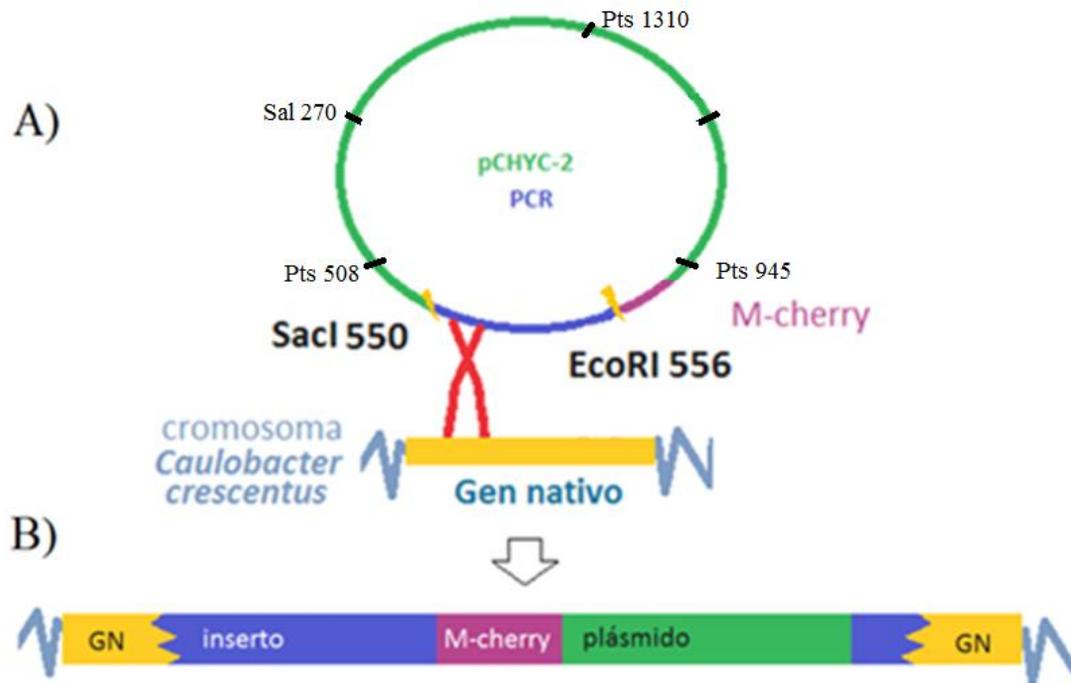


Figura 17. Construcción viable y esquema del cromosoma resultante. Panel (A) representa un esquema de la construcción que resultó viable: el fragmento amplificado del gen de interés (color azul) y el plásmido pCHYC-2 (color verde) que contiene al fluoróforo mCherry (color morado). Este plásmido presenta resistencia a kanamicina. También se presentan los sitios de cortes por las enzimas Sacl y EcorI. El panel (B) representa la integración por recombinación de esta construcción en el cromosoma de *C. crescentus* (amarillo). La primera copia del gen contiene el promotor y 769pb pertenecientes del gen nativo después viene insertado el fragmento amplificado de 581 pb, el fluoróforo y la resistencia a kanamicina. La segunda copia, al carecer del promotor nativo y estar truncada en su extremo 5', es una copia no funcional.

8. Preparación de las muestras para su observación en el microscopio

A partir de la sincronización de las células en medio M5GG con 10 Y 50 μM de fosfatos se tomaron alícuotas cada 10 minutos para observar al microscopio.

Las alícuotas de cada cultivo por separado fueron de 550 μl del cultivo. Fueron tomadas cada 10 min durante 120 min y se colocaron en un eppendorf nuevo de 1.5ml. A éstos se le agregaron 50 μl de formaldehído y se mezclaron con vórtex. Se dejaron reposar 20 min a temperatura ambiente y se conservaron a 4 °C hasta su observación en el microscopio.

-Localización de la expresión de la proteína codificada por el gen CC3494

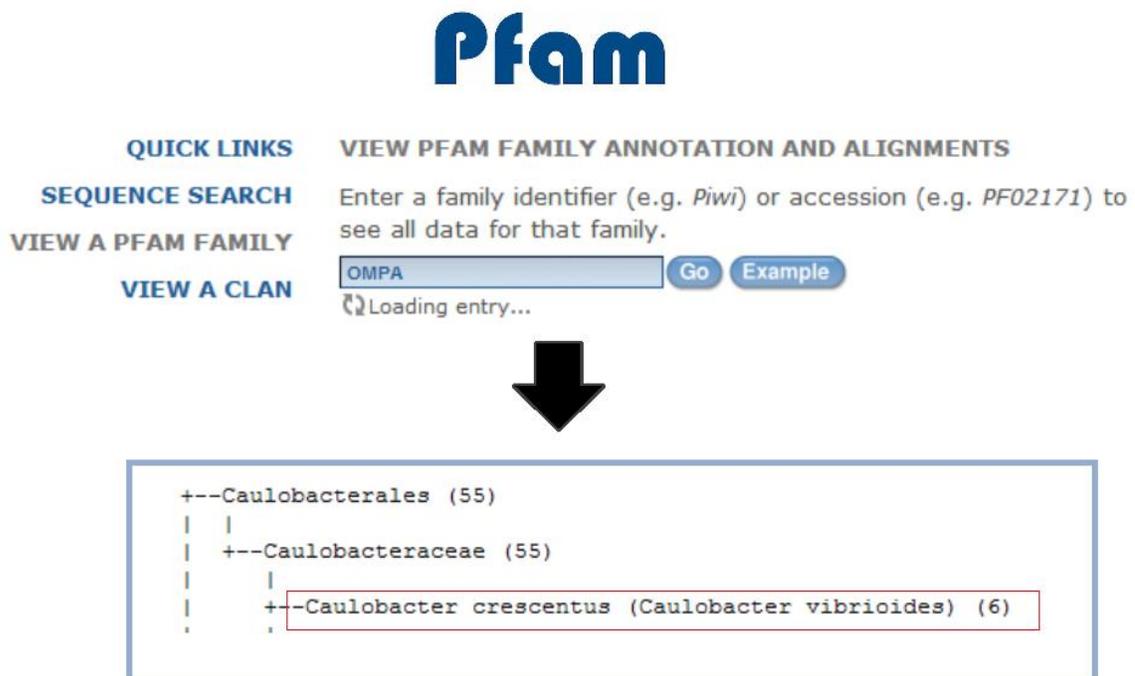
Se prepararon camas de agarosa consistentes de 750 μl de medio mínimo M5GG con 1.5% de agarosa, y se esparcieron con una micropipeta en un portaobjetos con 3 cubreobjetos apilados de cada lado para brindar altura e impedir que la agarosa se disperse fuera del portaobjetos. Se tapó con otro portaobjetos y se dejó gelificar. Una vez sólido, se removieron tanto los pilares laterales de los cubreobjetos como el cubreobjetos que estaba tapando la agarosa. Como resultado se tiene una capa de agarosa donde se colocan 2 μl del las células fijadas y se cubren con un cubreobjetos para su observación al microscopio.

La determinación de la localización de la construcción p3494-CHYC-2-mCherry (proteína fluorescente Mcherry) se llevó a cabo con el microscopio Nikon Eclipse E600 con un objetivo 100X de inmersión de contraste de fases y el filtro 594-mcherry para observar la fluorescencia de la construcción.

F Resultados

- 1) *C. crescentus* tiene seis genes que codifican para proteínas con el extremo carboxilo terminal de OmpA, dos de ellas además presentan el dominio amino terminal, por lo que podrían tener la misma función de *ompA* de *E. coli*.

La búsqueda en Pfam mostró que existen seis genes en el genoma de *C. crescentus* que codifican para proteínas que contienen el dominio correspondiente al carboxilo terminal de OmpA (Figura 18). Este resultado incluye a los genes 0201, 0747, 1573, 3229, 2845 y 3494.



Pfam

QUICK LINKS

- SEQUENCE SEARCH
- VIEW A PFAM FAMILY
- VIEW A CLAN

VIEW PFAM FAMILY ANNOTATION AND ALIGNMENTS

Enter a family identifier (e.g. *Piwi*) or accession (e.g. *PF02171*) to see all data for that family.

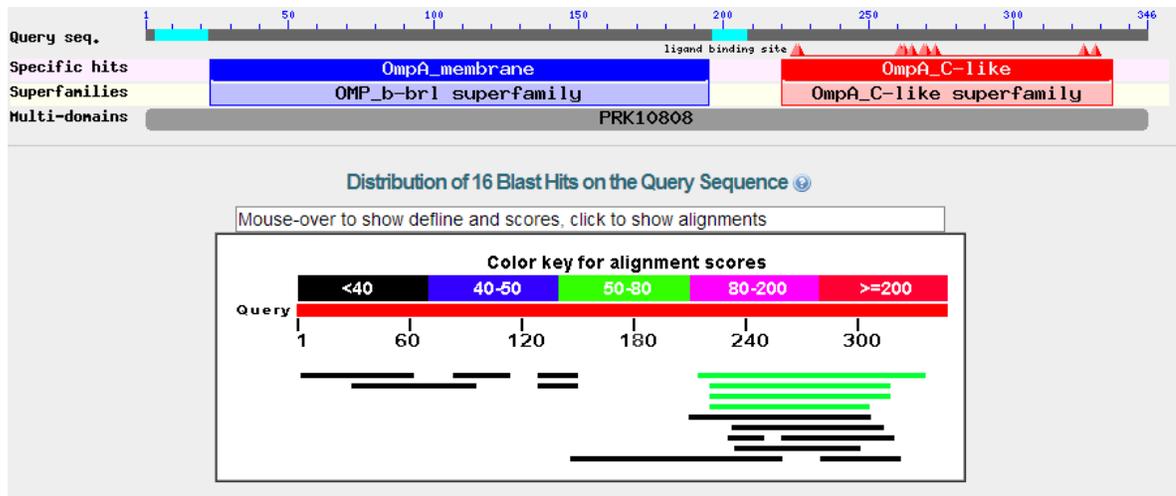
⌂ Loading entry...

↓

```
+--Caulobacteriales (55)
| |
| | +--Caulobacteraceae (55)
| | |
| | | +--Caulobacter crescentus (Caulobacter vibrioides) (6)
```

Figura 18 .Proteínas de *C. crescentus* pertenecientes a la familia de OmpA. El análisis de Pfam demostró que *C. crescentus* tiene al menos 6 genes relacionados con OmpA.

Adicionalmente, se realizó un BlastP de OmpA de *E. coli* contra el genoma de *C. crescentus*. Este análisis demostró la similitud de los genes encontrados con Pfam y la proteína OmpA de *E. coli* (Figura 19). El resultado de este análisis sugiere que los genes CC0201, CC3494 y CC0747 son los genes que codifican para proteínas con una mayor similitud a OmpA de *E. coli*, aunque la similitud se limita al dominio del extremo carboxilo terminal de OmpA.



Description	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession	Gen
OmpA family protein [Caulobacter crescentus CB15] >ref YP_002515576	62.4	34%	4e-12	35%	NP_419020.1	CC0201
OmpA family protein [Caulobacter crescentus CB15] >ref YP_002518982	63.5	27%	7e-12	40%	NP_422288.1	CC3494
OmpA family protein [Caulobacter crescentus CB15] >ref YP_002516157	61.2	27%	3e-11	41%	NP_419564.1	CC0747
OmpA family protein [Caulobacter crescentus CB15] >ref YP_002518311	56.6	24%	2e-10	41%	NP_421641.1	CC2845
OmpA family protein [Caulobacter crescentus CB15] >ref YP_002518709	38.9	28%	3e-04	25%	NP_422023.1	CC3229

Figura 19. BlastP de los seis genes reconocidos por Pfam. A través de un BlastP se alineó a la proteína OmpA en *E. coli* contra el proteoma de *C. crescentus*. La gráfica nos indica que sólo la región carboxilo de OmpA presenta similitud con todos los genes previamente identificados de *C. crescentus*. Sólo dos, CC201 y CC3494 presentan una similitud reducida en el amino terminal. Los genes de *C. crescentus* con un mayor porcentaje de similitud y puntaje total (total score) respecto a la proteína OmpA de *E. coli* fueron cinco de los anteriormente reconocidos por Pfam: CC0201, CC3494, CC747, CC2845 y CC3229. El gen CC1573 resultó con un porcentaje bajo (36%) y ningún acierto (Hit) específico, por lo cual no se muestra en los resultados.

Mientras que el valor E (E-value) nos demuestra que es probable que la similitud se deba a una probable homología y no al azar (pues el valor E es mucho menor a 1), la extensión de la región de similitud (Query coverage) aunque menor al 50% representa el dominio identificado por pFam (carboxilo terminal).

2) Las proteínas CC3494 y 0747 podrían tener la misma función que OmpA

Las proteínas codificadas por los genes identificados previamente fueron sometidos a un análisis de dominios conservados en NCBI (Figura 20). Ninguna de las seis proteínas codificados por los genes analizados presenta el dominio

amino terminal de OmpA, sin embargo CC3494 y CC0747 presentan dominios integrales de ME, mientras que la otra proteína con una alta similitud a OmpA (CC0201) es en realidad una lipoproteína de ME. Por otro lado, la proteína CC3229 corresponde a la lipoproteína Pal, esencial en *C. crescentus*, CC1573 es la proteína del motor flagelar MotB y CC2845 es una proteína periplásmica de función desconocida. Este resultado confirmó que los productos de los genes CC3494 y CC0747 codifican para proteínas, posiblemente con la misma función que OmpA. Para facilitar el estudio subsecuente, en este trabajo nos concentramos en el producto del gen CC3494 debido a que fue el que mayor porcentaje de similitud obtuvo. Además datos de expresión global obtenidos de experimentos de microarreglos de *C. crescentus* indican que CC3494 es un gen altamente expresado (McGrath et al., 2007). Por esta razón se esperaba que esta proteína estuviera presente en la bacteria en una alta cantidad. Esto concuerda con una posible función parecida a la de OmpA.

3) La estructura de la proteína expresada por el gen 3494 de *Caulobacter crescentus* es similar a OmpA de *Escherichia coli*

La comparación de topología de la proteína OmpA perteneciente a *E. coli* predicha a partir de su secuencia (Figura 21) y la predicción de la topología de la proteína codificada por el gen 3494 de *C. crescentus* (Figura 22) es similar en cuanto a número total de segmentos transmembranales de la ME y en la posición del barril β en el tramo que comprende al extremo amino terminal.

Las predicciones robustecen la hipótesis de que la proteína codificada por el gen CC3494 de *C. crescentus* y OmpA de *E. coli* tienen una topología similar. Respecto a los segmentos en la membrana externa (formadores del barril β), vueltas hacia el exterior de la membrana externa y vueltas en el periplasma, tanto en OmpA como en la proteína expresada por el gen CC3494 son de una longitud similar.

Las hebras β están en el rango de 8-10 residuos de aminoácidos, las vueltas hacia el exterior de la membrana externa son de 3-5 residuos de aminoácidos y finalmente, las vueltas en el periplasma son de 8-12 residuos de aminoácidos. Esto coincide con la aseveración de que el barril β es una estructura fuertemente conservada, al menos en longitud y número de las hebras (En OmpA corresponde a 8 hebras al igual que en la proteína codificada por el gen CC3494).

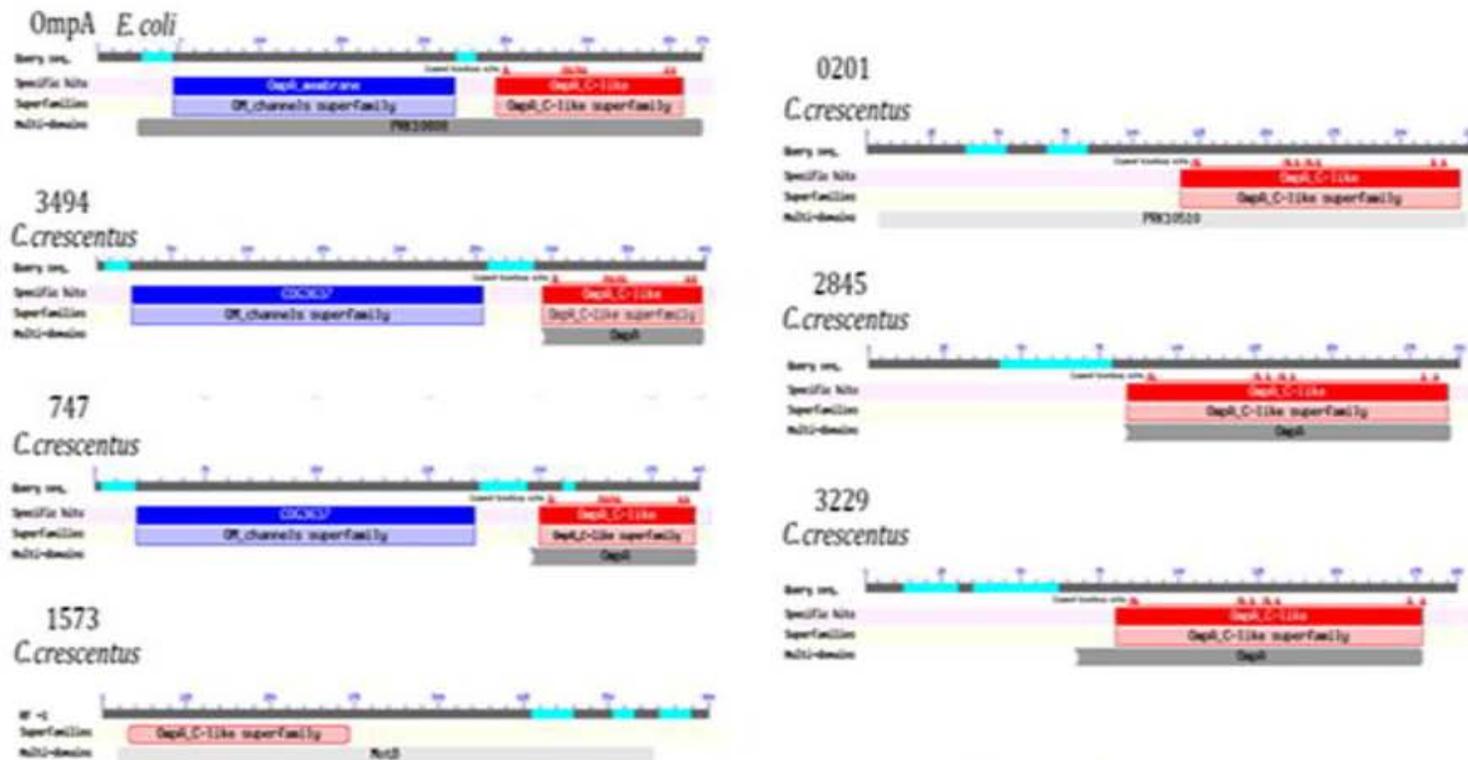


Figura 20. Dominios conservados de las proteínas obtenidas del análisis con Pfam. El primer esquema (en la parte superior izquierda) se presentan los dominios conservados de OmpA de *E. coli*. Los siguientes esquemas corresponden a las proteínas codificadas por los genes encontrados con el programa Pfam. En ellos, se muestran en color rojo los dominios correspondientes al extremo carboxilo terminal y en color azul los dominios del extremo amino terminal. Los esquemas de los genes CC3494 y CC747, son los únicos que contienen a ambos dominios. El dominio del extremo amino terminal representa una posible región transmembranal de ME, el dominio que comprende al carboxilo terminal representa un dominio putativo de OmpA.

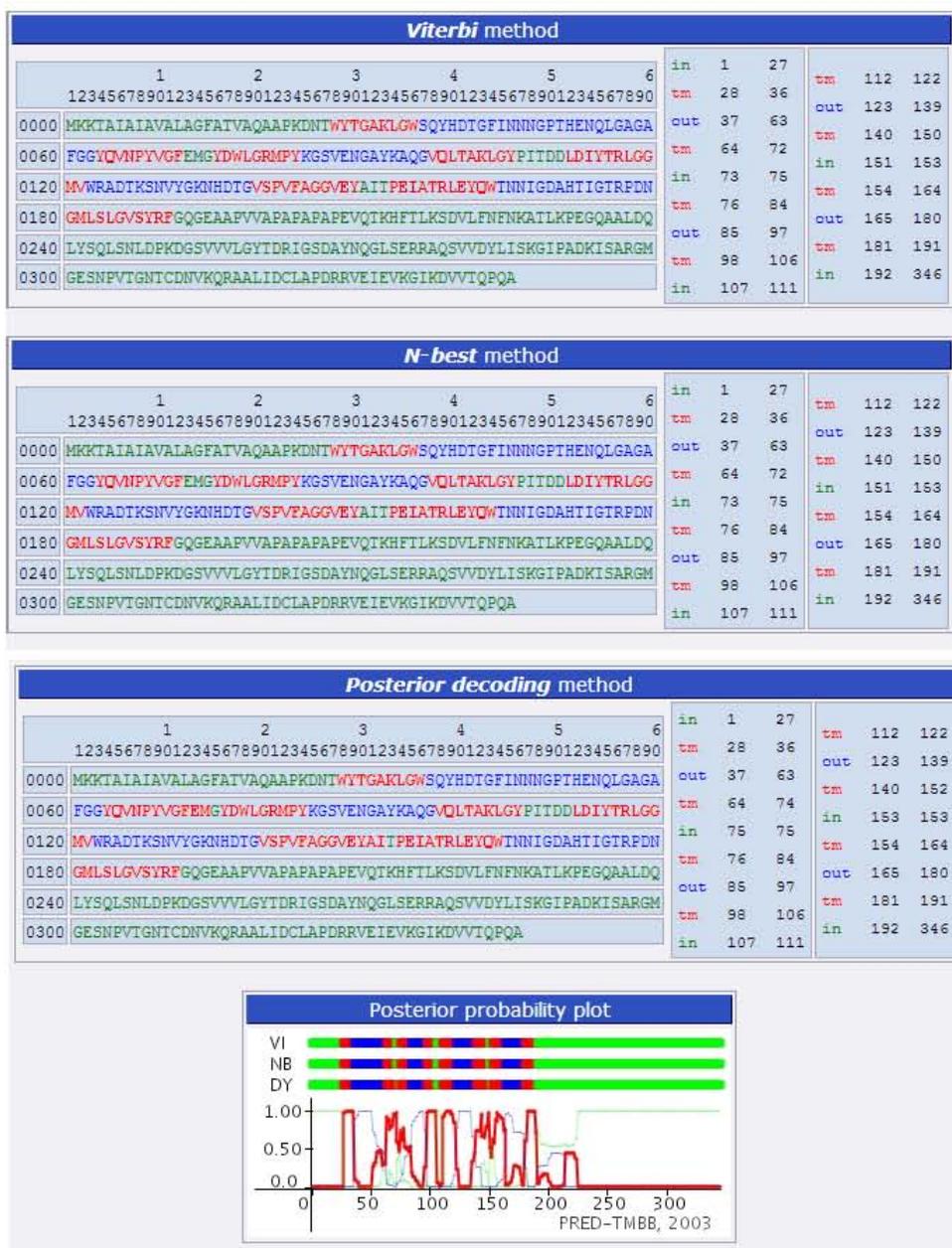


Figura 21. Predicción de la topología de OmpA de *E. coli*. Se muestran las predicciones de la topología de OmpA de *E. coli* predicha por los métodos Viterbi, N-Best y Posterior Decoding. En los tres casos, se evidencian los segmentos transmembranales en color rojo. Estos 8 segmentos corresponden al barril β de OmpA en la región que comprende al amino terminal.

Las únicas diferencias son el dominio del extremo carboxilo terminal y el número de residuos de aminoácidos que existen entre el inicio de la secuencia y la primera hebra β insertada en la membrana externa. En *E.coli* la longitud del extremo carboxilo terminal es de 154 residuos de aminoácidos, mientras que en *C. crescentus* es de 145 residuos de aminoácidos. La longitud del extremo amino terminal justo antes de ingresar como hebra β transmembranal en el caso de *E.coli* es de 27 residuos de aminoácidos, mientras que en *C. crescentus* es de 74 residuos. Aunque es probable que la anotación del genoma de *C. crescentus* este equivocada en cuanto a la posición de la metionina de inicio, ya que por un lado un péptido señal tan largo sería altamente improbable y por el otro existen dos posibles codones de inicio río abajo del reportado, que todavía predicen un péptido señal. Finalmente existe una cantidad importante de prolinas justo al final de la estructura del barril β . Estas prolinas podrían ayudar a posicionar el extremo carboxilo terminal de esta proteína más cerca de la PP con la cual interactúa.

4) Mediante un análisis de microscopia se muestra que la proteína de fusión CC3494-mCherry es funcional

Para determinar la localización de la proteína expresada por el gen CC3494 se fusionó el extremo 3'OH de este gen con el gen de la proteína fluorescente mCherry (sección de Metodología). En el panel A de la figura 23 se muestra la digestión del plásmido obtenido digerido con una sola enzima de restricción en su forma lineal y el mismo plásmido digerido con las dos enzimas utilizadas para clonar el fragmento. Como se puede observar, en esta última digestión el plásmido libera un fragmento del tamaño esperado.

El plásmido p3494CHYC-2 fue electroporado en *C. crescentus*. Una de las colonias resistentes a Kanamicina fue seleccionada. Esta cepa fue crecida en medio M5GG con $10\mu\text{M}$ MgPO_4 y cuando el cultivo alcanzó una densidad óptica de OD_{660} 0.3 las células se observaron en el microscopio óptico, tanto en contraste de fase para determinar su morfología como en epifluorescencia para observar su fluorescencia. Como se puede observar en el panel B de la figura 23 las células presentan una típica morfología. En el panel C de la misma figura se observa la imagen de fluorescencia de estas mismas células. Se nota la fluorescencia localizada en la periferia de las células. Este patrón es característico de proteínas membranales o periplásmicas. Interesantemente la intensidad de la fluorescencia no se distribuye homogéneamente a lo largo de las células, en cambio parece concentrarse en el polo viejo o prostecado.

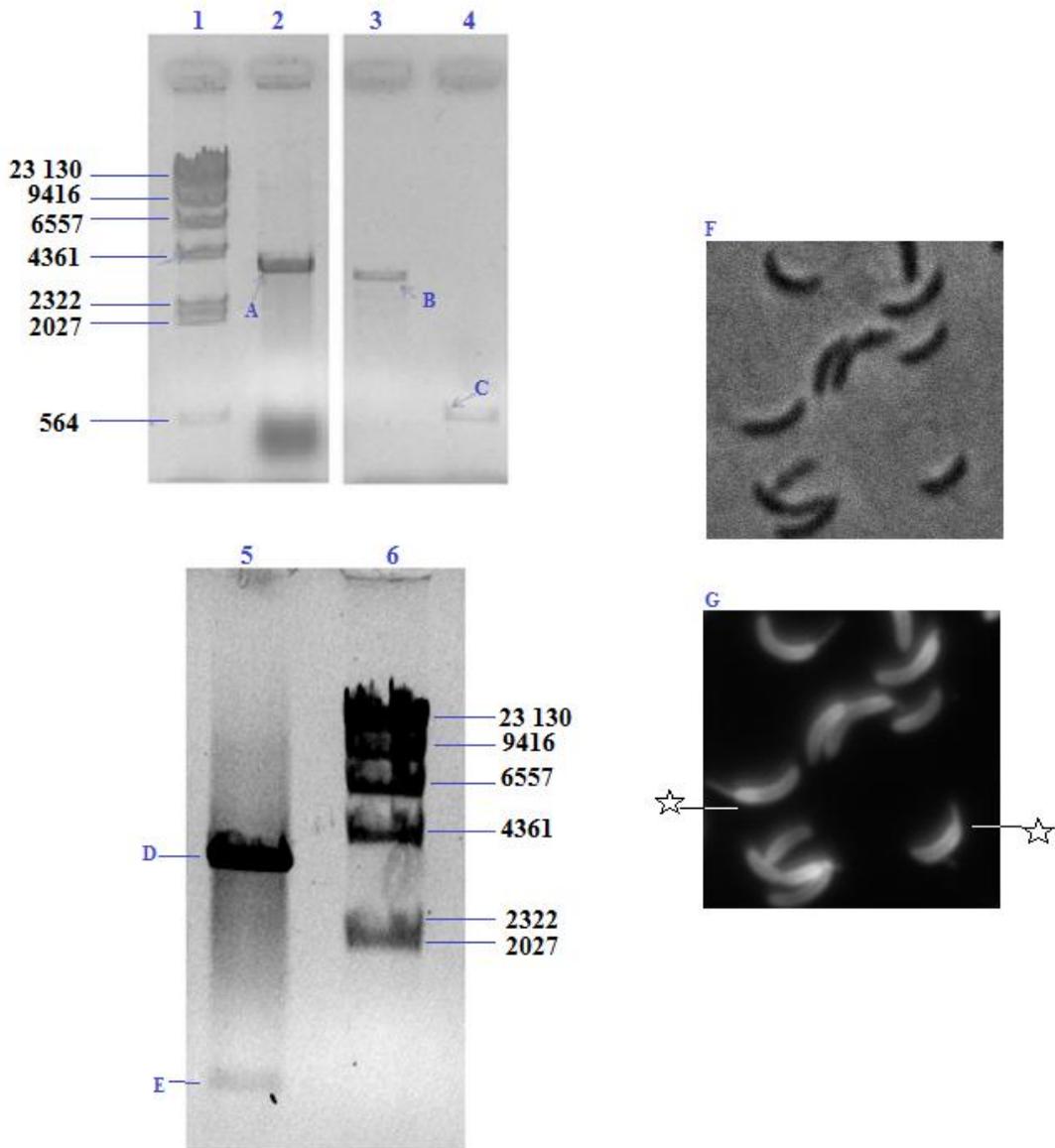


Figura 23. Patrón de fragmentos de la construcción del plásmido recombinante p3494CHYC-2 y patrón de localización en *Caulobacter crescentus*. El primer gel de agarosa muestra el patrón de bandas correspondientes a los fragmentos de la construcción correspondientes del plásmido y del inserto del gen CC3494. El carril número 1 corresponde al marcador de peso molecular λ -Hind III. El carril número 2 pertenece a la construcción 3494-pCHYC-2-mCherry con una longitud total de 3961 pb. El carril número 3 corresponde al plásmido purificado de 3380pb, el carril número 4 corresponde al fragmento de PCR del gen 3494 de 581pb. El siguiente gel de agarosa corresponde a una doble digestión. El carril número 5 corresponde a la construcción p3494CHYC-2 digerido con las enzimas de restricción EcoR1 y Sst1. Esta digestión divide a la construcción en el plásmido p-CHYC-2 y a al fragmento del gen CC3494. Finalmente el carril número 6 corresponde al marcador de peso molecular λ -Hind III. En el panel F, se muestran las células de la cepa que expresa la proteína de fusión observadas en campo claro. En el panel G se muestra la fotografía de las mismas células que en el panel F, observadas con el mismo microscopio, pero con

epifluorescencia. Las estrellas blancas señalan los polos prostecados con la conspicua fluorescencia en éste .

5) La localización preferencial de CC3494 a la prosteca se da durante el proceso de diferenciación.

El seguimiento del patrón de fluorescencia durante el ciclo celular en células sincronizadas demostró que la fluorescencia está presente durante todo el ciclo celular (figura 24). Cuando la bacteria es una célula flagelada y móvil, la localización de la proteína parece ser homogénea a lo largo del cuerpo celular. Conforme se va diferenciando hacia la fase de célula prostecada sésil, la proteína empieza a ubicarse preferencialmente en el polo prostecado, sin dejar de estar presente en el cuerpo celular. Justo cuando la célula se va a dividir, la proteína se acumula en el polo viejo o polo prostecado. La nueva célula que será liberada al medio, no presenta una fluorescencia tan conspicua como la de su progenitora.

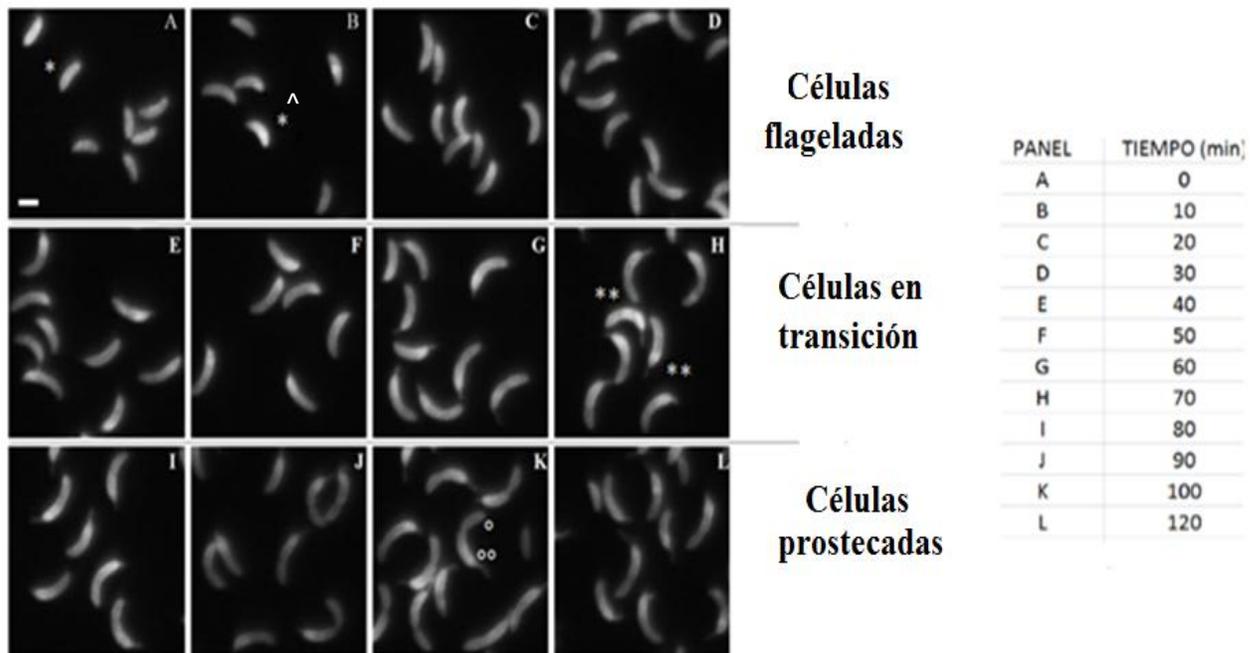
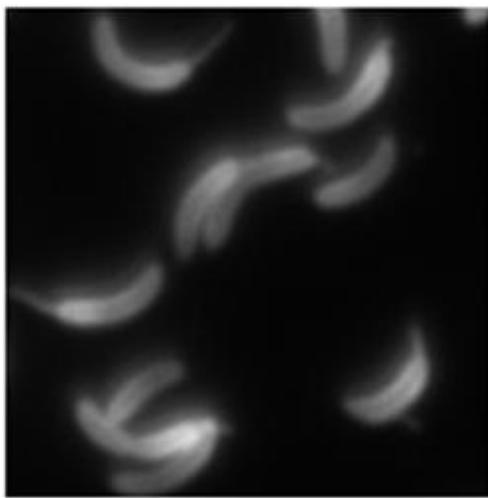
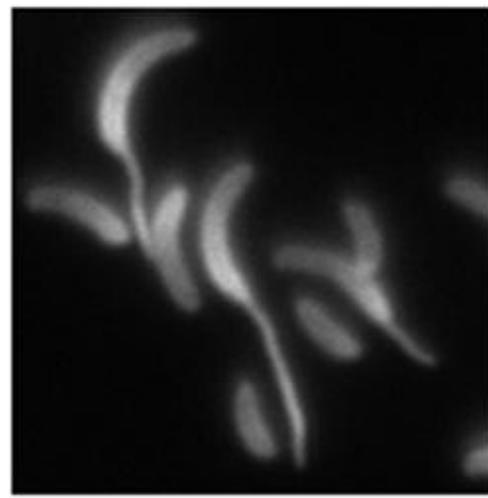


Figura 24. Distribución de la proteína CC3494-mCherry durante el ciclo celular. Se muestran tres hileras de imágenes, la primera representa a las células flageladas y móviles, el segundo muestra a las células que se están diferenciando de células móviles a células sésiles, el tercer panel muestra células sésiles prostecadas. La fluorescencia emitida por la CC3494-mCherry es visible durante todo el ciclo celular. En los subpaneles A y B (*) la fluorescencia parece ser homogénea en todo el cuerpo celular. La acumulación de la proteína se evidencia justo antes de que la división comience en el subpanel H (**), en el subpanel K se observa que la célula hija emite menos fluorescencia (°) que la célula progenitora (°°).

Finalmente dado que la proteína se acumula en el polo prostecado se decidió determinar si esta proteína se acumula también en la prosteca. En las imágenes obtenidas de células crecidas en medio con concentraciones altas de fosfatos (M2G), las prostecas son de un tamaño reducido y no parece haber una acumulación de la proteína en esta estructura. Sin embargo, se decidió determinar el patrón de fluorescencia de células crecidas en condiciones de limitación de fosfatos (medio M5GG), que induce el crecimiento de la prosteca. Como se puede observar en la figura 25, las células crecidas en bajos fosfatos presentaron prostecas más grandes en las que parece acumularse CC3494-mCherry en una mayor proporción que en las prostecas de células crecidas en altos fosfatos.



Sin condición de estrés



En condición de estrés

Figura 25. Fotomicrografías de epifluorescencia de células expresando el gen *CC3494-mCherry* en condiciones normales y de bajos fosfatos. Células prostecadas crecidas bajo condiciones sin estrés (panel izquierdo) y en condiciones de bajos fosfatos o con estrés (panel derecho). Ambos grupos de células se encuentran en la misma fase (células prostecadas). Es importante señalar que la fluorescencia emitida es mayor en condiciones de estrés que en condiciones normales. (Fotografías a 1000X con aceite de inmersión).

G Discusión

En este trabajo se investigó si la hipótesis sobre la existencia de una proteína en *C. crescentus* con una estructura similar a OmpA de *Escherichia coli* era correcta. De acuerdo con los resultados del programa Pfam en el genoma de *C. crescentus* sólo hay seis proteínas con un dominio carboxilo terminal de OmpA. Este dominio podría permitir a las proteínas interactuar con la pared de peptidoglicano. El análisis de los dominios conservados de estas proteínas mostró que únicamente CC3494 y CC0747 presentan una región transmembranal putativa de ME, sugiriendo que estas dos proteínas son los mejores candidatos para representar a OmpA en *C. crescentus*. Posteriormente, mediante un análisis de BlastP discernimos entre CC3494 y CC0747 por su similitud con OmpA de *E. coli*. El puntaje total (total score) en el análisis BlastP, demostró una mayor similitud entre OmpA y el gen CC3494, que entre OmpA y el gen CC0747. Adicionalmente los niveles de expresión de CC3494 determinados en experimentos de microarreglos también soportan el posible papel de esta proteína en la estabilidad de la ME (McGrath, P. T., 2007). La predicción con PRED-TMBB evidencia características que comparten las proteínas OmpA de *E. coli* y la codificada por el gen CC3494 de *C. crescentus*. La característica más sobresaliente es la predicción de ocho tramos transmembranales en el extremo amino terminal y una región que comprende al extremo carboxilo terminal en contacto con el espacio periplasmático, así como la presencia de una larga secuencia de prolinas que podrían ser la conexión entre el barril β transmembranal y el dominio que interactúa con el sáculo de peptidoglicanos.

La localización de la proteína de fusión CC3494-mCherry en la prosteca cuando las células fueron crecidas en bajas concentraciones de fosfatos sugiere que esta proteína es relevante para la estabilidad o función de la prosteca. La prosteca funciona como un apéndice de la bacteria para separarse de la superficie y mantenerla adherida al sustrato lo cual es de particular importancia en la formación de biopelículas o bajo condiciones de estrés. Al alargarse, la prosteca necesita ser más resistente para que la célula no pierda su anclaje al sustrato ni la capacidad de replicarse. Entonces, si la proteína codificada por el gen CC3494 tiene un papel estructural, por la localización de ésta, el papel estructural debe ser especialmente importante en la prosteca (quizá no única pues también se localiza en el cuerpo celular). Esta hipótesis sustentaría en parte la localización en la prosteca y el polo prostecado y el incremento de su concentración en la prosteca cuando esta se alarga en condiciones de bajos fosfatos.

Por otro lado, si la prosteca está involucrada en la toma de nutrimentos, entonces el repertorio de proteínas presentes en esta estructura debería ser consistente con esta función (Wagner, J. K. et. al., 2007). Las proteínas requeridas para la estabilidad, localización y nutrición en la prosteca deben de estar localizadas principalmente en el polo donde ésta se desarrollará, antes o durante su formación. La segunda hipótesis es que, de acuerdo a su localización en la prosteca y polo prostecado, esta proteína podría ser parte de algún complejo hipotético, cumpliendo con un rol de nutrición a través de la prosteca actuando como proteína receptora o como parte de un complejo proteico sosteniendo a algún receptor a través de las membranas celulares (Wagner, J. K. et. al., 2007).

Respecto a la localización diferencial durante el ciclo celular, se observó que mientras la replicación esta inhibida, la proteína codificada por el gen CC3494 se distribuye homogéneamente por el cuerpo celular. En contraste, las células que están replicando el cromosoma y están sintetizando la prosteca tienen una fluorescencia aumentada en el polo prostecado y la prosteca misma. Aún no se sabe qué promotor es responsable de la transcripción del gen CC3494, sin embargo sería importante saber si se encuentra bajo algún promotor regulado durante el ciclo celular.

H Conclusiones

Caulobacter crescentus expresa seis genes que codifican para proteínas con el dominio carboxilo terminal de OmpA. Dos de ellos presentan regiones transmembranales putativas de ME. De éstos, CC3494 codifica para la proteína con una mayor similitud a OmpA de *E.coli*.

Las similitudes entre la proteína expresada por el gen CC3494 de *Caulobacter crescentus* y OmpA de *Escherichia coli* (longitud y número de tramos transmembranales y vueltas) resaltan la conservación del barril β y de las vueltas extramembranales de la proteína a lo largo del linaje de las bacterias Gram negativas.

La proteína expresada por este gen es conspicua en la prosteca, aunque presenta cambios en su localización durante el ciclo celular: es homogénea en el cuerpo de la célula flagelada móvil, contrariamente, en la célula prostecada sésil se acumula en el polo prostecado y en la misma prosteca

I Literatura citada

- Arora A., Rinehart D., Szabo G., Tamm L.K. (2000). Refolded Outer Membrane Protein A of *Escherichia coli* forms ion channels with two conductance states in planar lipid bilayers. **J. Biol. Chem.** **275**: 1594-1600
- Babu, M. M., Priya, M. L., Selvan, A. T., Madera, M., Gough, J., Aravind, L., & Sankaran, K. (2006). A Database of Bacterial Lipoproteins (DOLOP) with Functional Assignments to Predicted Lipoproteins. **J. Bacteriol** **188(8)**: 2761–2773.
- Behr, M.G., Schnaitmas C.A., & Pugsley A.P. (1980). Major Heat-Modifiable Outer Membrane Protein in Gram-Negative Bacteria: Comparison with the OmpA Protein of *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.** **143(2)**: 906-913.
- Bodenmiller, D., Toh, E., & Brun, Y. V. (2004). Development of Surface Adhesion in *Caulobacter crescentus*. **J. Bacteriol.** **186(5)**: 1438–1447.
- Bond J.P., Feraldo-Gómez J.D., Sansom M.S. (2002). OmpA: a pore or not a pore? Simulation and modeling studies. **Biophys. J.** **83**: 763-775
- Bowers, L., Shapland E., Ryan K. (2008) Who's in charge here? Regulating cell cycle regulators. **Curr Opin Microbiol**: **6**: 547-552
- Curtis, P. D., & Brun, Y. V. (2010). Getting in the loop: regulation of development in *Caulobacter crescentus*. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** **74(1)**: 13–41.
- Debnath, D. K., & Otzen, D. E. (2010). Cell-free synthesis and folding of transmembrane OmpA reveals higher order structures and premature truncations. **Biophys Chem.** **152(1-3)**, 80–8.
- Dramsı, S., Magnet, S., Davison, S., & Arthur, M. (2008). Covalent attachment of proteins to peptidoglycan. **FEMS Microbiol. Rev.** **32(2)**: 307–20.
- Hong, H., Szabo G., Tamm L.K. (2006). Electrostatic couplings in OmpA ion-channel gating suggest a mechanism for pore opening. **Nat. Chem. Biol.** **2**: 627-635
- Gerding, M. A, Ogata, Y., Pecora, N. D., Niki, H., & De Boer, P. a J. (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*. **Mol. Microbiol.** **63(4)**: 1008–25.

- Ireland, M. M. E., Karty, J. a, Quardokus, E. M., Reilly, J. P., & Brun, Y. V. (2002). Proteomic analysis of the *Caulobacter crescentus* stalk indicates competence for nutrient uptake. **Mol. Microbiol.** **45(4)**: 1029–41
- Judd, E. M., Comolli, L. R., Chen, J. C., Downing, K. H., Moerner, W. E., & Mcadams, H. H. (2005). Distinct Constrictive Processes , Separated in Time and Space , Divide *Caulobacter* Inner and Outer Membrane. **J. Bacteriol.** **187(20)**: 6874–6882.
- Koebnik, R., Locher, K. P., & Van Gelder, P. (2000). Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. **Mol. Microbiol.** **37(2)**: 239–53.
- Lam H., Schofield W.B., & Jacobs-Wagner C. (2006). A Landmark Protein Essential for Stablishing and Perpetuation the Polarity of a Bacterial Cell. **Cell.** **124(5)**: 1011-23.
- Luirink, J., Yu, Z., Wagner, S., & De Gier, J.-W. (2012). Biogenesis of inner membrane proteins in *Escherichia coli*. **Biochim. Biophys. Acta.** **1817(6)**: 965–76.
- Martin, M. E., & Brun, Y. V. (2000). Coordinating development with the cell cycle in *Caulobacter*. **Curr. Opin. Microbiol.** **3(6)**: 589–95.
- McGrath, P. T., Lee, H., Zhang, L., Iniesta, A. a, Hottes, A. K., Tan, M. H., Hillson, N. J. (2007). High-throughput identification of transcription start sites, conserved promoter motifs and predicted regulons. **Nat. biotechnol.** **25(5)**: 584–92.
- Michael T. Mandigan, John M. Martinko, J. P. (2003). *Biología de los microorganismos* (10o ed., p. 1011). Pearson. Prentice Hall.
- Negoda, A., Negoda, E., & Reusch, R. N. (2011) . Resolving the native conformation of *Escherichia coli* OmpA. **FEBS J.** **277(21)**: 4427–4437.
- Nierman, W. C., Feldblyum, T. V, Laub, M. T., Paulsen, I. T., Nelson, K. E., Eisen, J. a, Heidelberg, J. F. (2001). Complete genome sequence of *Caulobacter crescentus*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** **98(7)**: 4136–41.
- Pautsch, a, & Schulz, G. E. (1998). Structure of the outer membrane protein A transmembrane domain. **Nat. Struct. Biol.** **5(11)**: 1013–7.
- Poindexter, J. S. (2006). *The Prokaryotes*. (M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, & E. Stackebrandt, Eds.): 72–90.
- Schaechter M. (2009). *Encyclopedia of Microbiology*. **Elsevier**. 3era edición

- Schlimpert, S., Klein, E. A., Briegel, A., Hughes, V., Kahnt, J., Bolte, K., Maier, U. G., et al. (2012). General Protein Diffusion Barriers Create Compartments within Bacterial Cells. **Cell**. **151(6)**:1270-82
- Schofield, W.B., Lim H.C., & Jacobs-Wagner, C. (2010). Cell cycle coordination and regulation of bacterial chromosome segregation dynamics by polarly localized proteins. **EMBO J**. **29(18)**: 3068-81.
- Silhavy, T. J., Kahne, D., & Walker, S. (2010). The bacterial cell envelope. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**. **2(5)**: a000414.
- Sly, L. I., Cox, T. L., & Beckenham, T. B. (1999). The phylogenetic relationship of *Caulobacter Asticcacaulis* and *Brevundimonas* species and their taxonomic implications. **Int. J. Syst Bacteriol**: 483–488.
- Smith, S. G. J., Mahon, V., Lambert, M. a, & Fagan, R. P. (2007). A molecular Swiss army knife: OmpA structure, function and expression. **FEMS Microbiology Lett**. **273(1)**: 1–11.
- Sonntag, I., Schwarz, H., Hirota, Y., & Henning, U. L. F. (1978). Cell Envelope and Shape of *Escherichia coli* : Multiple Mutants Missing the Outer Membrane Lipoprotein and Other Major Outer Membrane Proteins Lpp. **J. Bacteriol**. **136(1)**: 280–285.
- Sugawara E., Nikaido H. (1992). Pore-forming activity of OmpA protein of *Escherichia coli*. **J. Biol. Chem**. **267**: **2507-2511**
- Sperandeo, P., Dehò, G., & Polissi, A. (2009). The lipopolysaccharide transport system of Gram-negative bacteria. **Biochim. Biophys. Acta**, **1791(7)**: 594–602.
- Takacs, C.N., Poggio S., Charbon G., Pucheault M., Vollmer W., & Jacobs-Wagner C. (2010). MreB Drives De Novo Rod Morphogenesis in *Caulobacter crescentus* via Remodeling of the Cell Wall. **J. Bacteriol**, **192(6)**:1671-1684.
- Thanbichler, M., Iniesta, A. a, & Shapiro, L. (2007). A comprehensive set of plasmids for vanillate- and xylose-inducible gene expression in *Caulobacter crescentus*. **Nucleic Acids Res.**, **35(20)**:137.
- Vollmer, W., & Bertsche, U. (2008). Murein (peptidoglycan) structure, architecture and biosynthesis in *Escherichia coli*. **Biochim. Biophys. Acta**. **1778(9)**: 1714–34.
- Wagner, J. K., & Brun, Y. V. (2007). Out on a limb: how the *Caulobacter* stalk can boost the study of bacterial cell shape. **Molecular Microbiol**. **64(1)**: 28–33.

- Wang, Y. (2002). The function of OmpA in Escherichia coli. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **292(2)**: 396–401.
- Wimley, W. C. (2003). The versatile β -barrel membrane protein. **Curr. Opin. Struct. Biol.** **13(4)**: 404–411.
- Yakushi, T., Tajima, T., Matsuyama, S., Tokuda, H., Yakushi, T., Tajima, T., & Matsuyama, S. (1997). Lethality of the covalent linkage between mislocalized major outer membrane lipoprotein and the peptidoglycan of Escherichia coli. **J. Bacteriol.** **179(9)**: 2857-2862
- Yeh, Y.-C., Comolli, L. R., Downing, K. H., Shapiro, L., & McAdams, H. H. (2010). The caulobacter Tol-Pal complex is essential for outer membrane integrity and the positioning of a polar localization factor. **J. Bacteriol.** **192(19)**: 4847–58.

Recursos en línea

- Punta M., Coghill P.C., Eberhardt R.Y., Mistry J., Tate C., Bournsnell. N., Pang K., Forslund G., Ceric J., Clements A., Holm E.L., Sonnhammer S.R., Eddy A., Bateman R.D. (2012). The Pfam protein families database. Sanger Institute. **Nucleic Acid Res. Database Issue.** **40:D290- D301**. Página de internet: <http://pfam.sanger.ac.uk/>. Periodo de consulta: enero 2012- mayo 2013
- Geer L.Y., Marchler-Bauer A., Geer R.C., Han L., He S., Shi W., Bryant S.H. (2010). The NCBI Biosystems database. **Nucleic Acid Res. Database issue: D492-6**. Página de internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Periodo de consulta: enero 2012- mayo 2013
- Bagos P.G., Liakopoulos T.D., Spyropoulos I.C., Hamodrakas S.J. (2004) PRED-TMBB: web server for predicting the topology of beta-barrel outer membrane proteins. **Nucleic Acids Res: w400-404**. Página de internet: <http://biophysics.biol.uoa.gr/PRED-TMBB/> Périodo de consulta: Enero- Mayo 2013