



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Determinación de la localización de los receptores  
dependientes de TonB y de las proteínas TonB en  
*Caulobacter crescentus***

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**Biólogo**

**P R E S E N T A:**

**Sebastian Arriaga Astorga**



**DIRECTOR DE TESIS:  
Doctor Sebastian Poggio Ghilarducci  
2015**

**México, D.F.**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

1. Datos del alumno

Arriaga

Astorga

Sebastian

58 46 06 55

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

No. De cuenta 411004543

2. Datos del tutor

Doctor

Sebastian

Poggio

Ghilarducci

3. Datos del sinodal 1

Doctor

Saúl

Cano

Colín

4. Datos del sinodal 2

Doctora

Laura

Kawasaki

Watanabe

5. Datos del sinodal 3

Doctora

Claudia Andrea

Segal

Kischinevsky

6. Datos del sinodal 4

Maestra en Ciencias

Suri Karina

Martínez

Yee

## ÍNDICE

<b>Resumen</b>	<b>3</b>
<b>Introducción</b>	<b>4</b>
Célula bacteriana	4
Envoltura celular	4
Proteínas de membrana externa	5
Receptores dependientes de TonB	6
Regulación de la expresión de TBDR	8
Complejo TonB-ExbB-ExbD	9
Interacción de TonB y los TBDR	10
Mecanismo de acción de TonB	11
Movimiento del dominio globular en los TBDR	13
<i>Caulobacter crescentus</i>	13
Generalidades	13
La prosteca en <i>Caulobacter crescentus</i>	15
Funciones de la prosteca	16
La prosteca no cuenta con proteínas citoplasmáticas ni de membrana interna	16
Proteínas presentes en la prosteca	18
TBDR en <i>Caulobacter crescentus</i>	20
<b>Hipótesis y objetivos</b>	<b>23</b>
<b>Materiales y métodos</b>	<b>24</b>
<b>Resultados</b>	<b>35</b>
<b>Discusión</b>	<b>49</b>
<b>Conclusiones y perspectivas</b>	<b>53</b>
<b>Anexo</b>	<b>54</b>
<b>Referencias</b>	<b>56</b>

## RESUMEN

Para el transporte de nutrientes del medio al espacio periplásmico de la célula, las bacterias Gram negativas cuentan con receptores dependientes de TonB (TBDR por sus siglas en inglés) y el complejo de proteínas TonB-ExbB-ExbD. Los TBDR son proteínas presentes en la membrana externa que constan de un Barril  $\beta$  con 22 hebras  $\beta$  antiparalelas y un dominio globular en el interior del Barril que bloquea el paso de moléculas. Su función principal es el transporte de sideróforos, vitamina B12 y sustratos que se encuentran en bajas concentraciones en el medio o que son demasiado grandes para ser transportados por porinas (Balado, 2009). El proceso de transporte de sustratos a través de los TBDR, involucra un cambio estructural del Barril  $\beta$  y el movimiento del dominio globular, dichos cambios requieren energía. Al no haber fuentes de energía disponibles en la membrana externa o en el periplasma, se debe de transmitir la fuerza protón motriz generada en la membrana interna, hasta el TBDR en la membrana externa, dicha transmisión es llevada a cabo por el complejo TonB-ExbB-ExbD y se efectúa al interactuar la región C-terminal de la proteína TonB con la región denominada 'caja TonB' en el extremo N-terminal del dominio globular del TBDR (Braun, 1995).

*Caulobacter crescentus* es una alfa-proteobacteria, Gram-negativa, oligótrofa que habita ambientes acuáticos. Una característica distintiva de este organismo es su ciclo de vida asimétrico, en el que se pueden encontrar dos morfotipos principales: una célula nadadora, que es motil, contiene un flagelo y múltiples pili en un solo polo de la célula; y una célula prostecada, que es sésil y en la que el flagelo ha sido remplazado por una extensión delgada de la envoltura celular, llamada prosteca, que en su extremo cuenta con una estructura llamada 'sujetador' que le permite adherirse al sustrato (Curtis, 2010). La prosteca no cuenta con componentes citoplasmáticos ni de membrana interna, sin embargo, es rica en proteínas de membrana externa, entre las cuales predominan los TBDR (Cao, 2012). Su función se ha relacionado con la toma de nutrientes, en especial de fosfatos, que en cantidades limitadas provocan su elongación (Ireland, et al. 2002).

En este trabajo se corroboró experimentalmente la localización de los receptores dependientes de TonB en la prosteca de *Caulobacter crescentus* y se determinó si la proteína TonB del complejo TonB-ExbB-ExbD, se encuentra en dicha estructura de la bacteria. Para lograrlo se elaboraron proteínas fluorescentes de tres de los TBDR que tienen una mayor expresión a lo largo del ciclo celular de la bacteria (cc1750, cc2819 y cc0210) y de tres proteínas propuestas como TonB (TonB1, TonB2 y TonB3), estas construcciones se expresaron en *C. crescentus*. El análisis con microscopía de epifluorescencia y por western blot de las cepas elaboradas corroboró la presencia del TBDR cc1750 en la prosteca y la presencia de la proteína propuesta como TonB1 en la estructura. Los datos obtenidos sugieren que en la prosteca de *C. crescentus* es posible que ocurra el transporte activo de nutrientes.

## **INTRODUCCIÓN**

### **Célula bacteriana**

Las funciones metabólicas de las células procariontes, como las bacterias, se llevan a cabo en el citoplasma o en la membrana citoplasmática. En el grupo de de las bacterias hay una gran variedad de características morfológicas, tamaños, estructuras, procesos metabólicos, fuentes nutricionales, entre otras (Forbes, 2009). Uno de los rasgos más distintivos de gran parte de las numerosas especies de bacterias, es la presencia de la pared celular. Esta estructura semirígida rodea a la membrana citoplasmática, confiriendo estabilidad a la célula ante los cambios del medio en el que habita. Tiene numerosas funciones como el conferir rigidez y forma, proteger a la célula de cambios osmóticos, el anclaje de flagelos, entre otras propiedades que le han permitido a las células bacterianas establecerse y proliferar en diversos medios (Tortora, 2007).

### **Envoltura celular**

Basados en las diferencias estructurales que se pueden encontrar en la envoltura celular de las bacterias, éstas se pueden dividir en dos grandes grupos, las Gram positivas y las Gram negativas (figura 1).

En las Gram-positivas, la envoltura celular consiste fundamentalmente de la membrana citoplasmática y la pared celular, la cual se compone principalmente de peptidoglicano, un disacárido que contiene dos derivados de azúcar: N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico, que se unen por cadenas peptídicas cortas (Parija, 2009).

La pared en las bacterias Gram positivas tiene un gran grosor (de aproximadamente 80 nm), la mayor parte de esta pared está formada por numerosas capas de peptidoglicano. Adicionalmente este tipo de paredes contienen con frecuencia ácido teicóico, una sustancia con importantes funciones antigénicas, de unión para iones de magnesio, entre otras; y el ácido teicurónico, que se sintetiza en lugar del ácido teicóico cuando la concentración de fosfatos en el medio es limitada. También se pueden encontrar otros componentes como polisacáridos de manosa, arabinosa y glucosamina (Parija, 2009).

En las bacterias Gram negativas la envoltura celular se compone de una membrana bilipídica externa, cuya lámina exterior está compuesta por lipopolisacáridos (un glicolípido con importantes funciones biológicas), un espacio periplásmico, en el que se encuentran proteínas que participan en la adquisición de nutrientes, enzimas hidrolíticas, enzimas involucradas en la síntesis de peptidoglicano, entre otras; además de una o dos capas de peptidoglicano (cantidad significativamente menor a la presente en bacterias Gram positivas), que

rodean la membrana interna o citoplasmática. Es importante mencionar que la membrana externa cuenta con numerosas proteínas responsables de la interacción de la bacteria con el medio (Parija, 2009).

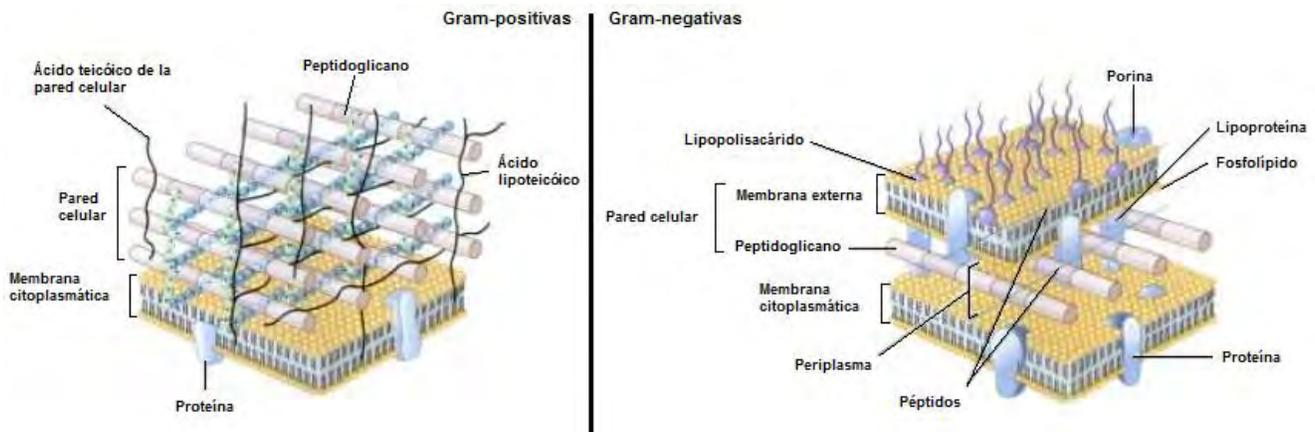


Figura 1. Diferencias estructurales de la envoltura celular en bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (modificado de Tortora, 2007).

### Proteínas de membrana externa

La membrana externa constituye una barrera contra ciertos antibióticos, enzimas digestivas, detergentes, metales pesados y algunos colorantes. Sin embargo, también tiene la capacidad de permitir el ingreso de ciertas sustancias para cubrir los requerimientos metabólicos y nutricionales de la célula. Gran parte de la captación de dichas sustancias ocurre gracias a la presencia de proteínas que forman canales membranales que permiten el paso de moléculas como nucleótidos, disacáridos, péptidos, aminoácidos, vitamina B<sub>12</sub>, hierro y más (Tortora, 2007; Remaut *et al.* 2014).

Las proteínas que funcionan como canales membranales están formadas por un barril- $\beta$  ensamblado por el complejo BAM (maquinaria de ensamblado de barril  $\beta$ , por sus siglas en inglés). El transporte a través de los barriles- $\beta$  puede o no requerir de energía. Las porinas, por ejemplo, forman un poro permanentemente abierto, a través del cual metabolitos hidrofílicos con masas moleculares de hasta 600 Da se difunden pasivamente (Krewulak *et al.* 2011). Moléculas que funcionan como micronutrientes para la célula y que se encuentran en muy bajas concentraciones en el medio extracelular, o cuya masa molecular es demasiado grande para difundir a través de las porinas, requieren del transporte activo llevado a cabo por otro tipo de proteínas también presentes en la membrana externa, llamadas receptores dependientes de TonB (TBDR por sus siglas en inglés) (Wiener *et al.* 2005).

## Receptores dependientes de TonB

Los receptores dependientes de TonB (TBDR) son de suma importancia en las bacterias Gram negativas. Una búsqueda bioinformática en los genomas publicados disponibles, reveló la presencia de 4,600 receptores putativos distribuidos en 346 especies, los cuales fueron divididos en 195 clusters, basados en la similitud de las secuencias (Krewulak *et al.* 2011). El análisis de la estructura de los TBDR, ha demostrado que están formados por un barril  $\beta$  con 22 hebras  $\beta$  antiparalelas, y se distinguen de las porinas por la presencia de un dominio globular en el extremo N-terminal (figura 2), que al estar en el interior del barril- $\beta$ , lo cierra en el lado periplásmico. Los sitios de ligación al sustrato en los TBDR, están formados por residuos en la región extracelular del dominio globular, en las paredes del barril- $\beta$  y en las asas extracelulares de este mismo (Noinaj *et al.* 2010).

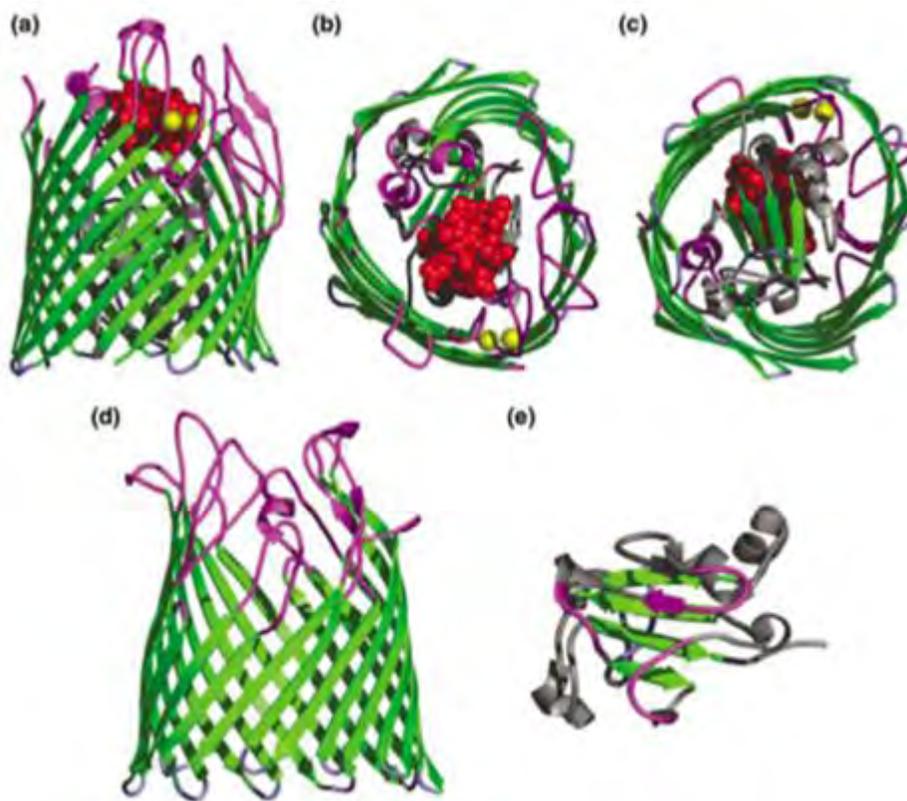


Figura 2. Estructura del TBDR BtuB, encargado de transportar vitamina B<sub>12</sub>. **(a)** En verde se muestra el barril  $\beta$ , las asas extracelulares del barril y las asas apicales del dominio globular se muestran en magenta, los giros cortos del lado periplásmico del barril y de la caja TonB se muestran en azul, la vitamina B<sub>12</sub> está representada en rojo y dos átomos de calcio (para lograr una unión de alta afinidad), se muestran en amarillo. **(b)** Vista superior (lado extracelular) del TBDR unido a su sustrato. **(c)** Vista inferior (lado periplásmico) del TBDR unido a



Figura 3. Representación esquemática del transporte de diversos sustratos mediante TBDR (BtuB) en la membrana externa, el complejo TonB-ExbB-ExbD de color azul verde y rojo en la membrana citoplasmática, y un transportador ABC, conformado por BtuF (proteína periplásmica de unión al sustrato, que se muestra con y sin unión a la vitamina B<sub>12</sub>), BtuC y BtuD. También se muestra la interacción del dominio C-terminal de TonB con el dominio globular del TBDR (modificado de Krewulak *et al.* 2011).

Los TBDR principalmente se encargan del transporte de compuestos férricos, como sideróforos, que son péptidos de bajo peso molecular (de 0.5 – 1 kDa), sintetizados y secretados al medio extracelular por microorganismos, que actúan como solubilizadores de hierro a partir de compuestos minerales u orgánicos. Una vez que el sideróforo se ha unido al hierro, es recuperado por el microorganismo gracias a transportadores específicos (como los TBDR). Sin embargo, los TBDR, también son capaces de transportar otros compuestos como la vitamina B<sub>12</sub>, Zinc, quelatos de níquel y carbohidratos (Noinaj *et al.* 2010).

### **Regulación de la expresión de TBDR**

El número de TBDRs codificados en el genoma de cada bacteria es muy variable, la regulación de su expresión depende de distintos mecanismos. Algunos son regulados por sistemas  $\sigma$ /anti- $\sigma$ , o sRNAs. En muchas bacterias en las que los TBDRs están involucrados en la toma de hierro, la expresión está regulada por el represor transcripcional Fur (regulador de la captación de hierro). En presencia de hierro, Fur se une a regiones del DNA llamadas cajas Fur usando el Fe<sup>2+</sup> como cofactor, provocando que se reprima la expresión de docenas de genes. Cuando el hierro no es abundante en el medio, Fur no puede unirse al DNA, permitiendo la expresión de los genes antes reprimidos, que codifican para transportadores de hierro, proteínas relacionadas con la síntesis de sideróforos y el metabolismo de hierro (Noinaj *et al.* 2010).

Un caso similar se encuentra en *Helicobacter pylori*, donde la síntesis del transportador de níquel FrpB4, se ve reprimida por el regulador transcripcional sensible al níquel, NikR. Por otra parte, en *Caulobacter crescentus*, la regulación de la proteína de membrana externa MalA, un TBDR necesario para la toma de maltosa del medio, es inducida por la presencia de maltosa (Noinaj *et al.* 2010).

La expresión de otros TBDRs, como BtuB en *Escherichia coli*, cuyo sustrato es la vitamina B<sub>12</sub>, es regulada por un *riboswitch*. Los *riboswitches* consisten en regiones de RNA no traducidas que cambian su conformación tras la unión específica con pequeñas moléculas (ligandos). Usualmente, se ubican en el extremo 5' de mRNAs y el cambio conformacional inducido por el ligando afecta positiva o negativamente la traducción de los genes río abajo. En el caso de la expresión de BtuB, en el extremo 5' del RNAm de BtuB, se logró mapear un tramo de 241 nucleótidos sin traducir, que resulta necesario para la expresión de BtuB. Varios estudios han sugerido que

la vitamina B<sub>12</sub> y la adenosilcobalamina funcionan como ligandos, que al unirse al tramo de mRNA de BtuB, provocan el cambio conformacional que resulta en la inhibición de su traducción (Noinaj *et al.* 2010).

### Complejo TonB-ExbB-ExbD

Como ya se mencionó, el complejo TonB-ExbB-ExbD es el responsable de la transmisión de la energía de la fuerza protón motriz de la membrana interna a los TBDR en la membrana externa. Una vez que algún sustrato se une al TBDR, éste sufre un cambio conformacional que aumenta la afinidad por la proteína TonB (Wiener *et al.* 2005).

En *E. coli*, ExbB es una proteína de membrana interna de 25 kDa, cuenta con tres dominios transmembranales helicoidales, la mayor parte de su dominio hidrofílico reside en el citoplasma. ExbD tiene una masa molecular de 17 kDa, el extremo N-terminal se encuentra en un dominio transmembranal helicoidal anclado a la membrana interna. El dominio hidrofílico que comprende al extremo C-terminal se encuentra en el periplasma (Krewulak *et al.* 2011).

TonB tiene una masa molecular de 26 kDa. Cuenta con tres dominios funcionales, el primero es el dominio N-terminal que va del residuo 1 al 32, que contiene una hélice  $\alpha$  transmembranal. El segundo dominio funcional (que va del residuo 66 al 102), es un espaciador rico en prolina, localizado en el periplasma. Más allá de la región rica en prolina, se encuentra otra región que va del residuo 103 al 149, que se sugiere, le confiere flexibilidad a TonB, permitiéndole extenderse a través del espacio periplásmico. El último dominio funcional abarca del residuo 150 al 239 y conforma el dominio C-terminal, que resulta esencial para la interacción con los TBDR (figura 4) (Krewulak *et al.* 2011).

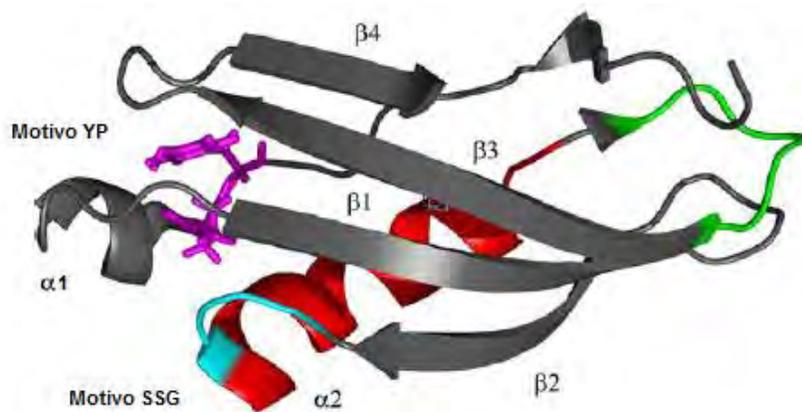


Figura 4. Estructura del dominio carboxilo terminal de TonB.  $\beta$ 1-4 muestran las láminas  $\beta$  y  $\alpha$ 1 y 2 muestran las hélices  $\alpha$  en el dominio. En magenta se muestra el dominio YP, cuya tirosina entra en contacto con la caja TonB

del receptor de membrana externa al interactuar. En rojo se muestra la hélice anfipática (cuya parte interna es no polar mientras que la externa es polar). En verde se muestra la región del asa de longitud variable que se encuentra entre la hélice  $\alpha_2$  y la lámina  $\beta_3$ . En azul se muestra el motivo SSG, que se encuentra muy próximo al receptor de membrana externa, por lo que probablemente juega un papel importante en el reconocimiento del receptor (modificado de Byron *et al.* 2007).

### **Interacción de TonB y los TBDR**

El dominio globular presente en los TBDR debe interactuar con la proteína TonB del complejo TonB-ExbB-ExbD para realizar el cambio conformacional, que permita el paso del sustrato a través del barril- $\beta$  del TBDR. Dicho dominio globular contiene una secuencia de aproximadamente 7 aminoácidos denominada 'caja TonB' que, tras la unión de un sustrato, es expuesta hacia el lado periplásmico para llevar a cabo la interacción con el dominio C-terminal de TonB (Krewulak *et al.* 2011; Noinaj *et al.* 2010).

En BtuB, se ha logrado ver que al unirse el sustrato, la región caja TonB se despliega y adquiere una flexibilidad que le permite hacer contacto con TonB. El análisis de numerosos TBDR, ha revelado que el contacto entre estas proteínas, también involucra la formación de estructuras que asocian físicamente la TonB box y el extremo C-terminal de TonB y que hacen posible la interacción (Krewulak *et al.* 2011).

En FhuA (un TBDR presente en *E. coli*), se ha documentado la formación de una interproteína con hebras  $\beta$  entre la región de la caja TonB y la lámina  $\beta$  central de TonB, creando una lámina con 4 hebras  $\beta$ . Una estructura similar a ésta se ha observado en BtuB, donde se forma una hebra  $\beta$  paralela entre la caja TonB y la lámina de tres hebras  $\beta$  de TonB. La formación de esta estructura caja TonB-TonB, involucra la presencia de enlaces de hidrógeno entre los residuos de la caja TonB (residuos 6 a 12) y los de TonB (residuos 226 a 223), aunque sólo en los residuos con número par se formarán dichos enlaces de hidrógeno (Krewulak *et al.* 2011).

Adicionalmente a la estructura mencionada en el párrafo anterior, tanto en BtuB como en FhuA, se ha determinado la formación de un puente salino durante la interacción con TonB, éste puente se forma entre un residuo conservado de arginina de TonB (Arg 158 para BtuB y Arg 166 para FhuA) y el aspartato 7 en caso de BtuB, y el glutamato 56 en FhuA. Se piensa que la formación de este puente, es importante para llevar a cabo una interacción de larga duración entre el TBDR y TonB, además de que puede actuar como el punto de nucleación en el que se cataliza la formación de la lámina  $\beta$  intermolecular (Krewulak *et al.* 2011).

## Mecanismo de acción de TonB

El mecanismo de acción de TonB no ha sido aclarado, sin embargo existen 4 modelos que proponen un mecanismo de cómo la interacción de TonB con los TBDR da como resultado el transporte de sustratos. Los modelos son: el modelo de la hélice propulsora (*propeller model*), el modelo lanzadera (*shuttle model*), el modelo de tracción (*pulling model*) y el modelo asistido por proteína de unión periplásmica (*periplasmic binding protein-assisted model*) (Krewulak *et al.* 2011).

En el modelo de la hélice propulsora, la propuesta se basó en la homología existente entre las proteínas ExbB/ExbD y las proteínas del motor flagelar MotA y MotB. Según este modelo, las proteínas ExbB-ExbD generan el movimiento rotacional de TonB, usando el gradiente de protones que va a través de la membrana interna. Dicha rotación induce el cambio conformacional o la expulsión del dominio globular del TBDR, que permite la translocación del sustrato hacia el periplasma (Letain *et al.* 1997). Para que esto pueda ocurrir, TonB debe funcionar como un dímero, lo cual ha sido observado para FhuA de *E. coli* (Sauter *et al.* 2003), en donde se estableció que la estequiometría de TonB-FhuA es de 2 : 1 (Khursigara *et al.* 2004); sin embargo, otros estudios demostraron que para este mismo TBDR, la expresión de un dominio C-terminal ligeramente más largo en TonB, hace que no actúe como dímero sino como un monómero, que también resulta funcional (Koedding *et al.* 2003; Peacock *et al.* 2005).

Además, al comparar las estructuras presentes en el motor flagelar y el complejo ExbB/ExbD, se notó que no hay ninguna estructura estacionaria en la membrana interna que evite que ExbB-ExbD roten junto con TonB; en el caso de MotB, esta cuenta con un motivo estructural de unión al peptidoglicano, que la ancla a la pared celular (Krewulak *et al.* 2011).

El modelo de lanzadera propone que ExbB-ExbD usa la fuerza protón motriz para activar a TonB, con lo cual queda en un estado energizado, en el que cruza el periplasma para unirse con el TBDR por medio de la interacción con la caja TonB. Tras esta interacción, TonB se separa de la membrana interna liberando su energía potencial almacenada en su forma conformacional hacia el TBDR, provocando en el dominio globular un cambio conformacional, permitiendo la translocación del sustrato al espacio periplásmico. Este modelo no aclara las diferencias estructurales existentes entre la forma energizada y la forma no energizada de TonB, tampoco explica cómo se da el retorno de TonB a la membrana interna, ni cómo vuelve a interactuar con ExbB-ExbD. Además se ha mencionado que no es termodinámicamente favorable que el dominio hidrofóbico transmembranal de TonB se disocie de la membrana interna y luego se reinserte en ella, aunque también se ha argumentado que la energía para la re inserción, no ocurre por el contacto de TonB con la membrana

interna, sino que proviene del contacto proteína-proteína, al interactuar los dominios transmembranales del complejo ExbB-ExbD y TonB (Krewulak *et al.* 2011).

La base del modelo de tracción se encuentra en estudios de despliegue de proteínas, realizados con IgG y ubiquitina, ya que las moléculas involucradas en estas proteínas son similares a las encontradas en el complejo de láminas  $\beta$  formadas por 4 hebras, que se forma con la interacción de la caja TonB y TonB. El modelo establece que TonB es capaz de ejercer fuerza sobre el complejo formado por la lámina  $\beta$  y el dominio globular. La cantidad de fuerza que TonB debe aportar para que ocurra el despliegue de la lámina  $\beta$ , depende de su orientación respecto al dominio globular, si TonB se encuentra en posición perpendicular, la cantidad de fuerza requerida sería muy baja, de encontrarse en posición paralela, la cantidad tendría que ser mucho mayor (Krewulak *et al.* 2011).

Recientes simulaciones de dinámica molecular dirigida, mostraron *in silico* cómo funcionaría este modelo en el caso de BtuB y TonB. En primer lugar, TonB se extiende a través del periplasma y se une a la 'TonB box' del TBDR. A continuación, TonB ejerce la fuerza sobre el dominio globular que, en respuesta, despliega parcialmente la lámina  $\beta$  y permite la translocación del sustrato. Adicionalmente, este estudio confirmó la presencia de moléculas de agua rodeando el dominio globular que, se sugiere, facilita su separación del barril- $\beta$  (Gumbart *et al.* 2007). Desafortunadamente, este modelo no cuenta con datos *in vivo* que puedan respaldarlo (Krewulak *et al.* 2011).

Por último, el modelo asistido por proteína de unión periplásmica fue propuesto cuando experimentos de diversos tipos, mostraron que TonB es capaz de formar un complejo 1 : 1 con FhuD (proteína de unión a sideróforos en el periplasma). Este modelo propone a TonB como la estructura encargada de presentar a FhuD con el TBDR que le corresponde en la membrana externa (FhuA), con el fin de facilitar la captación de sideróforos. Simultáneamente, TonB interactúa con la caja TonB provocando el cambio conformacional del dominio globular, que permite la translocación del sideróforo al periplasma. Ya unido FhuD a su sideróforo, TonB lo trasfiere a su transportador de membrana interna (FhuBC), para que se lleve a cabo el paso del sideróforo al citoplasma. Un mecanismo similar fue reportado para la vitamina B<sub>12</sub>, en donde se observó la interacción de TonB con BtuF (la proteína de unión de esta vitamina en el periplasma). Aunque este modelo es capaz de explicar la coordinación de la actividad de todas las proteínas involucradas en la translocación de sustratos, no toma en cuenta la energía necesaria para realizar el proceso (Krewulak *et al.* 2011).

## Movimiento del dominio globular en los TBDR

Como ya se ha mencionado en párrafos anteriores, durante el transporte de sustratos a través de los TBDRs el dominio globular, debe de sufrir un cambio conformacional para permitir el paso del sustrato al periplasma. Sin embargo, no se sabe con exactitud qué grado de cambio conformacional debe ocurrir, o si el dominio globular necesariamente tenga que salir en su totalidad del barril- $\beta$ , para dar lugar al transporte (Wiener *et al.* 2005). Se ha observado que para darse el paso de sideróforos, el dominio globular puede adoptar una conformación en la que se crea un poro entre este dominio y la pared interna del barril; los sideróforos tienen un tamaño que permite su paso por dicho poro (Noinaj *et al.* 2010).

Aunque el mecanismo describe el transporte de sustratos pequeños como los sideróforos (0.5 – 1 kDa), no explica cómo se da el transporte de ligandos más grandes, como las colicinas (29 – 69 kDa), bacteriocinas sintetizadas por *E. coli* para eliminar otras cepas de *E. coli* con las que compiten en condiciones de escasez nutricional (Krewulak *et al.* 2011) y cuyo paso al interior de la célula también ocurre a través de la membrana externa. El desplegamiento prácticamente completo del dominio globular sería necesario para permitir el transporte de moléculas tan grandes a través del TBDR. Diversos estudios experimentales y computacionales, sugieren que el dominio globular sale en su totalidad del barril para permitir el transporte; sin embargo, se requieren de más análisis para determinar realmente el grado de desplegamiento y los detalles sobre cómo ocurre el transporte (Noinaj *et al.* 2010).

De cualquier forma en la que ocurra el movimiento del dominio globular, es importante mencionar que diversos experimentos, como el de Gumbart *et al.* 2007, ya antes mencionado han reportado una gran cantidad de moléculas de agua presentes en la interface del dominio globular/barril  $\beta$ , la mayoría de estas moléculas se encuentran solvatando el dominio globular o los dominios del barril, en lugar de participar en la formación de puentes de hidrógeno que están presentes en la unión entre el dominio globular y el barril. Estas moléculas, pueden funcionar como un lubricante para reducir los costos energéticos producidos por el movimiento del dominio globular (Chimento *et al.* 2005).

## ***Caulobacter crescentus***

### **Generalidades**

*Caulobacter crescentus* es una alfa-proteobacteria, Gram-negativa, oligotrófica, que habita en ambientes acuáticos con bajas concentraciones de nutrientes. Esta bacteria ha resultado ser un modelo de estudio muy interesante, debido a que posee un ciclo celular asimétrico (Nierman *et al.* 2001).

*C. crescentus* presenta predominantemente dos morfotipos: las células *swarmer* o nadadoras y las células prostecadas. La célula nadadora es motil por medio de un flagelo polar y presenta múltiples pili en el mismo polo de la célula donde se ubica el flagelo. La célula prostecada es sésil y el flagelo ha sido remplazado por una extensión delgada de la envoltura celular, llamada prosteca, que en su extremo cuenta con una estructura llamada 'holdfast' o sujetador, que le permite adherirse al sustrato (Curtis *et al.* 2010).

En el ciclo celular, una célula prostecada ingresa a la fase S, en este estado la célula es capaz de replicar su material genético y el cuerpo celular sufre un elongamiento, convirtiéndose en una célula predivisional. A continuación, entra a la fase G2, en la que pierde la capacidad de replicar su cromosoma. Desde las últimas etapas de la fase predivisional, un flagelo es sintetizado en el polo opuesto al de la prosteca y una vez que la separación de las células ha ocurrido, se activa la rotación flagelar y los pilis son formados. Al finalizar el ciclo, se obtienen dos células, una prostecada ("célula madre"), que reingresa a la fase S para dividirse de nuevo y una nadadora ("célula hija"), que después de un periodo de tiempo, formará el sujetador, expulsará el flagelo, desensamblará los pili y desarrollará la prosteca en ese mismo polo, diferenciándose en una célula prostecada (Figura 5). Una célula nadadora no es capaz de replicar su cromosoma o llevar a cabo la división celular (Curtis *et al.* 2010).

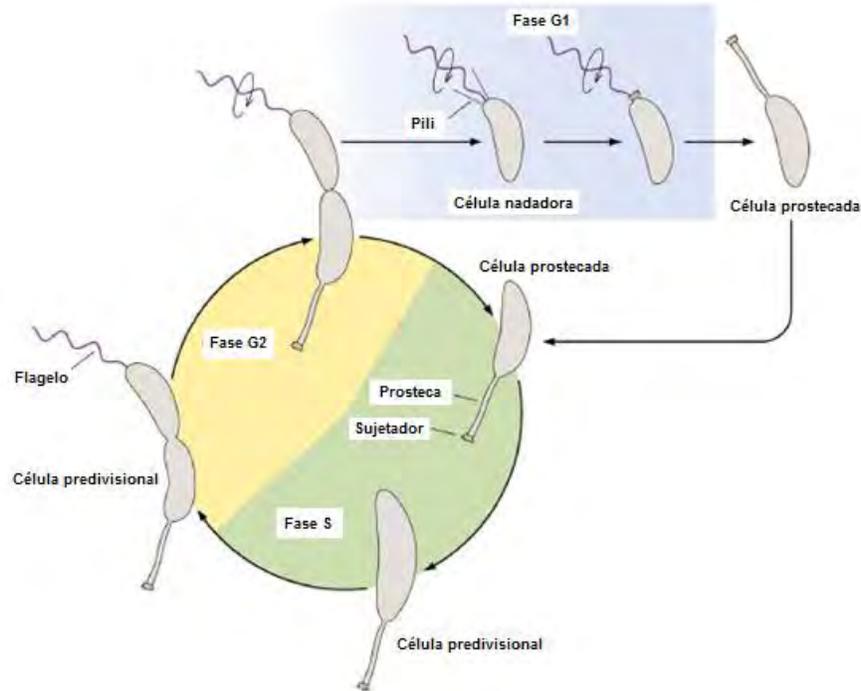


Figura 5. Ciclo celular asimétrico de *Caulobacter crescentus*, caracterizado por la formación de dos tipos principales de células: la prostecada y la nadadora (flagelada). Al entrar en división, la célula prostecada, da lugar a la célula flagelada, que más tarde se convertirá en una célula prostecada (modificado de Curtis *et al.* 2010).

### La prosteca en *Caulobacter crescentus*

Como se mencionó anteriormente, el ciclo celular de *C. crescentus* involucra la síntesis de una extensión tubular de la envoltura celular en un polo de la célula, que contiene un núcleo citoplasmático, membrana interna, externa, peptidoglicano y periplasma. Dicha síntesis, es direccional y culmina con la formación de una estructura tubular de aproximadamente 100 nm de diámetro o un quinto del diámetro del cuerpo celular, llamada prosteca. El crecimiento de las prostecas está dado por la adición de material de la envoltura celular en la unión prosteca-cuerpo celular; al insertarse el nuevo material, el material formado previamente es desplazado y se ve distanciado del cuerpo celular. Otra característica de esta extensión celular, es que se encuentra seccionada perpendicularmente a intervalos irregulares por estructuras llamadas 'crossbands' o bandas cruzadas (Wagner *et al.* 2007) que, se sugiere, están formadas por conjuntos de complejos protéicos, que abarcan la membrana interna, externa y el espacio periplásmico (Schlimpert *et al.* 2012).

La morfogénesis y la elongación de la prosteca utiliza muchas de las proteínas requeridas para la elongación del cuerpo celular de *C. crescentus*, como PBP2, RodA y MreB. No obstante, la prosteca es una estructura

distinta al cuerpo celular, por lo que el mecanismo que determina la localización, la forma y el tamaño de esta estructura, debe ser regulada por proteínas y procesos específicos para esta extensión de la envoltura celular (Wagner *et al.* 2007).

### **Funciones de la prosteca**

La función de la prosteca en *C. crescentus* no se conoce con exactitud, una hipótesis cada vez más aceptada es que facilita la adquisición de nutrientes en el ambiente (Wagner *et al.* 2006), lo cual la convierte en una de las estructuras que le permiten a la bacteria desarrollarse en ambientes limitados en nutrientes (Ireland *et al.* 2002). Diversas características apoyan esta hipótesis, por ejemplo, la elongación de la prosteca es estimulada por la limitación de fosfatos en el medio (Gonin *et al.* 2000), que lleva a la bacteria a tener un aumento de la superficie celular, sugiriendo que la prosteca aumenta directamente la captación de nutrientes (Wagner *et al.* 2007).

Se ha propuesto que la prosteca también tiene como función mantener a la célula en la interface aire-agua, lo cual resulta de suma importancia para un organismo aerobio como *C. crescentus*. Las células prostecadas suelen encontrarse adheridas a superficies en ambientes acuáticos, donde el fosfato es el nutriente limitante más común. En estas condiciones, el alargamiento de las prostecas le permitiría a las células distanciarse de la superficie, evitando la competencia con otras bacterias del medio en caso de haber una biopelícula (Ireland *et al.* 2002) y al mismo tiempo mantenerse en la capa superficial donde ocurre la sedimentación de nutrientes (Wagner *et al.* 2007).

### **La prosteca no cuenta con proteínas citoplasmáticas ni de membrana interna**

Diversos experimentos han mostrado que en la prosteca en *C. crescentus* no hay proteínas citoplasmáticas, el análisis proteómico de prostecas aisladas muestra que, además de no contener proteínas citoplasmáticas, el perfil de las proteínas de membrana interna es distinto al del resto del cuerpo celular (Ireland *et al.* 2002). Incluso cuando el diámetro de la membrana interna de la prosteca alcanza aproximadamente los 40 nm, que permitiría el ingreso de los ribosomas (de aproximadamente 20 nm de diámetro), experimentos con microscopía han mostrado que estas estructuras no están presentes en la prosteca (Wagner *et al.* 2007).

Se han planteado tres formas en las que se establece y se mantiene la compartimentalización entre la prosteca y el cuerpo celular. La primera comprende la presencia de una barrera física en la unión prosteca-cuerpo celular, que impide la libre difusión de proteínas citoplasmáticas y de membrana interna hacia la prosteca; pero no se ha dado la demostración formal de una membrana que funcione como dicha barrera en esta zona

de unión en particular. La segunda propuesta indica la presencia de un mecanismo de clasificación a nivel de síntesis y secreción de proteínas, que dirige solo algunas proteínas a la prosteca. Por último, se plantea que la libre difusión de muchas proteínas hacia la prosteca se ve impedida, ya que éstas se encuentran asociadas a otras proteínas, formando complejos en la membrana interna del cuerpo celular (Wagner *et al.* 2007).

Experimentos recientes apuntan a la existencia de barreras que previenen la difusión de proteínas citoplasmáticas y de membrana, las cuales están mediadas por proteínas. El complejo de proteínas involucradas ha sido denominado StpABCD, que se ensambla en los mismos sitios donde se forman las bandas cruzadas, los conjuntos macromoleculares de los complejos han sido propuestos como los responsables de la formación de las barreras. Estas barreras compartimentalizan la membrana interna, externa y el espacio periplásmico (Schlimpert *et al.* 2012), impidiendo el intercambio de proteínas entre la prosteca y el cuerpo celular, e incluso, entre los compartimentos formados en la prosteca por las bandas cruzadas (figura 6). Sin embargo, no se propone a este complejo como un método de clasificación y localización de proteínas, ya que no se observó que StpABCD segregara grupos de proteínas específicos, sino que más bien, al sintetizarse nuevas porciones de prosteca y formarse una nueva banda cruzada en ella, el complejo encapsula a las proteínas presentes en ese momento, sean cuales sean, manteniéndolas por detrás de la barrera que divide a la recién formada porción, del resto. (Klein *et al.* 2013).

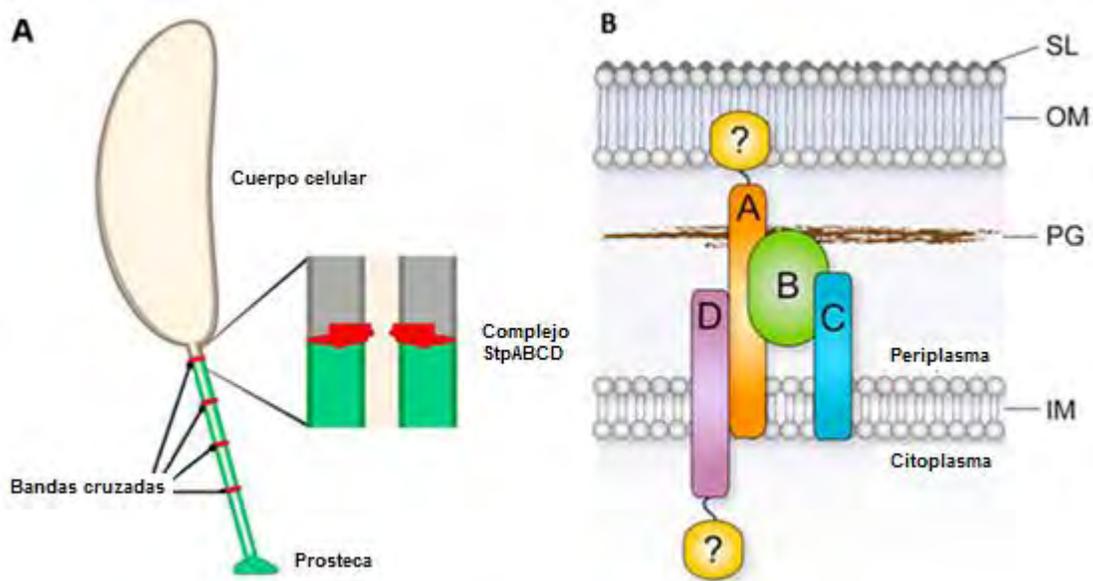


Figura 6. **A** Barreras de difusión, formadas por el complejo de proteínas StpABCD, presentes en las bandas cruzadas que se forman a lo largo de la prosteca de *Caulobacter crescentus* (Baldi *et al.* 2012). **B** SL: capa S,

OM: membrana externa, PG: peptidoglicano, IM: membrana interna. Muestra las proteínas que conforman el complejo StpABCD y su disposición en la prosteca. Los signos de interrogación indican la posible existencia de componentes no identificados, encargados de establecer una conexión con la OM, o el ensamblaje en la cara citoplasmática de la IM (modificado de Schilpert *et al.* 2012).

### **Proteínas presentes en la prosteca**

La prosteca contiene proteínas periplásmicas para la unión y utilización de diversos nutrientes, incluido el fosfato (Wagner *et al.* 2007), como por ejemplo la PstS, proteína periplásmica de unión al fosfato, que forma parte del complejo PstSCAB, un transportador ABC encargado de difundir el fosfato a través de la membrana interna (Wagner *et al.* 2006). Además, se ha determinado que la prosteca también es rica en proteínas de membrana externa, entre las cuales predominan los TBDR (Cao *et al.* 2012).

La predominante presencia de los TBDR en la prosteca, aunado a que el genoma de *C. crescentus* carece de homólogos para las porinas generales de mayor importancia (como OmpF y OmpC, por ejemplo), sugiere que los nutrientes son transportados del medio extracelular al periplasma por este sistema. Para que esto ocurra, el complejo de membrana interna TonB-ExbB-ExbD debería estar presente también en la prosteca, para transmitir la energía que requiere la translocación del sustrato (Wagner *et al.* 2006).

En caso de estar presente el complejo TonB-ExbB-ExbD, existen dos posibilidades para llevar a cabo el paso del sustrato al citoplasma; en la primera, el sustrato traslocado al periplasma se une a una proteína periplásmica, y se difunde a través del espacio periplásmico de la prosteca, hacia el espacio periplásmico del cuerpo celular, donde es transportado al citoplasma por un complejo de proteínas ABC. En la segunda opción, el sustrato es transportado a través de la membrana interna en la prosteca, por el transportador ABC, y luego se difunde a lo largo del núcleo citoplasmático de la prosteca, hacia el citoplasma del cuerpo celular para ser metabolizado (figura 7). Esta opción requeriría de la presencia de las proteínas del transportador ABC y de ATP (para su funcionamiento) en la prosteca. En el caso del transportador PstSCAB, experimentos realizados por Wagner *et al.* 2006, en los que se intentó localizar las proteínas del transportador en la membrana interna (como a PstA, por ejemplo) para tratar de encontrar evidencia a favor de la segunda posibilidad, no encontraron ninguna de éstas (solo fue localizada la proteína periplásmica de unión al fosfato PstS) (Wagner *et al.* 2006).

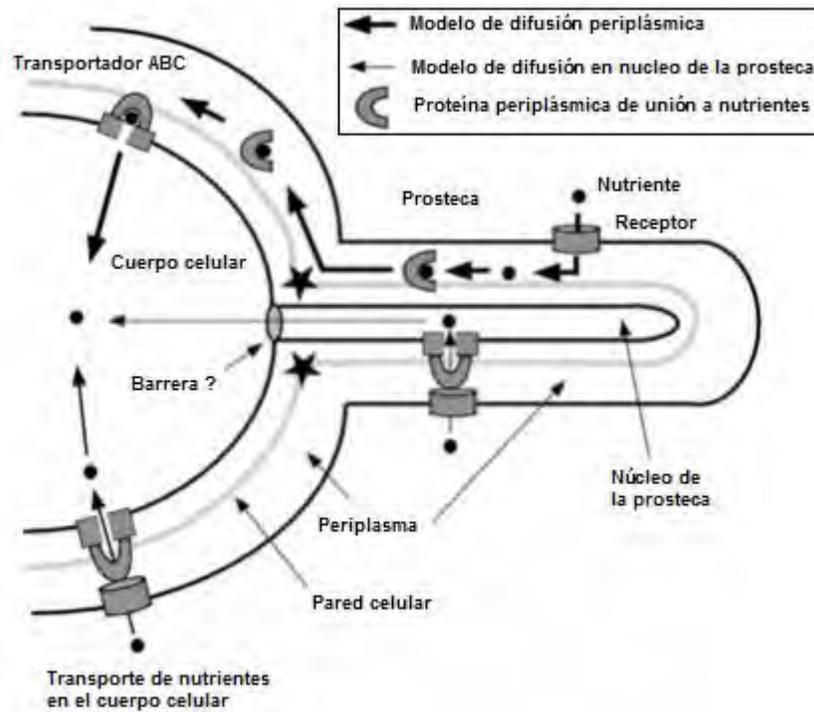


Figura 7. Modelos de toma de nutrientes en la prosteca y el cuerpo celular de *Caulobacter crescentus*. En la parte superior del diagrama se muestra el modelo de difusión periplásmica: el sustrato ingresa al periplasma de la prosteca y se une a una proteína periplásmica, el complejo se difunde a través del espacio periplásmico de la prosteca hasta el espacio periplásmico del cuerpo celular, donde el sustrato es translocado al citoplasma mediante un transportador ABC. En la parte inferior del diagrama se muestra el modelo de toma de nutrientes en el núcleo de la prosteca: al ingresar el sustrato al periplasma, es transportado al núcleo citoplasmático de la prosteca mediante la proteína periplásmica y un transportador ABC presente en la prosteca, a continuación el sustrato se difunde a lo largo de la prosteca hasta el citoplasma del cuerpo celular para ser metabolizado. Las estrellas indican los sitios de síntesis de prosteca (modificado de Wagner *et al.* 2007).

Inicialmente esta evidencia apuntó a la primera posibilidad como la correcta (Wagner *et al.* 2006), no obstante, la existencia de las ya mencionadas barreras a la difusión conformadas por StpABCD, imposibilitan que se lleve a cabo la difusión del complejo PstS-fosfato a través del periplasma de la prosteca. Además, análisis proteómicos indicaron que la proteína PstB (ATPasa citoplasmática) del complejo de membrana interna PstCAB, está presente en la prosteca y experimentalmente se mostró la presencia de PstA en la prosteca de *C. crescentus* (lo cual había sido negado por Wagner *et al.* 2006). Esta evidencia, nuevamente abre

la posibilidad de que la prosteca cuente con los componentes necesarios, en este caso el transportador ABC PstSCAB, para traslocar el fosfato del periplasma al núcleo citoplasmático de la prosteca (Klein *et al.* 2013).

Sin embargo, los experimentos para tratar de determinar la presencia de las proteínas del complejo TonB-ExbB-ExbD, no han logrado identificarlos en la prosteca (Ireland *et al.* 2002). Incluso un análisis de localización por inmunofluorescencia de la proteína ExbB, mostró su presencia en el cuerpo celular pero no en la prosteca, lo cual imposibilitaría el transporte mediante los TBDR en la prosteca (Wagner *et al.* 2006). Esto plantea una cuestión interesante que requiere de mayor estudio, pues no parece congruente que la prosteca contenga un gran número de TBDR con los cuales captar sustratos del medio extracelular, pero no cuente con el complejo del cual depende para liberar dichos sustratos en el periplasma.

### **TBDR en *Caulobacter crescentus***

Independientemente de la función que los TBDR puedan tener en la prosteca, estos transportadores son de suma importancia en *C. crescentus*. Los TBDR constituyen la segunda clase de proteínas más abundante en su genoma (Cao *et al.* 2012). Entre bacterias, el número de TBDR codificados es muy variable, *E. coli* sintetiza 7 TBDR dedicados a la toma de hierro (FhuA) y vitamina B12 (BtuB), *Pseudomonas aeruginosa* sintetiza 34 TBDR especializados principalmente en la toma de hierro (como FpvA, FtvA, PfeA, PirA, HasR, Phur y OptI) (Benz, 2004), mientras que en el genoma de *C. crescentus* se han encontrado alrededor de 65 TBDR putativos, lo cual deja suponer que son de suma importancia en esta bacteria (Noinaj *et al.* 2010) y sugiere que su función no se limita sólo al transporte de vitamina B12, sideróforos y otros complejos de hierro, sino que participan en la adquisición de otros sustratos de los medios escasos en nutrientes en los que *C. crescentus* se encuentra (Neugebauer *et al.* 2005) desafortunadamente la información sobre los TBDR en *C. crescentus* no es muy abundante y la mayoría de los TBDR putativos permanecen sin caracterizar. En relación a lo anterior, a continuación se presentan algunos resultados de trabajos experimentales que proporcionan evidencias en las que se involucra la participación de TBDR en la toma de diversos sustratos en *C. crescentus*.

En los estudios realizados por Neugebauer *et al.* 2005 se reportó que el crecimiento de *C. crescentus* en maltosa como la única fuente de carbono disponible induce la síntesis de la proteína MalA, la cual resultó ser indispensable para el crecimiento en maltopentosa y maltohexaosa. Para determinar si MalA forma sólo un poro específico para maltosa, o si es un transportador dependiente de energía, se elaboraron y analizaron mutantes de ExbB (cc2336), ExbD (cc2335) y de la previamente propuesta por Nierman *et al.* 2001 como TonB (cc2327) en *C. crescentus*, los mutantes de ExbB-ExbD no fueron capaces de crecer en maltopentosa ni en

maltohexosa. La dependencia de MalA a la presencia de ExbB-ExbD en estos experimentos, indicó que MalA constituye un transportador y no una porina dedicada al transporte de maltosa (Neugebauer *et al.* 2005).

En el caso de la mutante de TonB, al comparar la secuencia predicha de TonB de *C. crescentus* con la de *E. coli*, se notaron ciertas diferencias como la falta del residuo Ser-16, que en *E. coli* tiene una función importante. Además la secuencia alrededor del residuo Gln-160, que en *E. coli* es la encargada de interactuar con los TBDR en la membrana externa, es muy diferente en *C. crescentus*. Estas diferencias entre las secuencias hicieron dudar de la capacidad de este homólogo de TonB de *C. crescentus* para interactuar con la TonB box de MalA, lo cual coincidió con que su crecimiento ocurrió a una tasa similar a la de la cepa silvestre, es decir, la inactivación de TonB no afectó el transporte de maltosa por medio de MalA. Tomando en cuenta lo anterior, se propuso la posibilidad de la existencia de otro gen que codifique para una proteína que lleve a cabo la función de TonB, o la sustituya en caso de que la homóloga de TonB falle (Neugebauer *et al.* 2005).

El inesperado resultado de la mutante de TonB, llevó a analizar nuevamente el genoma de *C. crescentus*, con lo cual se encontró un nuevo gen homólogo de TonB, el cual fue denominado TonB1 (cc2334). TonB1 se encuentra adyacente a ExbB-ExbD y se transcribe en la misma dirección que éstos. A diferencia del gen TonB (cc2327), la inactivación de TonB1 eliminó el transporte de maltosa. Además se localizó en el genoma un nuevo gen que se propone, codifica para otra proteína TonB (cc3508), la cual tiene una similitud de 41% con cc2327 en la región homóloga. La inactivación de cc3508 y de cc3508 junto con cc2327, no eliminaron el transporte de maltosa. Por último, se propone que el gen cc2327 codifica para una proteína TonB que participa en la adquisición de sustratos diferentes a la maltosa, tomando en cuenta que se han identificado varios genes funcionales de TonB en algunos organismos, algunos de los cuales pueden reemplazarse entre sí mientras que otros llevan a cabo funciones específicas (Lohmiller *et al.* 2008).

Por otra parte, recientemente se determinó que el zinc es uno más de los sustratos que es transportado por TBDRs en *C. crescentus*. En este caso la participación de los TBDR es de suma importancia ya que están involucrados en el mantenimiento de los niveles intracelulares de este metal que funciona como micronutriente, pero que en exceso, puede resultar altamente tóxico (Ruiz *et al.* 2014).

En *C. crescentus*, el regulón Zur (regulador de la entrada de zinc, por sus siglas en inglés), juega un papel sumamente importante en mantener la homeostasis del zinc en la célula, está involucrado tanto en la toma de zinc como en su expulsión de la célula. La metaloproteína, perteneciente a la familia de proteínas Fur, cuenta con un ion de zinc en su estructura y uno más en su sitio regulador. El regulón Zur comprende genes que codifican proteínas de transporte para la introducción de zinc como transportadores ABC y TBDRs, además de

un sistema RND (*Resistance Nodulation Division*), que está involucrado en mantener la homeostasis intracelular, bajo condiciones de altas concentraciones de metales. En cuanto a los TBDRs, los experimentos revelaron que tienen un papel de suma importancia en la entrada de zinc. En el caso de los TBDR ZnuK y ZnuL, incluso se mostró que resultan esenciales para el crecimiento de *C. crescentus* en condiciones donde hay bajas concentraciones de zinc (Ruiz *et al.* 2014).

Por último, también se mostró que la toma de N-acetilglucosamina, producto de la degradación de quitina del medio extracelular, involucra la participación de NagA, una proteína cuya estructura muestra las características de un TBDR (como el barril  $\beta$ , dominio globular y la caja TonB). Aunque los experimentos realizados por Eisenbeis y colaboradores muestran que el transporte de N-acetil- $\beta$ -D-glucosamina no depende de este TBDR, sí revelan que el crecimiento de las células se ve afectado en mutantes de ExbB-ExbD, es decir, en las mutantes en las que TonB no puede transmitir la energía a los TBDR en la membrana externa, ya que la actividad de TonB depende totalmente de la presencia de ExbB y ExbD (Eisenbeis *et al.* 2008).

Así, actualmente se está descubriendo una variedad cada vez más grande de nutrientes que funcionan como sustratos para los TBDR en *C. crescentus*, esto coincide con el gran número de este tipo de transportadores codificados en su genoma, lo cual hace suponer que el papel de los TBDR en el transporte de nutrientes de esta bacteria tiene una importancia mayor de la que actualmente se le atribuye.

## HIPÓTESIS

Existe una distribución diferencial de los TBDR entre el cuerpo de la célula y la prosteca y la liberación de sus sustratos ocurre en ambas regiones.

## OBJETIVOS

General:

Corroborar experimentalmente la localización de los receptores dependientes de TonB en la prosteca de *Caulobacter crescentus* y determinar si la proteína TonB del complejo TonB-ExbB-ExbD, se encuentra presente en dicha estructura de la bacteria.

Particulares:

- Determinar qué genes codificantes de los receptores dependientes de TonB se expresan más a lo largo del ciclo celular de *Caulobacter crescentus*.
- Determinar qué genes han sido propuestos como codificantes de Proteínas TonB1 en *Caulobacter crescentus*.
- Obtener proteínas de fusión fluorescentes que funcionen como receptores dependientes de TonB y proteínas TonB.
- Expresar las fusiones obtenidas en *Caulobacter crescentus* en distintos medios de cultivo.
- Determinar la localización de los receptores dependientes de TonB y de la proteína TonB en *Caulobacter crescentus*, en distintas condiciones nutricionales.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 1. Oligonucleótidos empleados.

Nombre	Secuencia
1750mchF1 <i>SacI</i>	GAAGAGCTCCGGGCGGGGTCTTCCGGTTCG
1750mchR1 <i>EcoRI</i>	GAAGAATTCTCGAAGCGCGCCCGCAGACCCAG
2819mchF1 <i>SacI</i>	GAAGAGCTCCGCGTCGCGTGAGCTGGAAGG
2819mchR1 <i>EcoRI</i>	GAAGAATTCTCGTAGCGCAGGCGGGCGTTCAG
0210mchF1 <i>SacI</i>	GAAGAGCTCCAGAACCGCATCGAGCGCGCCTTCAAC
0210mchR1 <i>EcoRI</i>	GAAGAATTCTCGAAGCGCGCGTGGATCGTCGCCAC
tonB1mchF1 <i>SacI</i>	GAAGAGCTCGACGCGACGGTTGTGGAGCTG
tonB1mchR1 <i>EcoRI</i>	GAAGAATTCTCTTGCGGGACTTGGAACACCAG
tonB2mchF1 <i>SacI</i>	GAAGAGCTCGTCGAAACCGTGCCTCTCACG
tonB2mchR1	GAAGAATTCTCGGCGCGCGGTTGAAGCGGATGG
tonB3mchF1 <i>SacI</i>	GAAGAGCTCGGAAATGGCCTGCGACGAGG
tonB3mchR1 <i>EcoRI</i>	GAAGAATTCTCGGTCTGCGGAACCGAGAAGC

Tabla 2. Plásmidos y cepas bacterianas utilizadas.

Nombre	Descripción
<b>PLÁSMIDOS</b>	
pCHYC-4	Vector utilizado para generar fusiones de proteínas en el extremo carboxilo terminal, codifica para la proteína fluorescente mCherry y confiere resistencia a gentamicina (Thanbichler, 2007).
pTCYC-4	Vector utilizado para generar fusiones de proteínas en el extremo carboxilo terminal, codifica para un tag de tetracisteínas y confiere resistencia a gentamicina (Thanbichler, 2007).
<b>CEPAS</b>	
Top10	Cepa de células competentes de <i>Escherichia coli</i> (invitrogen).
CB15	Cepa silvestre de <i>Caulobacter crescentus</i> .
Top10 pCHYC-4 1750	Cepa con construcción que contiene el fragmento del gen cc1750 de <i>C. crescentus</i>

	para su purificación.
Top10 pCHYC-4 2819	Cepa con construcción que contiene el fragmento del gen cc2819 de <i>C. crescentus</i> para su purificación.
Top10 pCHYC-4 0210	Cepa con construcción que contiene el fragmento del gen cc0210 de <i>C. crescentus</i> para su purificación.
Top10 pCHYC-4 TonB1	Cepa con construcción que contiene el fragmento del gen cc2334a de <i>C. crescentus</i> para su purificación.
Top10 pCHYC-4 TonB2	Cepa con construcción que contiene el fragmento del gen cc2327 de <i>C. crescentus</i> para su purificación.
Top10 pCHYC-4 TonB3	Cepa con construcción que contiene el fragmento del gen cc3508 de <i>C. crescentus</i> para su purificación.
Top10 pTCYC-4 dlpM	Cepa con construcción que contiene el fragmento del gen cc1996 de <i>C. crescentus</i> para su purificación.
Top10 pTCYC-4 TonB1	Cepa con construcción que contiene el fragmento del gen cc2334a de <i>C. crescentus</i> para su purificación.
Top10 pTCYC-4 TonB2	Cepa con construcción que contiene el fragmento del gen cc2327 de <i>C. crescentus</i> para su purificación.
Top10 pTCYC-4 TipN	Cepa con construcción que contiene el fragmento del gen cc1485 de <i>C. crescentus</i> para su purificación.
CB15 pCHYC-4 1750	Cepa con construcción que contiene el fragmento del gen cc1750 para su visualización con microscopía de fluorescencia.
CB15 pCHYC-4 2819	Cepa con construcción que contiene el fragmento del gen cc2819 para su visualización con microscopía de fluorescencia.
CB15 pCHYC-4 0210	Cepa con construcción que contiene el fragmento del gen cc0210 para su visualización con microscopía de fluorescencia.
CB15 pCHYC-4 TonB1	Cepa con construcción que contiene el fragmento del gen cc2334a para su visualización con microscopía de fluorescencia.
CB15 pCHYC-4 TonB2	Cepa con construcción que contiene el fragmento del gen cc2327 para su visualización con microscopía de fluorescencia.
CB15 pCHYC-4 TonB3	Cepa con construcción que contiene el fragmento del gen cc3508 para su visualización con microscopía de fluorescencia.

CB15 pCHYC-2 dlpM	Cepa con construcción que contiene el fragmento del gen cc1996 para su visualización con microscopía de fluorescencia. Resistente a kanamicina.
CB15 pTCYC-4 dlpM	Cepa con construcción que contiene el fragmento del gen cc1996 para su visualización con microscopía de fluorescencia.
CB15 pTCYC-4 TonB1	Cepa con construcción que contiene el fragmento del gen cc2334a para su visualización con microscopía de fluorescencia.
CB15 pTCYC-4 TonB2	Cepa con construcción que contiene el fragmento del gen cc2327 para su visualización con microscopía de fluorescencia.
CB15 pTCYC-4 TipN	Cepa con construcción que contiene el fragmento del gen cc1485 para su visualización con microscopía de fluorescencia.

Tabla 3. Medios de cultivo empleados

Medio	Componentes (para la preparación de 1L de medio)
LB	10g bactotripton, 5g extracto de levadura y 10g NaCl
PYE	2g bactopectona, 1g extracto de levadura, 1mL MgSO <sub>4</sub> 1M, 0.5mL CaCl <sub>2</sub> 1M
M5GG 10mM	1mL NaCl 1M, 1mL KCl 1M, 6.25 mL NH <sub>4</sub> Cl <sub>2</sub> 0.05%, 850μL Glutamato de Sodio, 500μL MgSO <sub>4</sub> 1M, 10mL Glucosa 20%, 1mL FeSO <sub>4</sub> 10mM EDTA, 500μL CaCl <sub>2</sub> , 20mL Tris-HCl pH 7.0 1M, 5mL sales M2 1X
M5GG 0.05mM	1mL NaCl 1M, 1mL KCl 1M, 6.25 mL NH <sub>4</sub> Cl <sub>2</sub> 0.05%, 850μL Glutamato de Sodio, 500μL MgSO <sub>4</sub> 1M, 10mL Glucosa 20%, 1mL FeSO <sub>4</sub> 10mM EDTA, 500μL CaCl <sub>2</sub> , 20mL Tris-HCl pH 7.0 1M, 250μL sales M2 1X

### Secuencia de experimentación aplicada

- Selección de secuencia del gen de interés y diseño de oligonucleótidos.
- PCR del fragmento del gen con DNA cromosomal de la cepa CB15 como templado.
- Purificación y digestión del fragmento.
- Purificación y digestión del plásmido pCHYC-4.
- Ligación del fragmento y el plásmido pCHYC-4.
- Transformación de células competentes de *Escherichia coli* Top10 con la ligación.

- Comprobación de presencia de la construcción en células transformadas, por minipreparación de plásmido y su digestión.
- Purificación de la construcción.
- Transformación de células competentes de *Caulobacter crescentus* CB15.
- Inoculación de medios de cultivo PYE, M5GG con alto y de bajo fosfato con las células transformadas.
- Incubación de células hasta alcanzar una densidad óptica de 0.3 a 660 nm.
- Tinción de células para visualización de proteínas (en caso de que la cepa lo requiera).
- Visualización con microscopía de epifluorescencia.
- Determinación de la presencia de la proteína de fusión por medio de inmunodetección.

La secuencia de experimentación descrita, se aplicó para la obtención de cada una de las cepas de CB15 mostradas en la tabla 2, con excepción de la cepa CB15 pCHYC-2 dIpM.

### **Selección de secuencias**

Para la selección de los genes que codifican para receptores dependientes de TonB, se realizó una búsqueda de secuencias que codificaran para este tipo de proteínas en el genoma de *Caulobacter crescentus*, utilizando la base de datos Pfam, que determina familias de proteínas por medio de modelos ocultos de Markov. Se buscó el posible nivel de expresión de los genes identificados en datos de transcriptómica del trabajo de McGrath *et al.* 2007, que contiene el nivel de expresión de genes a lo largo del ciclo celular de la bacteria ya reportados. Se seleccionaron las secuencias de los genes que codifican receptores con mayor expresión para iniciar el diseño de oligonucleótidos.

Para las proteínas TonB, se consultaron estudios en los que se reportaran genes que codificaran para dichas proteínas en *C. crescentus*, y en donde se proporcionan los locus\_tag de dichos genes (un trabajo sumamente útil para esta tarea fue el artículo elaborado por Lohmiller *et al.* 2008). Con las secuencias de estos genes, se procedió a elaborar los oligonucleótidos.

### **Oligonucleótidos**

Al determinar qué genes codificantes de receptores dependientes de TonB resultarían adecuados para este trabajo y los locus\_tag de los genes que codifican para TonB, se obtuvo su secuencia completa en pares de bases con el programa Artemis. Con el programa DNAMAN, se diseñaron los oligonucleótidos seleccionando aproximadamente 21 pares de bases en la parte final de la secuencia y en la región intermedia del gen de interés, con una distancia de aproximadamente 500 pares de bases entre ellas, a cada una de éstas se le

añadió una secuencia de reconocimiento de enzimas de restricción. De las secuencias resultantes, se determinó la temperatura de desnaturalización ( $T_m$ ), procurando que la variación entre la  $T_m$  de un oligonucleótido y otro no fuera mayor a  $2^\circ\text{C}$ , que no se formaran posibles estructuras secundarias y no fueran autocomplementarios.

### Reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés)

Para la obtención de copias de los fragmentos de DNA determinados por los oligonucleótidos de un determinado gen, se utilizó la técnica de amplificación de DNA llamada PCR. Para la reacción se utilizaron los siguientes volúmenes.

Buffer PRIME STAR GC 2X	25 $\mu\text{L}$
DNA cromosomal 100ng/ $\mu\text{L}$ cepa CB15 como templado	1 $\mu\text{L}$
Oligonucleótidos diseñados a 10pmol/ $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$ de cada uno
dNTPs	4 $\mu\text{L}$
Enzima PRIME STAR	0.5 $\mu\text{L}$
H <sub>2</sub> O	17 $\mu\text{L}$

El programa utilizado en el termociclador constó de 30 repeticiones del siguiente ciclo:  $97^\circ\text{C}$  por 15s,  $58^\circ\text{C}$  por 15s y  $72^\circ\text{C}$  por 1min, con una velocidad de cambio de  $1.5^\circ\text{C/s}$  entre cada fase.

### Purificación de bandas de fragmento de DNA

Para la purificación de la reacción obtenida con la técnica de PCR, se le agregan 20 $\mu\text{L}$  de buffer de carga y se cargan, junto con el marcador de peso  $\lambda\text{DNA}/HindIII$ , en un gel de agarosa al 1%, sumergido en buffer E 1X dentro de una cámara electroforética. A continuación, se lleva a cabo la electroforesis para la separación del DNA. Al finalizar, el gel se tiñe con bromuro de etidio por aproximadamente 15min. Pasado este tiempo, las bandas de gel correspondientes al DNA de interés, se obtienen con ayuda de una lámpara de luz ultravioleta de longitud de onda larga para su visualización.

A continuación las bandas de DNA obtenidas en la electroforesis se purifican con el kit ilustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit elaborado por GE siguiendo las instrucciones del fabricante.

Finalmente se cuantifica el fragmento de DNA mediante espectrofotometría utilizando el NanoDrop, para conocer la cantidad de DNA en un volumen determinado de muestra (NanoDrop utiliza como unidades ng/ $\mu\text{L}$ ).

### **Digestión del fragmento**

Los fragmentos purificados, se digirieron con las enzimas de restricción antes seleccionadas, para ello, se agregan en un microtubo 2µL de buffer 2 de Biolabs 10X, 200ng del fragmento purificado, 0.5µL de cada una de las enzimas de restricción y H<sub>2</sub>O. La digestión se coloca por 4hrs en una incubadora a 37°C.

### **Purificación de plásmido para fusión**

Una vez seleccionado el plásmido adecuado para realizar la fusión con el fragmento digerido, se prepara un cultivo con 10mL de medio Lysogenic Broth (LB) y el antibiótico al cual es resistente la cepa con la que se inoculará el cultivo, dicha cepa contiene al plásmido de interés. El cultivo se coloca en la incubadora por toda una noche.

Al día siguiente de la inoculación, el cultivo se centrifuga por 10min a 4,000rpm, el sobrenadante obtenido se decanta. El botón formado se resuspende en 750µL de buffer P1, ya resuspendido, se agregan 20µL de la enzima RNasa. El producto se reparte en tres microtubos, a cada uno se le agregan 300µL de buffer P2 y se invierten lentamente para homogeneizar, procurando no mover demasiado los tubos y no dejar actuar el buffer P2 por más de 5min. A continuación, se agrega a cada tubo 300µL de buffer N3, nuevamente se invierten para homogeneizar. Los tres tubos se centrifugan por 15min a 14,000rpm en una centrífuga refrigerada a 4°C.

El sobrenadante de cada tubo se coloca en la columna del kit QIAprep Spin Miniprep de QIAGEN, siguiendo las instrucciones del fabricante se obtuvo el plásmido purificado. Al igual que con el fragmento purificado, se cuantifica el DNA mediante el NanoDrop.

### **Digestión del plásmido**

Al igual que el fragmento, el plásmido se digiere con las enzimas de restricción seleccionadas, para lo cual se agregan: 1.5µL de buffer 2 de Biolabs 10X, 3µL de plásmido purificado, 0.5µL de cada una de las enzimas de restricción y 10.5µL de H<sub>2</sub>O. La digestión se coloca en incubación por 4hrs a 37°C.

### **Ligación de fragmento y plásmido digeridos**

Para realizar la fusión del fragmento y el plásmido, se llevó a cabo el procedimiento de ligación: ambas digestiones (de fragmento y plásmido), se colocan a 75°C por 15min, pasado el tiempo, se ponen en hielo. Pasados 10min, se agregan en un microtubo, 1µL de buffer 2 de Biolabs 10X, 1.5µL de ATP, 4µL del fragmento digerido, 1µL del plásmido digerido (se procura mantener una proporción 1 : 1 entre la concentración del

plásmido y del fragmento), 0.4µL de la enzima ligasa T4 y 2µL de H<sub>2</sub>O. La ligación se coloca en un Biochiller a 17°C por toda una noche.

### **Transformación**

Para obtener la construcción conseguida con la ligación se transformaron las células competentes de *E. coli* Top10 por electroporación. Este método también se ocupó para integrar la construcción en *Caulobacter crescentus* CB15. La transformación se hizo por medio de electroporación.

Para la electroporación se inactiva previamente la ligasa colocándola a 75°C por 15 min, para la transformación de Top10 se toma 1µL de la ligación, el cual se agrega a las células competentes. Para la transformación de CB15, se agregan 500ng de la construcción purificada a las células competentes. Posteriormente, las células competentes con el plásmido se colocan en una celda de electroporación de 0.1cm previamente enfriada en hielo. A continuación la celda con las células se coloca en el electroporador donde se les da una descarga de 1.6V. Las células transformadas se colocan en 1mL de medio (LB para Top10 y PYE para CB15) por 1hr en incubación a 37°C (para Top10) o a 30°C (Para CB15) con agitación para la recuperación de las células.

Pasado el tiempo, las células se siembran en placas de medio LB o PYE (según la cepa), con el antibiótico correspondiente (gentamicina 30µg/mL para placas LB y 5µg/mL para placas PYE).

### **Purificaciones con minipreparaciones y su digestión**

Para comprobar la presencia de las construcciones en las células de *E. coli* Top10 transformadas, se llevó a cabo el método de purificación de plásmido por medio de minipreps hervidos. Previo a su realización, es necesario hacer parches de las colonias obtenidas en la placa de la transformación de células e incubarlos durante un día a 37°C. Con los parches se inocularán cultivos líquidos con 2mL de LB y el antibiótico correspondiente (gentamicina 0.3% 5µL/mL). Los cultivos deben permanecer en incubación a 37°C con agitación por toda una noche.

Los cultivos líquidos obtenidos, se colocan en microtubos y se centrifugan por 1min a 13,000rpm, el sobrenadante se decanta y el botón formado se resuspende. A cada tubo se le agregan 300µL de STET (8% de sacarosa, 50 mM de EDTA pH 8.0, 5% tritón, 50mM Tris-HCl pH 8.0), 30µL de la enzima lisozima y se agita con un vortex por 2s. A continuación los tubos se colocan en agua en ebullición por 45s, pasado este tiempo, se centrifugan los tubos por 15min a 13,000rpm. Se toma el sobrenadante obtenido tras la centrifugación y se coloca en 300µL de isopropanol en tubos nuevos, los cuales se centrifugan nuevamente por 15min a 14,000 en la centrífuga refrigerada a 4°C. El sobrenadante resultado de esta centrifugación, se descarta y se le agregan

500µL de etanol 70% al botón formado. Los tubos se invierten y posteriormente se descarta el etanol. Los tubos con el botón se colocan en un termoblock a 65°C por 20min. Finalmente los botones se resuspenden en 35µL de H<sub>2</sub>O y se colocan nuevamente en el termoblock a 65°C por 10 min.

Posteriormente, los minipreps se corren en un gel de agarosa, junto con el marcador de peso λDNA/*Hind*III. Al finalizar la electroforesis se seleccionan los minipreps en los que aparentemente se encuentra la construcción del plásmido elaborada, para realizar una digestión de éstos.

Para la digestión de los minipreps, se agregan 1.5µL de buffer 2 de Invitrogen 10X, 3µL de miniprep, 0.3µL de las enzimas de restricción correspondientes y 10.5µL de H<sub>2</sub>O. Se colocan en incubación a 37°C por una hora, pasado este tiempo, se agrega 1µL de RNasa que se deja actuar por 10min. Por último, se corren las digestiones en un gel de agarosa junto con el marcador de peso λDNA/*Hind*III, para comprobar la presencia del plásmido y el fragmento de la construcción.

### **Cultivos de *C. crescentus* CB15**

Para la preparación de cultivos de las cepas de *C. crescentus* que se utilizarán para su observación al microscopio, se utilizan medios líquidos con 3mL de PYE, M5GG con alto fosfato (10mM) y M5GG con bajo fosfato (0.05mM), inoculados con la cepa de interés y crecidos hasta 0.3 de densidad óptica a 660nm.

### **Microscopía de epifluorescencia**

Para la observación en el microscopio de fluorescencia, se deben preparar previamente laminillas de agarosa al 1.5%: En un tubo de ensayo, se pesan 0.06g de agarosa y se les agregan 4mL de buffer de sales M2 1X sin NH<sub>4</sub>Cl, se coloca el tubo a la flama de un mechero hasta disolver completamente la agarosa. Con una micropipeta, se toman 700µL de la agarosa disuelta, se esparcen sobre un portaobjetos y se coloca otro portaobjetos sobre la agarosa. Al cuajar la agarosa, se retira uno de los portaobjetos, dejando la laminilla de agarosa expuesta. Se toma 1µL del cultivo líquido de la cepa, y se colocan sobre la laminilla. Sobre la muestra se coloca un cubreobjetos.

Durante las observaciones al microscopio, se utiliza el objetivo de 100X, colocando previamente una gota de aceite de inmersión sobre el cubreobjetos. Se realizan observaciones en campo claro y en fluorescencia con el filtro para fluorescencia apropiado y se capturan imágenes de las cepas en ambos campos con los programas Wasabi y Micro Manager 1.4.

## **Análisis de las imágenes capturadas en la microscopía**

Para detectar por medio de la epifluorescencia, posibles diferencias en cuanto al nivel de expresión de proteínas en las distintas cepas y en los distintos medios de cultivo utilizados, se cuantificó la fluorescencia en cada una de las imágenes capturadas durante la microscopía. Para lograrlo, se utilizó el programa ImageJ. Con los parámetros proporcionados por el programa, se calculó la fluorescencia total corregida.

Con una determinada imagen de células con fluorescencia, se inicia delimitando una de las células con la herramienta 'freehand selection', se analiza la imagen seleccionada, obteniendo su área y densidad integrada. A continuación, con la herramienta 'oval selection', se traza un círculo en una zona sin fluorescencia junto a la célula previamente delimitada y nuevamente se analiza la imagen seleccionada, obteniendo el valor de la media de la escala de grises (el cual funcionará como blanco). Este proceso se repite con 14 células más de la imagen. Posteriormente, se calculan promedios con los 15 valores de área, los 15 valores de densidad integrada y los 15 valores de la media de la escala de grises. El valor de cada promedio se sustituye en la siguiente fórmula para obtener la fluorescencia total corregida (FTC).

$$FTC = \text{Promedio de la densidad integrada} - (\text{Promedio del área de las células seleccionadas} \times \text{Promedio del valor de la escala de grises})$$

Con el programa Excel, se realizó un análisis estadístico prueba t de Student con un nivel de confianza de 95%, comparando los datos de FTC de los diferentes medios de cultivo utilizados dentro de una misma cepa, con el fin de determinar si existen diferencias significativas entre la fluorescencia detectada entre las distintas condiciones nutricionales. Finalmente se generaron gráficas con los datos de fluorescencia total corregida en las que se cuantifica la intensidad de la fluorescencia de cada una de las imágenes capturadas.

## **Western-blot**

Para detectar las proteínas de interés en las muestras se realizó la técnica de western-blot. Para llevar a cabo este procedimiento, es necesaria la preparación de extractos proteicos: se inoculan cultivos de PYE, M5GG con alto fosfato y M5GG con bajo fosfato con cada una de las cepas de interés. Al tener los cultivos a 0.3 de densidad óptica a 660nm, se toma 1mL de cada cultivo y se centrifuga por 2min a 13,000rpm, se retira todo el sobrenadante posible y se resuspenden los botones formados. A cada botón, se le agregan 100µL de Magic mix 1X y se colocan en hielo. Cada extracto se sonica con un pulso de 10s, a continuación se deben colocar en un termoblock a 100°C por 10min, pasado el tiempo, se ponen en hielo y se sonicen nuevamente. Finalmente, los extractos se congelan colocándolos a -20°C.

Por otra parte, para llevar a cabo una electroforesis sds-page, se prepara un gel de acrilamida bisacrilamida al 12%. En éste gel, se cargan los extractos, junto con los marcadores de peso molecular ColorPlus Prestained Protein Marker o Thermo Scientific Prestained Protein Molecular Weight Marker. La cámara donde se coloca el gel, se llena con buffer E 1X. El gel se corre a 25mA constantes hasta que el colorante alcanza el final del gel (esto ocurre en 40-50 min aproximadamente).

Ya corrido el gel, se realiza la transferencia del gel a una membrana de nitrocelulosa, colocándolos en un casete, dentro de una cámara de transferencia. La cámara se conecta a la corriente a 250mA por 1h. Al terminar la transferencia, se coloca la membrana en un recipiente, donde se agregan 10mL de TBS Tween (TBS: tris Cl 20mM pH7.5, NaCl 500mM y Tween 20 0.1%. Para 500mL de TBS tween: 50mL TBS 10x, 450mL de agua, 500 mL de Tween 20) para enjuagar, al terminar, se desecha y se agregan 15mL de leche Carnation descremada al 1.5%. La membrana con la leche se coloca en movimiento a temperatura ambiente durante 1h.

Pasado el tiempo, se inicia con el western-blot, desechando la leche y agregando 10mL de TBS Tween junto con 0.5µL del anticuerpo primario anti mCherry 1:20,000, que se incuba por 1hr en movimiento a temperatura ambiente. Al terminar el tiempo, se desecha el Tbs Tween con el anticuerpo. La membrana se enjuaga con 10mL de TBS Tween, el cual se desecha. Nuevamente se agregan 10mL de TBS Tween, se incuba por 15min, y se desecha para volver a enjuagar con 10mL de TBS Tween; este paso se repite 3 veces más. Finalmente se agregan 10mL de TBS Tween con 0.5µL del anticuerpo secundario anti mouse 1:13,000, se incuba por 1hr y se repite el ciclo de enjuagado con TBS Tween ya descrito.

Por último la detección de las proteínas se llevó a cabo mediante quimioluminiscencia usando 950µL de CDP-Star (de Applied Biosystems) como sustrato y 50µL de Nitro Block (de Applied Biosystems) como potenciador, para la revelación de la membrana se utilizaron placas fotográficas R-X, variando el tiempo de exposición, según la visualización de las bandas de la membrana en la placa.

### **Tinción FIAsH**

Para la visualización de algunas proteínas en cepas con construcciones de plásmidos que poseen una etiqueta de tetracisteínas, fue necesario llevar a cabo una tinción en la que dicha etiqueta se une no-covalentemente a un compuesto que en el contexto de este péptido se vuelve fluorescente, haciendo visible la proteína de la fusión en la microscopía de epifluorescencia. Para la tinción se utilizó el kit TC-FIAsH In-Cell Tetracysteine Tag Detection.

Antes de iniciar con el protocolo de tinción, las células se fijaron y se les aplicó un compuesto para reducir los átomos de azufre de las tetracisteínas y hacer posible la unión al compuesto fluorescente (al estar oxidados, el azufre se encuentra unido al azufre de otra tetracisteína lo cual no hace posible la unión con el compuesto). Para la fijación de células se preparan cultivos a 0.3 de densidad óptica a 660nm, a 180μL del cultivo, se le agregan 20μL de paraformaldehído al 30%, se incuban a temperatura ambiente por 30min. Pasado el tiempo, se centrifuga por 1min a 13,000rpm, se descarta el sobrenadante y se resuspende el botón en 180μL de cultivo.

Para la reducción, se toman 40μL de células fijadas y se les agrega 1μL de DTT 1M. Esto se coloca a temperatura ambiente por 30min y a continuación se centrifugan las células por 1min a 13,000rpm. Se lava el botón resuspendiéndolo en 80μL de medio y centrifugándolo nuevamente. Finalmente se resuspende en 20μL de medio para iniciar con la tinción.

A las células fijadas y reducidas resuspendidas en 20μL de medio se les agregan 20μL del compuesto FIAsh 5μM. Las células junto con el compuesto se incuban por 30min a 30°C en completa oscuridad. Pasado el tiempo se centrifugan las células por 1min a 13,000rpm y se descarta el sobrenadante. A continuación se resuspende el botón en 40μL del buffer BAL Wash 1X (buffer de lavado del kit), al terminar el lavado, nuevamente se centrifugan las células para descartar el buffer de lavado y se resuspende el botón en 20μL de medio.

Finalmente, las células teñidas, se observaron en el microscopio de fluorescencia con el filtro YFP para la visualización del compuesto unido a las proteínas de interés.

### **Cultivo de células para criopreservación en glicerol**

Para la conservación de las cepas elaboradas de *E. coli* y *C. crescentus* se utilizó la conservación en glicerol agregando en un tubo estéril con 500μL de glicerol al 65%, 900μL del cultivo con la cepa de interés y mezclando con vortex. Una vez mezclado, el tubo se coloca en hielo seco hasta su congelación y finalmente se guarda en un ultracongelador a -70°C.

## RESULTADOS

### Selección de TBDR

Con la base de datos Pfam y los datos de transcriptómica del nivel de expresión de genes en el ciclo celular de *Caulobacter crescentus* (McGrath *et al.* 2007), se determinó que las secuencias de receptores dependientes de TonB que más se expresan a lo largo del ciclo celular de la bacteria, son las codificadas por los genes cc1750, cc2819 y cc0210 (figura 1). A los oligonucleótidos diseñados en dirección reversa (R), se les añadió la secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción *EcoRI* (5' GAATTC 3') y a los diseñados para dirección delantera (D), se les añadió la secuencia de reconocimiento de la enzima *SacI* (5' GAGCTC 3').

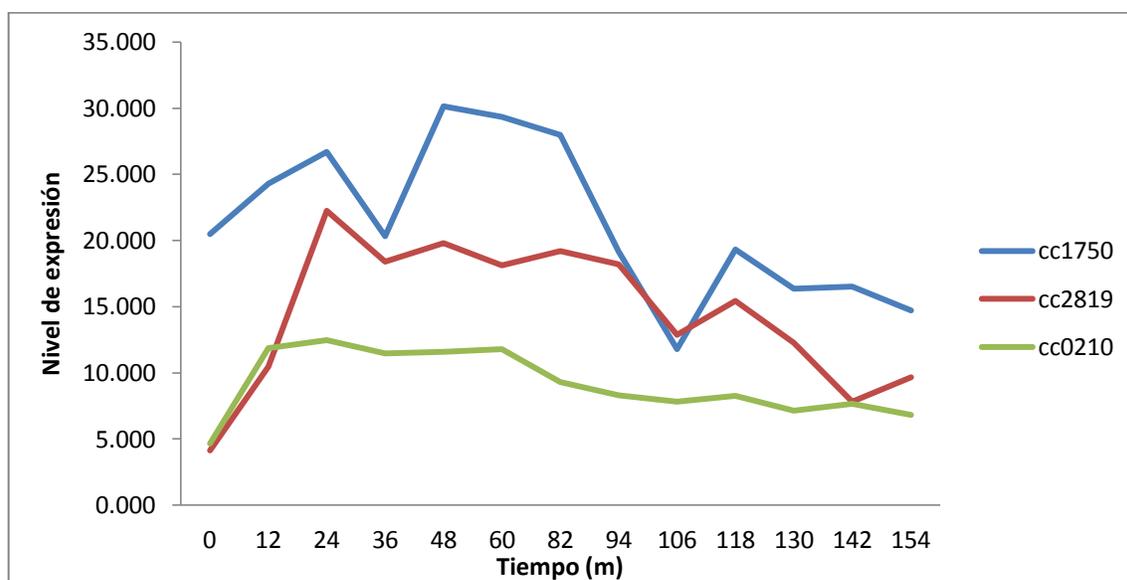


Figura 1. Expresión de los genes cc1750, cc2819 y cc0210 a lo largo del ciclo celular de *C. crescentus*. La gráfica se elaboró con los datos de transcriptómica (McGrath *et al.* 2007).

### Elaboración de las construcciones pCHYC-4 1750, pCHYC-4 2819 y pCHYC-4 0210

Con los oligonucleótidos diseñados, se llevó a cabo la reacción en cadena de la polimerasa, que dio como resultado fragmentos de 452pb para el gen cc1750 (1953pb), 531pb para el gen cc2819 (1710pb) y de 542pb para el gen 0210 (2532pb). Los fragmentos se purificaron mediante geles de agarosa y el kit de purificación de bandas de DNA ilustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit(GE) (figura 2A). A continuación se digirieron los fragmentos con las enzimas *EcoRI* y *SacI*, para llevar a cabo la ligación con el plásmido pCHYC-4, previamente digerido con estas enzimas (figura 2B).



Figura 2. Se muestran los geles de agarosa obtenidos tras los distintos protocolos realizados con el fin de obtener cepas fluorescentes de CB15. Las imágenes solo muestran el proceso experimental realizado para obtener el fragmento del gen cc1750 y la construcción pCHYC-4 1750; para los fragmentos de genes cc2819, cc0210 y sus construcciones correspondientes, se llevaron a cabo los mismos procedimientos. Las enzimas de restricción utilizadas en las digestiones fueron *SacI* y *EcoRI* **(A)** Electroforesis del fragmento del gen cc1750, producto de PCR. Esta banda se purificó con ayuda del kit de purificación de bandas de DNA DNA illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit(GE). **(B)** Electroforesis de la digestión del fragmento puro de PCR y del plásmido pCHYC-4. Al observar que tanto el fragmento como el plásmido habían sido correctamente digeridos, se realizó la ligación y la transformación en Top10. **(C)** Electroforesis de minipreps elaborados con las colonias obtenidas en la transformación de Top10. **(D)** Electroforesis de la digestión de los primeros cuatro minipreps (imagen C). De esta forma se comprobó que las colonias contenían la construcción con la fusión del plásmido y el fragmento. **(E)** Electroforesis de la digestión de la construcción pCHYC-4 1750. Se corroboró que la construcción purificada contara con la fusión del plásmido y el fragmento. Con esta construcción se transformó a la cepa CB15.

Con las ligaciones pCHYC-4 1750, pCHYC-4 2819 y pCHYC-4 0210, se transformaron células competentes Top10. Tras un día de incubación, y al haber hecho e incubado los parches de las colonias obtenidas, se realizaron minipreps, y sus digestiones, corrieron en un gel de agarosa para la visualización de bandas que demostraran la presencia de la construcción deseada en las colonias (figura 2C y 2D). Con esta visualización, se determinó qué colonias contenían las construcciones. Al haber establecido qué colonias eran las más adecuadas, se purificó cada construcción con un cultivo inoculado con dichas colonias y el kit de purificación de plásmido QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN) (figura 3). Por último, cada construcción se digirió con las enzimas de restricción *EcoRI* y *SacI*, para comprobar la presencia del fragmento en el plásmido (figura 2E).

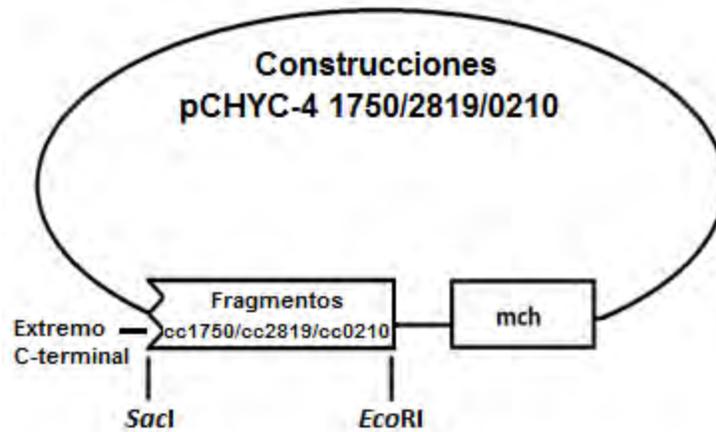


Figura 3. Estructura de las construcciones realizadas con los fragmentos de los genes codificantes para TBDR y el plásmido pCHYC-4 con la proteína mCherry (mch). Entre el sitio de reconocimiento de la enzima *EcoRI* y el inicio de mch, hay aproximadamente 50 pares de bases.

#### **Obtención de las cepas CB15 pCHYC-4 1750, CB15 pCHYC-4 2819 y CB15 pCHYC-4 0210**

Al corroborar que las construcciones pCHYC-4 1750, pCHYC-4 2819 y pCHYC-4 0210 contenían la fusión del plásmido y el fragmento, se procedió a transformar células competentes de *C. crescentus* (CB15) por medio de electroporación. Para probar distintos medios nutricionales, las colonias obtenidas se parcharon y se prepararon tres medios de cultivo: 3mL de PYE, de M5GG con bajo fosfato (0.05mM) y de M5GG con alto fosfato (10mM), a cada uno se le agregó 15µL de gentamicina 0.04%. Los cultivos fueron inoculados con las cepas CB15 pCHYC-4 1750, CB15 pCHYC-4 2819 y CB15 pCHYC-4 0210. Los cultivos se dejaron crecer hasta la etapa exponencial (0.3 de densidad óptica a 660nm) y se observaron al microscopio (figura 4).

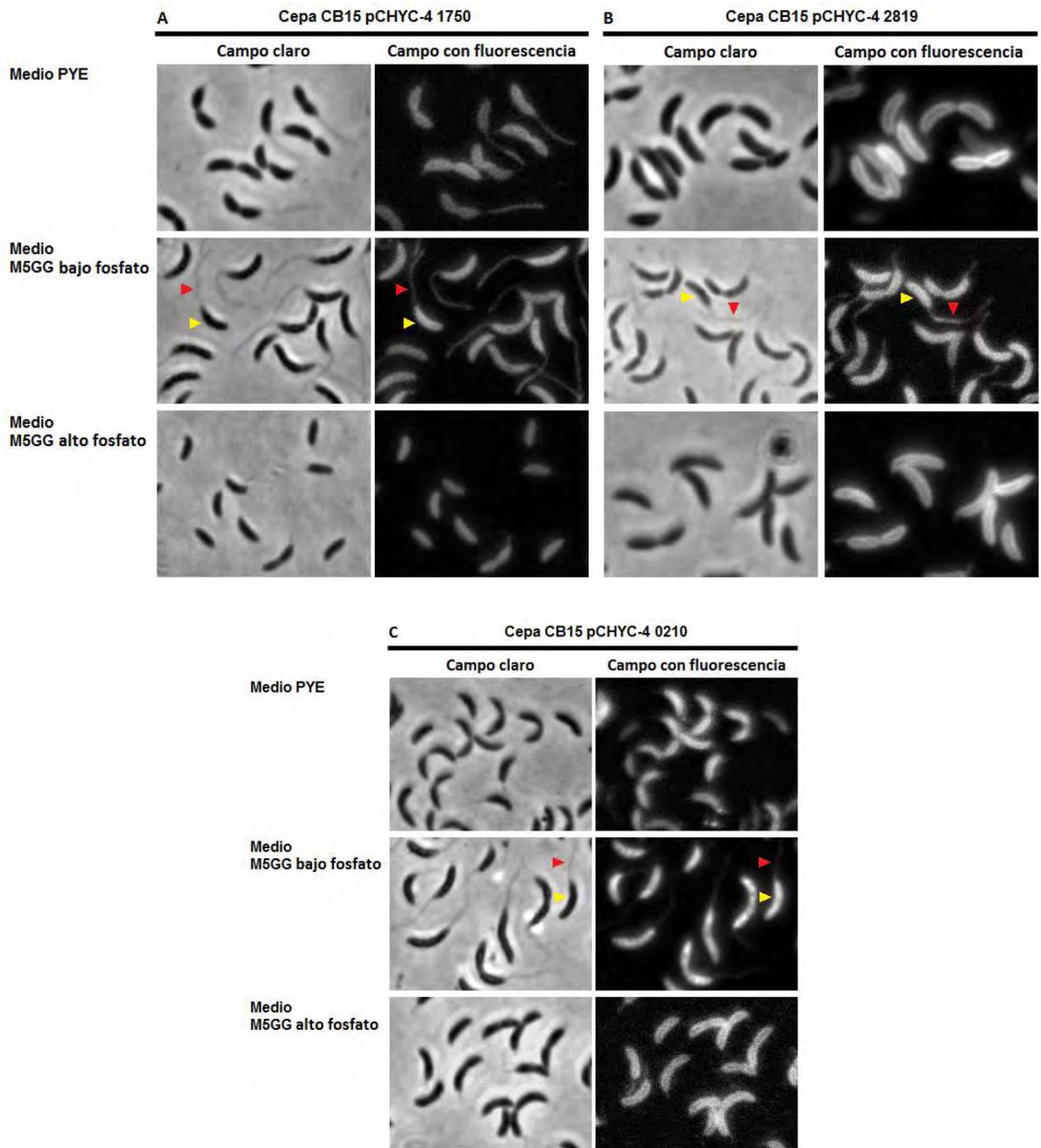


Figura 4. Microscopía de campo claro y con epifluorescencia a 1000X de las cepas CB15 pCHYC-4 1750 (A), CB15 pCHYC-4 2819 (B) y CB15 pCHYC-4 0210 (C), crecidas en las distintas condiciones nutricionales (medios PYE, M5GG con bajo fosfato y M5GG con alto fosfato). La flecha roja en las imágenes de medio M5GG de bajo fosfato, señalan la prosteca mientras que las amarillas señalan el cuerpo celular de alguna de las células, las flechas se colocaron en ambos campos, sin embargo por falta de fluorescencia no se aprecian estas partes en algunos casos.

Con la finalidad de tratar de determinar diferencias en la expresión de las proteínas entre los distintos medios utilizados para cultivar las cepas y las tres distintas cepas de receptores dependientes de TonB, basándose en la idea de que la intensidad de la fluorescencia está relacionada con el nivel de expresión de la proteína fluorescente, tras la observación de las cepas al microscopio, las imágenes capturadas se analizaron con el programa ImageJ para la obtención de parámetros que permitieran cuantificar la fluorescencia obtenida en cada cepa. Los parámetros proporcionados por el programa, permitieron calcular la fluorescencia total corregida. Con los datos de cada cepa, se generaron gráficas (figura 5).

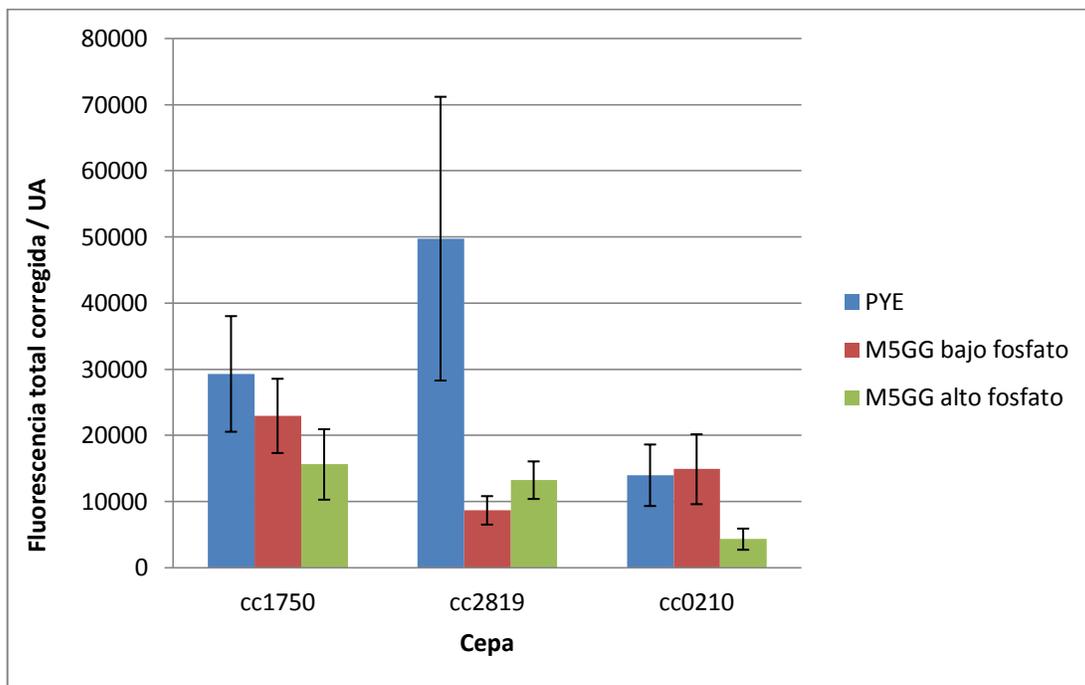


Figura 5. Gráfica con los datos de fluorescencia total corregida de las células de cada cepa de receptores dependientes de TonB, crecidas en los distintos medios de cultivo y observadas al microscopio. cc1750, cepa CB15 pCHYC-4 1750. cc2819, cepa CB15 pCHYC-4 2819. cc0210, cepa CB15 pCHYC-4 0210. Para cada cepa se analizaron 45 células (15 de cada medio). Las líneas en las barras representan la desviación estándar.

Con el análisis estadístico se compararon los datos de fluorescencia total corregida (FTC) obtenida en los diferentes medios dentro de una misma cepa, para determinar si existían diferencias en los distintos medios nutricionales utilizados. Se confrontaron los datos de FTC del medio PYE con el M5GG de alto fosfato, el medio PYE con el M5GG de bajo fosfato y el medio M5GG de alto fosfato con el M5GG de bajo fosfato de cada una de las cepas. En las cepas cc1750 y cc2819 se obtuvieron diferencias significativas en todas las comparaciones (los valores obtenidos no superaron el valor de  $\alpha$  de 0.5). En la cepa cc0210, las comparaciones también mostraron diferencias significativas, excepto en el caso del medio PYE y el M5GG de bajo fosfato, en donde no se puede

asegurar que las células de esta cepa presenten mayor fluorescencia en medio M5GG de bajo fosfato que en PYE.

### Análisis por western blot de las proteínas de interés

Para corroborar la presencia de las proteínas de fusión, se llevó a cabo el análisis por western-blot. Al igual que en los cultivos para la visualización al microscopio, los extractos utilizados para esta técnica se prepararon en los medios PYE, M5GG con bajo fosfato (0.05mM) y de M5GG con alto fosfato (10mM), como se muestra en la figura 6 la única proteína de fusión cuya fracción mayoritaria corresponde a la proteína completa es la CC1750, las otras dos proteínas de fusión parecen ser rápidamente proteolizadas liberando a la proteína fluorescente. Este resultado indica que el único patrón de localización que posiblemente corresponda con el de la proteína nativa es el de la proteína de fusión de CC1750.

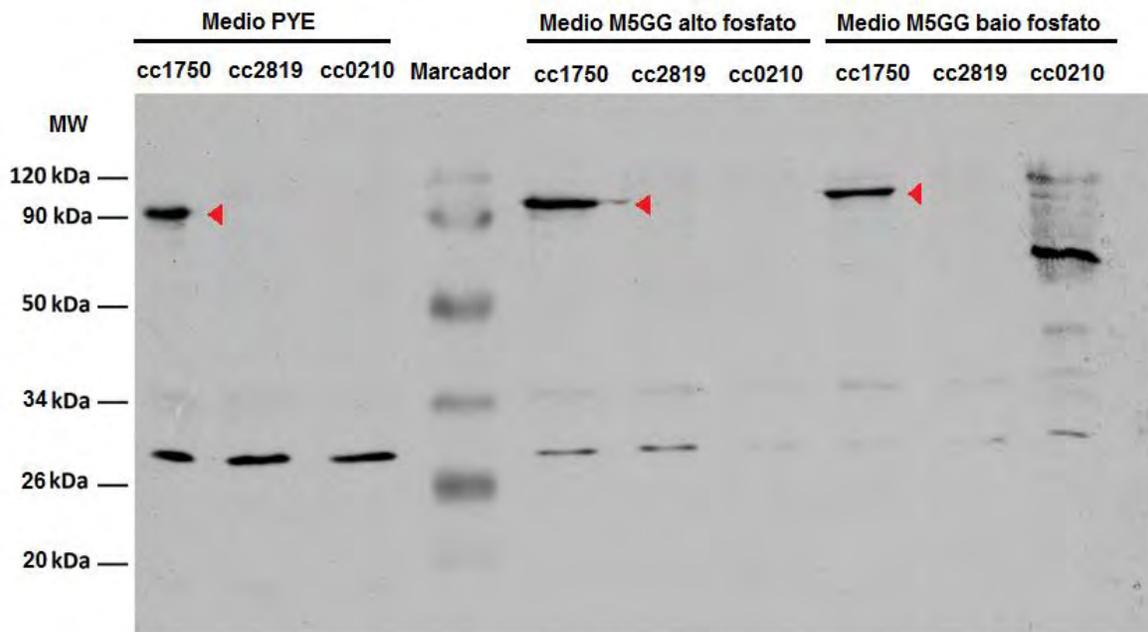


Figura 6. Western-blot de las proteínas cc1750, cc2819 y cc0210 en medios PYE, M5GG con alto fosfato y M5GG con bajo fosfato. Marcador utilizado: Thermo Scientific Prestained Protein Molecular Weight Marker. Las flechas rojas señalan la posible presencia de la proteína cc1750 en el western blot. Los pesos moleculares esperados de las proteínas de fusión son los siguientes: cc1750-mch: 99kDa. cc2819-mch: 91kDa. cc0210-mch: 122kDa.

## Obtención de secuencias de proteínas TonB

La consulta del artículo de Lohmiller *et al.* 2008, en el que se propone que el transporte de maltosa en *C. crescentus* ocurre mediante transportadores dependientes de TonB, proporcionó los locus\_tag de tres genes presentes en el genoma de la bacteria que se propone, codifican para proteínas TonB. Los tres locus\_tag reportadas en dicho trabajo son los siguientes: TonB1 cc2334a, TonB2 cc2327 y TonB3 cc3508. Con las secuencias ubicadas se procedió al diseño de los oligonucleótidos, al igual que con los TBDR, se les añadieron las secuencias de reconocimiento de las enzimas *EcoRI* y *SacI*. A continuación se muestra el alineamiento entre las secuencias de dichas proteínas para su comparación (figura 7).



Figura 7. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos que se propone, conforman las proteínas TonB (cc2327, cc2334a y cc3508). \* indica identidad de aminoácidos entre las tres secuencias, : indica identidad de aminoácidos entre dos de las secuencias. El alineamiento se obtuvo con el programa Clustal en MUSCLE 3.8 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>).

### Elaboración de las construcciones pCHYC-4 TonB1, pCHYC-4 TonB2 y pCHYC-4 TonB3 y obtención de cepas

El procedimiento para la obtención de las cepas con las proteínas fluorescentes TonB1, TonB2 Y TonB3, fue el mismo que en el caso de los TBDR, una vez diseñados los oligonucleótidos, se obtuvieron fragmentos que se purificaron, digirieron con las enzimas *EcoRI* y *SacI*, y se ligaron con el plásmido pCHYC-4 previamente purificado y digerido (con las mismas enzimas). Con las ligaciones, se transformaron células competentes de *E. coli* Top10. Mediante minipreps y su digestión, se seleccionaron las colonias con las construcciones que integran el plásmido y el fragmento de las proteínas, la estructura de las construcciones realizadas, se muestra en la figura 8.

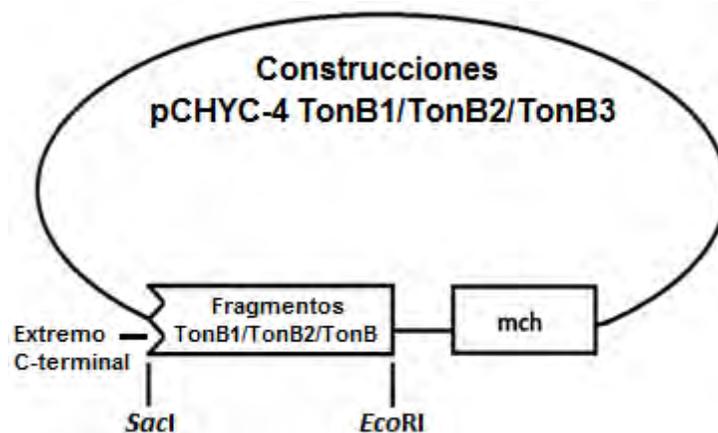


Figura 8. Estructura de las construcciones realizadas con los fragmentos de los genes codificantes para proteínas TonB y el plásmido pCHYC-4 con la proteína mCherry (mch). Entre el sitio de reconocimiento de la enzima *EcoRI* y el inicio de mch, hay aproximadamente 50 pares de bases.

Con las colonias seleccionadas, se purificó la construcción y se transformaron a las células competentes de *C. crescentus* CB15, con dicha transformación se obtuvieron las cepas CB15 pCHYC-4 TonB1, CB15 pCHYC-4 TonB2 y CB15 pCHYC-4 TonB3. Las colonias obtenidas de cada cepa, se crecieron a 0.3 de densidad óptica a 660nm, en los medios PYE, M5GG con bajo fosfato y M5GG con alto fosfato, para su observación con microscopía de campo claro y de epifluorescencia (figura 9).

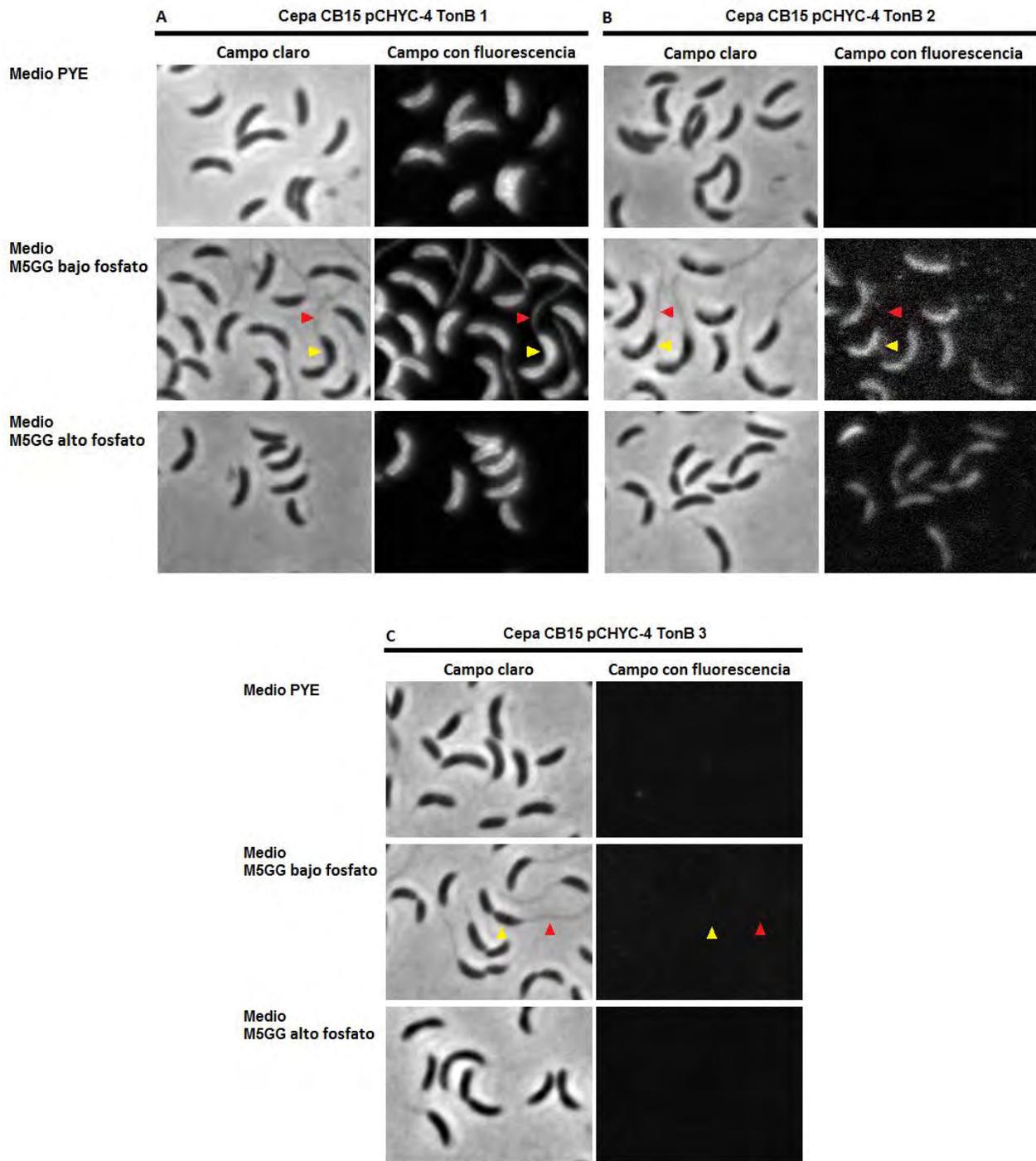


Figura 9. Microscopía de campo claro y con epifluorescencia a 1000X de las cepas CB15 pCHYC-4 TonB1 (A), CB15 pCHYC-4 TonB2 (B) y CB15 pCHYC-4 TonB3 (C), crecidas en los distintos medios de cultivo. La flecha roja en las imágenes de medio M5GG de bajo fosfato, señalan la prosteca mientras que las amarillas señalan el cuerpo celular de alguna de las células, las flechas se colocaron en ambos campos, sin embargo por falta de fluorescencia no se aprecian estas partes en algunos casos.

Al igual que con las cepas de los receptores dependientes de TonB, con las imágenes obtenidas en el microscopio, también se llevó a cabo un análisis con el programa ImageJ para la cuantificación de la fluorescencia y así, detectar las diferencias en la expresión de las proteínas entre las cepas y por otro lado, entre los medios de cultivo con distintas concentraciones de fosfatos, dentro de cada cepa. Las gráficas elaboradas con estos datos se muestran en la figura 10.

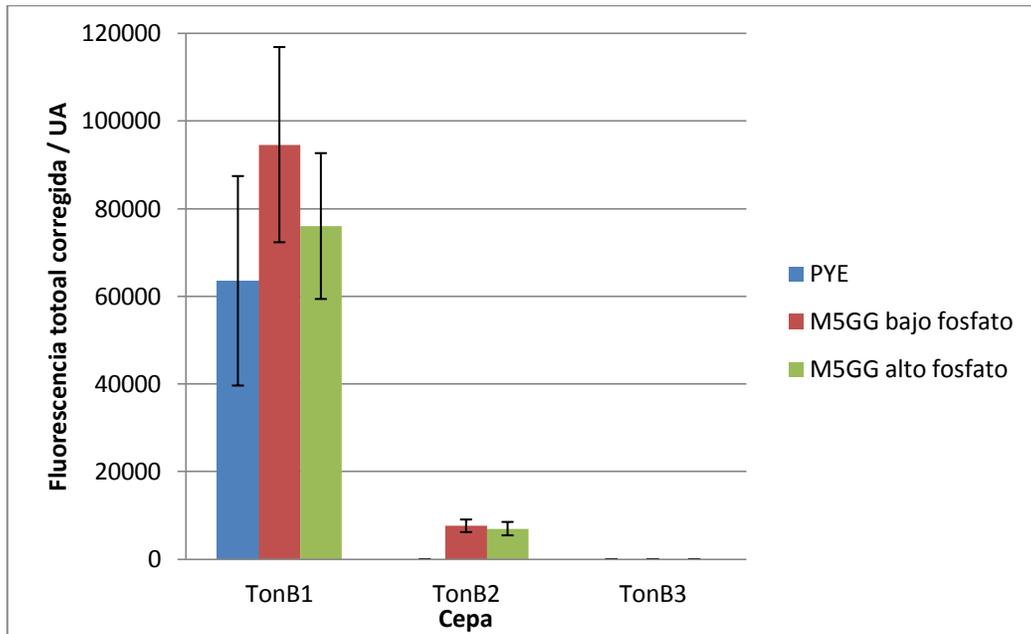


Figura 10. Gráfica con los datos de fluorescencia total corregida de las cepas CB15 pCHYC-4 TonB1 (TonB1), CB15 pCHYC-4 TonB2 (TonB2) y CB15 pCHYC-4 TonB3 (TonB3), crecidas en los distintos medios de cultivo (PYE, M5GG con alto fosfato y M5GG con bajo fosfato). Para cada cepa se analizaron 45 células (15 de cada medio, excepto en los casos donde no hubo fluorescencia). Las líneas en las barras representan la desviación estándar.

Al igual que con los receptores dependientes de TonB, se realizó el análisis estadístico para determinar diferencias significativas en la fluorescencia total corregida detectada en los distintos medios nutricionales utilizados. Nuevamente se confrontaron los datos de FTC del medio PYE con el M5GG de alto fosfato, el medio PYE con el M5GG de bajo fosfato y el medio M5GG de alto fosfato con el M5GG de bajo fosfato de cada una de las cepas (excepto TonB3 que no presentó fluorescencia en ninguna condición). Para TonB1, la comparación entre los medios PYE/M5GG de bajo fosfato y M5GG de alto fosfato/M5GG bajo fosfato mostró diferencias significativas, sin embargo, la diferencia entre la FTC de PYE y M5GG alto fosfato no fue significativa. La diferencia entre el medio M5GG de alto fosfato-M5GG de bajo fosfato de TonB2 tampoco resultó ser significativa.

## Western-blot de proteínas

Nuevamente se realizó un análisis por western-blot para verificar la expresión de las proteínas TonB1, TonB2 y TonB3. Los extractos utilizados para el procedimiento se obtuvieron creciendo las tres cepas en medio M5GG con alto fosfato y M5GG con bajo fosfato. Aunque en la figura 11 se observa una diferencia no esperada en el tamaño de las proteínas de fusión de TonB1 y TonB2, ambas proteínas parecen estar presentes. La proteína TonB3 no parece expresarse, lo que coincide con los resultados obtenidos en la microscopia de fluorescencia.

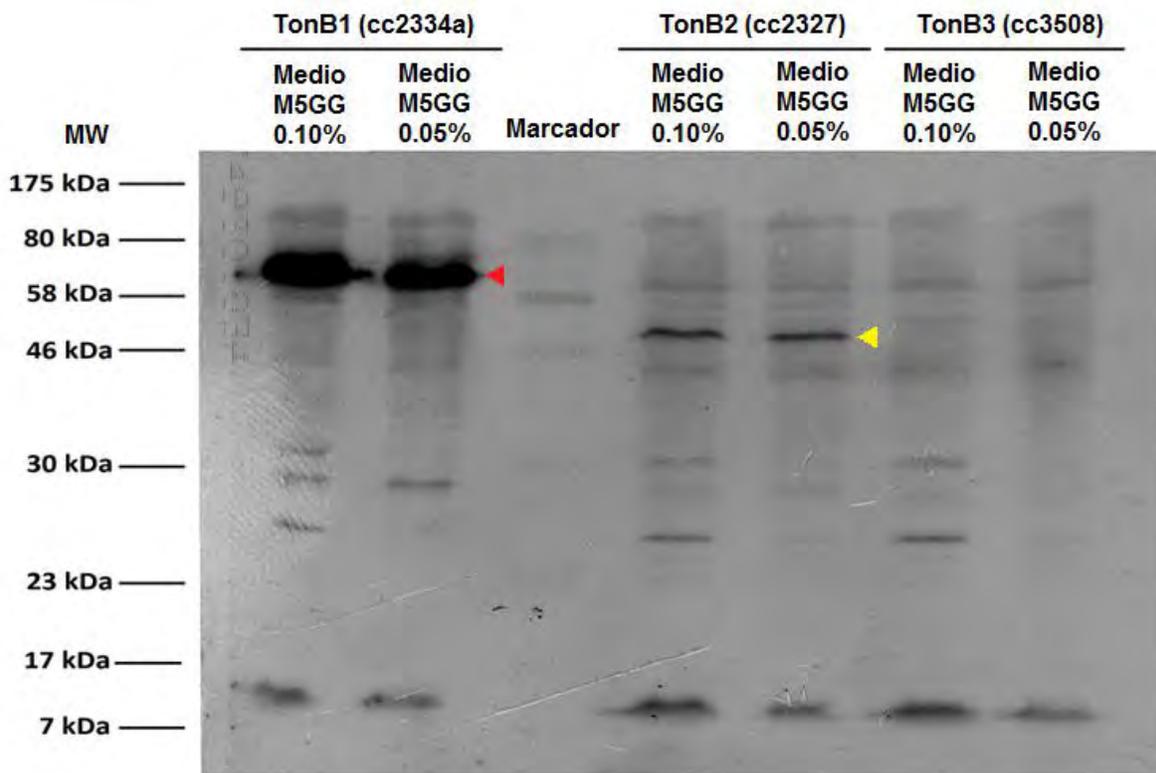


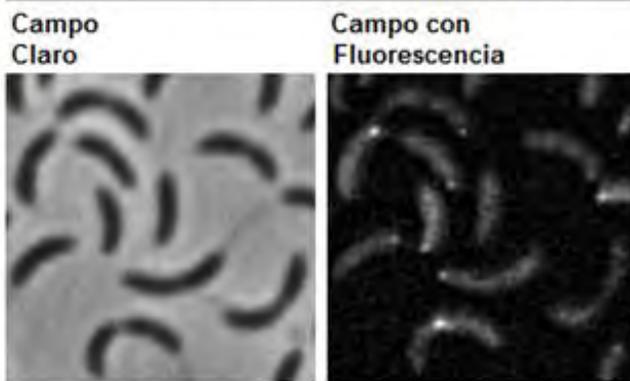
Figura 11. Western-blot de las proteínas TonB1 (cc2334a), TonB2 (cc2327) y TonB3 (cc3508), en medios M5GG con alto fosfato (10mM) y M5GG con bajo fosfato (0.05mM). Marcador utilizado: ColorPlus Prestained Protein Marker. La flecha roja y amarilla señala la posible presencia de TonB1 y TonB2 respectivamente. Los pesos moleculares de las proteínas de fusión son los siguientes: TonB1-mch: 56kDa. TonB2-mch: 55kDa. TonB3-mch: 72kDa.

### **Marcaje de proteínas periplásmicas con etiqueta de tetracisteínas**

Con el fin de obtener un método útil para la determinación de la localización de las proteínas TBDR y TonB, se realizaron fusiones en el carboxilo terminal de las proteínas TonB1 y TonB2 con una etiqueta de tetracisteínas utilizando los fragmentos de PCR usados anteriormente y el plásmido pTCYC-4, se excluyó a la proteína TonB3 por no haberse expresado durante los experimentos realizados. La etiqueta de tetracisteínas se une no-covalentemente a un compuesto que en el contexto de este péptido se vuelve fluorescente. Además se fusionó el plásmido pTCYC-4, con el fragmento de la proteína periplásmica DipM, digerido con las enzimas de restricción *SacI* y *NdeI*. La localización de esta proteína en *C. crescentus* es conocida, por lo cual se eligió como control experimental al momento de realizar la tinción. Adicionalmente la fusión de DipM con la proteína fluorescente se utilizó como control del tratamiento.

Como resultado de estos experimentos, se obtuvieron las cepas CB15 pTCYC-4 TonB1, CB15 pTCYC-4 TonB2 y CB15 pTCYC-4 DipM. Estas cepas se crecieron en cultivos con medio M5GG con alto fosfato hasta una densidad óptica de 0.3 a 660nm y se sometieron a los protocolos de fijación (con paraformaldehído al 30%), reducción de las cisteínas (con DTT 1M) y finalmente, la tinción con el reactivo FIAsh. Una vez teñidas, se observaron con microscopía de campo claro y epifluorescencia. En la figura 12 se muestran las fotos capturadas durante la microscopía, como se puede observar la localización de DipM-mCherry no se afecta por el tratamiento anterior a la tinción. Sin embargo la tinción de las tres fusiones con la etiqueta de tetracisteína resultó en una señal difusa. Como control de la tinción se obtuvo la fusión de TipN, una proteína membranal con el extremo carboxilo en el citoplasma, con la etiqueta de tetracisteínas. La tinción de esta cepa resultó en la señal esperada. Las modificaciones del protocolo de tinción que consistieron en la permeabilización de las células, tinción sin reducción con DTT, tinción de células sin fijar o diferentes lavados resultaron infructuosas.

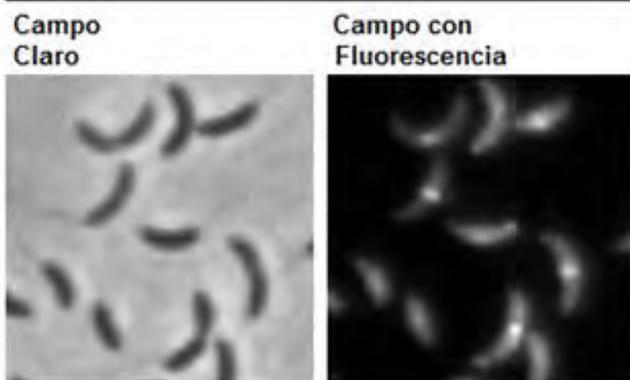
**A** Cepa control de fijación CB15 pTCYC-4 TipN



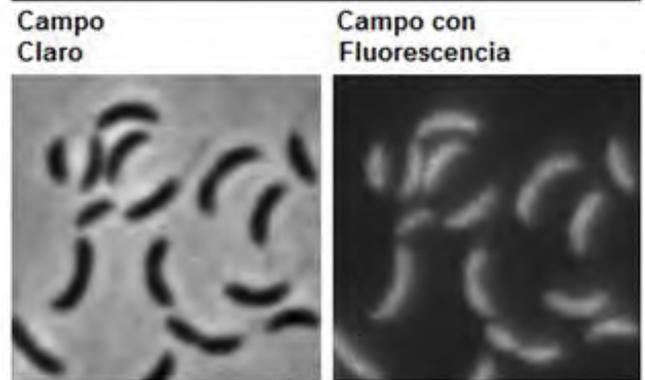
**B** Cepa control CB15 pCHYC-2 DipM



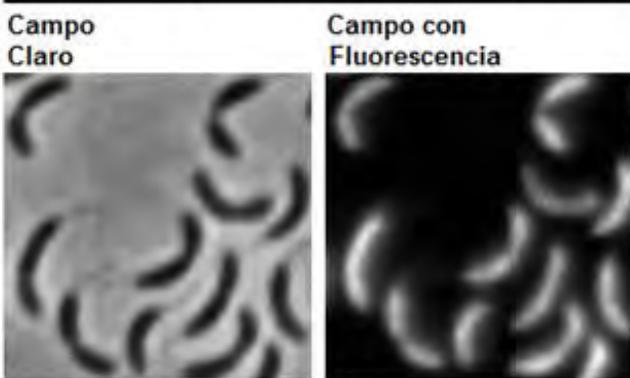
**C** Cepa control CB15 pCHYC-2 DipM fij. y red.



**D** Cepa CB15 pTCYC-4 DipM con tinción FIAsH



**E** Cepa CB15 pTCYC-4 TonB1 con tinción FIAsH



**F** Cepa CB15 pTCYC-4 TonB2 con tinción FIAsH

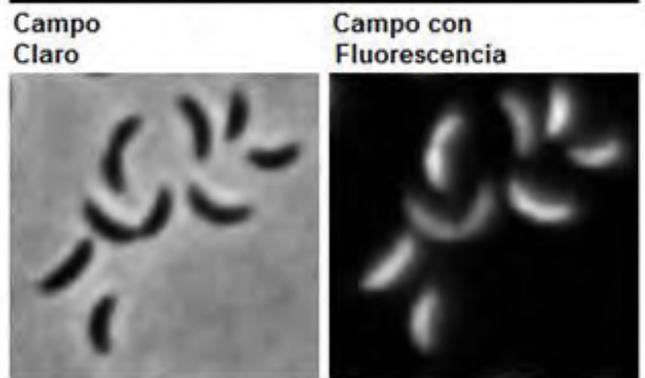


Figura 12. Microscopía en campo claro y fluorescencia de las cepas control CB15 pTCYC-4 TipN (A), CB15 pCHYC-2 DipM (B), CB15 pCHYC-2 DipM tras el tratamiento de fijación y reducción (C), y CB15 pTCYC-4 DipM (D), CB15 pTCYC-4 TonB1 (E), y CB15 pTCYC-4 TonB2 (F) tras el proceso de tinción FIAsH. En B se puede observar la localización que tiene DipM en *C. crescentus*.

## DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos con las construcciones CB15 pCHYC-4 1750 y CB15 pCHYC-4 TonB1 corroboran que el receptor dependiente de TonB cc1750 se encuentra presente tanto en el cuerpo celular como en la prosteca de *Caulobacter crescentus* (figura 4A) y además determinan que la proteína TonB1 (cc2334) se expresa en el cuerpo celular y la prosteca de la bacteria (figura 9A).

Con los experimentos llevados a cabo con las cepas CB15 pCHYC-4 1750, CB15 pCHYC-4 2819 y CB15 pCHYC-4 0210, se intentó determinar la localización de los receptores dependientes de TonB codificados por los genes cc1750, cc2819 y cc0210. La presencia de estas proteínas en la prosteca de *Caulobacter crescentus* ya había sido reportada en el análisis proteómico de la prosteca por Ireland *et al.* 2002, en donde además se señala que la composición de la prosteca consta de proteínas de membrana externa, principalmente los receptores dependientes de TonB. Sin embargo no se ha reportado hasta el momento si alguno de los TBDRs se localizan preferencialmente o exclusivamente en la prosteca.

En el caso de la fusión de la proteína cc1750, se obtuvo fluorescencia en todo el cuerpo celular y la prosteca de las células (figura 4A). En cuanto a la intensidad de dicha fluorescencia, se perciben diferencias significativas según el medio de cultivo. En el medio M5GG de alto fosfato la intensidad es menor respecto a la del medio M5GG con bajo fosfato que, a la vez, es menor que la intensidad de la cepa crecida en medio PYE (figura 5). Al contrastar estos resultados con el western-blot (figura 6), vemos que la banda esperada de 99kDa está presente en los tres medios, sugiriendo que posiblemente, el receptor dependiente de TonB codificado por el gen cc1750 se expresa no solo durante todo el ciclo celular, sino también en diferentes condiciones nutricionales, aunque en diferente medida a juzgar por la intensidad de la fluorescencia en los distintos medios.

En los ensayos con microscopía realizados con la cepa CB15 pCHYC-4 2819 (figura 4B), también hubo diferencias en la intensidad de la fluorescencia en los tres medios de cultivo probados, siendo ahora el cultivo con medio PYE en el que hay mayor intensidad, seguido por M5GG con alto fosfato y por último M5GG con bajo fosfato (figura 5). Mientras que con la cepa CB15 pCHYC-4 0210 (figura 4C), el cultivo con mayor intensidad de fluorescencia fue el elaborado con medio M5GG con bajo fosfato, y el que presentó menor intensidad fue el preparado con medio M5GG de alto fosfato (figura 5). Sin embargo, el western-blot reveló que en ninguno de los dos casos hay expresión de proteínas. En las placas obtenidas únicamente se perciben bandas de aproximadamente 30kDa, que es el peso molecular aproximado de la proteína mCherry, su expresión explica la fluorescencia de las dos cepas durante la microscopía (figura 6).

Tomando en cuenta que la microscopía y el western-blot coincidieron en los datos referentes a la presencia y la expresión del gen cc1750 en la cepa, se puede afirmar que este receptor dependiente de TonB, se encuentra en el cuerpo celular y en la prosteca de *C. crescentus*. Desafortunadamente las fusiones de los receptores codificados en los genes cc2819 y cc0210 son inestables por lo que no se pudo determinar su localización.

Los experimentos realizados con las proteínas propuestas como TonB, codificadas en los genes cc2334, cc2327 y cc3508, se llevaron a cabo con la intención de conocer si estas proteínas se encuentran en la prosteca de *C. crescentus*, lo cual aportaría información sobre la adquisición de nutrientes en esta estructura. El alineamiento de las secuencias de aminoácidos (figura 7), muestran mayor similitud en el extremo carboxilo terminal, que constituye una de las regiones más relevantes de la proteína, pues es la responsable de la interacción con la región denominada caja TonB del dominio globular, ubicada en el extremo amino terminal de los TBDRs, que permite el cambio conformacional para la translocación del sustrato al periplasma.

El análisis con microscopía de la cepa CB15 pCHYC-4 TonB1, dejó ver que la proteína TonB1 codificada por el gen cc2334, se encuentra en el cuerpo celular y la prosteca de la bacteria (figura 9A). La cuantificación de la intensidad de fluorescencia y el análisis estadístico entre los distintos medios utilizados para crecer la cepa reveló un mayor grado de fluorescencia en el medio de bajo fosfato. Sin embargo, las diferencias no fueron significativas entre el medio PYE y el de alto fosfato (figura 10) a pesar de esto, los datos muestran que en medios ricos en fosfato (como PYE y M5GG de alto fosfato) la expresión es menor que en aquellos con fosfato limitado. Con el western blot, se obtuvieron bandas con un peso molecular aproximado al predicho tanto en el medio M5GG con alto fosfato, como en el de bajo, lo cual confirma la presencia de la proteína de fusión (figura 11).

En el caso de la proteína TonB2, codificada por el gen cc2327, la microscopía no mostró fluorescencia en el caso del medio PYE pero sí en los medios M5GG, aunque sin diferencias significativas en la intensidad entre el medio de bajo fosfato y el de alto fosfato. En general, la fluorescencia de esta cepa, tuvo una intensidad baja en comparación con la observada en la cepa de TonB1. Dicha fluorescencia se concentró en el cuerpo celular y parece no presentarse en la prosteca (como se aprecia en el medio M5GG con bajo fosfato de la figura 9B). El western-blot, muestra bandas de peso molecular ligeramente menores a las predichas y no tan evidentes como en TonB1, lo cual sugiere degradación de la proteína y posiblemente explica la baja intensidad de la fluorescencia (figura 11).

Finalmente, la que fue propuesta como proteína TonB3, codificada en el gen cc3508, no mostró fluorescencia en ninguno de los tres medios utilizados (figura 9C). Estos resultados coincidieron con el western-blot, que

tampoco reveló la expresión de la proteína en ninguno de los medios M5GG (figura 11). Un análisis posterior de esta proteína (realizado con la función “Conserved Domains” disponible en la página web [www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)), reveló que la región amino terminal de CC3508 consiste de un dominio MecR1. La proteína MecR1 funciona como un antirrepresor encargado de la regulación de la resistencia a la metilina y la región amino terminal de esta proteína tiene una función presumiblemente sensora. Nuestros experimentos muestran que CC3508 no se expresa en las condiciones establecidas, por lo que probablemente su función está relacionada con la respuesta a algún estímulo no identificado. La presencia en el extremo carboxilo terminal de un dominio TonB sugiere que esta proteína pudiera acoplar la transmisión de energía a los receptores dependientes de TonB ante algún estímulo.

Los datos obtenidos sugieren que en las condiciones en las que fueron cultivadas las células, la proteína TonB1 codificada por el gen *cc2334* tiene una función importante, mostrando una expresión elevada en las distintas condiciones y principalmente en condiciones con bajas concentraciones de fosfatos; mientras que la proteína TonB2, tiene un papel secundario, expresándose en menor medida. En cuanto a TonB3, posiblemente es expresada únicamente en condiciones diferentes y su función es distinta o más especializada que el de las otras proteínas TonB. Volviendo al caso de TonB1, la observación de su presencia en la prosteca de *C. crescentus*, aporta evidencia a favor de la posibilidad de que en esta estructura se lleva a cabo el transporte activo de nutrientes hacia el periplasma, lo cual le sumaría importancia en el tema de adquisición de nutrientes, en el que *C. crescentus* destaca por la eficiencia que le ha permitido habitar medios con bajas concentraciones de nutrientes.

Sin embargo, el establecer la presencia o ausencia de las proteínas TonB en la prosteca, no puede determinar por sí sólo si existe o no transporte activo en ella, ni explicar cómo se lleva a cabo. Si se comprueba la presencia de TonB en la prosteca, surgen nuevas cuestiones importantes, como el aclarar qué ocurriría con el sustrato una vez que éste se encuentra en el periplasma. Por un lado podría ser transportado al núcleo citoplasmático de la prosteca por transportadores ABC, pero la presencia de este tipo de proteínas no ha sido reportada en la membrana interna de esta estructura. Alternativamente, los sustratos podrían difundir a través del espacio periplásmico de la prosteca hasta el cuerpo celular (donde hay transportadores ABC), si esto requiere de una proteína periplásmica, ésta tendría que pasar por las barreras constituidas por las “crossbands” y no se sabe si realmente dicha proteína podría recorrer distancias considerables (como la de la prosteca) sin disociarse de su sustrato. Este problema fue planteado por Klein *et al.* 2013, con la proteína periplásmica de unión al fosfato PstS, que según cálculos elaborados con valores de disociación y constantes de unión de la proteína, sólo es capaz de difundir aproximadamente 0.7µm antes de disociarse. En condiciones

de crecimiento de bajo fosfato, la prosteca tiene una longitud de varias decenas de micrómetros, las cuales representan las condiciones en las que esta proteína junto con el resto del complejo Pst resultarían esenciales.

Si se demostrara que el transporte activo está restringido al cuerpo celular de *C. crescentus*, aún se tendría que dilucidar la función de los receptores dependientes de TonB en la prosteca. Eisenbeis y colaboradores 2002 propusieron, basados en los resultados de sus experimentos, que NagA (un receptor dependiente de TonB), es capaz de formar un pequeño poro por el cual es posible difundir de forma pasiva N-acetil-glucosamina, un monosacárido de menos de 300 Da; mientras que para el transporte de oligosacáridos de mucho mayor peso, funciona como un transportador dependiente de energía. Sabiendo que *C. crescentus*, no cuenta con homólogos para las principales porinas generales, como OmpF u OmpC (Wagner, 2006), se podría justificar la presencia de estos transportadores en la prosteca, en donde funcionarían por medio de difusión pasiva permitiendo el ingreso de compuestos pequeños. Sin embargo, además de que la hipótesis de Eisenbeis y colaboradores, tiene que ser probada, la variedad y características de los sustratos, al igual que la especificidad con la que éstos se unen a los receptores dependientes de TonB en *C. crescentus*, aún permanece en gran parte desconocida (Presley, 2014), lo cual no permite extrapolar esta propuesta a otros receptores además de NagA (Eisenbeis *et al.* 2008).

Para establecer un método alternativo que permitiera determinar la localización de las proteínas TonB pero sobre todo de los TBDRs, se intentó establecer un protocolo de tinción con el colorante FIAsh, el cual al unirse a una etiqueta de tetracisteínas se vuelve fluorescente. El problema de la implementación de esta técnica para proteínas periplásmicas es que la interacción del colorante y la etiqueta requiere que las cisteínas estén reducidas y en el periplasma las cisteínas son oxidadas por el ambiente o por tiorredoxinas. Por este motivo se incluyó un paso de reducción de cisteínas por DTT. Los controles realizados con la fusión DipM-mCherry mostraron que los pasos de fijación y reducción no alteraban significativamente la localización. Sin embargo, la localización de DipM-tetracisteína se perdió completamente, provocando la fluorescencia de todo el cuerpo celular. La correcta localización de una proteína con la etiqueta de cisteínas en el citoplasma confirma la funcionalidad del protocolo de tinción. Por lo tanto, no resulta confiable tomar en cuenta los resultados obtenidos con las cepas CB15 pTCYC-4 TonB1 y CB15 pTCYC-4 TonB2 para la determinación de la localización de las proteínas TonB, en las que se observa fluorescencia uniforme en todo el cuerpo celular.

## CONCLUSIONES

- Se corroboró que el receptor dependiente de TonB codificado en el gen cc1750 se encuentra presente en la prosteca de *Caulobacter crescentus*. La presencia de los receptores cc2819 y 0210 en la estructura, no pudo ser confirmada.
- La proteína propuesta como TonB1, codificada por el gen cc2334 se encuentra presente en la prosteca de *Caulobacter crescentus*.
- La proteína propuesta como TonB2, codificada por el gen cc2327, tiene una expresión moderada con respecto a TonB1 y no muestra su presencia en la prosteca de *Caulobacter crescentus*.
- La expresión de la proteína propuesta como TonB3, codificada en el gen cc3508, no fue detectada en las condiciones planteadas en este trabajo. Es posible que su función sea diferente a la de TonB.

## PERSPECTIVAS

- Investigar la existencia de sustratos reportados para los receptores dependientes de TonB, que permitieran probar su expresión mediante distintos medios nutricionales.
- Determinar la funcionalidad de los receptores dependientes de TonB en la prosteca de *Caulobacter crescentus* utilizando pequeñas etiquetas que permitan rastrear y determinar si hay transporte de sustratos a través de ellos.
- Elaborar una mutante de TonB1 y analizar su fenotipo.
- Elaborar proteínas fluorescentes de TonB utilizando el extremo amino terminal en vez del carboxilo terminal (que es el que interactúa con la caja TonB del receptor dependiente de TonB) y comparar los resultados de los dos tipos de construcciones.
- Elaborar proteínas fluorescentes de ExbB y ExbD (parte del complejo que transmite la energía de la membrana citoplasmática a la membrana externa) y estudiar su localización en *Caulobacter crescentus*.

## ANEXO

A continuación se muestran las tablas obtenidas en Excel al realizar el análisis estadístico con los datos de fluorescencia total corregida (FTC) de las cepas estudiadas.

	Comparación de FTC en medio PYE y M5GG de bajo fosfato en cepa cc1750		Comparación de FTC en medio PYE y M5GG de alto fosfato en cepa cc1750	
	Variable 1 (PYE)	Variable 2 (M5GG)	Variable 1 (PYE)	Variable 2 (M5GG)
Media	29305.8249	22960.7369	29305.8249	15616.3575
Varianza	76419970.7974	31507580.2139	76419970.7974	28355533.8260
Observaciones	15.0000	15.0000	15.0000	15.0000
Diferencia hipotética de las medias	0.0000		0.0000	
Grados de libertad	24.0000		23.0000	
Estadístico t	2.3655		5.1797	
P(T<=t) una cola	0.0132		0.0000	
Valor crítico de t (una cola)	1.7109		1.7139	
P(T<=t) dos colas	0.0264		0.0000	
Valor crítico de t (dos colas)	2.0639		2.0687	
	Comparación de FTC en medio M5GG de alto fosfato y M5GG de bajo fosfato en cepa cc1750		Comparación de FTC en medio PYE y M5GG de bajo fosfato en cepa cc2819	
	Variable 1 (ALTO)	Variable 2 (BAJO)	Variable 1 (PYE)	Variable 2 (M5GG)
Media	15616.3575	22960.7369	49757.8026	8676.0697
Varianza	28355533.8260	31507580.2139	460095202.9551	4638719.5608
Observaciones	15.0000	15.0000	15.0000	15.0000
Diferencia hipotética de las medias	0.0000		0.0000	
Grados de libertad	28.0000		14.0000	
Estadístico t	-3.6764		7.3806	
P(T<=t) una cola	0.0005		0.0000	
Valor crítico de t (una cola)	1.7011		1.7613	
P(T<=t) dos colas	0.0010		0.0000	
Valor crítico de t (dos colas)	2.0484		2.1448	
	Comparación de FTC en medio PYE y M5GG de alto fosfato en cepa cc2819		Comparación de FTC en medio M5GG de alto fosfato y M5GG de bajo fosfato en cepa cc2819	
	Variable 1 (PYE)	Variable 2 (M5GG)	Variable 1 (ALTO)	Variable 2 (BAJO)
Media	49757.8026	13241.2219	13241.2219	8676.0697
Varianza	460095202.9551	8050428.3129	8050428.3129	4638719.5608
Observaciones	15.0000	15.0000	15.0000	15.0000
Diferencia hipotética de las medias	0.0000		0.0000	
Grados de libertad	14.0000		26.0000	
Estadístico t	6.5365		4.9635	
P(T<=t) una cola	0.0000		0.0000	
Valor crítico de t (una cola)	1.7613		1.7056	
P(T<=t) dos colas	0.0000		0.0000	
Valor crítico de t (dos colas)	2.1448		2.0555	
	Comparación de FTC en medio PYE y M5GG de bajo fosfato en cepa cc0210		Comparación de FTC en medio PYE y M5GG de alto fosfato en cepa cc0210	
	Variable 1 (PYE)	Variable 2 (M5GG)	Variable 1 (PYE)	Variable 2 (M5GG)
Media	13986.5537	14893.6839	13986.5537	4318.8216
Varianza	21613873.6994	27917820.6680	21613873.6994	2556711.2239
Observaciones	15.0000	15.0000	15.0000	15.0000
Diferencia hipotética de las medias	0.0000		0.0000	
Grados de libertad	28.0000		17.0000	
Estadístico t	-0.4992		7.6160	
P(T<=t) una cola	0.3108		0.0000	
Valor crítico de t (una cola)	1.7011		1.7396	

P(T<=t) dos colas	0.6215		0.0000	
Valor crítico de t (dos colas)	2.0484		2.1098	
	Comparación de FTC en medio M5GG de alto fosfato y M5GG de bajo fosfato en cepa cc0210		Comparación de FTC en medio PYE y M5GG de bajo fosfato en cepa TonB1	
	Variable 1 (ALTO)	Variable 2 (BAJO)	Variable 1 (PYE)	Variable 2 (M5GG)
Media	4318.8216	14893.6839	63515.5021	94584.6513
Varianza	2556711.2239	27917820.6680	571440575.0073	496227324.828
Observaciones	15.0000	15.0000	15.0000	15.0000
Diferencia hipotética de las medias	0.0000		0.0000	
Grados de libertad	17.0000		28.0000	
Estadístico t	-7.4191		-3.6826	
P(T<=t) una cola	0.0000		0.0005	
Valor crítico de t (una cola)	1.7396		1.7011	
P(T<=t) dos colas	0.0000		0.0010	
Valor crítico de t (dos colas)	2.1098		2.0484	
	Comparación de FTC en medio PYE y M5GG de alto fosfato en cepa TonB1		Comparación de FTC en medio M5GG de alto fosfato y M5GG de bajo fosfato en cepa TonB1	
	Variable 1 (PYE)	Variable 2 (M5GG)	Variable 1 (ALTO)	Variable 2 (BAJO)
Media	63515.5021	76010.5800	76010.5800	94584.6513
Varianza	571440575.0073	276903601.4774	276903601.4774	496227324.828
Observaciones	15.0000	15.0000	15.0000	15.0000
Diferencia hipotética de las medias	0.0000		0.0000	
Grados de libertad	25.0000		26.0000	
Estadístico t	-1.6615		-2.5872	
P(T<=t) una cola	0.0546		0.0078	
Valor crítico de t (una cola)	1.7081		1.7056	
P(T<=t) dos colas	0.1091		0.0156	
Valor crítico de t (dos colas)	2.0595		2.0555	
	Comparación de FTC en medio M5GG de alto fosfato y M5GG de bajo fosfato en cepa TonB2			
	Variable 1 (ALTO)	Variable 2 (BAJO)		
Media	6946.1433	7590.9507		
Varianza	2341036.1480	2070810.3938		
Observaciones	15.0000	15.0000		
Diferencia hipotética de las medias	0.0000			
Grados de libertad	28.0000			
Estadístico t	-1.1890			
P(T<=t) una cola	0.1222			
Valor crítico de t (una cola)	1.7011			
P(T<=t) dos colas	0.2444			
Valor crítico de t (dos colas)	2.0484			

## REFERENCIAS

- Baldi, S. et al. (2012). Bacterial Border Fence. *Cell*, *151*, 1159-1160.
- Benz, R. (2004) Bacterial and Eukaryotic Porins. Weinheim: Wiley–VCH.
- Byron, C. H. et al. (2007). Bioinformatic analysis of the TonB protein family. *Biometals*, *20*, 467-483.
- Cao, Y. et al. (2012). Improved enrichment and proteomic identification of outer membrane proteins from a Gram-negative bacterium: Focus on *Caulobacter crescentus*. *Proteomics*, *12*, 251-262.
- Chimento, D. P. et al. (2005). Comparative Structural Analysis of TonB Dependent Outer Membrane Transporters: Implications for the Transport Cycle. *PROTEINS: Structure, Function and Bioinformatics*, *59*, 240-251.
- Curtis, P. D. et al. (2010). Getting in the Loop: Regulation of Development in *Caulobacter crescentus*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *74*(1), 13-41.
- Eisenbeis, S. et al. (2008). NagA-Dependent Uptake of N-Acetyl-Glucosamine and N-Acetyl-Chitin Oligosaccharides across the Outer Membrane of *Caulobacter crescentus*. *Journal of Bacteriology*, *190*(15), 5230-5238.
- Forbes, B. A. et al. (2009). Diagnóstico Microbiológico. (12<sup>a</sup> ed.). Argentina: Editorial Médica Panamericana.
- Gonin, M. et al. (2000). Regulation of the Stalk Elongation by Phosphate in *Caulobacter crescentus*. *Journal of Bacteriology*, *182*(2), 337-347.
- Gumbart, J. et al. (2007). Mechanics of Force Propagation in TonB Dependent Outer Membrane Transport. *Biophysical Journal*, *93*, 496-504.
- Ireland, M. M. E. et al. (2002). Proteomic Analysis of the *Caulobacter crescentus* Stalk indicates competence for nutrient uptake. *Molecular Microbiology*, *45*(4), 1029-1041.
- Khursigara, C. M. et al. (2004). Enhanced Binding of TonB to a Ligand-loader Outer Membrane Receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, *279*(9), 7405-7412.
- Klein, E. A. et al. (2013). Physiological role of stalk lengthening in *Caulobacter crescentus*. *Communicative and Integrative Biology*, *6*(4).

- Koedding, J. et al. (2003). Dimerization of TonB Is Not Essential for Its Binding to the Outer Membrane Siderophore Receptor FhuA of *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(11), 9978-9986.
- Krewulak, K. D. et al. (2011). TonB or not TonB: is that the question?. *Biochemistry and Cell Biology*, 89, 87-97.
- Letain, T. E. et al. (1997). TonB protein appears to transduce energy by shuttling between the cytoplasmic membrane and the outer membrane in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 24(2), 271-283.
- Lohmiller, S. et al. (2008). TonB-dependent maltose transport by *Caulobacter crescentus*. *Microbiology*, 154, 1748-1754.
- Neugebauer, H. et al. (2005). ExbBD Dependent Transport of Maltodextrins through the Novel MalA Protein across the Outer Membrane of *Caulobacter crescentus*. *Journal of Bacteriology*, 187(24), 8300-8311.
- Nierman, W. C. et al. (2001). Complete Genome Sequence of *Caulobacter crescentus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(11), 4133-4141.
- Noinaj, N. et al. (2010). TonB-Dependent Transporters: Regulation, Structure and Function. *Annual Review of Microbiology*, 64, 43-60.
- Parija, S. C. (2009). Textbook of Microbiology and Immunology. India: Elsevier.
- Peacock, R. S. et al. (2005). The solution Structure of the C-Terminal Domain of TonB and Interaction Studies with TonB Box Peptides. *Journal of molecular Biology*, 345, 1185-1197.
- Presley, G. N. et al. (2014). Extracellular gluco-oligosaccharide degradation by *Caulobacter crescentus*. *Microbiology*, 160, 635-645.
- Remaut, H. et al. (2014). Bacterial Membranes: Structural and Molecular Biology. Gran Bretaña: Caister Academic Press.
- Ruiz, R. et al. (2014). Analysis of the *Caulobacter crescentus* Zur regulon reveals novel insights in zinc acquisition by TonB dependent outer membrane proteins. *BMC Genomics*, 15.
- Sauter, A. et al. (2003). In Vivo Evidence for TonB Dimerization. *Journal of Bacteriology*, 185(19), 5747-5754.
- Schlimpert, S. et al. (2012). General Protein Diffusion Barriers Create Compartments within Bacterial Cells. *Cell*, 151, 1270-1282.

Thanbichler, M. et al. (2007). A comprehensive set of plasmids for vanillate- and xylose-inducible gene expression in *Caulobacter crescentus*. *Nucleic Acids Research*, 35(20).

Tortora, G. J. et al. (2007). *Introducción a la Microbiología*. (9ª ed.). Argentina: Editorial Médica Panamericana.

Wagner, J. K. et al. (2006). A nutrient uptake role for bacterial cell envelope extensions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(31), 11772-11777.

Wagner, J. K. et al. (2007). Out on a limb: how the *Caulobacter* stalk can boost the study of bacterial shape. *Molecular Microbiology*, 64(1), 28-33.

Wiener, M. C. (2005). TonB-dependent outer membrane transport: going for Baroque?. *Current Opinion in Structural Biology*, 15, 394-400.