



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**Caracterización de los mecanismos involucrados
en la difusión limitada de la proteína OmpA2 de
Caulobacter crescentus.**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias Biomédicas

P R E S E N T A :

Luis David Ginez Vázquez

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Sebastian Poggio Ghilarducci

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

COMITÉ TUTOR

Dr. Otto Geiger

Dr. Miguel Ángel Cevallos Gaos

Centro de Ciencias Genómicas, UNAM

Ciudad Universitaria, Ciudad de México.

Febrero de 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Datos del alumno

Ginez
Vázquez
Luis David
Universidad Nacional Autónoma de México
Instituto de Investigaciones Biomédicas
Doctorado en Ciencias Biomédicas
410056075

Datos del Tutor

Dr. Sebastian Poggio Ghilarducci

Datos del sinodal 1 (Presidente)

Dr. Georges Dreyfus Cortés

Datos del sinodal 2 (Secretario)

Dr. Otto Geiger

Datos del sinodal 3 (Vocal)

Dra. María de Lourdes Girard Cuesy

Datos del sinodal 4 (Vocal)

Dra. Bertha María Josefina González Pedrajo

Datos del sinodal 5 (Vocal)

Dr. Rodolfo García Contreras

Datos del trabajo escrito

Caracterización de los mecanismos involucrados en la difusión limitada de la proteína OmpA2 de *Caulobacter crescentus*.

70 páginas

Febrero de 2020

Agradecimientos

Este trabajo se realizó bajo la tutoría del Dr. Sebastian Poggio Ghilarducci en el Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB), UNAM. Fue financiado parcialmente por el proyecto PAPIIT IN203119 y por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), institución que otorgó la beca número 333933 a Luis David Ginez Vázquez.

Se agradece a los miembros del comité tutor y a los sinodales de examen de grado. También, a la Dra. Rosa Laura Camarena Mejía por sus aportaciones constantes y por la revisión crítica del manuscrito publicado.

En gran parte del trabajo experimental se contó con el apoyo de la Q.F.B. Aurora Ventura Osorio Franco.

A la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, donde se resolvió la secuencia genética de varias de las construcciones diseñadas en este estudio.

ÍNDICE

Resumen	5
Abstract	6
Introducción	
1. Estructura y estabilidad de la envoltura celular en bacterias Gram-negativas.	7
2. Estructura de la membrana externa.	10
3. Proteínas integrales de membrana externa (OMPs): estructura y funciones.	12
4. Biogénesis de las OMPs.	12
5. Organización de las OMPs en la ME de <i>E. coli</i> .	15
6. Características de OmpA en <i>E. coli</i> .	20
7. Características de <i>Caulobacter crescentus</i> .	23
8. OmpA2 forma un gradiente de concentración en <i>C. crescentus</i> .	27
9. Gradientes de concentración de proteínas en otras bacterias.	28
Hipótesis	29
Objetivos	29
Resultados	
1. OmpA2 es una proteína inmóvil en la membrana externa de <i>C. crescentus</i> .	30
2. OmpA2 requiere de sus dos dominios estructurales para formar el gradiente.	32
3. La inmovilidad de OmpA2 depende de la unión del dominio C-terminal con el peptidoglicano.	36
4. La unión de OmpA2 con la pared celular es importante para la estabilidad de la proteína y la formación del gradiente.	37
5. La difusión del barril β es independiente de la depleción de FtsZ.	42
6. El gradiente de OmpA2 se forma por inserción polar y difusión limitada.	45
Discusión	48
Conclusiones	52
Material y métodos	53
Anexo 1. Construcción de plásmidos y obtención de cepas.	61
Referencias	64

Resumen

La localización de proteínas en bacterias, de acuerdo con patrones espaciales y temporales bien definidos, es de gran relevancia para la organización interna y la fisiología celular. Uno de los patrones menos frecuentes y, por lo tanto, menos estudiados, son los gradientes de concentración. Éstos se forman por la acumulación de una o varias proteínas en un sitio específico y su posterior difusión hacia el resto de la célula.

En este trabajo caracterizamos los mecanismos que le permiten a OmpA2 establecer y mantener un gradiente de concentración en la membrana externa (ME) de *Caulobacter crescentus*. Dicho patrón depende de la posición del gen en el cromosoma, e implica que la síntesis y la translocación de la proteína hacia el periplasma ocurren cerca del locus, y que el gradiente se forma por la difusión de la proteína a partir de este punto. Mostramos que la translocación de OmpA2, dependiente de SecA y SecB, así como la identidad del péptido señal nativo, son necesarios para establecer el gradiente. La caracterización de la localización y movilidad de la proteína completa, así como las de sus dos dominios estructurales, mostró que OmpA2 es una proteína inmóvil y que ambos dominios tienen distintas contribuciones a la formación del gradiente, la cual ocurre en dos pasos. El barril β es requerido para una restricción inicial rápida de la difusión de la proteína en el periplasma, y una vez ensamblado en la ME difunde lentamente. Después, el dominio C-terminal se une de manera estable a la pared de peptidoglicano y estabiliza la posición de OmpA2.

Dado que en *C. crescentus*, la difusión del barril β de OmpA2 es contraria al comportamiento del barril de OmpA y el de otros barriles en *Escherichia coli*, se propone que las ME de ambas bacterias tienen diferentes propiedades que podrían ser relevantes para la organización de este tipo de proteínas.

Abstract

Protein localization in bacteria, according to well-defined spatial and temporal patterns, is relevant for inner organization and cell physiology. Protein concentration gradients are unusual patterns and for this reason, they are poorly studied and understood. Gradients are established by the accumulation of one or several proteins at a specific site and subsequent diffusion towards the entire cell body.

In this work, we characterized the mechanisms that allow the OmpA2 protein to establish and maintain a concentration gradient in the outer membrane (OM) of *Caulobacter crescentus*. This pattern depends on the position of the gene in the chromosome, suggesting that synthesis and translocation of OmpA2 occur near the gene locus and that the gradient forms by diffusion of the protein from this site. We showed that both the Sec-dependent translocation of OmpA2 and the native signal peptide are necessary to establish the gradient. We also evaluated the localization and mobility of the full-length protein and its two structural domains. These results showed that OmpA2 is an immobile outer membrane protein (OMP) and that both domains have distinct contributions for gradient formation, which occurs in two steps. First, the OmpA2 β -barrel is required for a fast restriction of diffusion in the periplasm and after its integration in the OM, it diffuses slowly. Subsequently, the C-terminal domain binds stably to the peptidoglycan cell wall and stabilize the position of OmpA2.

In *C. crescentus*, the diffusion of the OmpA2 β barrel is opposite to the immobility of β -barrels, included the OmpA β -barrel, in the OM of *Escherichia coli*. This fact suggested that both membranes have different properties that could be relevant for the organization of membrane proteins in the OM in both bacteria.

INTRODUCCIÓN

1. Estructura y estabilidad de la envoltura celular en bacterias Gram-negativas.

La envoltura celular de las bacterias Gram-negativas está formada por la membrana citoplasmática o membrana interna (MI), la pared de peptidoglicano (PG) contenida en el espacio periplásmico y la membrana externa (ME) (**Fig.1**). La MI es una bicapa lipídica que confiere unidad a la célula y es el sitio donde ocurre gran parte del metabolismo. La pared de PG es una red polimérica que brinda forma y rigidez y previene la lisis osmótica (1,2). La ME es una bicapa lipídica asimétrica, cuya superficie externa está formada por lipopolisacáridos (LPS). Éstos convierten a la ME en una barrera muy selectiva que limita el paso de moléculas tóxicas tales como antibióticos y detergentes. Por su parte, el periplasma es un ambiente de naturaleza oxidante que concentra enzimas involucradas en el transporte de nutrientes, en la síntesis de la pared celular y la ME, así como en la degradación de antibióticos que atraviesan la ME (3,4).

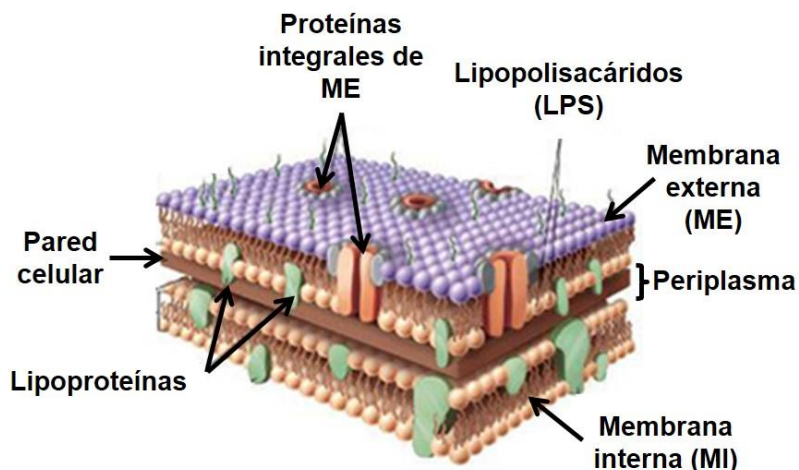


Figura 1. Esquema de la envoltura celular en bacterias Gram-negativas. Se señalan los componentes de la envoltura celular, así como las proteínas integrales y lipoproteínas en la ME. Modificado de: <http://microbioenergetica.squarespace.com>.

La envoltura celular se sintetiza y remodela constantemente, pero su integridad es preservada por varios mecanismos que actúan sobre sus distintos componentes, cambiando sus propiedades físicas y químicas o bien, sobre la estabilidad y plegamiento de las proteínas presentes en este espacio celular. Un conjunto de proteínas de

membrana capaces de unirse a la pared y de formar complejos entre esta y la ME, son de particular importancia para la estabilidad de la envoltura. En *Escherichia coli* estas proteínas son OmpA, la lipoproteína de Braun y las proteínas del complejo Tol-Pal (**Fig.2A**). Sus interacciones incrementan la resistencia de la envoltura celular frente a la presión osmótica que ejerce el citoplasma sobre la MI. Estas proteínas tienen función redundante, pero la ausencia de dos de ellas causa que la ME y la pared se disocien, se desprendan vesículas de ME y se libere contenido periplásmico hacia el medio externo (**Fig.2B**) (5–9).

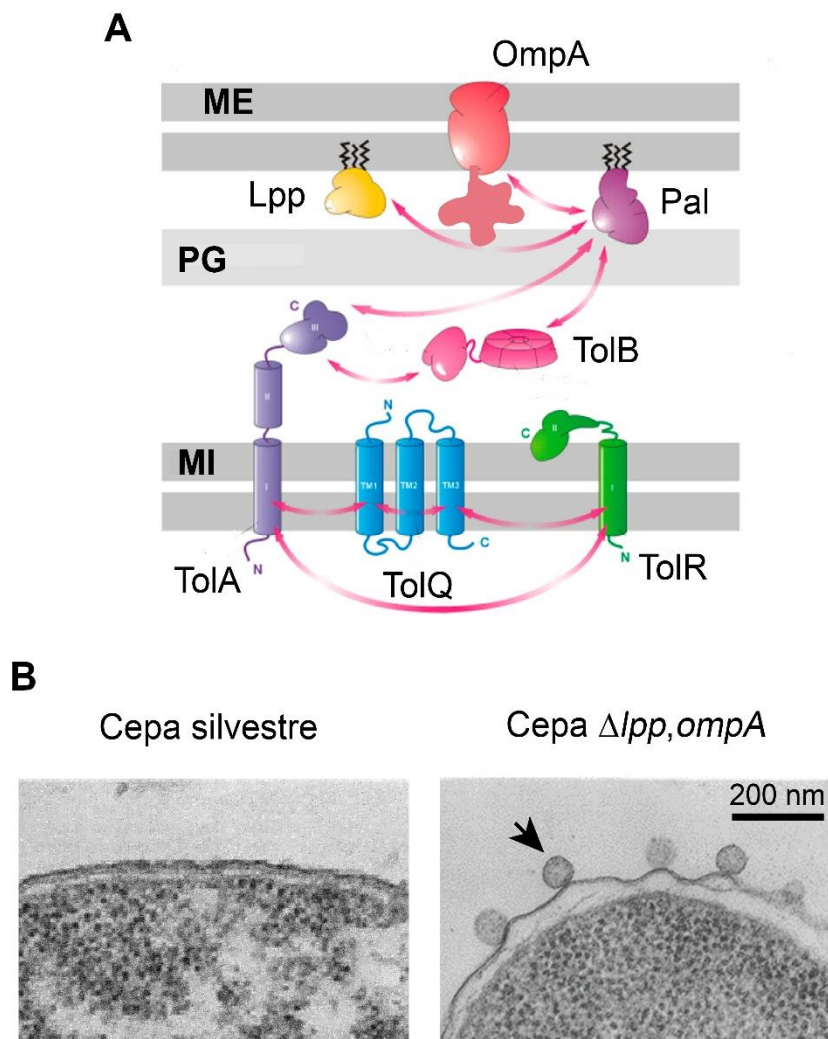


Figura 2. Estabilización de la envoltura celular mediante proteínas de membrana que se unen a la pared. A) Esquema de las interacciones caracterizadas en *Escherichia coli*, entre las proteínas OmpA, Lpp y el complejo Tol-Pal, consigo mismas y con la pared de peptidoglicano. **B)** Micrografías electrónicas de transmisión de una cepa silvestre de *E. coli* y una doble mutante en *lpp* y *ompA*; la flecha señala una vesícula de ME. Modificado de (10,11).

La unión de OmpA, Lpp y Pal con la pared depende de la estructura del PG, cuya unidad fundamental es un disacárido formado por *N*-acetil-glucosamina (NAG) y ácido *N*-acetil-murámico (NAM) unidos a través de un enlace *O*-glicosídico 1 β →4 (**Fig.3A**). Este disacárido forma hebras de glicano (de 20 a 100 monómeros), que son entrecruzadas por el pentapéptido (L)-Ala-(D)-Glu-(γ)-(m)-DAP-(D)-Ala-(D)-Ala, donde *m*-DAP representa al ácido *meso*-diaminopimélico (12). El *m*-DAP permite la condensación entre dos pentapéptidos, pero también la unión covalente con Lpp (**Fig.3B**) o bien, la unión electrostática con el dominio periplásmico C-terminal de OmpA y posiblemente con Pal (13,14) (**Fig.3C**).

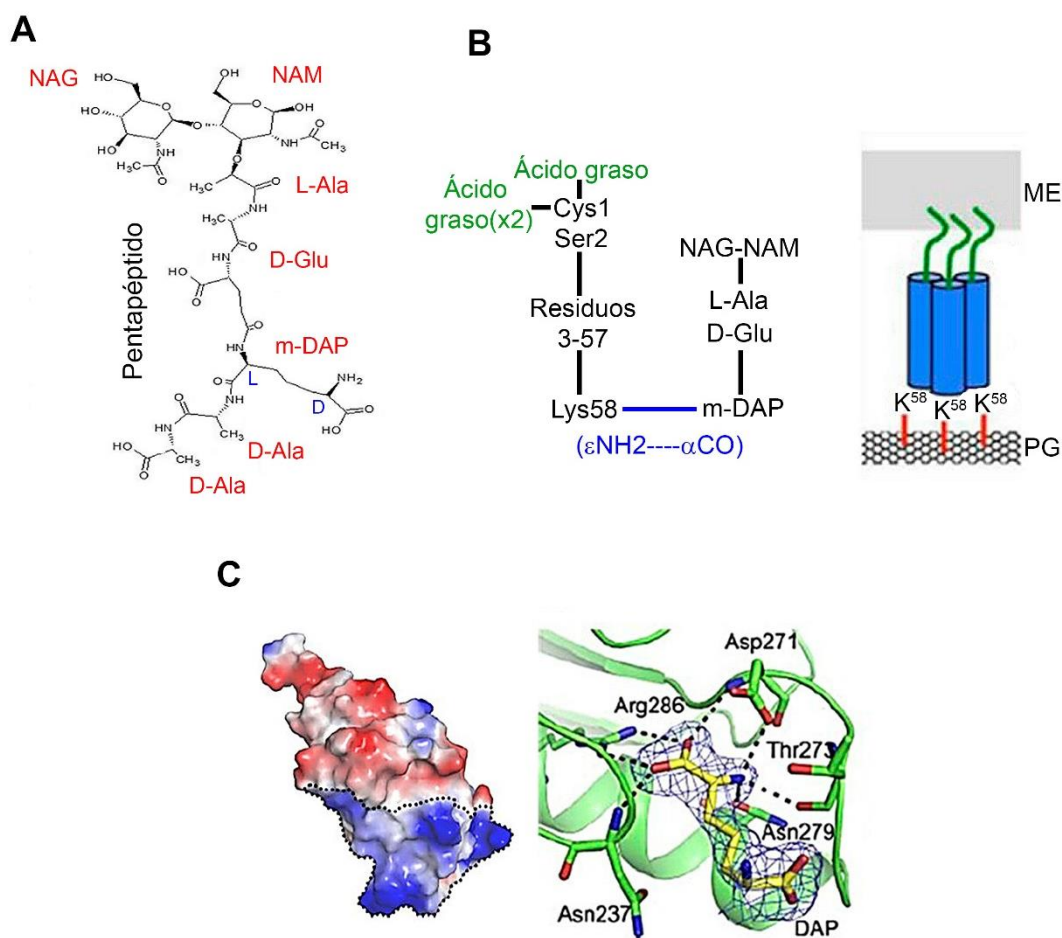


Figura 3. El residuo *m*-DAP del peptidoglicano establece interacciones con las proteínas que estabilizan la envoltura celular. A) Estructura de la unidad básica del peptidoglicano, que consta del disacárido NAG-NAM y un pentapéptido, que incluye al residuo *m*-DAP. **B)** El residuo Lys58 (K58) de la lipoproteína Lpp forma un enlace covalente con el residuo *m*-DAP del PG. **C)** Dos residuos conservados (D271 y R286) ubicados en una región electropositiva (azul, línea punteada) del dominio periplásmico de OmpA establecen interacciones electrostáticas específicas con *m*-DAP del PG. Modificado de (12–14).

2. Estructura de la membrana externa.

A diferencia de la MI, en la que ambos lados de la bicapa están formados por lípidos de cabeza polar, la ME tiene una composición asimétrica. Su cara interna consta de fosfolípidos mientras que su cara externa está formada casi exclusivamente por lipopolisacáridos (LPS), (3). Las moléculas de LPS están integradas por el lípido A, un oligosacárido central (o *core*) y por el antígeno O (**Fig.4A**). El lípido A permite el anclaje del LPS a la ME y en *E. coli*, consta de dos residuos de N-acetil-glucosamina unidos por un enlace $\beta 1 \rightarrow 6$, modificados por un grupo fosfato en las posiciones 1 y 4' y por 6 ácidos grasos saturados de 12 y 14C (15). El *core* en su porción interna, incluye dos unidades de ácido 3-deoxi-D-*mano*-oct-2-ulosónico (o Kdo₂) y dos o tres residuos de heptosa fosforilados (Hep), y en su porción externa consta de tres residuos de galactosa y glucosa. El antígeno O es un polisacárido de longitud variable, formado por la repetición de subunidades de 3-6 monosacáridos dispuestos en una estructura lineal o ramificada en la superficie de la bacteria (16,17) (**Fig.4A**). El LPS es una molécula polianiónica rica en carboxilatos y grupos fosfato, cuya carga eléctrica es neutralizada por cationes divalentes (como calcio y magnesio), que permiten la formación de interacciones laterales fuertes entre moléculas adyacentes de LPS (**Fig.4B**) (4). Esto le otorga a la ME una conformación compacta y semicristalina, crucial para su función como barrera.

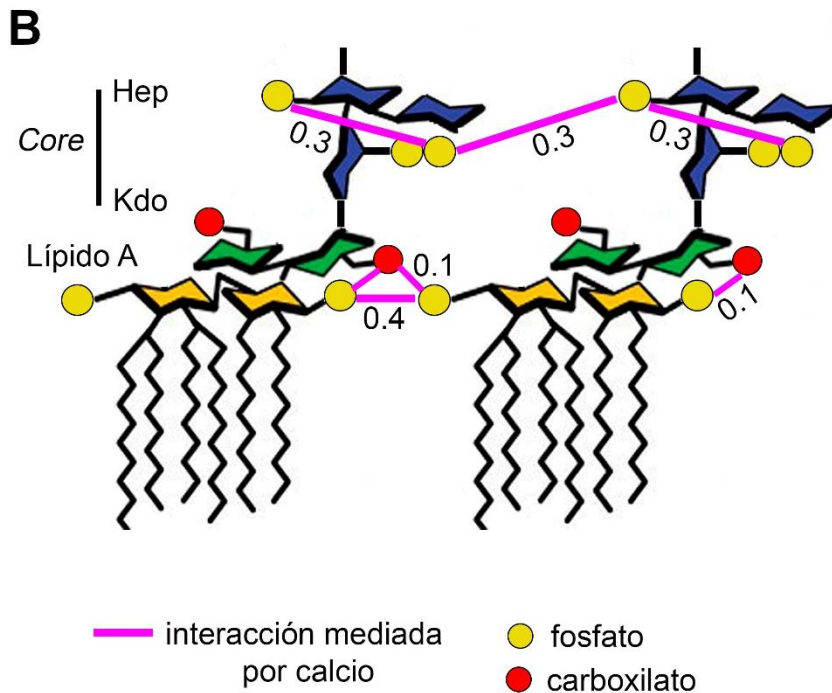
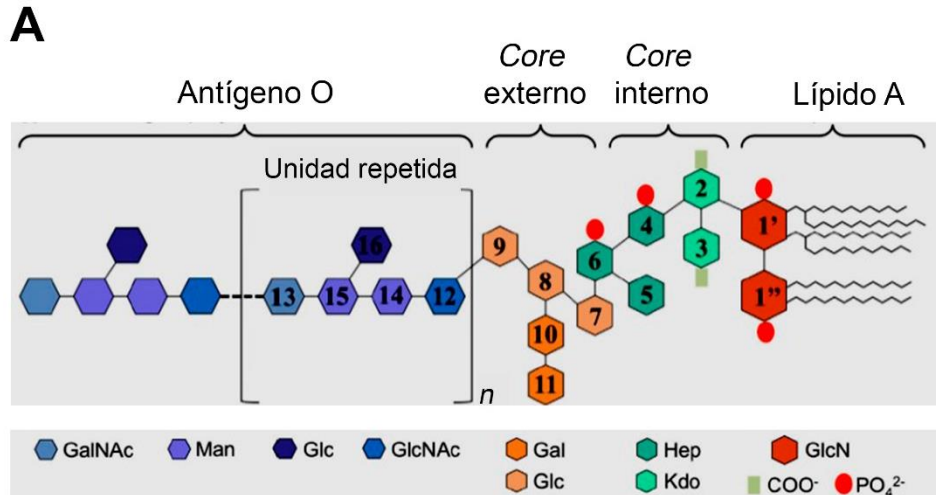


Figura 4. Estructura del LPS en *E. coli*. **A)** Esquema de la estructura del lipopolisacárido en *E. coli*. GalNAc, *N*-acetil D-galactosamina; Man, D-manosa; Glc, D-glucosa; GlcNAc, *N*-acetil D-glucosamina; Gal, D-galactosa; Glc, D-glucosa; Hep, L-glicerol-D- manoheptosa; Kdo, ácido 3-deoxi-D-mano-oct-2-ulonósico; GlcN, D-glucosamina; COO⁻, carboxilato; PO₄²⁻, fosfato. **B)** Modelo de las interacciones laterales mediadas por cationes divalentes entre residuos de carga negativa presentes en moléculas adyacentes de LPS. Las líneas color rosa representan dichas interacciones y los valores numéricos son datos probabilísticos obtenidos mediante estudios de dinámica molecular. Modificado de (4,16).

3. Proteínas integrales de membrana externa (OMPs): estructura y funciones.

Las proteínas presentes en la ME pueden ser lipoproteínas o proteínas integrales (OMPs, *Outer Membrane Proteins*). Las primeras, requieren la adición covalente de tres ácidos grasos para anclarse a las membranas y algunas de ellas, desempeñan funciones esenciales relacionadas con la división, la biosíntesis de la envoltura y la transducción de señales (1,18). Por su parte, la estructura general de las OMPs consta de un dominio compuesto por 8-36 hebras β antiparalelas, cuya estructura terciaria es un cilindro conocido como barril β (19). Algunas de las OMPs tienen función de porina, y permiten la difusión pasiva de moléculas pequeñas (menores a 700 Da) tales como aminoácidos, disacáridos y aniones, o bien, pueden ser parte del sistema de transporte de alta afinidad de ligandos grandes, tales como quelados de Fe^{2+} o vitaminas (B12). Por su integración en la ME, ciertas regiones de las OMPs quedan expuestas al medio circundante de la célula, donde desempeñan funciones de adhesión y reconocimiento a otros tipos celulares, o bien, actúan como blancos moleculares para bacteriófagos, péptidos antimicrobianos y en su caso, para células del sistema inmune (1,20).

Aunque la estructura general de las OMPs consta de un barril β , algunas proteínas presentan dominios adicionales. Este es el caso de OmpA, cuyo dominio C-terminal reside en el periplasma (**Fig.2B**), donde establece interacciones no-covalentes con el residuo *m*-DAP del peptidoglicano (**Fig.3C**) y estabiliza la envoltura celular (21,22).

4. Biogénesis de las OMPs.

En la **figura 5** se muestra un esquema de la biogénesis de las proteínas integrales de ME. A continuación, se describen los distintos eventos involucrados.

➤ *Síntesis en el citoplasma y translocación a través de la MI.*

Las OMPs, junto con las lipoproteínas y las proteínas solubles del periplasma, constituyen un grupo conocido como proteínas de secreción. Éstas se producen en el citoplasma como pre-proteínas con una secuencia (péptido) señal en el extremo N-terminal, la cual determina su translocación de forma post-traducciona. Durante su estancia en el citoplasma, son mantenidas en un estado no-plegado principalmente por acción de la chaperona SecB. Estos complejos tienen una elevada afinidad por SecA, una ATPasa que forma parte del aparato de translocación SecYEG en la MI (23–27). A pesar de ser definida como post-traducciona, la translocación mediada por esta vía ocurre con gran rapidez debido a las interacciones que SecA establece con el ribosoma

y el péptido señal (28–30). Por último, el péptido señal es removido por diversas peptidasas en la MI, y la proteína es translocada hacia el periplasma.

A diferencia de las proteínas de secreción, las proteínas integrales de MI se insertan de forma co-traducciona. Esto es dirigido principalmente, por la partícula de reconocimiento de señales (SRP, *Signal Recognition Particle*), la cual consta de un complejo de RNA 4.5S y la proteína Ffh (31,32). Por lo general, SRP reconoce de forma específica el primer cruce transmembranal de las proteínas de MI y junto con su receptor asociado a membrana (FtsY), permite la entrega de la proteína naciente al translocón SecYEG. De esta forma, se acopla la traducción de las proteínas transmembranales con su integración en la MI (33). Este tipo de procesamiento evita la agregación de proteínas muy hidrofóbicas (como las de MI) en el citoplasma, pero ocurre lentamente y está limitado por la velocidad de traducción (34).

En *E. coli* la función de estas dos vías parece ser no-redundante, ya que Ffh es esencial (35) y mutantes carentes de SecA o SecB acumulan proteínas de secreción en el citoplasma, lo cual disminuye el repertorio de proteínas en la ME (25). Además, se ha mostrado que la vía SRP procesa cerca del 90% de las proteínas de MI y un grupo limitado de proteínas periplásmicas y de ME, que poseen secuencias señal muy hidrofóbicas (36,37). En congruencia con lo anterior, la expresión de una versión termosensible de Ffh ocasiona problemas en el crecimiento y la división celular, reducción de la viabilidad e incremento de proteínas de estrés calórico (35).

➤ *Estancia en el periplasma.*

Las condiciones acuosas y oxidantes del periplasma propician la agregación y degradación de las OMPs. Sin embargo, ambos procesos son mínimos, puesto que una vez expuestas al periplasma, las OMPs son reconocidas por chaperonas como SurA y Skp, que asisten su plegamiento y facilitan su entrega a la maquinaria BAM, encargada del ensamblaje de barriles β en la ME (38–40). Aquellas proteínas cuyo plegamiento fracasa son sometidas a un proceso de control de calidad, efectuado principalmente por la chaperona/proteasa DegP, que evita la acumulación de productos defectuosos y con ello la generación de estrés periplásmico y la liberación de vesículas de ME (41).

➤ *Inserción en la ME.*

Éste es el último paso en la biogénesis de las OMPs y es dirigido por el complejo BAM, que en *E. coli* está compuesto por la proteína integral de ME BamA, así como por cuatro lipoproteínas asociadas (BamB, C, D y E), (42,43). BamA posee un barril β de 16 cruces

transmembranales y una región periplásmica compuesta por cinco dominios POTRA (*Polypeptide Transport Associated*). Dichos dominios reconocen secuencias presentes en el C-terminal de las OMPs, en un evento conocido como “refuerzo de láminas beta”, que favorece la entrada del polipéptido en la cavidad del barril BamA y finalmente la liberación de la nueva proteína en la ME (44,45). BamA y BamD son proteínas esenciales, y su depleción resulta en menor abundancia de OMPs, acumulación de OMPs con plegamiento aberrante y aumento de la proteasa DegP. Aunque las demás proteínas Bam no son esenciales, son requeridas para el funcionamiento eficiente de todo el complejo, y su ausencia múltiple resulta en un fenotipo de letalidad sintética condicional (46,47).

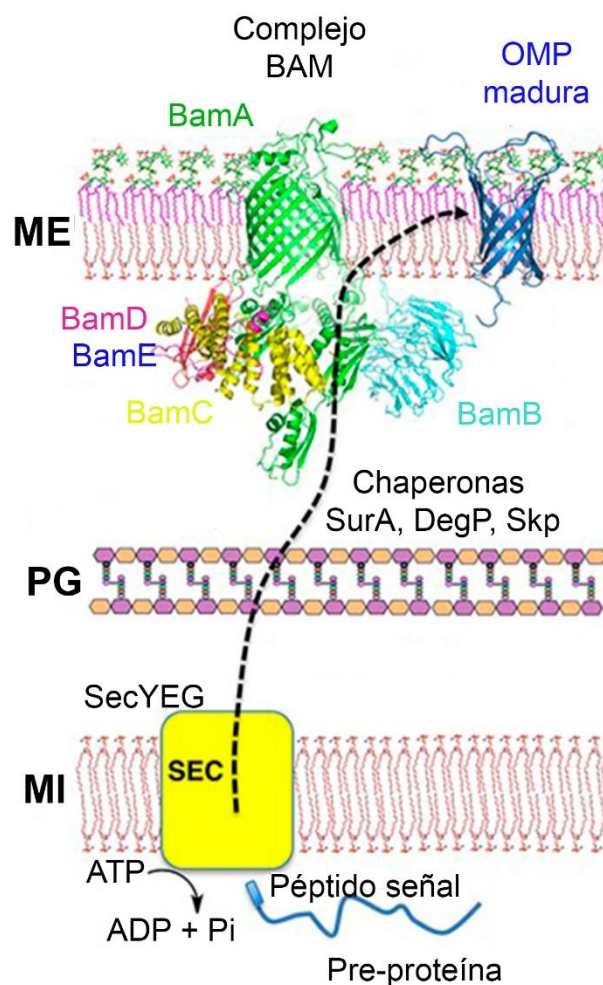


Figura 5. Biogénesis de las proteínas integrales de ME. Esquema que muestra la translocación, plegamiento e inserción de OMPs. Modificado de (48).

5. Organización de las OMPs en la ME de *E. coli*.

La localización de proteínas en bacterias, y en particular en la ME, es un fenómeno muy poco estudiado y se ha efectuado principalmente en *E. coli* mediante microscopía electrónica o de fluorescencia. Para ello, se han empleado diversas estrategias de marcaje, desde fusiones genéticas fluorescentes hasta la detección específica por anticuerpos, péptidos e incluso por colas de bacteriófagos acoplados a fluoróforos o partículas de oro. Estos estudios han mostrado que las OMPs se localizan de manera homogénea o bien, agrupándose en cúmulos discretos dispersos a lo largo del cuerpo celular (**Fig.6**) (49–52).

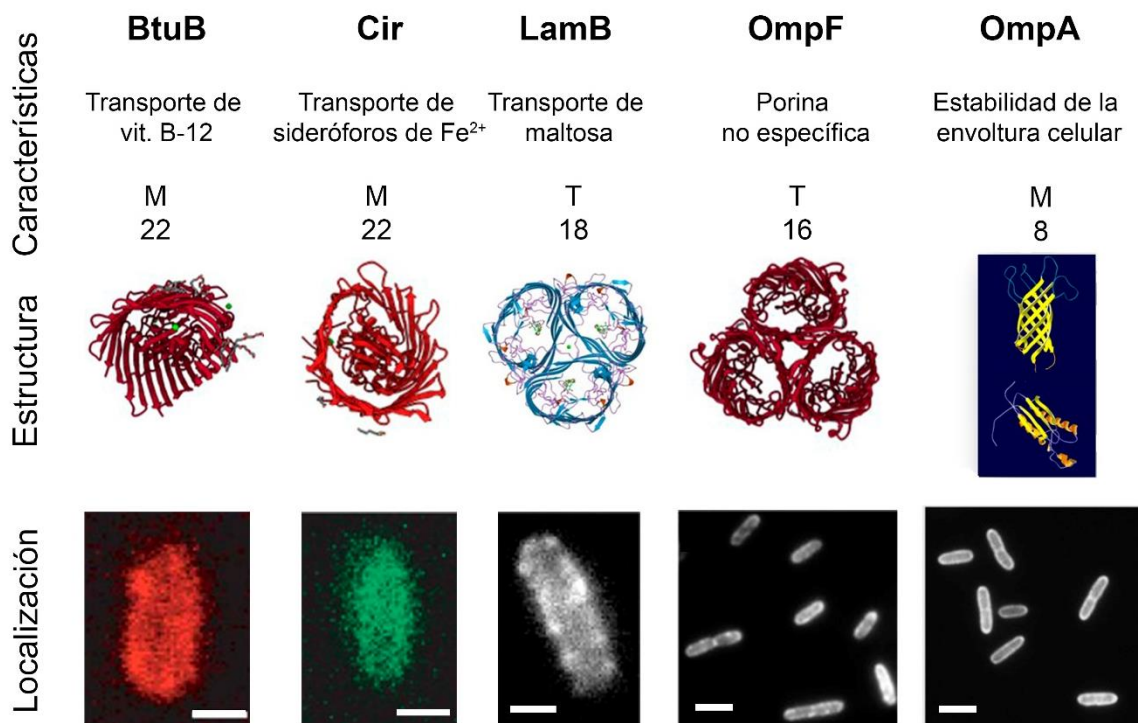


Figura 6. Patrones de localización de OMPs en *E. coli*. Se muestra la estructura cristalográfica y la localización en el cuerpo celular (por microscopía de fluorescencia) de ciertas OMPs. Se indica si la proteína es monomérica (M) o trimérica (T) y el número de hebras β que forman el barril. Barra=2 μ m. Las estructuras cristalográficas corresponden a las depositadas en el PDB (*Protein Data Bank*): BtuB, 1NQE; Cir, 2HDF; LamB, 1AF6; OmpF, 1MPF y para OmpA, 1QJP. Microscopías tomadas de (49–52).

No sólo la localización, sino también el estudio de la dinámica (movilidad) de las OMPs dentro de la ME, ha sido bastante escaso. La difusión lateral de estas proteínas se ha

estudiado mediante técnicas de microscopía de fluorescencia convencional, como el FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*) y la FCS (*Fluorescence Correlation Spectroscopy*) o bien, siguiendo la trayectoria de moléculas individuales mediante SPT (*Single Particle Tracking*), (53). Todas las OMPs estudiadas hasta el momento en *E. coli*, son inmóviles o difunden lentamente dentro de dominios confinados conocidos como islas (**Tabla 1**) (49,51,52,54).

Proteína	Método	Marcaje	D ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)	Diámetro de confinamiento (μm)
BtuB	MF/SPT	^{AF488} Colicina E9	0.013	0.5
Cir	MF/SPT	^{AF488} Colicina Ia	0.019	0.6
LamB	MF/SPT	Fago λ -eYFP	0.059	0.4
OmpF	MF/SPT	^{AF455} Anticuerpos	0.006	0.1
β-OmpA	MF/FRAP	mCherry	Inmóvil	NA
TatA	MF/SPT	YFP	0.1-0.01	NA
CheY	MF/FCS	GFP	4.6	NA
GFP-cit	MF/FRAP	NA	9.0	NA
GFP-perip	MF/FRAP	NA	2.6	NA

Tabla 1. Difusión de OMPs en *E.coli*. Se especifica la técnica empleada, el método de marcaje, el coeficiente de difusión (D) y el diámetro de confinamiento. MF, Microscopía de Fluorescencia; SPT, *Single Particle Tracking*; FRAP, *Fluorescence Recovery After Photobleaching*; FCS (*Fluorescence Correlation Spectroscopy*). NA, No Aplica. Con fines comparativos, se incluyen los coeficientes de difusión de TatA y CheY en la MI, así como para GFP en el citoplasma (cit) o en el periplasma (perip), observados en *E. coli*. Datos tomados de (49,51,52,54).

La ausencia de difusión ha sido atribuida, de acuerdo con datos *in vitro*, a la tendencia que tienen las OMPs de auto-asociarse y establecer interacciones promiscuas con otros barriles β , a través de residuos hidrofóbicos y aromáticos presentes en la superficie lateral de estas proteínas (**Fig.7**) (49,55). Sin embargo, también puede ser resultado del estado semicristalino de la ME, característica otorgada por el empaquetamiento de las moléculas de LPS y su estabilización a través de cationes divalentes (**Fig. 4**).

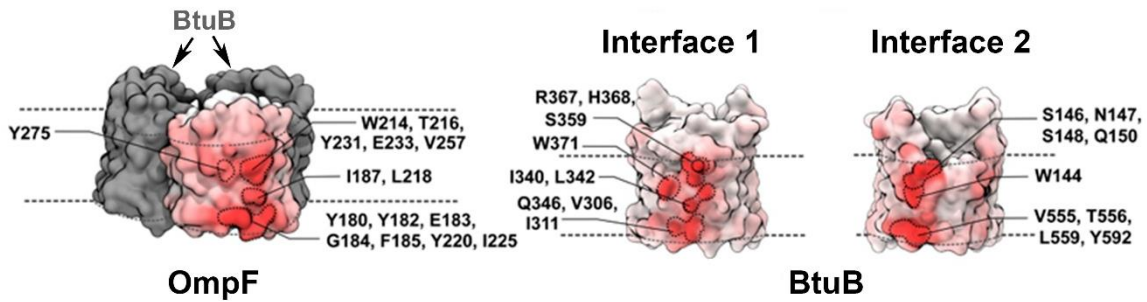


Figura 7. Modelo propuesto de las interacciones promiscuas entre barriles β . Se marcan los sitios de interacción más frecuentes en las interfaces de BtuB y OmpF. Las líneas punteadas representan la posición en la bicapa. Tomado de (49).

La incorporación de OMPs, contenidas dentro de dichas islas, ocurre en regiones cercanas al sitio de la división y, por efecto del crecimiento, son desplazadas de manera pasiva y constante hacia los polos conforme nuevas islas toman su lugar. Este mecanismo resulta en la acumulación progresiva de proteínas viejas en los polos, cada vez que la célula se divide (**Fig.8A**). Por otra parte, se ha mostrado que cerca de la tercera parte de estas islas albergan al complejo BAM (**Fig.8B**) (49).

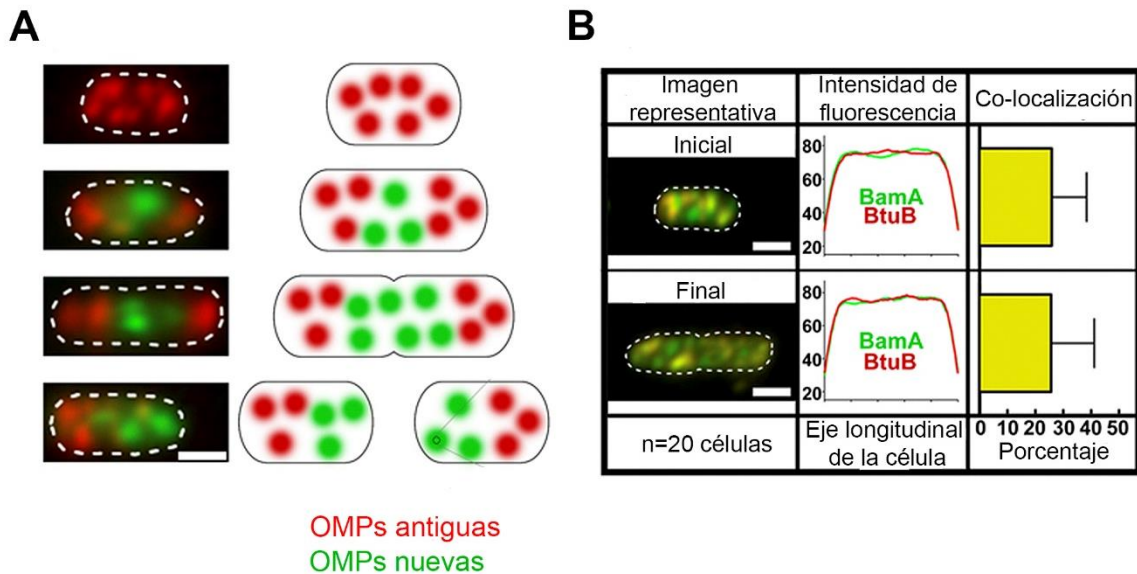


Figura 8. Patrón de integración de OMPs en la ME de *E. coli*. **A)** Microscopías de fluorescencia que muestran el marcaje secuencial de BtuB con colicinas (ColE9) acopladas a dos fluoróforos distintos (TMR, rojo; AF488, verde). Primero, se induce la expresión de BtuB con L-arabinosa y se marca con ColE9-TMR. Se retira el exceso de colicina fluorescente y se permite el crecimiento celular. El segundo marcaje se realiza con ColE9-AF488. TMR, tetrametil-rodamina; AF, Alexa Fluor. **B)** Microscopías de fluorescencia que muestran la distribución de BtuB (rojo), BamA (verde) y su co-localización (naranja). A la derecha, porcentaje de islas donde co-localizan BamA y BtuB. Barra= 2 μ m. Modificado de (49).

Recientemente, también se mostró que en *E. coli*, los complejos BAM forman arreglos conocidos como precintos de ensamblaje, los cuales están distribuidos de manera dispersa a lo largo de todo el cuerpo celular. Estos arreglos tienen un diámetro de ~130 nm y agrupan de 4 a 6 complejos BAM. Su tamaño y abundancia dependen de la síntesis activa de proteínas, así como de la presencia de BamB, que permite la formación de contactos entre complejos BAM vecinos (**Fig.9**) (56).

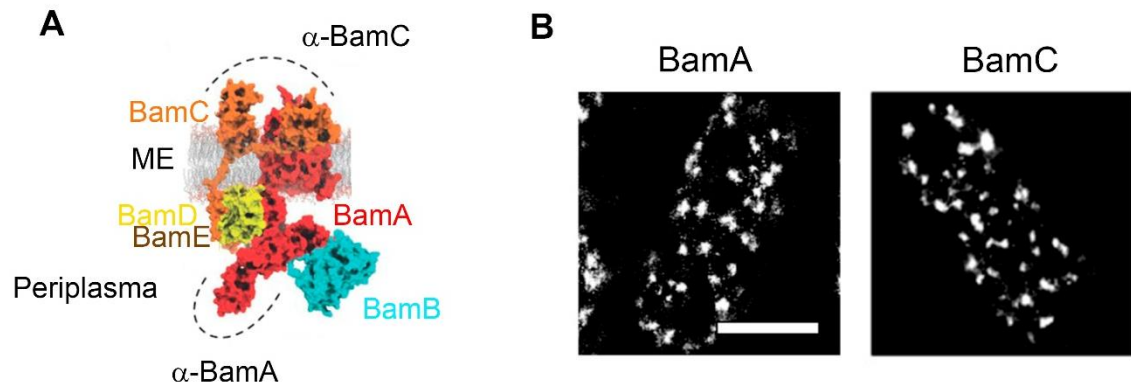


Figura 9. Distribución espacial de BamA y BamC en *E. coli*. **A)** Arreglo del complejo BAM en la ME. Se señalan las regiones reconocidas por los anticuerpos empleados para la detección de BamA y BamC. En el primer caso, el anticuerpo reconoce los dominios POTRA de BamA que residen en el periplasma. Para BamC, un epítipo de la proteína expuesto en la superficie de la ME. **B)** Microscopías de súper-resolución obtenidas mediante d-STORM (*direct Stochastic Optical Reconstruction Microscopy*), que muestran la localización de BamA o BamC en el cuerpo celular Barra= 2 μ m. Modificado de (56).

Algunas de las OMPs como OmpA, existen en forma monomérica, mientras que otras como OmpF y OmpC forman complejos homotriméricos (**Fig.6**). La oligomerización es dependiente de la existencia de los precintos BAM, de la actividad eficiente de BamA, así como de la interacción específica de las OMPs con diferentes regiones del LPS en la ME (**Fig.10**) (56,57).

También se ha documentado la formación de superestructuras entre diferentes complejos, por ejemplo, la que ocurre entre el aparato de translocación SecYEG, la chaperona periplásmica SurA y el complejo BAM, lo cual facilita el paso de las OMPs recién sintetizadas, disminuye su exposición ante proteasas, y favorece su incorporación en la ME (58).

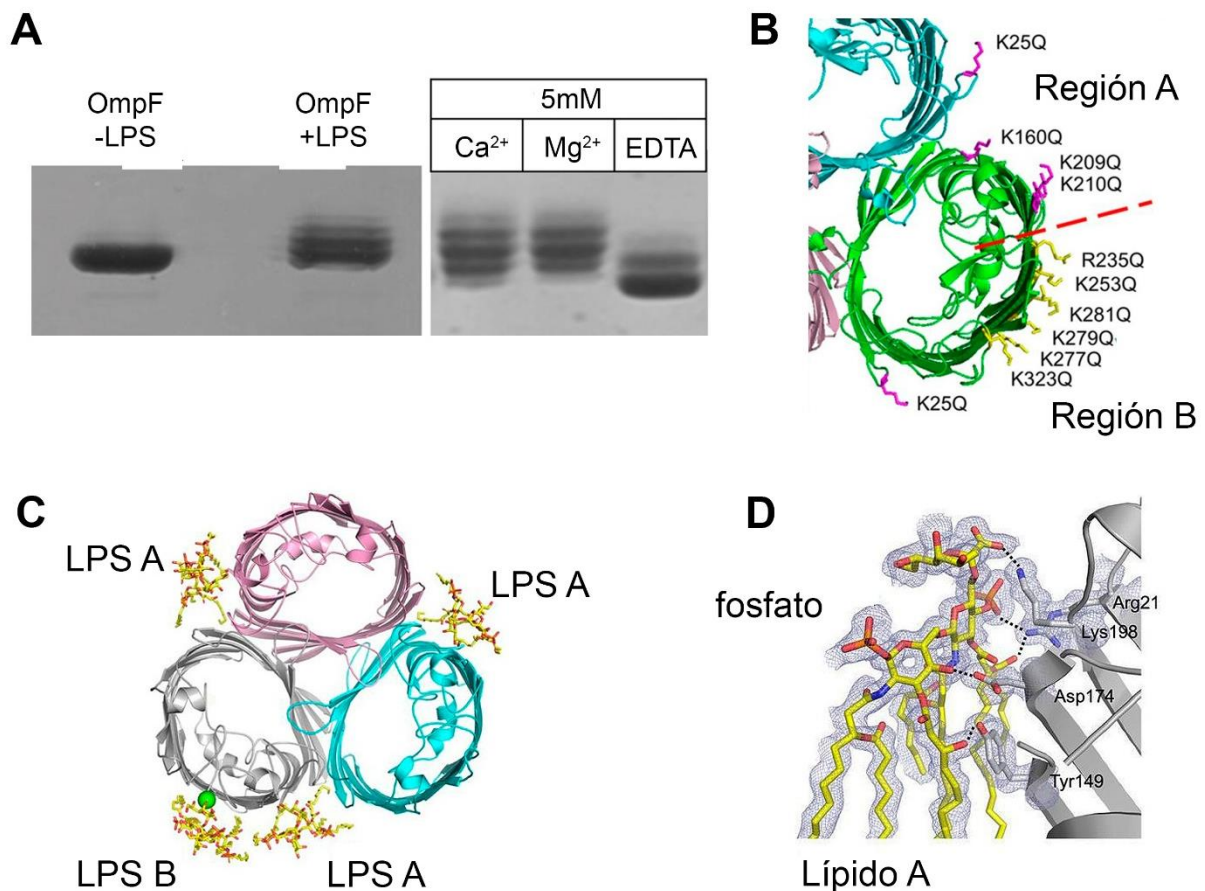


Figura 10. Interacciones entre las OMPs y el LPS. **A)** SDS-PAGE al 10% que muestra el patrón de migración de OmpF pura en ausencia y presencia de LPS (en un exceso molar 1:5). El patrón depende de la presencia de cationes divalentes, y la remoción de estos con EDTA causa una migración similar como cuando se resuelve la proteína libre de LPS. **B)** Modelo tridimensional que muestra un trímero de OmpF y la identificación de dos regiones ricas en residuos de carga positiva, que posiblemente interactúan con el LPS. **C)** Estructura cristalográfica obtenida mediante difracción de rayos X que muestra un trímero de OmpE36, un homólogo de OmpC en *Enterobacter cloacae*, purificado y resuelto con moléculas de LPS. LPS-A se refiere a moléculas de LPS que interactúan con OmpE36 en la cavidad formada por la unión de dos barriles y LPS-B a las que lo hacen en la superficie más expuesta del trímero. **D)** Establecimiento de interacciones polares específicas (líneas punteadas) de OmpE36 con LPS-B, principalmente a través de los grupos fosfato del lípido A. Modificado de (57).

6. Características de OmpA en *E. coli*.

➤ Estructura

OmpA es de las proteínas más abundantes en *E. coli*, con hasta 100 mil copias por célula; en comparación, el número de cada subunidad BAM es ~300 por célula (56, 59). OmpA consta de 325 residuos organizados en dos dominios: en el extremo N-terminal (residuos 23-171), tiene un dominio barril β de ME compuesto por ocho hebras β , y en el C-terminal (residuos 190-325), un dominio periplásmico de unión a la pared de peptidoglicano. Ambas estructuras están conectadas a través de una región rica en Ala y Pro, mientras que los primeros residuos (1 a 22) constituyen el péptido señal (**Fig.11**) (22,59,60). Esta marca permite la translocación de OmpA2 hacia el periplasma. Aunque OmpA no es sustrato del complejo SRP, se ha mostrado que su translocación ocurre tanto de forma co-traducciona ($\sim 60\%$) como post-traducciona (61).

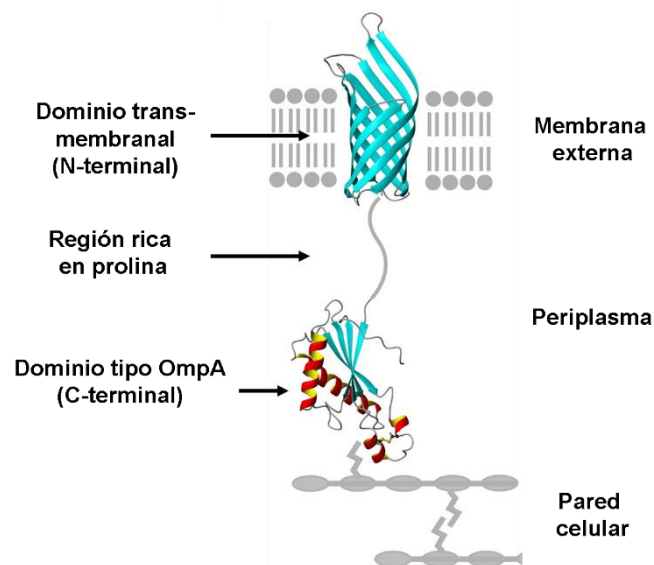


Figura 11. Estructura e interacciones de OmpA con la pared celular y la ME. Modelo de la estructura terciaria de OmpA basado en los datos cristalográficos depositados en el PDB: 1QJP (para la porción transmembranal) y 4ERH (para el dominio periplásmico). Modificado de (22).

➤ Plegamiento

El plegamiento de OmpA depende de las propiedades de ambos dominios. *In vitro*, se ha mostrado que el dominio transmembranal de OmpA tiene una elevada tendencia a

agregarse y su plegamiento requiere de la presencia de un ambiente hidrofóbico. Por su parte, el dominio C-terminal actúa como una chaperona sobre el dominio barril β , acelerando su plegamiento y reduciendo la propensión a agregarse (62). *In vivo*, la inserción de OmpA en la ME requiere de la formación sincronizada de estructuras secundaria y terciaria en un mecanismo asistido por las chaperonas periplásmicas SurA y Skp, así como por el lipopolisacárido (44,63,64).

➤ *Interacciones*

El mecanismo por el cual OmpA reconoce e interacciona con la pared celular ha sido elucidado mediante cristalografía de rayos X y calorimetría usando como modelo al dominio periplásmico de OmpA de *Acinetobacter baumannii*. Estos estudios mostraron que los residuos Asp271 y Arg286, posicionados dentro de una región de carga positiva, establecen puentes salinos y de H con el aminoácido *m*-DAP del peptidoglicano (**Fig.3C**). Dichos residuos están conservados en todos los dominios tipo OmpA C-terminal, y en el caso de OmpA de *A. baumannii*, sustituirlos de forma independiente por Ala, causa una pérdida completa de la afinidad de la proteína por el PG (13). La unión con *m*-DAP es necesaria también para el plegamiento completo de este dominio (65).

➤ *Funciones*

A nivel fisiológico, OmpA es una proteína que junto con la lipoproteína de Braun y el sistema Tol-Pal, le confiere estabilidad a la envoltura celular de las bacterias Gram-negativas (**Fig.2B**). Esto se debe a su interacción directa con la ME y la pared de peptidoglicano. Por su localización en la superficie celular, también está implicada en otras funciones, tales como la difusión pasiva de iones; la adhesión a superficies u otras células; unión con ciertos carbohidratos; la capacidad de formar biopelículas; el reconocimiento por diversos bacteriófagos y bacteriocinas (péptidos antimicrobianos); y en el caso de especies patógenas, en la evasión de la respuesta inmune, y al mismo tiempo, como un blanco de ésta (59,66).

➤ *Localización y dinámica en la ME.*

La expresión de OmpA fusionada con mCherry a partir de un plásmido, mostró que esta proteína se localiza de manera homogénea en la ME de *E. coli* (**ver Fig.6**). Mediante FRAP, se reveló que OmpA no difunde lateralmente en la membrana externa, y que esta inmovilidad no depende de la unión de la proteína con el peptidoglicano, dado que el

dominio barril β por sí solo no difunde (**Fig.12**), (52). Estos datos apoyan la idea generalmente aceptada de que las OMPs no difunden y que la presencia de un barril β es suficiente para limitar la difusión dentro de la ME.

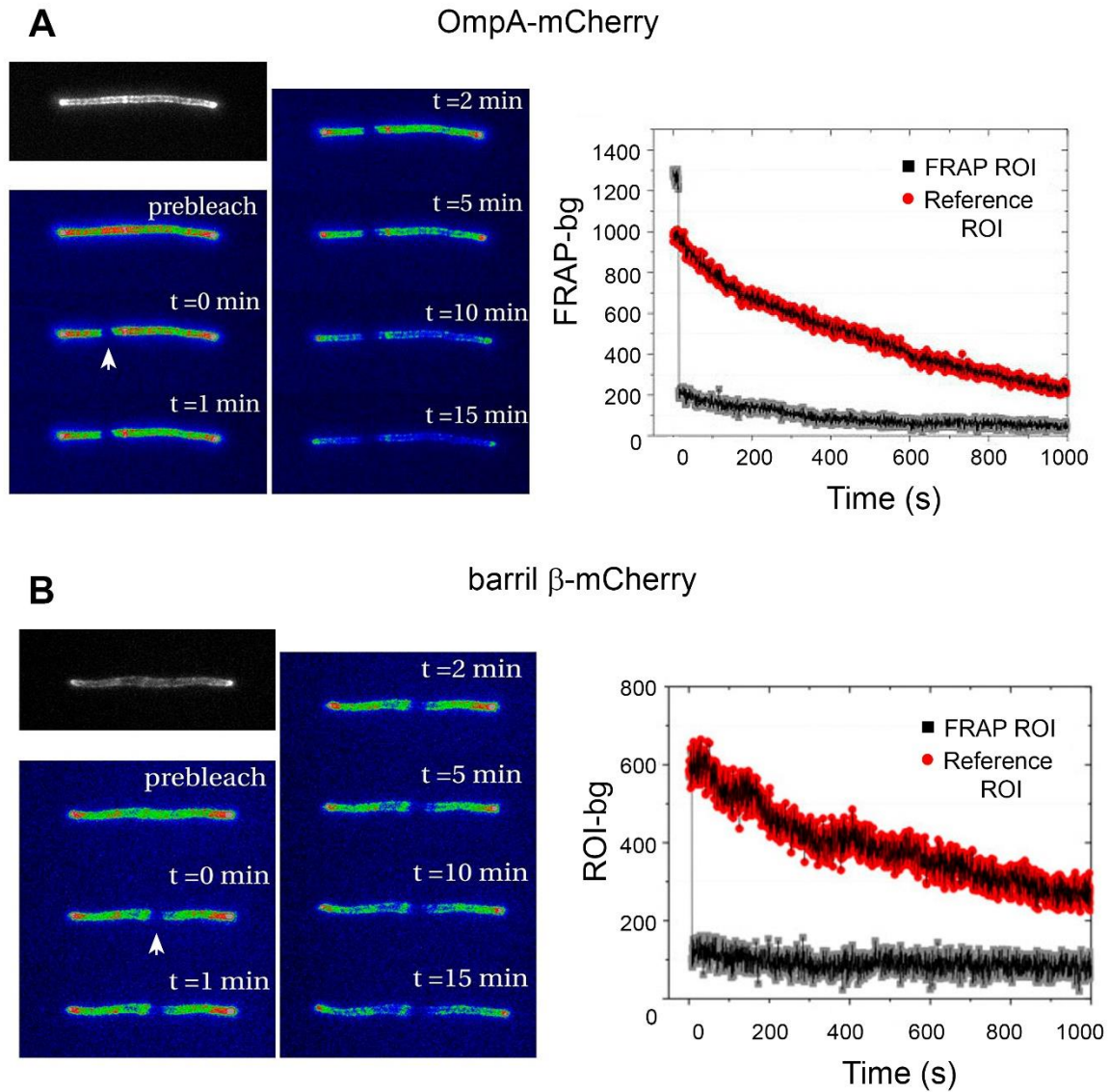


Figura 12. Dinámica de OmpA en la ME de *E. coli*. Ensayos de FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*) en células filamentadas por cefalexina y expresando la versión completa de OmpA (**A**) o únicamente el barril β (**B**). La flecha señala la región blanqueada. A la derecha de cada conjunto de imágenes, se muestra la gráfica de la intensidad de fluorescencia en el área del FRAP (línea gris) y en una de zona de referencia (línea roja). ROI, *Region of Interest*, región de interés; bg, *background*, fondo. Modificado de (52).

7. Características de *Caulobacter crescentus*.

Caulobacter crescentus es una bacteria Gram-negativa, que se ha consolidado como un sistema modelo para estudiar procesos complejos como la diferenciación celular, la localización de proteínas, la regulación de la expresión génica, la segregación del cromosoma, el crecimiento y la división (67).

➤ *Morfología y polaridad celular.*

Esta bacteria tiene un ciclo de vida característico que, tras la división, produce dos progenies distintas: células nadadoras con un único flagelo polar y células sésiles adheridas a superficies a través de una estructura conocida como prosteca (**Fig.13**). La presencia del flagelo y la prosteca define al polo celular viejo, mientras que los polos nuevos corresponden a aquellos originados por la división celular. Esta diferenciación morfológica facilita el estudio de la localización de proteínas a través del ciclo celular.

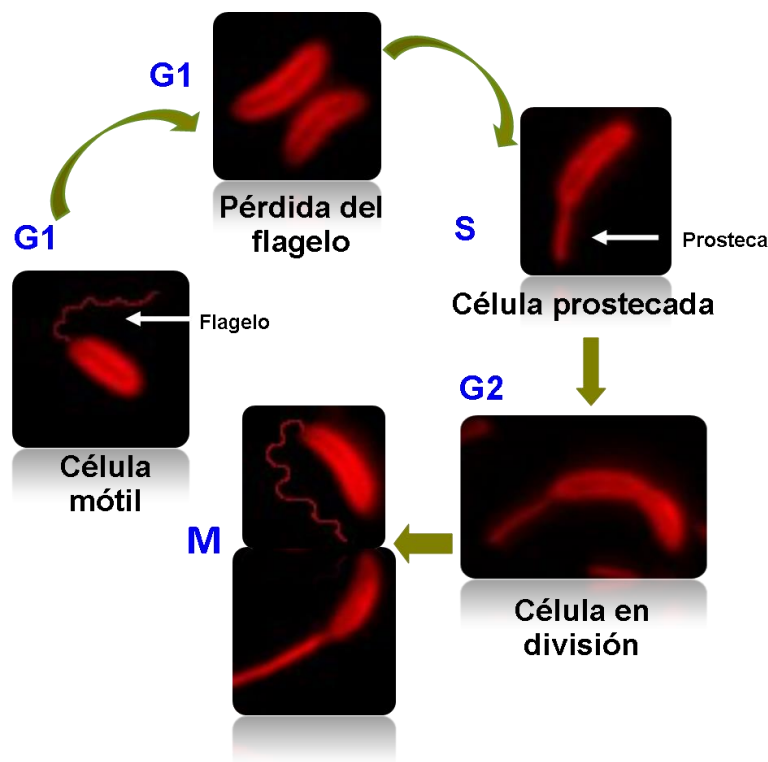


Figura 13. Ciclo celular de *C. crescentus*. El proceso de diferenciación comienza con células nadadoras en fase G1. Tras perder el flagelo y sintetizar la prosteca, las células replican el cromosoma y crecen (fase S). El crecimiento es acompañado del inicio de la división durante G2. Después de la citocinesis (fase M), se forman dos células hijas diferentes en morfología y fisiología, que retoman el ciclo celular en fases distintas. Fuente: elaboración propia.

➤ *Adaptaciones de la envoltura celular a la oligotrofia.*

C. crescentus es una bacteria oligotrófica que prospera en ambientes acuáticos limitados en nutrientes tales como el fósforo. Para contender con esas carencias, ha adoptado estrategias como la elongación de la prosteca, estructura que llega a medir hasta 30µm, equivalente a 15 veces la longitud celular (68). La prosteca es una extensión tubular delgada de la envoltura celular, que posee tanto pared como membranas, y concentra proteínas dedicadas a la captura de nutrientes (69).

Otra adaptación se ve reflejada en la composición lipídica de sus membranas, las cuales están enriquecidas en glicolípidos y no en fosfolípidos como las de *E. coli* (70,71). En el caso de la ME, se ha mostrado que el lípido A presente en el LPS de *C. crescentus* carece de fosfatos (**Fig.14**) (72). Además, esta bacteria codifica y expresa un conjunto distintivo de OMPs, entre ellos once receptores dependientes de TonB (73), los cuales median el transporte de sideróforos, cobalamina, maltodextrinas y sacarosa. La presencia de dichos transportadores en esta bacteria puede ser importante para el crecimiento en ambientes diluidos en nutrientes y para compensar la ausencia de porinas generales (69).

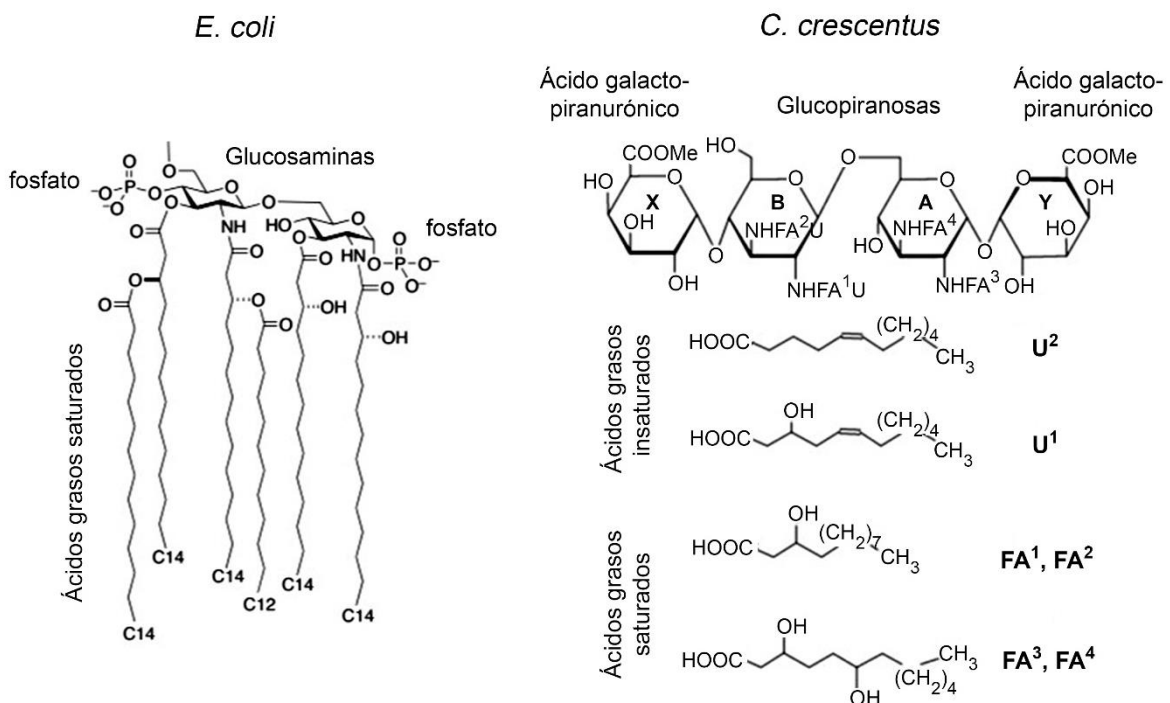


Figura 14. Diferencias estructurales del lípido A de *E. coli* y *C. crescentus*. Las características de cada molécula se señalan en la imagen. Modificado de (72).

➤ *Organización del cromosoma y los RNAs mensajeros.*

En esta bacteria, el origen de replicación (*oriC*) se encuentra cerca del polo celular prostecado o polo viejo, mientras que el término de replicación (*ter*) en el polo nuevo de la célula. Como ambos loci están en polos celulares opuestos, el resto de los genes en el cromosoma mantienen una relación lineal con respecto al cuerpo celular (**Fig.15A**), (74). Este orden es mantenido durante la replicación y es heredado después de la división celular. También se ha mostrado por hibridización *in situ*, que los RNAs mensajeros no difunden del sitio en el que se sintetizan(**Fig.15B**), (75).

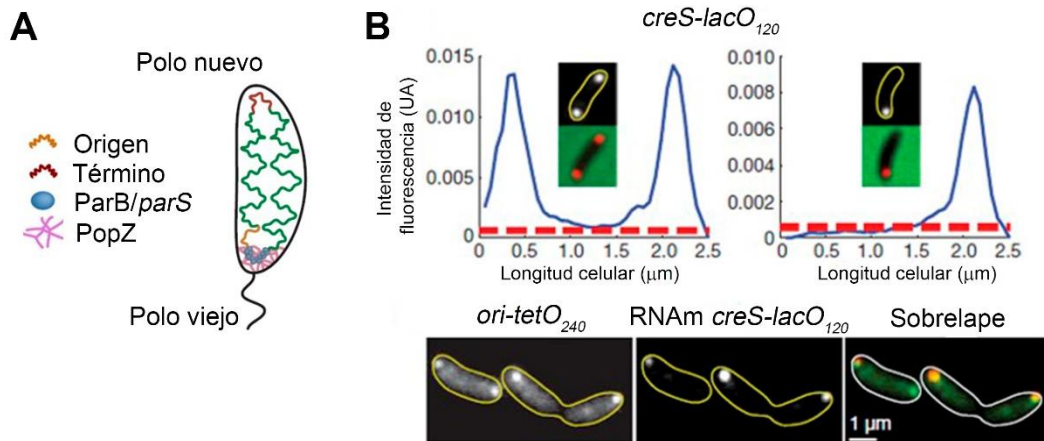


Figura 15. Organización del cromosoma y de los RNA mensajeros en *C. crescentus*. A) Esquema que muestra el arreglo lineal del cromosoma por la asociación del origen y término de replicación con los polos celulares. B) Arriba. Gráficas que muestran la localización del RNA mensajero de *creS* fusionado con *lacO*120, en células con dos o una sola copia del gen. El gen *creS* se ubica cerca del origen de replicación (*ori*). Abajo. Microscopías de fluorescencia que muestran la localización del *ori* y el sobrelape con la localización del RNA mensajero de *creS*. Modificado de (74,75).

➤ *Proteínas tipo OmpA en C. crescentus.*

En *C. crescentus*, OmpA1 y OmpA2 tienen una estructura similar a OmpA de *E. coli*. Ambas poseen un dominio barril β de ME en el extremo N-terminal y un dominio C-terminal de unión a la pared celular de peptidoglicano. En OmpA1, estos dominios están conectados por una región rica en Ala y Pro y en el caso de OmpA2, por 31 prolinas consecutivas (**Fig.16A**).

En un trabajo previo caracterizamos la función y localización de estas proteínas en *C. crescentus*. Mostramos que OmpA2 tiene una participación importante en el mantenimiento de la estabilidad de la envoltura celular (sobre todo en condiciones de

estrés por temperatura, limitación de fosfatos y ante agentes que desestabilizan la ME, como los detergentes), así como en el crecimiento de la prosteca. Por su parte, OmpA1 tiene una contribución secundaria en ambas funciones. La estabilización de la envoltura celular se da por la acción conjunta de estas proteínas en conjunto con Pal, ya que *C. crescentus* carece de Lpp o de cualquier otra proteína unida covalentemente a la pared (76). Mientras que OmpA1 tiene una distribución dispersa en la ME, OmpA2 forma un gradiente de concentración a partir de la prosteca y el polo celular viejo (o prostecado) (**Fig.16B**) (77).

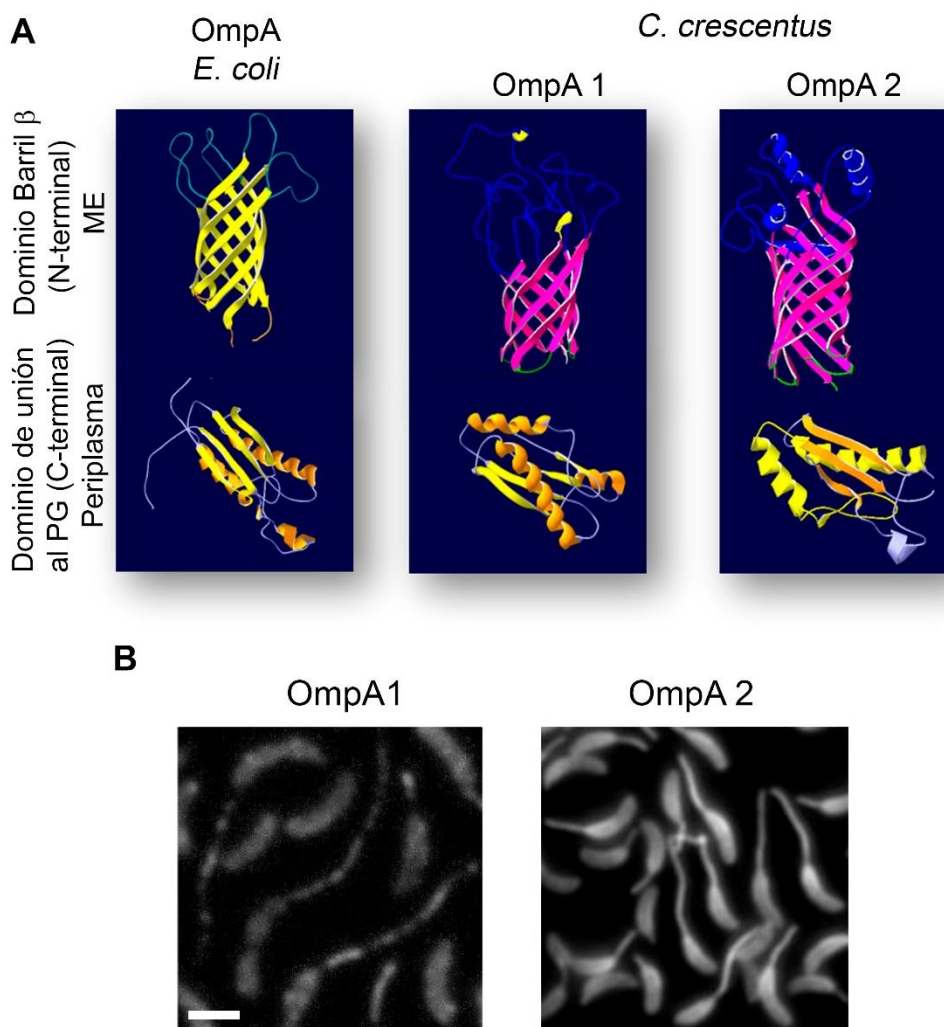


Figura 16. Estructura predicha y localización de las proteínas tipo OmpA en *C. crescentus*. **A)** Modelo tridimensional de las proteínas OmpA de *E. coli*, y de OmpA1 y OmpA2 de *C. crescentus*, obtenidos mediante SWISS-MODEL. **B)** Microscopías de fluorescencia de cepas que expresan OmpA1 u OmpA2 fusionadas con mCherry, como única copia del gen y desde su promotor nativo. Las células mostradas son representativas de cultivos creciendo en medio mínimo suplementado con 50 μ M de fosfatos Barra= 1 μ m. Tomado de (77).

8. OmpA2 forma un gradiente de concentración en *C. crescentus*.

El gradiente de OmpA2 comienza a formarse en las etapas tempranas del ciclo celular y se acentúa conforme la célula envejece. La mayor acumulación de OmpA2 en el polo prostecado coincide con la ubicación del gen cerca del origen de replicación del cromosoma. Esta organización determina la localización de la proteína, pues el cambio de posición de *ompA2* a la mitad del cromosoma o a un locus cercano al término de replicación, resulta en la formación de un gradiente inverso, es decir, con una mayor concentración de la proteína en el polo nuevo (**Fig.17**). La presencia y orientación del gradiente son relevantes para la fisiología de *C. crescentus*, pues células carentes de la proteína o con un gradiente invertido, tienen menor adecuación que la cepa silvestre durante ensayos de competencia, y forman prostecas de menor tamaño (78).

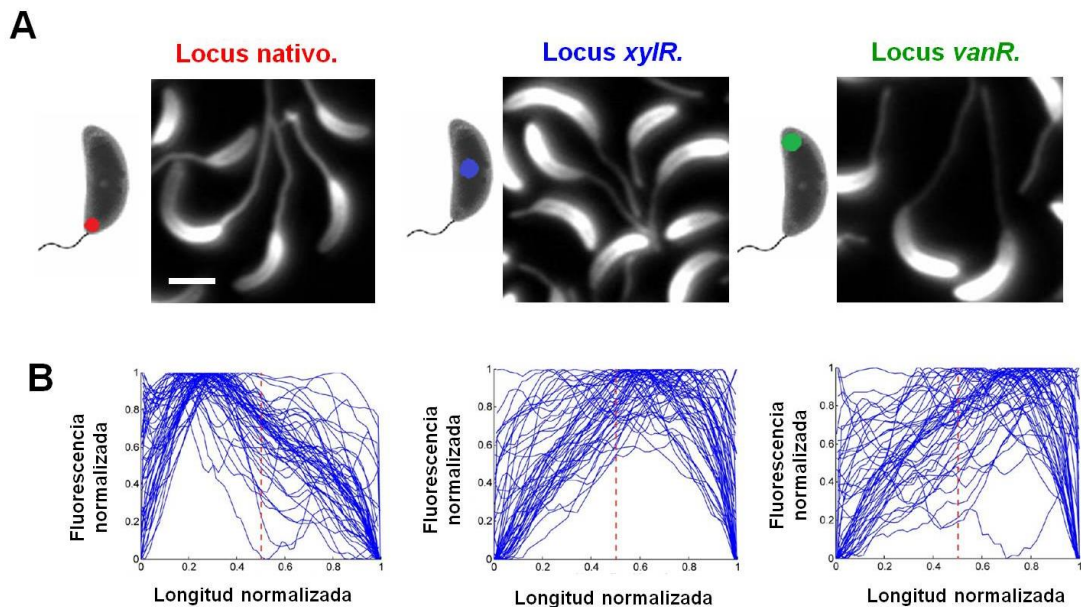


Figura 17. La posición de *ompA2* en el cromosoma determina la localización de la proteína.

A) Microscopías de fluorescencia de las cepas que expresan OmpA2-mCherry desde el locus nativo, *xylR* o *vanR*, creciendo en fase exponencial en medio mínimo limitado en fosfatos. Longitud de la barra= 1 μ m. A la izquierda de cada micrografía, se muestra un esquema de la ubicación aproximada de *ompA2* en el cromosoma y respecto al cuerpo celular. **B)** Superposición de los perfiles de intensidad de fluorescencia de cien células de cada una de las cepas indicadas en A). Tomado de (77).

9. Gradientes de concentración de proteínas en otras bacterias.

Aunque son poco comunes, los gradientes de concentración son relevantes para la organización y fisiología bacteriana, pues restringen la actividad de una proteína a un espacio confinado. Ejemplo de ello es MipZ, una proteína de *C. crescentus* que se asocia al origen de replicación y tras la segregación de los cromosomas, forma un gradiente de concentración a partir de ambos polos. Su localización determina la posición de la proteína esencial FtsZ a la mitad de la célula, y con ello el inicio de la división (79).

En el nivel unicelular, la formación de un gradiente de concentración requiere la acumulación de una molécula en un sitio conocido como *fuentes*, la difusión limitada a partir de dicho punto y la degradación específica en toda la célula. En el caso de proteínas, se ha propuesto que el principal factor para la formación de un gradiente es la difusión limitada, ya que la proteólisis es un proceso lento (80). Sin embargo, los gradientes también pueden ser generados o modificados por dilución no-homogénea de la molécula debido al crecimiento y la división de la célula.

Como ya se mencionó, los gradientes de concentración son poco comunes. La mayoría de los que se han descrito se forman en el citoplasma o en el lado citoplásmico de la MI. Con respecto a proteínas de ME, además de OmpA2 en *C. crescentus*, se ha descrito que una familia de autotransportadores, que incluye a las proteínas AIDA-I en *E. coli* e IcsA en *Shigella flexneri*, forman un gradiente polar (81). Hasta ahora, el ejemplo mejor caracterizado es el de IcsA, la cual se exporta al espacio periplásmico en el polo viejo (82). Después de su ensamblaje como barril β en la ME, posiblemente difunde hacia todo el cuerpo celular (83,84). Además de la difusión, la formación del gradiente de IcsA requiere de la presencia de OmpA y de una proteína periplásmica (PhoN2), así como de la degradación específica por la proteasa IcsP (85,86). La localización de IcsA es relevante para su función durante la internalización de esta bacteria en su célula hospedera (87).

HIPÓTESIS

La formación del gradiente de OmpA2 en la membrana externa de *Caulobacter crescentus* depende de la difusión limitada de la proteína madura, así como la de sus distintos intermediarios.

Lo anterior implica que la síntesis de OmpA2 y su translocación a través de la MI ocurren cerca del gen en el polo prostecado, y que la proteína tiene una difusión limitada desde su síntesis hasta que estabiliza su posición tras integrarse a la ME y unirse a la pared celular.

OBJETIVO

➤ General

Caracterizar los mecanismos involucrados en la difusión limitada de la proteína OmpA2 de *Caulobacter crescentus*.

➤ Particulares

1. Caracterizar la dinámica de la proteína OmpA2.
2. Determinar la localización de los dominios amino y carboxilo de OmpA2.
3. Caracterizar la dinámica de los dos dominios de OmpA2.
4. Definir la importancia de la unión a la pared en la formación del gradiente.

RESULTADOS

1. OmpA2 es una proteína inmóvil en la membrana externa de *C. crescentus*.

El establecimiento del gradiente de concentración de OmpA2 podría ser el resultado de la difusión continua de la proteína después de su inserción en la ME. Para evaluar esta idea, medimos la movilidad de OmpA2 mediante un ensayo de FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*). Esta técnica requiere que la proporción de moléculas no-fotoblanqueadas sea prácticamente “infinita” con respecto a las fotoblanqueadas. Dado que las bacterias tienen dimensiones reducidas, dicho requisito se logra por el tratamiento con antibióticos que inhiben la división y producen células filamentadas (88). En este trabajo empleamos una estrategia distinta para obtener filamentos de *C. crescentus*, la cual consistió en expresar la proteína esencial de división FtsZ a partir de un promotor inducible por xilosa. La remoción del inductor (fase de depleción) no afectó el crecimiento ni la replicación del cromosoma, pero sí la división, generando células filamentadas. La longitud de estas células depende del tiempo que FtsZ permanece ausente y puede alcanzar varias decenas de veces la longitud celular típica. A diferencia del tratamiento con antibióticos que bloquean la división, en *E. coli* se han descrito los efectos fisiológicos de la depleción de FtsZ. La depleción excesiva reduce la viabilidad, afecta la segregación de los cromosomas, induce la respuesta contra daño al DNA y disminuye la integridad de la membrana interna, así como su repertorio de proteínas (89). Ya que estos efectos pleiotrópicos podrían también presentarse en *C. crescentus*, empleamos células cuya longitud fuese dos o tres veces el tamaño normal con el fin de reducir tales alteraciones.

Evaluamos la localización de OmpA2-mCherry (de aquí en adelante OmpA2, por simplicidad) en estas células ligeramente filamentadas. La microscopía de fluorescencia mostró que la proteína de fusión formó un gradiente de concentración a partir de ambos polos. Este patrón puede deberse a tres posibles causas: 1) la expresión de la proteína a partir de los loci estabilizados en polos opuestos, 2) la dilución de OmpA2 en el resto de la célula por efecto del crecimiento o 3) por la difusión de la proteína desde ambos polos. Se evaluó la difusión de OmpA2 en estas células mediante FRAP, registrando la redistribución de la fluorescencia cada 5 segundos durante un minuto. No se detectó ningún cambio de intensidad en la zona fotoblanqueada. Esto indicaba que OmpA2 podría tener una dinámica de difusión en una escala temporal mayor. Para probar esto,

después de la depleción de FtsZ, bloqueamos la síntesis de proteínas con espectinomycin y cloranfenicol por al menos 30 min. Esto asegura que toda la proteína fluorescente termina de madurar y descarta la síntesis *de novo*; una evidencia de lo anterior es la ausencia de crecimiento y de la intensidad total de fluorescencia (datos no mostrados). Se fotoblanquearon dos regiones con diferente concentración de OmpA2, cerca del polo o en la mitad del filamento. Ninguna de las dos regiones mostró recuperación de fluorescencia, aún después de tiempos largos (al menos 15 min) (**Fig.18**).

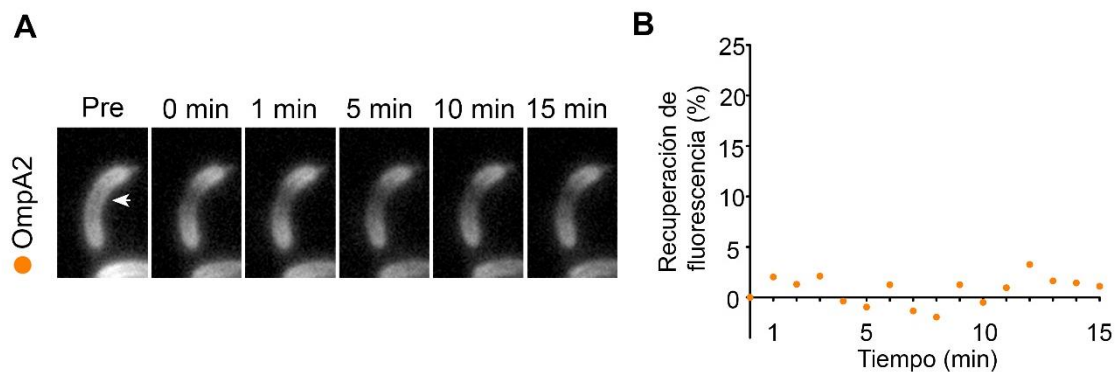


Figura 18. OmpA2 es una proteína estática. A) Microscopías de fluorescencia de un ensayo de FRAP en filamentos de *C. crescentus* que expresan OmpA2-mCherry. La flecha señala la zona blanqueada ($t= 0$ min). **B)** Gráfica que muestra el porcentaje de recuperación de fluorescencia en la región del FRAP a lo largo de 15 min.

Un posible artefacto de los ensayos de FRAP es el daño celular producido por el láser durante el fotoblanqueo. Para descartar esto como la causa de la inmovilidad de OmpA2, evaluamos la difusión de mCherry en el periplasma, así como la de FtsN en la MI. Ambas proteínas se localizaron de forma homogénea en filamentos depletados de FtsZ y congruente con lo que se ha reportado en *E. coli*, difundieron libremente con un tiempo de recuperación media de fluorescencia ($\tau_{1/2}$) menor a 10 s. Es importante notar que la longitud de estos filamentos fue mayor que el de las células empleadas para medir la difusión de OmpA2, debido a que la dinámica de difusión de mCherry periplásmica y FtsN es casi instantánea (**Fig.19**). Estos resultados nos permiten concluir que OmpA2 es una proteína inmóvil y sugieren que el gradiente de concentración debe formarse por la difusión de la proteína antes de que ésta estabilice su posición.

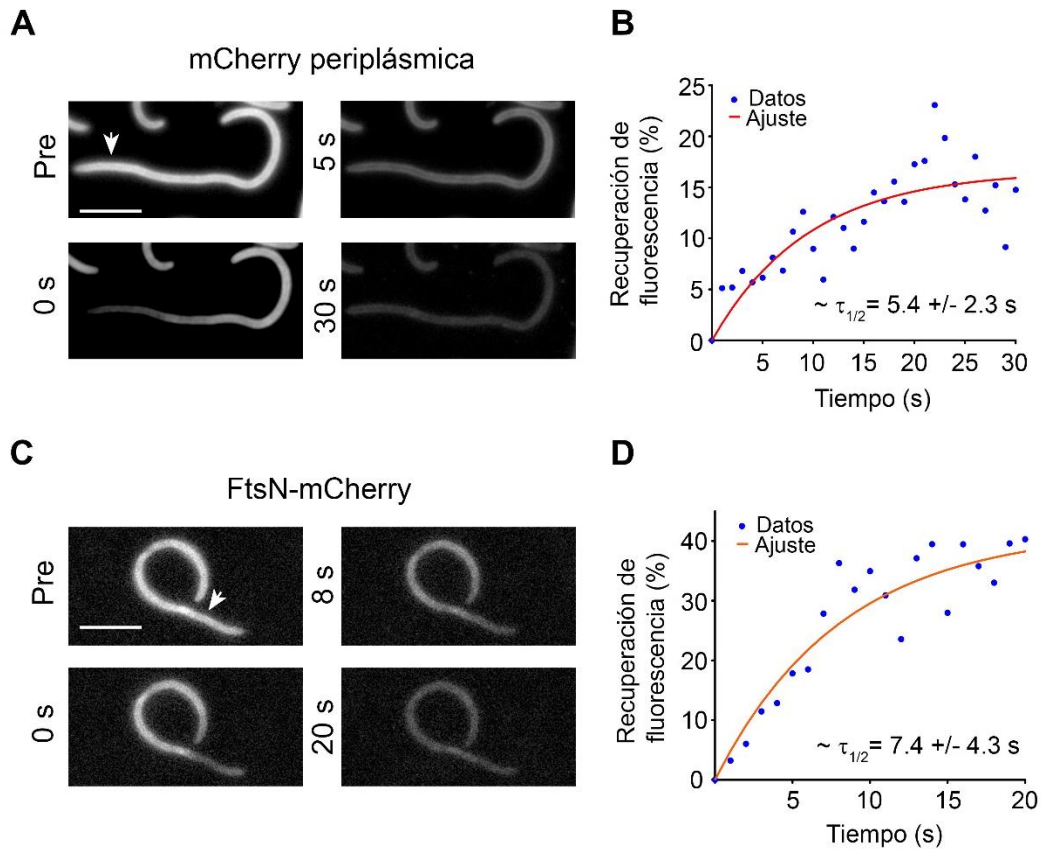


Figura 19. Dinámica de mCherry periplásmica y de FtsN en filamentos depletados de FtsZ. **A) y C)** FRAP en filamentos de *C. crescentus* que expresan mCherry periplásmica (ver Fig.20) o FtsN-mCherry, respectivamente. La flecha señala la zona blanqueada. Barra= 5 μ m. **B) y D)** Gráficas que muestran el porcentaje de recuperación de fluorescencia en la región del FRAP. Se indican los tiempos de recuperación media de fluorescencia ($\tau_{1/2}$).

2. OmpA2 requiere de sus dos dominios estructurales para formar el gradiente.

Con el fin de evaluar la contribución de los dos dominios estructurales de OmpA2 para la inmovilidad de la proteína y la formación del gradiente, generamos versiones truncas fusionadas con mCherry. Éstas reemplazaron el alelo silvestre *ompA2* y expresaban sólo el barril β o el dominio C-terminal como única copia del gen a partir del locus, promotor y péptido señal nativos. En la **Fig.20** se presenta un esquema de las construcciones genéticas diseñadas. En el caso de la versión que expresa el dominio C-terminal, además del péptido señal, fue necesario incluir la primera lámina β del barril, ubicada justo después del péptido señal predicho. En ausencia de esta región, la proteína de fusión no pudo ser detectada.

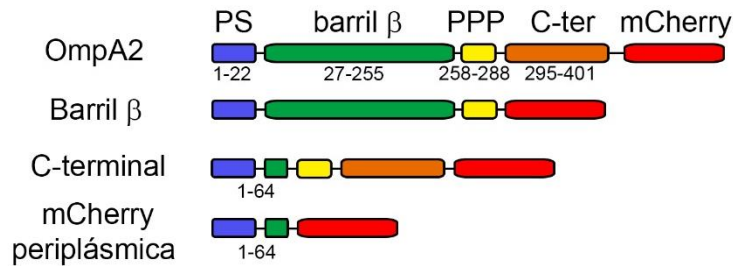


Figura 20. Esquema de OmpA2 y sus versiones truncas. PS, péptido señal; PPP, región rica en prolina; C-ter, dominio C-terminal. Los números indican la longitud en residuos para cada región de OmpA2.

Determinamos la localización subcelular y estabilidad de estas versiones truncas mediante fraccionamiento y Western-blot (**Fig. 21**). Como control, fusionamos mCherry con la región codificante para el péptido señal y la primera lámina β de OmpA2. Esta región fue la misma que la incluida en la fusión OmpA2 C-terminal y permitió la translocación de mCherry hacia el periplasma. Después del fraccionamiento celular, se detectaron dos bandas para la fusión mCherry periplásmica únicamente en la fracción soluble. De éstas, la más abundante corresponde a la proteína completamente procesada, en la que el péptido señal y la lámina β de OmpA2 fueron removidos. Este resultado muestra que la presencia de dicha región después del péptido señal, no altera la localización de mCherry como proteína soluble del periplasma.

De acuerdo con la localización subcelular esperada, el barril β estuvo presente en la fracción insoluble y el dominio C-terminal en la soluble. Tanto para la proteína completa como para sus versiones truncas, se detectaron varias poblaciones en el Western-blot. En el caso de OmpA2 y del barril β, las bandas de menor peso molecular probablemente corresponden a un posible desplegamiento parcial aún en condiciones desnaturizantes, como ya se ha reportado para este tipo de proteínas. Para la versión C-terminal, las poblaciones menos abundantes podrían corresponder a la remoción de la primera lámina del barril β, del péptido señal o de ambos. La versión mCherry periplásmica mostró el mismo patrón.

Para el barril β se observó en la fracción soluble una población minoritaria cuyo peso fue similar al de mCherry periplásmica. Esto sugiere que el plegamiento del barril podría resultar comprometido en ausencia del dominio C-terminal de OmpA2, tal como se ha sugerido en experimentos *in vitro* para OmpA de *E. coli* (62).

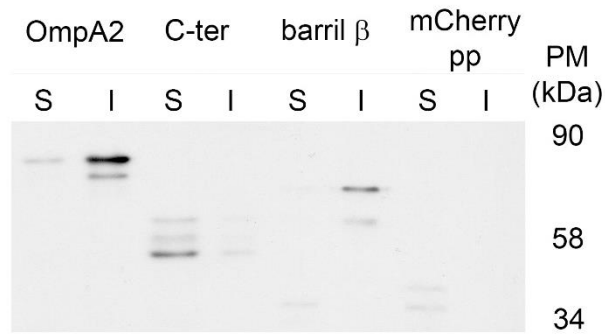


Figura 21. Estabilidad de las versiones truncas de OmpA2. Fraccionamiento celular y Western-blot α -mCherry de la versión completa de OmpA2 y sus versiones truncas. C-ter y barril β , dominios C-terminal y N-terminal de OmpA2, respectivamente; mCherry pp, mCherry periplásmica; S, fracción soluble; I, fracción insoluble. Pesos moleculares de las proteínas maduras: OmpA2-mCherry, 67 kDa; C-ter-mCherry, 45 kDa; barril β -mCherry, 57 kDa; mCherry pp, 30 kDa.

Posteriormente, verificamos que la fusión barril β estuviese correctamente insertada en la ME. Para ello, aprovechamos la migración anómala y la modificación por temperatura en geles desnaturizantes (SDS-PAGE). Una posible explicación a este fenómeno es la presencia de un barril β y su interacción con los LPS y las proteínas de ME, que limitan el acceso del SDS incluso en altas temperaturas (100 °C, 15 min), (90,91). Esta proteína de fusión consta de dos barriles, el de OmpA2 y el de mCherry. En *E. coli* se ha mostrado que la desnaturalización de mCherry comienza alrededor de 60 °C (52), mientras que la del barril de OmpA2 en *C. crescentus*, ocurrió alrededor de 80 °C; esto permitió identificar y seguir el proceso de desnaturalización de ambos barriles. Se obtuvieron extractos totales de las cepas que expresan OmpA2 o la versión trunca y se incubaron a diferentes temperaturas, desde 45 hasta 100 °C por 15 min (**Fig.22**). Dado que el patrón de desnaturalización dependiente de temperatura fue similar en ambos casos, es probable que la versión barril β se ensamble de manera correcta en la ME.

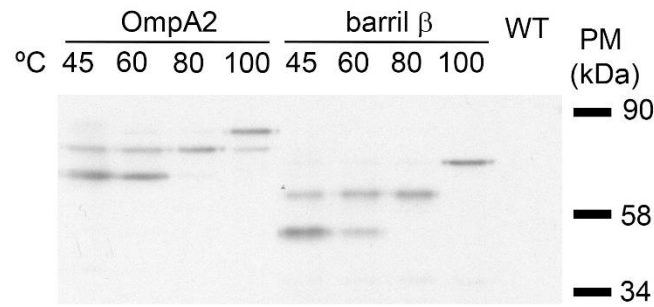


Figura 22. Inserción de OmpA2 y el barril β en la ME. Western-blot α -mCherry en condiciones desnaturalizantes contra extractos totales de cepas que expresan OmpA2 o la versión barril β , ambos fusionados con mCherry. Se indica en cada carril, la temperatura a la cual se incubó la muestra durante 15 min antes de ser resuelta. Como control negativo, se incluyó un extracto total de la cepa silvestre (WT) CB15N, que no lleva ninguna fusión con mCherry.

Después de corroborar la estabilidad, inserción en la ME (en el caso del barril β) y la presencia en la fracción esperada, procedimos a evaluar la localización de estas versiones truncas mediante microscopía de fluorescencia (**Fig. 23**). Ninguna de ellas reprodujo el gradiente de concentración que forma la proteína completa, por lo que dicho patrón depende de las propiedades de ambos dominios estructurales. Dado que las versiones truncas se expresaron en ausencia de la proteína completa, en ambos casos se produjeron vesículas de ME. Además, las células que expresaban sólo el dominio C-terminal mostraron una zona con fluorescencia reducida o casi nula alrededor del sitio de la división. La ausencia de un gradiente sugería que estas versiones truncas de OmpA2, a diferencia de la proteína completa, podrían difundir libremente en la célula.

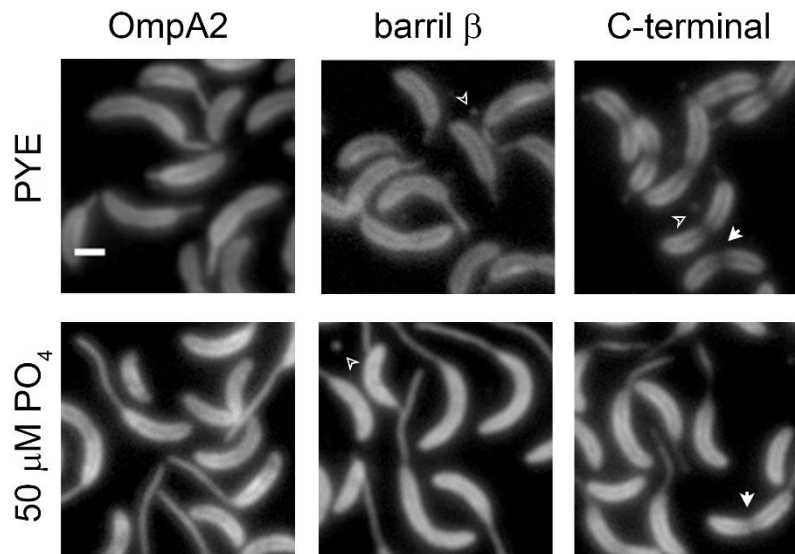


Figura 23. Localización de las versiones truncas de OmpA2. Microscopías de fluorescencia de las cepas indicadas creciendo en fase exponencial en medio rico PYE o en medio mínimo M5GG suplementado con 50 μM de fosfatos. El gradiente de concentración se forma únicamente en las células que expresan la proteína completa. Las puntas huecas de flecha señalan vesículas de ME y las flechas sólidas, regiones con fluorescencia reducida en células que expresan el dominio C-terminal. Barra= 1 μm .

3. La inmovilidad de OmpA2 depende de la unión del dominio C-terminal con el peptidoglicano.

Para determinar la contribución de ambos dominios en la difusión limitada de OmpA2, evaluamos la dinámica de las versiones truncas mediante experimentos de FRAP. Empleamos células ligeramente filamentadas (2-3 veces la longitud celular normal) por la depleción de FtsZ, y observamos que ambas proteínas truncas se localizaron de manera homogénea, tal como en células no filamentadas. El FRAP reveló que únicamente la fusión barril β era capaz de difundir (**Fig. 24**). Para estimar el coeficiente de difusión aparente (D), así como el tiempo ($\tau_{1/2}$) en el cual la región blanqueada alcanza la mitad de la fluorescencia máxima, ajustamos los datos experimentales a ecuaciones validadas para el análisis de FRAP en dos dimensiones (92). Esto mostró que el barril β de OmpA2 difunde lentamente en la ME de *C. crescentus*, con un $\sim D$ de $2.7 \pm 2 \times 10^{-4} \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ y un $\tau_{1/2}$ de 5.35 ± 1.7 min, lo cual representa casi una décima parte del ciclo celular. Dado que el dominio C-terminal es inmóvil, estos resultados indican que la unión de OmpA2 con la pared celular es lo que principalmente restringe la difusión de la proteína.

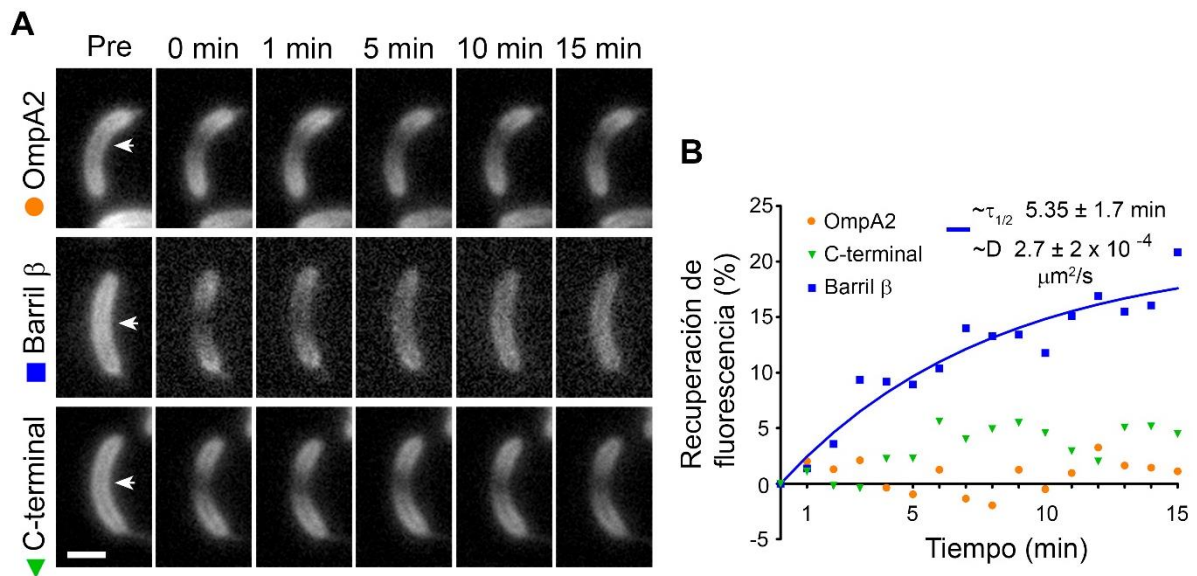


Figura 24. Difusión de OmpA2 y sus versiones truncas. **A)** FRAP en células de *c. crescentus* depletadas de FtsZ y expresando OmpA2 o cualquiera de sus versiones truncas. La flecha señala la región blanqueada en el tiempo $t = 0 \text{ min}$. Para comparar, se incluyeron los datos mostrados en la Figura 18. Barra = $1 \mu\text{m}$. **B)** Gráfica que muestra el porcentaje de recuperación de fluorescencia en la región del FRAP a lo largo de 15 min. Se especifica para la versión barril β , el tiempo de recuperación media de fluorescencia y el coeficiente de difusión.

4. La unión de OmpA2 con la pared celular es importante para la estabilidad de la proteína y la formación del gradiente.

La localización homogénea y difusión del barril β sugieren que el dominio C-terminal de OmpA2 es relevante para la formación del gradiente, ya sea por su unión con la pared celular o a través de interacciones consigo mismo u otras proteínas. Para diferenciar entre estas opciones, generamos mutantes puntuales de OmpA2 que fueran incapaces de unirse al peptidoglicano (PG). El diseño de estas mutaciones se basó en los datos cristalográficos y calorimétricos del dominio periplásmico de OmpA de *Acinetobacter baumannii*. Éstos muestran que los residuos D271 y R286 establecen interacciones iónicas y puentes de hidrógeno con el residuo *m*-DAP del PG y que la sustitución independiente por Ala abate por completo la interacción (13). Ambos residuos están conservados en los dominios C-terminal tipo OmpA, y en el caso de OmpA2 corresponden a D336 y R351 (**Fig. 25**).

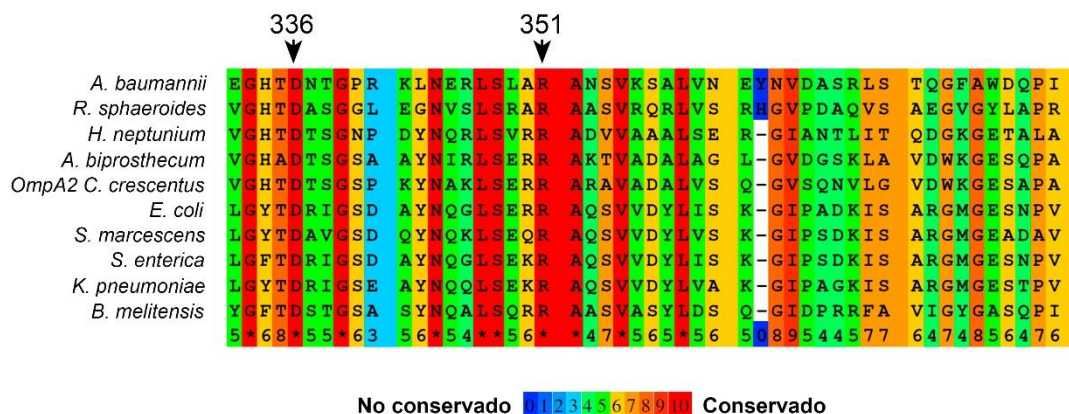


Figura 25. Alineamiento múltiple del dominio C-terminal presente en diferentes proteínas tipo OmpA. El alineamiento se realizó con el algoritmo PRALINE (93) y la escala de color muestra el grado de conservación a lo largo de la secuencia de aminoácidos. Las flechas indican los residuos conservados Aspártico y Arginina, que en OmpA de *Acinetobacter baumannii* establecen interacciones específicas con el residuo *m*-DAP del PG. Los números indican dichos aminoácidos conservados presentes en OmpA2 de *C. crescentus*. *R. sphaeroides*, *Rhodobacter sphaeroides*; *H. neptunium*, *Hyphomonas neptunium*; *A. biprosthicum*, *Asticcacaulis biprosthicum*; *C. crescentus*, *Caulobacter crescentus*; *E. coli*, *Escherichia coli*; *S. marcescens*, *Serratia marcescens*; *S. enterica*, *Salmonella enterica*; *K. pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae*; *B. melitensis*, *Brucella melitensis*.

Mediante microscopía de fluorescencia mostramos que ambas variantes (OmpA2_{D336A} y OmpA2_{R351A}) se localizan de manera homogénea, aunque algunas células que expresan la versión D336A presentan un gradiente poco marcado. Estas mutantes puntuales reemplazaron el alelo silvestre y su expresión causó la formación de vesículas de ME (VME), sobre todo en el caso de R351A (**Fig. 26**).

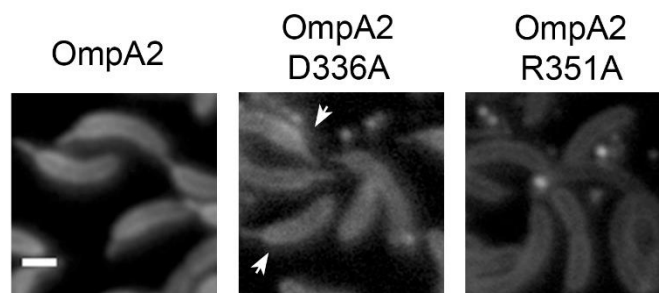


Figura 26. Localización de versiones mutantes puntuales de OmpA2 en residuos posiblemente implicados en la unión con la pared. Microscopías de fluorescencia de cepas que expresan OmpA2 completa, en su forma silvestre o mutante puntual. Las flechas señalan la presencia de un gradiente. Barra= 1 μ m.

Este resultado sugiere que la unión con la pared es importante para el plegamiento de OmpA2, y es congruente con un estudio reciente en el que el dominio C-terminal de OmpA de *A. baumannii* requiere la unión con el residuo *m*-DAP para concluir su plegamiento (65). La formación excesiva de vesículas también indica un problema en el plegamiento, ya que se ha sugerido que las VME se forman por la presencia de proteínas mal plegadas en el periplasma. De hecho, un Western-blot reveló que ambas proteínas eran ligeramente inestables, ya que una población pequeña corresponde a un producto de degradación con un peso molecular similar al de mCherry (**Fig. 27**).

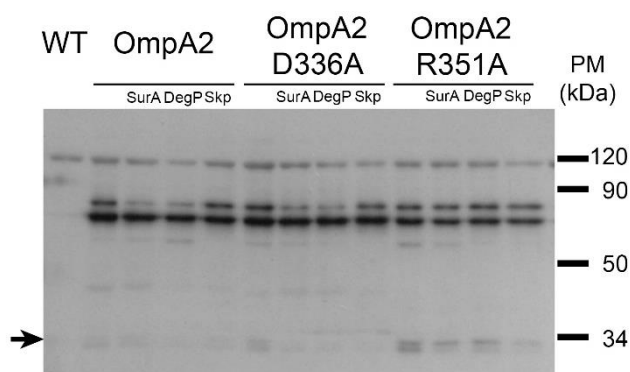


Figura 27. Estabilidad de las versiones mutantes puntuales de OmpA2 y efecto de las chaperonas periplásmicas. Western-blot α -mCherry a partir de extractos totales de cada una de las cepas indicadas. La sobreexpresión de las chaperonas se logró clonando la secuencia codificante de cada una de ellas en un plásmido de alto número de copias e induciendo la expresión con 0.3 % de xilosa por 3 h. La flecha indica una posible banda de degradación de OmpA2-mCherry.

Ya que una menor eficiencia en el plegamiento podría afectar la localización de OmpA2 y sus interacciones con otras proteínas, decidimos sobreexpresar de manera independiente las chaperonas periplásmicas SurA, DegP o Skp, mismas que en *E. coli* asisten el plegamiento de las OMPs en el periplasma. Evaluamos el efecto de la sobreexpresión de estas chaperonas sobre la formación de vesículas de ME, así como la estabilidad de OmpA2 y la capacidad de formar el gradiente de concentración. En las células que expresan la versión silvestre de OmpA2, la sobreexpresión de las chaperonas no afectó la formación del gradiente. Mientras que en aquellas que expresan la variante OmpA2_{D336A}, se redujo la formación de vesículas (~90 %) y la inestabilidad de la proteína. A pesar de que, con cualquiera de las chaperonas, OmpA2_{D336A} recuperó su competencia de formar el gradiente, éste fue más evidente tras la sobreexpresión de DegP y Skp. En el caso de la versión OmpA2_{R351A}, la inestabilidad de la proteína se redujo sobre todo con la sobreexpresión de Skp. Esto redujo considerablemente la

producción de vesículas (~60 %), pero las células no mostraron la localización característica de OmpA2 (**Fig. 28**).

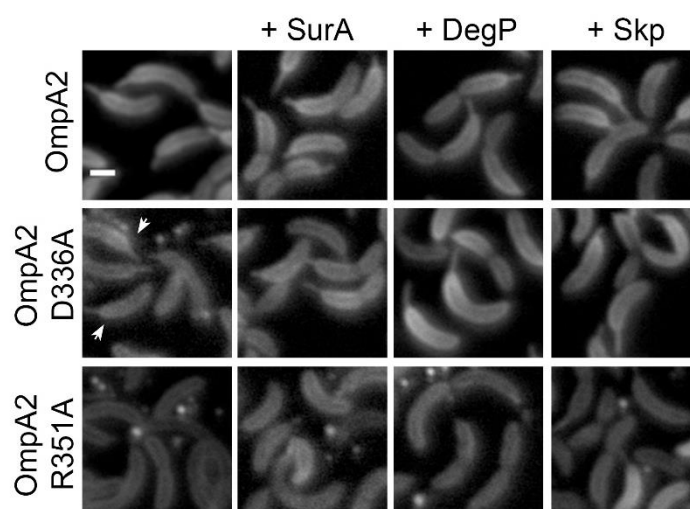


Figura 28. Efecto de la sobreexpresión de SurA, DegP o Skp sobre la localización de las variantes de OmpA2. Microscopías de fluorescencia de cepas crecidas en medio rico PYE en fase exponencial antes y después de la sobreexpresión de las chaperonas. Barra= 1 μm . Las flechas señalan células con un gradiente poco marcado.

De acuerdo con los datos de OmpA de *A. baumannii*, estas mutantes puntuales de OmpA2 no deberían tener afinidad por el peptidoglicano (PG) (13). Dado que dicho estudio se realizó *in vitro*, decidimos evaluar la capacidad de ambas mutantes puntuales para unirse al peptidoglicano. Esto lo evaluamos mediante FRAP en células depletadas de FtsZ. De manera inesperada, esta condición mejoró la estabilidad de las proteínas mutantes (ver Fig.30) y permitió la formación del gradiente de OmpA2_{D336A}, comportamiento similar al observado con la sobreexpresión de las chaperonas periplásmicas. Si estas variantes no pueden unirse al PG, entonces su movilidad sería parecida a la del barril β . De acuerdo con su localización, los ensayos de FRAP mostraron que OmpA2_{D336A} es inmóvil como la proteína silvestre, mientras que OmpA2_{R351A} difunde con una dinámica similar a la del barril β (coeficiente de difusión $D= 2.7 \pm 1.5 \times 10^{-4} \mu\text{m}^2/\text{s}$ y $\tau_{1/2}= 6.54 \pm 3.38 \text{ min}$) (**Fig.29**).

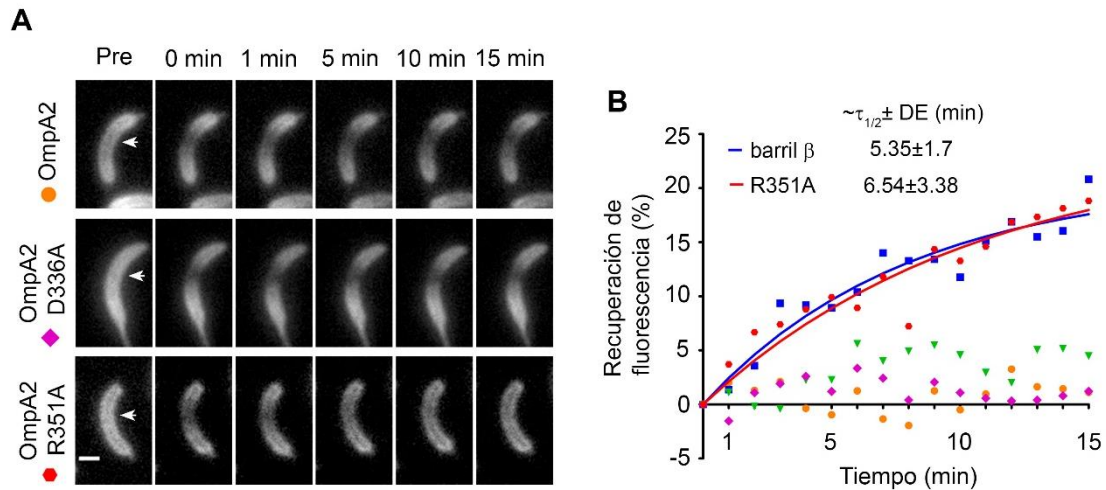


Figura 29. Difusión de las variantes de OmpA2 que no pueden unirse al PG. A) FRAP en células depletadas de FtsZ expresando OmpA2 o cualquiera de sus variantes. Flecha, región blanqueada en el tiempo $t=0$ min. Para comparar, se incluyeron los datos mostrados en la Figura 24. **B)** Gráfica que muestra el porcentaje de recuperación de fluorescencia en la región del FRAP a lo largo de 15min. Se especifica para la versión barril β y OmpA2 R351A, el tiempo de recuperación media de fluorescencia, DE= desviación estándar. Datos de recuperación de fluorescencia para: **OmpA2**, círculos naranjas; **barril β** , cuadros azules; **versión C-terminal**, triángulos verdes; **OmpA2 D336A**, rombos magenta; **OmpA2 R351A**, círculos rojos.

Estos resultados indican que, *in vivo* el residuo R351 de OmpA2 establece interacciones cruciales con el PG. Sin embargo, cuando OmpA2 no puede unirse al PG, D336 es aún más importante para el plegamiento y estabilidad de OmpA2, ya que una doble mutante puntual OmpA2_{D336A, R351A} se degradó casi por completo, y su estabilidad no pudo ser rescatada por la sobreexpresión de las chaperonas periplásmicas. Adicionalmente, la estabilidad de las mutantes puntuales sencillas depende en gran medida de la presencia del barril β , puesto que cuando se introdujeron dichas mutaciones en la versión trunca C-terminal, las proteínas resultantes se degradaron aún en presencia de las chaperonas (datos no mostrados).

Aunque la estabilidad de las versiones mutantes de OmpA2 puede ser restaurada, ya sea por la depleción de FtsZ o por la sobreexpresión de las chaperonas periplásmicas, el gradiente sólo se forma cuando el dominio C-terminal puede unirse al PG. Lo anterior implica que esta interacción puntual es estable y esencial para la inmovilidad de la proteína. Dado que OmpA2_{R351A} y el barril β difunden con la misma dinámica, se puede

asumir que el dominio C-terminal no establece interacciones con otras proteínas o bien, que éstas no son relevantes para su movilidad.

5. La difusión del barril β es independiente de la depleción de FtsZ.

Ya que la difusión del barril β de OmpA2 es un comportamiento contrario al observado para las OMPs en *E. coli*, hicimos un conjunto de experimentos control para descartar que esto fuera causado por una condición anormal en la membrana externa inducida por la depleción de FtsZ.

Después de la depleción de FtsZ y del bloqueo de la síntesis de proteínas, verificamos que la estabilidad y localización subcelular de las versiones truncas permaneciera como en la cepa que expresa la proteína completa. También evaluamos la integridad de las membranas mediante un ensayo de permeabilidad a yoduro de propidio. En éste, las células sanas no permiten el paso del compuesto, pero en aquellas cuyas membranas están dañadas, el yoduro de propidio se intercala con el DNA y emite fluorescencia (**Fig.30**), (89).

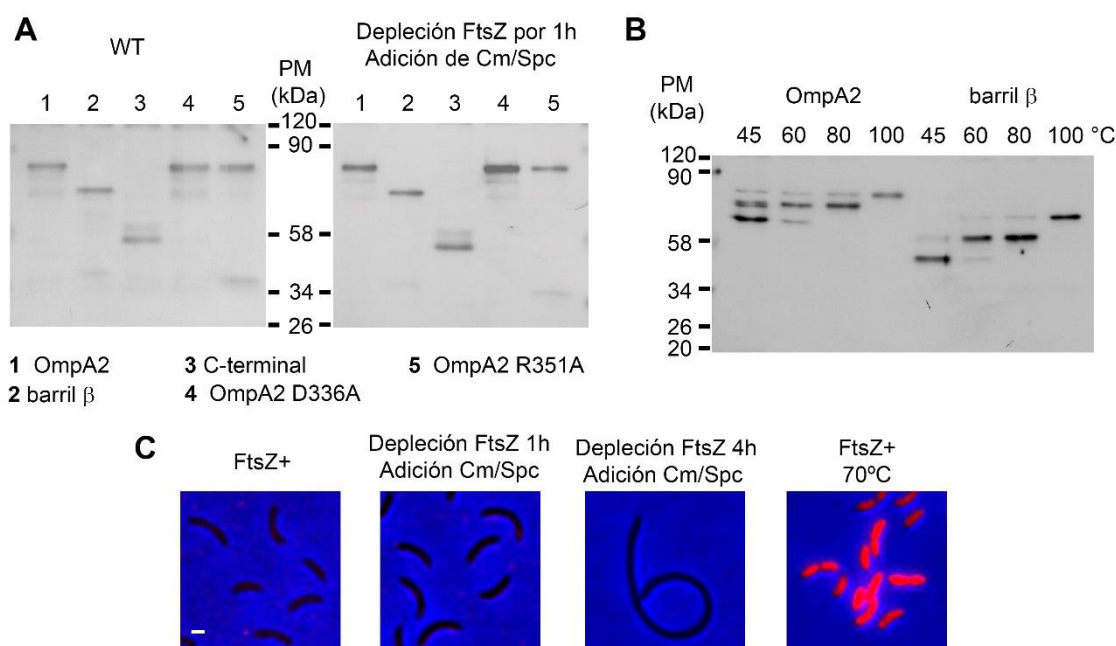


Figura 30. La depleción de FtsZ no afecta la integridad de las membranas ni la estabilidad y localización de OmpA2. **A)** Western-blot α -mCherry para las cepas que expresan cualquiera de las versiones de OmpA2 en el fondo silvestre o en de la depleción de FtsZ. **B)** Migración dependiente de temperatura para OmpA2 y el barril β tras depletar FtsZ. **C)** Ensayo de accesibilidad a yoduro de propidio en las condiciones especificadas. Barra= 1 μ m. Cm, cloranfenicol; Spc, espectinomycin.

También evaluamos la difusión de OmpA2 y del barril β en células no filamentadas. A pesar de que, en estas condiciones el fotoblanqueo abarca casi la mitad de la célula, detectamos que sólo el barril β difunde, mientras que la proteína completa sigue siendo inmóvil (**Fig. 31**). Esto confirmó los resultados obtenidos con células depletadas de FtsZ.

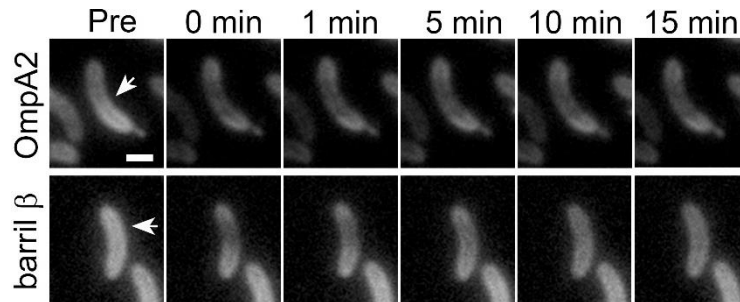


Fig. 31. La difusión del barril β de OmpA2 no es debido a la ausencia de FtsZ. FRAP en células no filamentadas que expresan la versión completa de OmpA2 o sólo el barril β . Barra= 1 μm .

Otro control consistió en emplear métodos alternativos de filamentación. Comúnmente, la técnica de FRAP en bacterias se realiza sobre células tratadas con antibióticos que bloquean la división celular, como la cefalexina que es un inhibidor de PBP3 (FtsI o *Penicillin Binding Protein 3*), (88). La diferencia entre las células depletadas de FtsZ y las tratadas con cefalexina, es la presencia de la maquinaria de división (divisoma) en estas últimas. Evaluamos la difusión del barril β en dichos filamentos, así como en los obtenidos por la depleción de FtsI. Los ensayos de FRAP mostraron que en ambas condiciones el barril difunde con una dinámica similar a la observada en las células depletadas de FtsZ (**Fig. 32**).

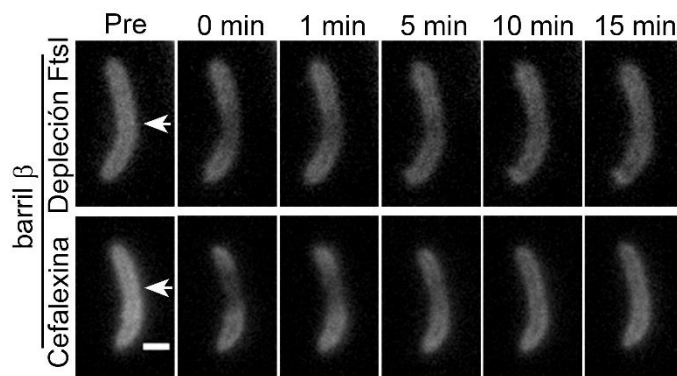


Figura 32. Otros métodos de filamentación permiten la difusión del barril β de OmpA2. FRAP de células filamentadas por la depleción de FtsI o por el tratamiento con cefalexina, expresando la versión barril β -mCherry. Barra= 1 μm .

También detectamos que la filamentación excesiva afecta la movilidad del barril, puesto que en células depletadas de FtsZ por ~4h, el tiempo medio de recuperación ($\tau_{1/2}$) fue $9.82 \pm 3.8\text{min}$, casi el doble que en células depletadas por ~1h. Mientras que en el caso de la depleción de FtsI o el tratamiento por cefalexina, la difusión se abolió por completo (**Fig. 33**). En contraste, la movilidad de mCherry en el periplasma y la de FtsN-mCherry en la MI, continuó ocurriendo en la escala de segundos, como en las células ligeramente filamentadas.

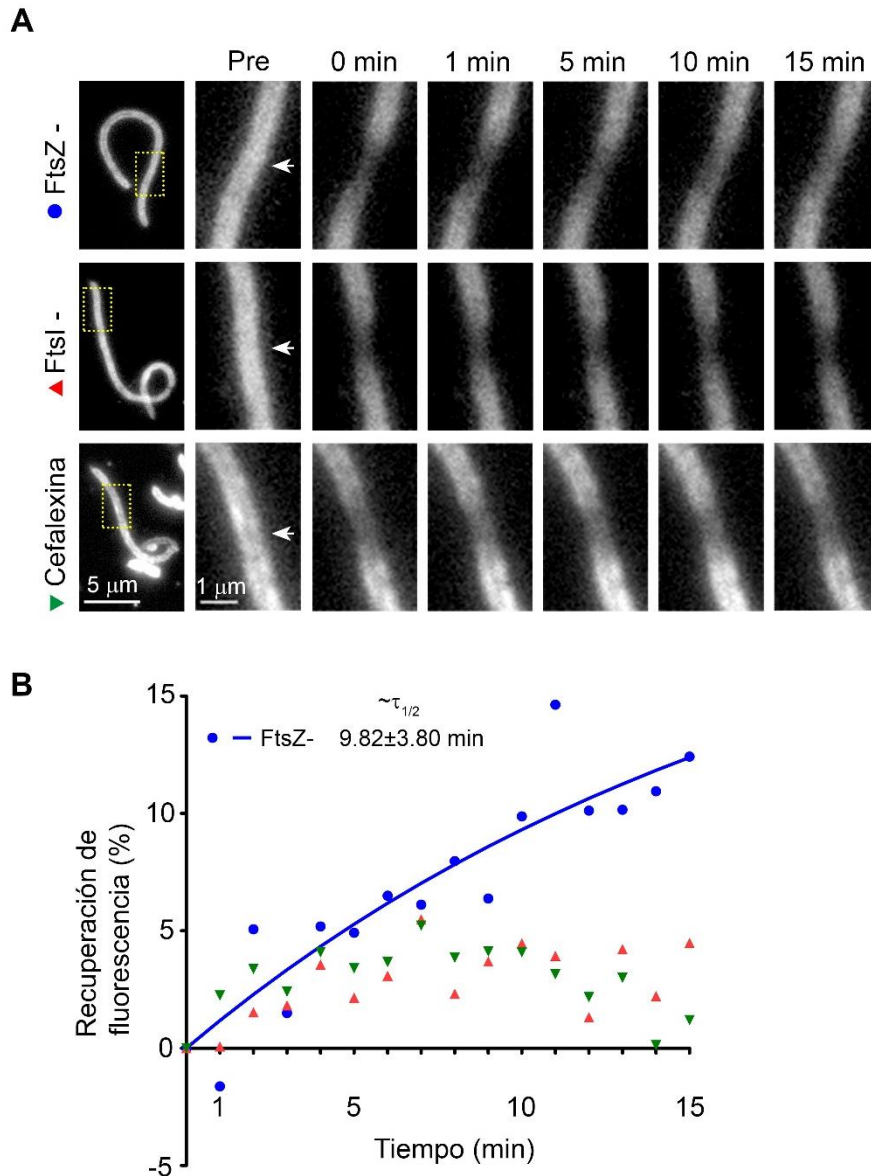


Figura 33. Movilidad del barril β en células sobrefilamentadas. A) FRAP en células filamentadas por la depleción excesiva de FtsZ o FtsI y por el tratamiento con cefalexina. **B)** Gráfica que muestra el porcentaje de recuperación de fluorescencia por 15 min en el área blanqueada. Se indica el valor $\tau_{1/2}$ en la cepa depletada de FtsZ por 4 h.

6. El gradiente de OmpA2 se forma por inserción polar y difusión limitada.

Se ha propuesto que, en bacterias una proteína puede establecer un gradiente de concentración si se cumplen uno o varios de los siguientes requisitos: 1) la acumulación de la molécula en un sitio específico, 2) la difusión limitada a partir de dicho punto, 3) en menor medida, la proteólisis específica (79,80), y 4) la dilución no-homogénea causada por el crecimiento y la división celular.

Dado que OmpA2 es una proteína estática, entonces el gradiente podría ser resultado del crecimiento y la división. De hecho, ambos procesos afectan la forma del gradiente, ya que éste se hace más conspicuo conforme las células progresan a través del ciclo celular y envejecen. El efecto es muy claro en células que arrestan el ciclo en estadio predivisional, lo cual es característico de la fase estacionaria en medios de cultivo limitados de fosfato. En tal condición, es posible detectar la acumulación de OmpA2 en el polo prostecado de prácticamente todas las células.

Con el objetivo de obtener información sobre cómo se establecía el gradiente en etapas previas al crecimiento y la división, se fotoblanqueó el cuerpo completo de células nadadoras y se determinó la aparición de la proteína nueva en células individuales (**Fig.34A**). Incluso 10 min después del FRAP, se detectó la aparición de un gradiente en el polo celular viejo. Esto indica que OmpA2 es retenida y eventualmente integrada en este sitio, estableciendo el gradiente desde etapas previas al crecimiento y la división. La proteína continuó acumulándose de forma gradual a través del tiempo. Treinta minutos después del blanqueo, la forma del gradiente fue muy clara, con la mayor concentración en el primer cuarto de la célula y con una marcada disminución hacia el polo nuevo (**Fig.34B**). Esto confirma la difusión limitada de OmpA2 desde el momento en que se sintetiza en el citoplasma, hasta que su posición se estabiliza por la unión con la pared celular mediante el dominio C-terminal.

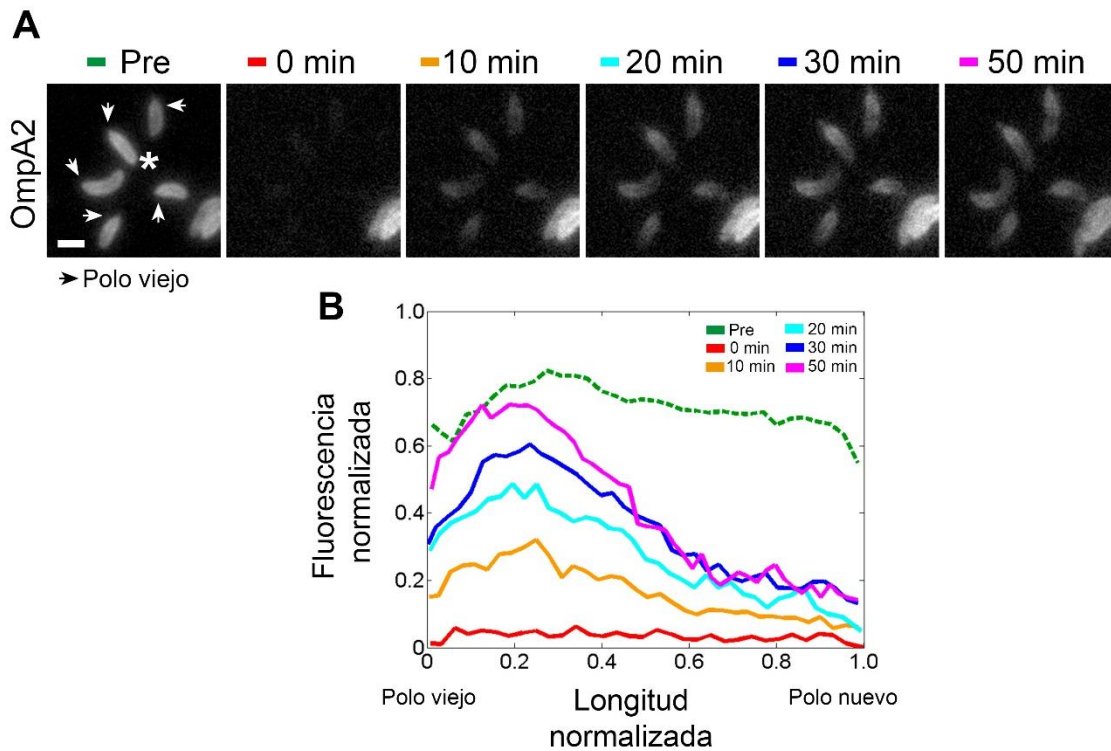


Figura 34. La aparición de nueva OmpA2 ocurre en el polo prostecado. A) *Time-lapse* de una población de células nadadoras creciendo y expresando OmpA2 fusionada con mCherry. El polo viejo (flechas) se determinó por la localización de MipZ-YFP (no mostrado). En el tiempo $t=0$ min se blanqueó todo el cuerpo celular y se siguió la aparición de la nueva fluorescencia. Barra= $1\mu\text{m}$. **B)** Cuantificación normalizada de la intensidad de fluorescencia para la célula marcada con asterisco en A). La longitud celular se normalizó de 0 a 1 en todos los casos. Para permitir la observación con mayor detalle en los tiempos iniciales, dividimos por tres la intensidad de fluorescencia previa al blanqueo (línea verde punteada).

En contraste con la proteína completa, las células que expresan el dominio C-terminal incorporaron la proteína nueva de forma homogénea en los primeros 30 min después del FRAP (**Fig.35**). En los siguientes 20 min, el crecimiento localizado alrededor del sitio de la división diluyó la concentración de la proteína. De esta forma, cuando las células hijas se separan, cada una muestra un gradiente de concentración, que es incluso más evidente que el de las células con la proteína completa. Como OmpA2 y la versión C-terminal tienen el mismo péptido señal y se expresan a partir del locus nativo, es posible que la translocación de ésta última hacia el periplasma también ocurra cerca del polo viejo. A pesar de esto y de que el dominio no difunde, la proteína trunca no es capaz de formar el gradiente. Esto sugiere que la unión del dominio C-terminal a la pared es un

proceso lento, lo cual le confiere a la proteína un periodo de difusión a través del periplasma.

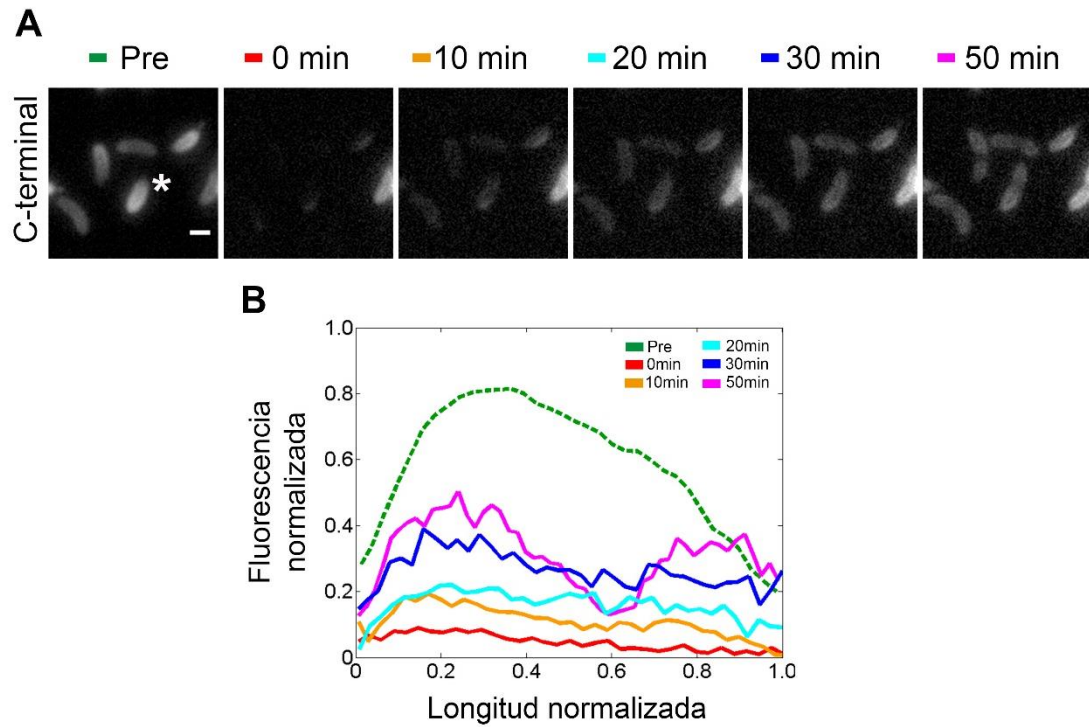


Figura 35. El crecimiento y la división crean el gradiente de las células que expresan la versión trunca C-terminal de OmpA2 fusionada con mCherry. A) *Time-lapse* de células nadadoras creciendo y expresando la versión C-terminal de OmpA2, antes y después del FRAP. Barra= 1 μ m. **B)** Cuantificación normalizada de la intensidad de fluorescencia para la célula marcada con asterisco en A). La longitud celular se normalizó de 0 a 1 en todos los casos. Para permitir la observación con mayor detalle en los tiempos iniciales, dividimos por tres la intensidad de fluorescencia previa al blanqueo (línea verde punteada).

DISCUSIÓN

En un trabajo previo mostramos que OmpA2 forma un gradiente de concentración en el polo celular viejo de *C. crescentus* y que su orientación depende de la posición del gen en el cromosoma (78). Dado que en esta bacteria los RNA mensajeros no difunden, nuestros resultados sugerían que la formación del gradiente de OmpA2 requiere tanto la síntesis y la translocación de la proteína cerca del polo prostecado, como la difusión limitada de la proteína madura.

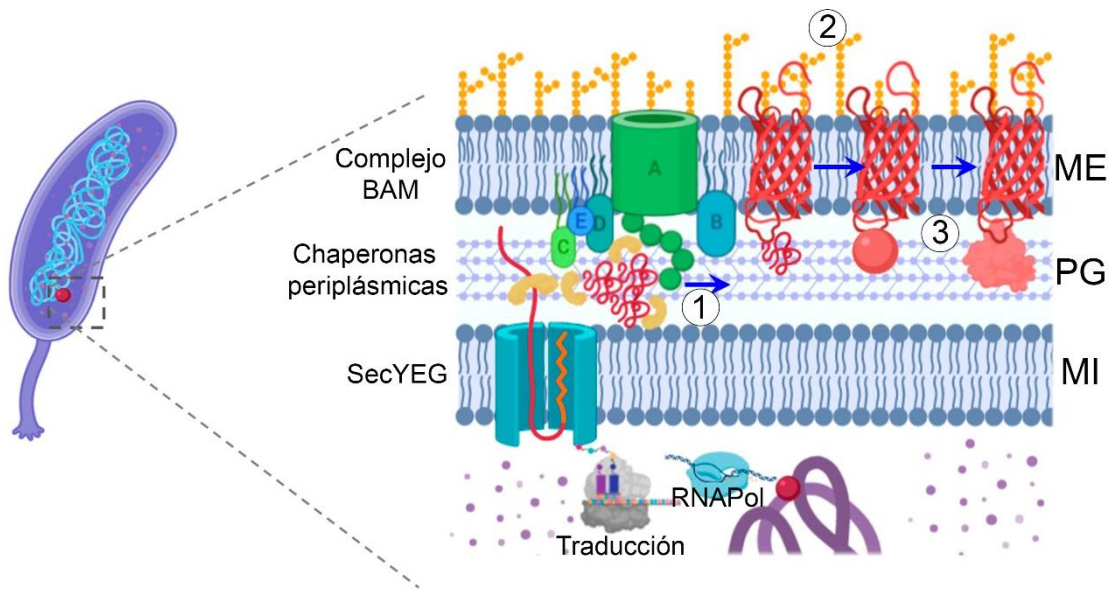
Nuestros resultados de FRAP en células completas mostraron que OmpA2 es retenida en el polo celular viejo hasta integrarse en la envoltura celular y establecer el gradiente. Dado que OmpA2 es una proteína inmóvil, el gradiente debe formarse gracias a un breve periodo de difusión en el periplasma antes de que la proteína establezca su posición. Pero por su naturaleza estática, también podría ser resultado de otros procesos, como la dilución no-homogénea o el desplazamiento, causados por eventos como el crecimiento o la división. Una vez más, los fotoblanqueos de células completas mostraron que, a diferencia de las células que expresan sólo el dominio C-terminal, el gradiente de OmpA2 es el resultado de un periodo breve de difusión y no del crecimiento ni la división.

Para determinar si cualquiera de los dos dominios de OmpA2 era suficiente para formar un gradiente, generamos versiones truncas de OmpA2. Una fusión fluorescente del barril β se localiza de forma homogénea y difunde con una dinámica lenta. Esto indica que dicho dominio por sí solo no es suficiente para mantener el gradiente. Lo anterior es opuesto a lo que se ha reportado para varios barriles β en *E. coli*. Dicho comportamiento ha sido atribuido a interacciones promiscuas entre las OMPs, pero esa idea se ha probado sólo en experimentos *in vitro* (49). Es posible que en OmpA2 estas interacciones sean poco relevantes o que la membrana externa de *C. crescentus* tenga propiedades físicas particulares. De acuerdo con esto, la composición lipídica de la ME y la estructura del lípido A del LPS muestran diferencias importantes con respecto a los de *E. coli* (70,72).

En contraste, el dominio C-terminal de OmpA2 no difunde, lo cual indica que la interacción de este dominio con la pared celular es muy estable aun en ausencia del dominio barril β . La localización de este dominio fue homogénea excepto en el sitio de la división, donde su concentración fue reducida. Este patrón no se observó en las células depletadas de FtsZ, lo cual indica que su presencia está relacionada con un

proceso activo de división. En *C. crescentus*, justo después de que las células forman el anillo FtsZ y antes de que comience la constricción, cambia el crecimiento de la pared celular, de lateral a zonal. Éste se caracteriza por la concentración de pared recién sintetizada alrededor del anillo FtsZ (94). El crecimiento periférico de la pared podría ser la causa de la dilución de la fusión C-terminal en el sitio de la división, creando el patrón observado. Otra posibilidad es que esta fusión resulte desplazada por otras proteínas. Un candidato sería Pal, una lipoproteína cuyo dominio C-terminal es el mismo que el de OmpA2 y que conserva los residuos esenciales para su unión con el PG. La acumulación de Pal en el sitio de la división es congruente con la idea del desplazamiento de OmpA2. Otra posibilidad interesante sería que el peptidoglicano acumulado alrededor del anillo FtsZ tenga una composición distinta. En *E. coli* se ha descrito que diferentes amidasas localizadas en el sitio de la división, remueven la porción peptídica de las hebras de glicano (95,96). Esto último resultaría en una menor concentración de sustrato libre para unirse con el dominio C-terminal de OmpA2. De acuerdo con nuestros experimentos de FRAP, prácticamente toda la población de esta versión trunca es inmóvil, por lo que una vez que la proteína es desplazada, esta región puede ser ocupada por otras proteínas. Pero esto ocurre sólo después de que concluyen los procesos relacionados con la división y se hacen visibles tras la maduración de la proteína fluorescente.

La proteína completa no resulta desplazada del sitio de la división, lo cual indica que el dominio barril β es capaz de mantener la posición de OmpA2 en esta zona. En su ausencia, el dominio C-terminal no es capaz de formar el gradiente de concentración. Esto sugiere que la versión trunca C-terminal tiene un periodo de difusión previo a la unión con la pared. Si asumimos que la translocación de este dominio también ocurre en el polo prostecado, entonces una vez que la proteína completa es exportada al periplasma, el barril β debe limitar de forma eficiente la difusión. Esto se lograría a través de su interacción inicial con las chaperonas periplásmicas y el complejo BAM y después, por su movilidad reducida en la ME. Mientras estos eventos ocurren, el dominio C-terminal termina de plegarse, se une a la pared y fija la posición de OmpA2.



- 1) Difusión en el periplasma antes del plegamiento
- 2) Inserción del barril y difusión en la ME
- 3) El dominio C-terminal termina de plegarse y estabiliza la posición de OmpA2

Figura 36. Modelo general propuesto para la formación del gradiente de OmpA2. La posición de *ompA2* en el cromosoma determina la orientación del gradiente. Diversos eventos previenen la libre difusión de la proteína desde su síntesis en el citoplasma hasta que concluye su maduración. La inmovilización de la proteína ocurre a través de su dominio C-terminal, pero antes de que esto ocurra existe un breve periodo de difusión en el periplasma.

Otra posible contribución del barril β sería limitar la difusión de la pre-proteína en el citoplasma. Esto ocurriría a través de su asociación con la chaperona SecB, misma que evita la agregación de los barriles β en el ambiente acuoso del citoplasma. Además, ayuda al plegamiento del dominio C-terminal. De acuerdo con lo anterior, mientras que las mutantes puntuales de OmpA2 son ligeramente inestables, las versiones mutantes que expresan únicamente el dominio C-terminal, se degradan casi por completo y no pueden ser estabilizadas por la sobreexpresión de las chaperonas periplásmicas. Esto sugiere que el barril β tiene una participación en el plegamiento del dominio C-terminal, ya sea de forma directa o a través del reclutamiento de las chaperonas periplásmicas. Esta función es más relevante cuando el dominio C-terminal es incapaz de unirse a la pared.

En el caso de OmpA de *A. baumannii* se ha mostrado que los residuos D271 y R286 presentes en el dominio periplásmico, son esenciales para su unión con el sustrato y para el plegamiento correcto de la proteína (13,65). De acuerdo con esto, las versiones mutantes puntuales de OmpA2 en los correspondientes residuos conservados (D336 o R351), no formaron el gradiente y fueron sensibles a degradación. De manera inesperada, sólo el residuo R351 fue indispensable para la unión con el sustrato, ya que la ausencia de D336 puede ser compensada por la acción de las chaperonas periplásmicas. Esto sugiere diferentes roles para estos dos residuos durante el plegamiento y la unión al sustrato. Sin embargo, ambos aminoácidos contribuyen a la afinidad de la proteína por la pared, ya que las células que expresan la versión OmpA2_{D336A} y sobreexpresan las chaperonas, todavía producen vesículas de ME.

De forma inesperada, la estabilidad de las proteínas que llevan las mutaciones puntuales fue similar en cepas que expresan las chaperonas que en las células depletadas de FtsZ. Esto indica que en *C. crescentus*, la depleción de FtsZ podría generar algún tipo de estrés periplásmico, similar al que la filamentación produce en el citoplasma de *E. coli*, y cuya respuesta consiste en la sobreexpresión de chaperonas. Este estrés inducido por la filamentación, también podría ser la causa de la ausencia de difusión del barril β en células muy filamentadas, ya sea por la asociación de este dominio con otras proteínas como una respuesta al estrés o bien, porque las propiedades de la ME resultan alteradas. Congruente con esto último, se ha mostrado que la depleción de FtsZ en *E. coli* afecta la expresión de proteínas reguladoras de genes implicados en la síntesis del LPS y de polisacáridos capsulares (89).

Los experimentos de blanqueo en células completas mostraron que OmpA2 se inserta en la ME cerca del polo viejo. En *E. coli*, la inserción de las nuevas OMPs ocurre en la región lateral de las células, pero no en los polos (49). Sin embargo, la inserción polar ha sido reportada para el caso de una familia de autotransportadores, donde se incluye a la proteína AIDA-I de *E. coli* (97). El ejemplo mejor estudiado es el de la proteína IcsA de *Shigella flexneri*, la cual forma un gradiente polar en el polo celular viejo. La localización polar de IcsA es dirigida por una señal presente en la proteína y depende de OmpA y PhoN2 (85). Aunque no se conoce el patrón de localización de OmpA en esta bacteria, el resultado anterior sugiere que al igual que IcsA, podría formar un gradiente de concentración polar.

En contraste, en *C. crescentus* la inserción polar de OmpA2 depende de la posición del gen en el cromosoma y, en consecuencia, de la translocación polar de la proteína hacia

el periplasma y finalmente de la inserción en la ME cerca del polo viejo. Si la translocación de las OMPs ocurre cerca del sitio en el que son sintetizadas, como el modelo que proponemos para OmpA2, una posible explicación del patrón medial de inserción observado en *E. coli*, sería la posición a partir de la cual las proteínas son producidas y translocadas. El hecho de que ninguno de los dos dominios de OmpA2 pueda generar el gradiente, sin importar si difunden o no, muestra que la formación de este patrón de localización es el resultado de la combinación de diferentes propiedades de ambos dominios y sus interacciones.

CONCLUSIONES

1. Después de su síntesis, OmpA2 es retenida y translocada cerca del polo prostecado.
2. La formación del gradiente de concentración de OmpA2 requiere de la presencia de sus dos dominios estructurales.
3. OmpA2 es una proteína inmóvil debido a la unión estable de su dominio C-terminal con la pared celular.
4. El residuo conservado R351 de OmpA2 tiene una función crucial para el plegamiento de la proteína y su afinidad por el peptidoglicano.
5. El dominio barril β de OmpA2 muestra una dinámica de difusión lenta en la ME.
6. El gradiente de OmpA2 se forma por la inserción polar de la proteína, seguida de un breve periodo de difusión que concluye con la unión estable a la pared.

MATERIAL Y MÉTODOS

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

Las cepas y los plásmidos empleados en este trabajo se enlistan en la tabla 2 y su construcción se detalla en el anexo 1. Para el mantenimiento y la purificación de los plásmidos se usaron las cepas de *E. coli* DH5 α o TOP10, las cuales se crecieron en medio LB con el antibiótico apropiado a 37 °C. Las cepas de *C. crescentus* se crecieron a 30 °C en medio rico PYE (peptona-extracto de levadura) o medio mínimo M5GG amortiguado con Tris y suplementado con 10 mM o 50 μ M de fosfatos (98). Los antibióticos se usaron en las siguientes concentraciones, para *E. coli*: gentamicina 20 μ g/mL, kanamicina 50 μ g/mL, espectinomicina 50 μ g/mL, ácido nalidíxico 20 μ g/mL, tetraciclina 10 μ g/mL y cloranfenicol 30 μ g/mL; para *C. crescentus*, para medio líquido y sólido, respectivamente: gentamicina, 2 y 5 μ g/mL, kanamicina, 5 y 20 μ g/mL, espectinomicina, 15 y 100 μ g/mL, tetraciclina 2.5 y 3 μ g/mL y cloranfenicol 2 y 5 μ g/mL.

2. Métodos de genética y biología molecular.

Se usaron procedimientos estándar para la manipulación de DNA, transformación, conjugación y transducción bacterianas. Las reacciones de PCR se hicieron usando la enzima PrimeStar-HS (Takara) y un amortiguador apropiado para genomas con alto contenido en GC. Para las construcciones genéticas se usaron enzimas de restricción adquiridas de NEB, Roche e Invitrogen, así como T4 DNA ligasa (Roche). La mutagénesis sitio dirigida se realizó mediante una reacción de PCR con la enzima PrimeStar-HS y usando como molde un plásmido con la región de interés; el producto se trató con la enzima DpnI, se dializó usando una membrana VSWP (Millipore) de 0.025 μ m y se introdujo en *E. coli* mediante electroporación (99). Todos los constructos se verificaron mediante restricción, y cuando fue necesario, por secuenciación.

3. Sincronización de cultivos de *C. crescentus* (100).

Mediante este método es posible separar la población de células nadadoras de las prostecadas a partir de un cultivo en fase exponencial (densidad óptica a 660 nm de \sim 0.3). El cultivo debe ser mantenido en hielo durante 10 min antes de comenzar la sincronía. Asimismo, tubos de ensayo de 15 mL, amortiguador de fosfatos M2 1X y una solución de Ludox pH 7.0 filtrada, deben ser puestos en hielo. En un tubo se mezclan 6 mL de Ludox y 450 μ L de HCl 1M. En otro tubo se colocan 3 mL de la mezcla anterior y 12 mL del cultivo frío, mezclando por inversión. Se centrifuga a 8500 rpm durante 30 min a 4 °C. Después de este paso, se forman dos bandas, la más cercana a la superficie

contiene a las células prostecadas, mientras que la cercana al fondo a las flageladas. Se remueve el sobrenadante por aspiración con vacío y se recupera la banda con las células de interés. Éstas son colocadas en un tubo limpio y se les agregan 10 mL de amortiguador de fosfatos M2 1X y se mezcla por inversión. Se vuelve a centrifugar por 5 min a 9000 rpm en frío. Ahora, en el fondo del tubo se forma un paquete celular, el cual se resuspende suavemente y se agregan 10 mL de medio de cultivo previamente enfriado. Se repite el paso de centrifugación anterior. Se retira el sobrenadante y las células se resuspenden en 1 mL de medio nuevo precalentado a 30 °C.

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

4. Western-blot y ensayos de cambio de movilidad por temperatura.

Para los ensayos de inmunodetección, se obtuvieron extractos totales a partir de cultivos de *C. crescentus* creciendo en fase exponencial, a una densidad óptica (a 660 nm) de ~0.3. Después de concentrar las células por centrifugación, se resuspenden en amortiguador de fosfatos y se lisan por sonicación. Todos los extractos proteicos se cuantificaron mediante el ensayo Bradford (BioRad) y la cantidad de proteína corrida en cada carril fue ajustada siempre a 3 µg. Las muestras se mezclan con amortiguador de carga, cuya concentración final es: 50 mM de Tris pH 6.8, 1 % de SDS; 10 % de glicerol, 2 % de 2-mercaptoetanol y 2 mM de EDTA. Para los ensayos de cambio de movilidad, las muestras se incubaron por 15min a 45, 60, 80 o 100 °C, mientras que para los Western-blot convencionales, se incubaron a 100 °C por el mismo tiempo.

Las proteínas resueltas en el gel se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0.45 µm. Posteriormente, se bloqueó la membrana con una solución de TBS-Tween 20-2% de leche por al menos una hora con agitación constante. (TBS-Tween 1X, 1L: 100 mL de TBS 10X, 900 mL de H₂O y 1 mL de Tween-20). Como anticuerpo primario se usó un anticuerpo policlonal α-RFP generado contra mCherry fusionada a un epítipo de seis residuos de histidina; a una dilución de 1:30,000 en TBS-Tween. La incubación con este anticuerpo fue por 4 h. Para la fase de detección se empleó un anticuerpo secundario α-mouse (1:30,000; Sigma) acoplado a la enzima fosfatasa alcalina, así como una mezcla de sustrato Tropix CDP-STAR/Nitroblock (20:1; Thermo Fisher

Scientific). La luminiscencia producida en esta reacción se reveló sobre placas de rayos-X.

5. Fraccionamiento celular.

Para determinar la localización subcelular de las versiones truncas de OmpA2, se realizó un fraccionamiento celular a partir de cultivos creciendo en fase exponencial ($DO_{660nm} \sim 0.3$) (101). Las células se concentraron por centrifugación y se resuspendieron en 1/30 del volumen original en amortiguador TES (concentración final: 50 μ M de Tris-HCl, pH 7.8; 500 μ M de EDTA; 3.75 % de sacarosa). Las suspensiones celulares se sonicaron con tres pulsos de 10 s en intervalos de un minuto y se mantuvieron en hielo. Los lisados se centrifugaron por 5 min a 8000 x g. Se recolectaron los sobrenadantes, se determinó la cantidad de proteína mediante Bradford, y se ajustaron con respecto a la muestra con menor concentración añadiendo amortiguador TES a un volumen final de 5 mL. Las muestras se centrifugaron a 35,000 x g por 3 h a 4 °C en un rotor SW50. Los sobrenadantes corresponden a la fracción soluble, mientras que las pastillas a la insoluble. Éstas se resuspendieron en el mismo volumen de amortiguador TES.

6. Ensayos FRAP.

Las células se crecieron en medio rico PYE por toda la noche a 30 °C y cuando fue necesario, en presencia de xilosa (concentración final 0.3 %). Al día siguiente, se reinocularon en el mismo medio y se crecieron hasta una DO_{660nm} de ~ 0.6 . En el caso de las cepas de depleción, se removió la xilosa lavando las células tres veces con medio PYE y se diluyeron los cultivos hasta una DO_{660nm} de ~ 0.05 . Para inducir la filamentación por el tratamiento con cefalexina, se añadió dicho antibiótico a una concentración final de 10 μ g/mL a cultivos con densidad ~ 0.05 . Se monitoreó el grado de filamentación por medio de microscopía de campo claro. Definimos como filamentación ligera el estado en el cual las células poseen el doble o triple de la longitud normal. Esto se logró tras una o cinco horas después del inicio de la depleción de FtsZ o FtsI, respectivamente, y después de 3 h para el tratamiento con cefalexina. La filamentación excesiva se alcanzó tras la depleción de FtsZ por 4 h o la de FtsI por 16 h. Después, se inhibió la traducción añadiendo cloranfenicol y espectinomicina a una concentración final respectiva de: 80 y 300 μ g/mL en las células depletadas de FtsZ o a 20 y 75 mg/mL para las depleciones de FtsI y filamentación por cefalexina. Las células se incubaron por 1 h a 30 °C con agitación constante. Se concentraron las células por centrifugación y se colocó 1 μ L de muestra en una película de agarosa al 1.5 %, preparada en solución M2 1X con la misma mezcla de antibióticos. Las muestras se cubrieron con un portaobjetos y se sellaron con

una mezcla de parafina, vaselina y aceite mineral. Durante la observación, la temperatura de las muestras se mantuvo a 30 °C por medio de un dispositivo (Bioptechs) capaz de calentar el objetivo del microscopio. La microscopía se realizó con el equipo de epifluorescencia Nikon Eclipse Ti acoplado a la unidad de FRAP Micropoint (Andor) y una cámara SCMOS pco.edge controlados con MicroManager 2.0 Beta (102). Durante el fotoblanqueo, se usó un filtro para reducir la intensidad del láser hasta 30 % de absorbancia y 70 % de transmitancia. Durante la adquisición, se usó un filtro de densidad neutra ND4 para reducir la intensidad de la lámpara de mercurio y la pérdida de fluorescencia. La tasa de adquisición dependió de la velocidad de difusión de cada molécula particular. Para el caso de OmpA2 y sus distintas versiones mutantes, fue cada minuto. Para mCherry periplásmica y FtsN, cada segundo.

El fotoblanqueo completo se realizó en células nadadoras obtenidas por sincronización. Las células se inmovilizaron sobre una película de agarosa al 1.5 % preparada en medio rico PYE y se permitió su crecimiento a 30 °C. El fotoblanqueo y la visualización se realizaron en las mismas condiciones antes descritas. En este caso, la tasa de adquisición fue cada 10 min. Se usó MicrobeTracker (103) para detectar las células en las imágenes, y los perfiles de intensidad de fluorescencia se obtuvieron con la herramienta *intprofileall*. Las gráficas se editaron usando MATLAB y la longitud de la célula se normalizó de 0 a 1 para cada tiempo.

7. Análisis de los datos de FRAP.

Mediante el software ImageJ (104), se construyeron series a partir de las imágenes individuales. Se substrajo el fondo (*background*) y se cuantificó la intensidad de fluorescencia en la zona fotoblanqueada (FRAP; ~15x40 píxeles). Esto también se hizo para una selección de las mismas dimensiones sobre una célula vecina no-blanqueada (referencia), así como para el fondo. Éste último valor se restó de las señales de referencia y del FRAP. Usando Excel, se calculó el porcentaje de recuperación de fluorescencia. Los datos experimentales se ajustaron mediante la herramienta “cftool” de MATLAB, a la ecuación $I(t) = A (1 - e^{-bt})$, donde I , t , A y b corresponden a la intensidad de fluorescencia, tiempo, fracción móvil y velocidad de recuperación de fluorescencia, respectivamente. Se calcularon los tiempos de recuperación media de fluorescencia ($\tau_{1/2}$) usando la ecuación $\tau_{1/2} = \ln(0.5)/-b$. Los coeficientes de difusión aparente ($\sim D$), se determinaron usando la ecuación clásica de FRAP en dos dimensiones $D = 0.224 (r^2/\tau_{1/2})$, donde r es el radio del láser y $\tau_{1/2}$ es el tiempo medio de recuperación (92).

Tabla 2. Cepas y plásmidos.

Cepa o plásmido.	Descripción y/o genotipo.	Fuente o referencia.
Cepas		
CB15N	Cepa sincronizable derivada de CB15	(101)
LDG1	CB15N <i>ompA2::pompA2-mCherry</i>	(77)
LDG2	CB15N Δ <i>ompA2::</i> ΩSpc	(77)
LDG3	CB15N <i>ompA2::pompA2-barril-β-mCherry</i>	Este trabajo
LDG4	LDG2 <i>ompA2::pompA2-C-terminal-mCherry</i>	Este trabajo
LDG5	CB15N <i>vanA::pVpsompA2-mCherry</i>	Este trabajo
LDG6	CB15N <i>ftsZ::pXftsZ</i>	Este trabajo
LDG7	LDG6 <i>ompA2::pompA2-mCherry</i>	Este trabajo
LDG8	LDG6 <i>ompA2::pompA2-barril-β-mCherry</i>	Este trabajo
LDG9	LDG6 <i>ompA2::pompA2-C-terminal-mCherry</i>	Este trabajo
LDG10	CB15N Δ <i>ftsI xylR::pXftsI-5, ompA2::pompA2-barril-β-mCherry</i>	Este trabajo
LDG11	CB15N <i>ompA2::pompA2-D336A-mCherry</i>	Este trabajo
LDG12	CB15N <i>ompA2::pompA2-R351A-mCherry</i>	Este trabajo
LDG13	LDG1 pBX <i>surA</i>	Este trabajo
LDG14	LDG1 pBX <i>degP</i>	Este trabajo
LDG15	LDG1 pBX <i>skp</i>	Este trabajo
LDG16	LDG11 pBX <i>surA</i>	Este trabajo
LDG17	LDG11 pBX <i>degP</i>	Este trabajo
LDG18	LDG11 pBX <i>skp</i>	Este trabajo
LDG19	LDG12 pBX <i>surA</i>	Este trabajo
LDG20	LDG12 pBX <i>degP</i>	Este trabajo
LDG21	LDG12 pBX <i>skp</i>	Este trabajo
LDG22	LDG11 <i>ftsZ::pXftsZ</i>	Este trabajo
LDG23	LDG12 <i>ftsZ::pXftsZ</i>	Este trabajo
LDG24	LDG1, <i>mipZ::mipZ-YFP</i>	(78)
LDG25	LDG6, <i>vanA::pVpsompA2-mCherry</i>	Este trabajo
LDG26	CB15N <i>ftsZ::pXftsZ-2</i>	Este trabajo
LDG27	LDG26, <i>vanR::pVftsN-mCherry</i>	Este trabajo
SP13	CB15N Δ <i>ftsI xylR::pXftsI-5</i>	(101)

SP20	CB15N <i>vanR::pVmCHYftsN6</i>	(101)
DH5- α	Cepa de clonación	Invitrogen
TOP10	Cepa de clonación	Invitrogen
Plásmidos		
<i>pompA2</i> -barril- β -mCherry	Plásmido pCHYC-4, con el péptido señal, el barril β y la región rica en prolina, fusionados con mCherry.	Este trabajo
<i>pompA2</i> -C-terminal-mCherry	Plásmido pCHYC-2, con 600pb río arriba de <i>ompA2</i> , los primeros 64 residuos (incluyendo el péptido señal), la región rica en prolina y el dominio C-terminal fusionado con mCherry.	Este trabajo
pVps <i>ompA2</i> -CHYC4	Plásmido pVCHYC-4, con los primeros 64 residuos de <i>ompA2</i> .	Este trabajo
pX <i>ftsZ</i> -6 or pX <i>ftsZ</i> -2	Plásmido pXMCS-6 o pXMCS-2, con los primeros 163 codones de <i>ftsZ</i> .	Este trabajo
<i>pompA2</i> D336A-mCherry	Plásmido <i>pompA2</i> -mCherry, con la mutación puntual <i>ompA2</i> -D336A.	Este trabajo
<i>pompA2</i> R351A-mCherry	Plásmido <i>pompA2</i> -mCherry, con la mutación puntual <i>ompA2</i> -R351A.	Este trabajo
pBX <i>surA</i>	Plásmido pBXMCS4 con el alelo <i>surA</i> completo, regulado por el promotor <i>xyIX</i> .	Este trabajo
pBX <i>degP</i>	Plásmido pBXMCS4 con el alelo <i>degP</i> completo, regulado por el promotor <i>xyIX</i> .	Este trabajo
pBX <i>skp</i>	Plásmido pBXMCS4 con el alelo <i>skp</i> completo, regulado por el promotor <i>xyIX</i> .	Este trabajo
<i>pompA2</i> -mCh	Plásmido pCHYC-2, con el un fragmento 3' de <i>ompA2</i> .	(78)
pNPTS138	Plásmido derivado de PLitmus, que lleva <i>oriT</i> y <i>sacB</i> . Resistente a kanamicina.	MRK Alley
pCHYC-2	Plásmido con el replicón pMB1, codifica a <i>mCherry</i> . Resistente a kanamicina.	(105)
pCHYC-4	Plásmido con el replicón pMB1, codifica a <i>mCherry</i> . Resistente a gentamicina.	(105)

pBXMCS-4	Plásmido con el origen de replicación de pBBR1 y el promotor <i>xyIX</i> . Resistente a gentamicina.	(105)
pXMCS-6	Plásmido con <i>oriT</i> y un promotor inducible por xilosa. Resistente a cloranfenicol.	(105)
pXTCYC-5	Replicón pMB1 con el promotor y represor <i>pxyIX</i> y <i>pxyIR</i> y una etiqueta de tetracisteínas. Resistente a tetraciclina.	(105)
pCR2.1 TOPO TA	Plásmido para clonación.	Invitrogen

Tabla 3. Oligonucléotidos.

Nombre	Secuencia
ompA2 met3 F1 NdeI	caa <i>catatg</i> aaactcaacctctgg
ompA2 ΔC R1 SacI	caa <i>gagctc</i> g ttccggcgtcaggaccgattgg
ompA2 del F1 EcoRI	caa <i>gaattc</i> acgcggccgcgccaattctgc
ompA2 ps R1 SacI	caa <i>gagctc</i> atccttgtcggttccaagc
ompA2 Δbb F1 SacI	caa <i>gagctc</i> ctgcttactcgttcgctgc
ompA2 R1 EcoRI	caa <i>gaattc</i> ac gaagttgatcgagatcgtcgaacg
ompA2 met2 F2 NdeI	caa <i>catatg</i> cttggataacgatgctcggctg
ompA2 ps R2 SacI	caa <i>gagctc</i> g atccttgtcggttccaagc
ftsZ F1 NdeI	gaa <i>catatg</i> gctatttctcttccgcgcccgcgtac
ftsZ R1 SacI	caa <i>gagctc</i> cccgagtgacgacacctggctg
ompA2 D336A F1	gtcgtcggccacaccg c cacctcgggttcgcc
ompA2 D336A R1	ggcgaacccgaggtg g cgggtgtggccgacgac
ompA2 R351A F1	ccaagctctcggaacgt gca gctcgcgcccgtcgc
ompA2 R351A R1	gcgacggcgcgagc tgc acgtccgagagcttgg
surA F1 NdeI	caa <i>catatg</i> ggggcgtgcgggcggacc
surA R1 EcoRI	caa <i>gaattc</i> gcgacgtcaccgggttcgatgg
degP F1 NdeI	caa <i>catatg</i> cgcaagtacctgctcattgg
degP R1 EcoRI	caa <i>gaattc</i> cgctacttgacctcggtgacc
skp F1 NdeI	caa <i>catatg</i> tccaagttcctgttcgc
skp R1 EcoRI	caa <i>gaattc</i> ttacttgttggtcggttgcagc

Anexo 1. Construcción de plásmidos y obtención de cepas.

El producto de PCR obtenido con los oligonucleótidos *ompA2 met3* F1 y *ompA2ΔC* R1 y el DNA cromosomal de CB15N, se clonó en el plásmido pCR2.1-TOPO TA. Se digirió con las enzimas NdeI y SacI, y el fragmento de 920pb resultante, se integró en pCHYC4, dando origen a *pompA2-barril-β-mCherry*.

Para construir *pompA2-C-terminal-mCherry*, los fragmentos amplificados con los oligonucleótidos *ompA2* del F1/*ompA2ps* R1 y *ompA2Δbb* F1/*ompA2* R1, se digirieron con SacI, se ligaron y el producto de la ligación se usó como DNA molde en una nueva reacción. Ésta usó los oligonucleótidos *ompA2* del F1/*ompA2* R1, y su producto se clonó en el sitio EcoRI de pCHYC-2. Se verificó la orientación del fragmento por digestión con SacI.

El plásmido *pVpsompA2-CHYC4* se obtuvo clonando el producto amplificado con los oligonucleótidos *ompA2met2* F1 y *ompA2ps* R2 a partir del DNA cromosomal de CB15N, en los sitios NdeI y SacI de pVCHYC-4.

Los plásmidos *pXftsZ-6* y *pXftsZ-2*, se obtuvieron a partir de pXMCS-6 o pXMCS-2. A éstos se les integró en los sitios NdeI y SacI, el fragmento amplificado con los oligonucleótidos *FtsZ* F1 y *FtsZ* R1.

Usando como molde al plásmido *pompA2-mCh* se hizo una reacción de mutagénesis sitio dirigida con los oligonucleótidos *ompA2* D336A F1/*ompA2* D336A R1 y *ompA2* R351A F1/*ompA2* R351A R1, para obtener las construcciones *pompA2D336A-mCherry* y *pompA2R351A-mCherry*, respectivamente.

La construcción de los plásmidos *pBXsurA*, *pBXdegP* y *pBXskp* se logró mediante la clonación de los productos de PCR obtenidos con los oligonucleótidos *surA* F1/*surA* R1, *degP* F1/*degP* R1 y *skp*F1/*skp* R1 y el DNA cromosomal de CB15N, en los sitios NdeI y EcoRI del plásmido pBXMCS-4.

La cepa LDG3 se obtuvo por electroporación de células CB15N con el plásmido *pompA2-barril-β-mCherry*. La selección se hizo en cajas de PYE-gentamicina.

Se introdujo el plásmido *pompA2*-C-terminal-mCherry por electroporación en células de LDG2 para obtener la cepa LDG4. La selección se hizo en cajas PYE-kanamicina.

La cepa LDG5 se obtuvo por electroporación de células CB15N con el plásmido pVpsompA2-CHYC4, las clonas positivas se seleccionaron en cajas PYE-gentamicina.

Las cepas LDG6 y LDG26 se obtuvieron mediante electroporación de células CB15N con p*XftsZ*-6 o p*XftsZ*-2. La selección se hizo en cajas PYE-cloranfenicol o PYE-kanamicina, respectivamente.

Para obtener las cepas LDG7, LDG8, LDG9, LDG22 y LDG23, se introdujeron por transducción los siguientes alelos *ompA2::pompA2*-mCherry, *ompA2::pompA2*-β-barril-mCherry, *ompA2::pompA2*-C-terminal-mCherry, *ompA2::pompA2D336A* y *ompA2::pompA2R351A*, respectivamente en la cepa LDG6. La selección se hizo en cajas PYE con xilosa y kanamicina o gentamicina (para la cepa LDG8).

La cepa LDG10 se obtuvo por transducción del alelo *ompA2::pompA2*-barril-β-mCherry, desde la cepa LDG3 a la cepa SP13. La selección se efectuó en cajas PYE-xilosa-gentamicina-tetraciclina.

Las cepas LDG11 y LDG12, se obtuvieron por electroporación de células CB15N con el plásmido *pompA2D336A*-mCherry o *pompA2R351A*-mCherry, respectivamente. La selección se hizo en cajas PYE-kanamicina.

Las cepas LDG13, LDG14 y LDG15, se obtuvieron por electroporación de los plásmidos pBX*surA*, pBX*degP* o pBX*skp*, en la cepa LDG1. La selección se hizo en cajas PYE-gentamicina.

Las cepas LDG16, LDG17 y LDG18, se obtuvieron por electroporación de células LDG11 con pBX*surA*, pBX*degP* o pBX*skp* en células competentes de LDG11. La selección se hizo en cajas PYE-gentamicina.

Las cepas LDG19, LDG20 y LDG21 se obtuvieron por electroporación de células LDG12 con los plásmidos pBX*surA*, pBX*degP* o pBX*skp*. La selección se hizo en placas PYE-gentamicina.

La cepa LDG25 se obtuvo por transducción del alelo *vanR::pVsigpepompA2-mCherry* (desde la cepa LDG5) en la cepa LDG6. La selección se realizó en placas PYE-xilosa-gentamicina.

La cepa LDG27 se obtuvo por transducción del alelo *vanR::pVftsN-mCherry*, desde la cepa SP20 a la cepa LDG26. La selección se efectuó en placas PYE-xilosa-cloranfenicol.

REFERENCIAS

1. **Silhavy TJ, Kahne D, Walker S.** 2010. The Bacterial Cell Envelope. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, **2**(5):a000414–a000414.
2. **Deng Y, Sun M, Shaevitz JW.** 2011. Direct measurement of cell wall stress stiffening and turgor pressure in live bacterial cells. *Phys Rev Lett.*, **107**(15):7–10.
3. **Nikaido H.** 2003. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev.*, **67**(4):593–656.
4. **Rice A, Wereszczynski J.** 2018. Atomistic Scale Effects of Lipopolysaccharide Modifications on Bacterial Outer Membrane Defenses. *Biophys J.*, **114**(6):1389–99.
5. **Bernadac A, Gavioli M, Lazzaroni JC, Raina S, Lloubès R.** 1998. *Escherichia coli* tol-pal mutants form outer membrane vesicles. *J Bacteriol.*, **180**(18):4872–8.
6. **Lloubès R, Cascales E, Walburger A, Bouveret E, Lazdunski C, Bernadac A, et al.** 2001. The Tol-Pal proteins of the *Escherichia coli* cell envelope: an energized system required for outer membrane integrity? *Res Microbiol.*, **152**:523–9.
7. **Cascales E, Bernadac A, Gavioli M, Lazzaroni J-C, Lloubes R.** 2002. Pal lipoprotein of *Escherichia coli* plays a major role in outer membrane integrity. *J Bacteriol.*, **184**(3):754–9.
8. **Braun V, Wolff H.** 1970. The Murein-Lipoprotein Linkage in the Cell Wall of *Escherichia coli*. *Eur J Biochem.*, **14**(2):387–91.
9. **Wang Y.** 2002. The Function of OmpA in *Escherichia coli*. *Biochem and Biophys Res Comm.*, **292**: 396-401.
10. **Sonntag I, Schwarz H, Hirota Y, Henning U.** 1978. Cell Envelope and Shape of *Escherichia coli*: Multiple Mutants Missing the Outer Membrane Lipoprotein and Other Major Outer Membrane Proteins. *J Bacteriol.*, **136**(1): 280-285.
11. **Godlewska R, Wiśniewska K, Pietras Z, Jagusztyn-Krynicka EK.** 2009. Peptidoglycan-associated lipoprotein (Pal) of Gram-negative bacteria: Function, structure, role in pathogenesis and potential application in immunoprophylaxis: *FEMS Microbiology Letters.*, **298**: p. 1–11.
12. **de Pedro MA, Cava F.** 2015. Structural constraints and dynamics of bacterial cell wall architecture. *Front Microbiol.*, **6** (449): 1-10.
13. **Park JS, Lee WC, Yeo KJ, Ryu K-S, Kumarasiri M, Heseck D, et al.** 2012. Mechanism of anchoring of OmpA protein to the cell wall peptidoglycan of the gram-negative bacterial outer membrane. *FASEB J.*, **26**(1):219–28.
14. **Braun V, Sieglin U.** 1970. The covalent murein-lipoprotein structure of the *Escherichia coli* cell wall. The attachment site of the lipoprotein on the murein. *Eur J Biochem.*, **13**(2):336–46.
15. **Caroff M, Karibian D.** 2003. Structure of bacterial lipopolysaccharides. *Carbohydr Res.*, **338**(23):2431–47.
16. **Wu EL, Engström O, Jo S, Stuhlsatz D, Yeom MS, Klauda JB, et al.** 2013. Molecular

- dynamics and NMR spectroscopy studies of *E. coli* lipopolysaccharide structure and dynamics. *Biophys J.*, **105**(6):1444–55.
17. **Leanne K, Sc MB.** 2007. Molecular Characterisation of *Shigella flexneri* lcsA and the Role of Lipopolysaccharide O-Antigen in Actin-based Motility. *Frontiers in Cell and Infect Microbiol.*, **6**(29): 1-10.
 18. **May KL, Silhavy TJ.** 2017. Making a membrane on the other side of the wall. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids*, **1862**(11):1386–93.
 19. **Schulz GE.** The structure of bacterial outer membrane proteins. *Biochim et Biophys Acta (BBA) - Biomembranes*, **1565**(2), 308–317.
 20. **Koebnik R, Locher KP, Van Gelder P.** 2000. Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Mol Microbiol.*, **37**(2):239–53.
 21. **Bremer E, Cole ST, Hindennach I, Henning U, Beck E, Kurz C, et al.** 1982. Export of a protein into the outer membrane of *Escherichia coli* K12. Stable incorporation of the OmpA protein requires less than 193 amino-terminal amino-acid residues. *Eur J Biochem.*, **122**(1):223–31.
 22. **Ishida H, Garcia-Herrero A, Vogel HJ.** 2014. The periplasmic domain of *Escherichia coli* outer membrane protein A can undergo a localized temperature dependent structural transition. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.*, **1838**(12):3014–24.
 23. **Lycklama Nijeholt JA, M Driessen AJ.** 2012. The bacterial Sec-translocase: structure and mechanism. *Phil. Trans. R. Soc. B.*, **367**, 1016–1028.
 24. **Fekkes P, De Wit JG, Van Der Wolk JPW, Kimsey HH, Kumamoto CA, Driessen AJM.** 1998. Preprotein transfer to the *Escherichia coli* translocase requires the co-operative binding of SecB and the signal sequence to SecA. *Mol Microbiol.*, **29**(5):1179–90.
 25. **Baars L, Jimmy Ytterberg A, Drew D, Wagner S, Thilo C, Jan van Wijk K, et al.** 2006. Defining the Role of the *Escherichia coli* Chaperone SecB Using Comparative Proteomics. *The Journal of Biological Chemistry*, **281**(15): 10024-10034.
 26. **Den Blaauwen T, Terpetschnig E, Lakowicz JR, Driessen AJM.** 1997. Interaction of SecB with soluble SecA. *FEBS Lett.*, **416**(1):35–8.
 27. **Hartl FU, Lecker S, Schiebel E, Hendrick JP, Wickner W.** 1990. The binding cascade of SecB to SecA to SecY E mediates preprotein targeting to the *E. coli* plasma membrane. *Cell*, **63**(2):269–79.
 28. **Huber D, Rajagopalan N, Preissler S, Rocco MA, Merz F, Kramer G, et al.** 2011. SecA Interacts with Ribosomes in Order to Facilitate Posttranslational Translocation in Bacteria. *Mol Cell.*, **41**(3):343–53.
 29. **Cranford-Smith T, Huber D.** 2018. The way is the goal: how SecA transports proteins across the cytoplasmic membrane in bacteria. *FEMS Microbiol Lett Physiol Biochem.*, **365**.
 30. **Chun SY, Randall LL.** 1994. In vivo studies of the role of SecA during protein export in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.*, **176**(14):4197–203.
 31. **Steinberg R, Upffer LK, Origi A, Asti R, Koch H-G, Karamanou L.** 2018. Co-

- translational protein targeting in bacteria. *FEMS Microbiol Lett Physiol Biochem.*, **365**.
32. **Bibi E.** 2012. Is there a twist in the *Escherichia coli* signal recognition particle pathway? *Trends in Biochemical Sciences*, **37**:1–6.
 33. **Driessen AJM, Nouwen N.** 2008. Protein Translocation Across the Bacterial Cytoplasmic Membrane. *Annu Rev Biochem.*, **77**(1):643–67.
 34. **Steinberg R, Knüpfner L, Origi A, Asti R, Koch HG.** 2018. Co-translational protein targeting in bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, **365**.
 35. **Wickström D, Wagner S, Baars L, Ytterberg AJ, Klepsch M, Van Wijk KJ, et al.** 2011. Consequences of depletion of the signal recognition particle in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.*, **286**(6):4598–4609.
 36. **Schibich D, Gloge F, Pöhner I, Björkholm P, Wade RC, Von Heijne G, et al.** 2016. Global profiling of SRP interaction with nascent polypeptides. *Nature*. **536**(7615):219–23.
 37. **Fekkes P, Driessen AJM.** 1999. Protein Targeting to the Bacterial Cytoplasmic Membrane. *Microbiol and Mol Biol Reviews*, **63** (1): 161-173.
 38. **Konovalova A, Kahne DE, Silhavy TJ.** 2017. Outer Membrane Biogenesis *Annual Review of Microbiology*, **71**: 539-556.
 39. **Kleinschmidt JH.** 2015. Folding of β -barrel membrane proteins in lipid bilayers - Unassisted and assisted folding and insertion. *Biochim Biophys Acta - Biomembranes*, **1848**(9):1927–43.
 40. **Costello SM, Plummer AM, Fleming PJ, Fleming KG.** 2016. Dynamic periplasmic chaperone reservoir facilitates biogenesis of outer membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci.*, **113**(33):4794-4800.
 41. **Soltés GR, Martin NR, Park E, Sutterlin HA, Silhavy TJ.** 2017. Distinctive Roles for Periplasmic Proteases in the Maintenance of Essential Outer Membrane Protein Assembly. *J Bacteriol.*, **199**(20):e00418-17.
 42. **Han L, Zheng J, Wang Y, Yang X, Liu Y, Sun C, et al.** 2016. Structure of the BAM complex and its implications for biogenesis of outer-membrane proteins. *Nature Struc and Mol Biol.*, **23**(3): 192-197.
 43. **Bakelar J, Buchanan SK, Noinaj N.** 2016. The structure of the β -barrel assembly machinery complex. *Science*, 351(6269):180–6.
 44. **Patel GJ, Rg J, Kleinschmidt H.** 2013. The Lipid Bilayer-Inserted Membrane Protein BamA of *Escherichia coli* Facilitates Insertion and Folding of Outer Membrane Protein A from Its Complex with Skp. *Biochemistry*, **52**: 3974-3986.
 45. **Lee J, Tomasek D, Santos T, May MD, Meuskens I, Kahne D.** 2019. Formation of a β -barrel membrane protein is catalyzed by the interior surface of the assembly machine protein BamA. *Elife*. **8**.
 46. **Wu T, Malinverni J, Ruiz N, Kim S, Silhavy TJ, Kahne D.** 2005. Identification of a multicomponent complex required for outer membrane biogenesis in *Escherichia coli*. *Cell*, **121**(2):235–45.
 47. **Werner J, Misra R.** 2005. YaeT (Omp85) affects the assembly of lipid-dependent and

- lipid-independent outer membrane proteins of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.*, **57**(5):1450–1459.
48. **Contini A, Stella L, Robinson JA.** 2019. Folded Synthetic Peptides and Other Molecules Targeting Outer Membrane Protein Complexes in Gram-Negative Bacteria. *Front Chem.*, **7**:45.
 49. **Rassam P, Copeland NA, Birkholz O, Tóth C, Chavent M, Duncan AL, et al.** 2015. Supramolecular assemblies underpin turnover of outer membrane proteins in bacteria. *Nature*, **523**(7560):333–6.
 50. **Ursell TS, Trepagnier EH, Huang KC, Theriot JA.** 2012. Analysis of Surface Protein Expression Reveals the Growth Pattern of the Gram-Negative Outer Membrane. *PLoS Comput Biol.*, **8**(9).
 51. **Spector J, Zakharov S, Lill Y, Sharma O, Cramer WA, Ritchie K.** 2010. Mobility of BtuB and OmpF in the *Escherichia coli* Outer Membrane: Implications for Dynamic Formation of a Translocon Complex, *Biophys J.*, **99**:3880–6.
 52. **Verhoeven GS, Dogterom M, den Blaauwen T.** 2013. Absence of long-range diffusion of OmpA in *E. coli* is not caused by its peptidoglycan binding domain. *BMC Microbiol.*, **13**(1):66.
 53. **Erwin G, Peterman PJ, Oswald F, Ernst M, Bank LM, Bollen YJ, G Peterman EJ.** 2014. Imaging and quantification of trans-membrane protein diffusion in living bacteria. *Phys Chem Chem Phys.*, **16**(16):12625–34.
 54. **Gibbs KA, Isaac DD, Xu J, Hendrix RW, Silhavy TJ, Theriot JA.** 2004. Complex spatial distribution and dynamics of an abundant *Escherichia coli* outer membrane protein, LamB. *Mol Microbiol.*, **53**(6):1771–83.
 55. **Kleanthous C, Rassam P, Baumann CG, Bonvin AMJJ, Zlem Keskin O.** 2015. Protein-protein interactions and the spatiotemporal dynamics of bacterial outer membrane proteins. *Curr Opin Struct Biol.*, **35**:109–15.
 56. **Gunasinghe SD, Shiota T, Stubenrauch CJ, Schulze KE, Webb CT, Fulcher AJ, et al.** 2018. The WD40 Protein BamB Mediates Coupling of BAM Complexes into Assembly Precincts in the Bacterial Outer Membrane. *Cell Rep.*, **23**(9):2782–2794.
 57. **Arunmanee W, Pathania M, Solovyova AS, Le Brun AP, Ridley H, Baslé A, et al.** 2016. Gram-negative trimeric porins have specific LPS binding sites that are essential for porin biogenesis. *Proc Natl Acad Sci.*, E5034-E5043.
 58. **Wang Y, Wang R, Jin F, Liu Y, Yu J, Fu X, et al.** 2016. A Supercomplex Spanning the Inner and Outer Membranes Mediates the Biogenesis of-Barrel Outer Membrane Proteins in Bacteria. *J Biol Chem.*, **291**(32): 16720-16729.
 59. **Smith SGJ, Mahon V, Lambert MA, Fagan RP.** 2007. A molecular Swiss army knife: OmpA structure, function and expression. *FEMS Microbiol Lett.*, **273**:1–11
 60. **Negoda A, Negoda E, Reusch RN.** 2010. Resolving the native conformation of *Escherichia coli* OmpA. *FEBS J.*, **277**(21): 4427–4437.
 61. **Freudl R, MacIntyre S, Degen M, Henning U.** 1988. Alterations to the signal peptide of

- an outer membrane protein (OmpA) of *Escherichia coli* K-12 can promote either the cotranslational or the posttranslational mode of processing. *J Biol Chem.*, **263**(1):344–9.
62. **Danoff EJ, Fleming KG, Jenkins TC.** 2011. The soluble, periplasmic domain of OmpA folds as an independent unit and displays chaperone activity by reducing the self-association propensity of the unfolded OmpA transmembrane β -barrel. *Biophys Chem.*, **159**:194–204.
 63. **Bulieris P V, Behrens S, Holst O, Rg J, Kleinschmidt H.** 2003. Folding and Insertion of the Outer Membrane Protein OmpA Is Assisted by the Chaperone Skp and by Lipopolysaccharide. *J Biol Chem.*, **278**(11): 9092-9099.
 64. **Qu J, Behrens-Kneip S, Holst O, Kleinschmidt H.** 2009. Binding Regions of Outer Membrane Protein A in Complexes with the Periplasmic Chaperone Skp. A Site-Directed Fluorescence Study. *Biochemistry*, **48**:4926–36.
 65. **Mushtaq AU, Park JS, Bae S-H, Kim H-Y, Yeo KJ, Hwang E, et al.** 2017. Ligand-Mediated Folding of the OmpA Periplasmic Domain from *Acinetobacter baumannii*. *Biophys J.*, **112**(10):2089–98.
 66. **Confer AW, Ayalew S.** 2013. The OmpA family of proteins: Roles in bacterial pathogenesis and immunity. *Vet Microbiol.*, **163**(3–4):207–22.
 67. **Hughes V, Jiang C, Brun Y.** 2012. *Caulobacter crescentus*. *Curr Biol.*, **22**(13).
 68. **Schmidt JM, Stanier RY.** 1966. The development of cellular stalks in bacteria. *J Cell Biol.*, **28**: 423-436.
 69. **Wagner JK, Setayeshgar S, Sharon LA, Reilly JP, Brun Y V.** 2006. A nutrient uptake role for bacterial cell envelope extensions. *Proc Natl Acad Sci.*, **193**(31): 11772-11777.
 70. **De Siervo AJ, Homola AD.** 1980. Analysis of *Caulobacter crescentus* Lipids. *J Bacteriology*, **143**(3): 1215-1222.
 71. **Contreras I, Shapiro L, Henry S.** 1978. Phospholipid Composition of *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol.*, **135**(3): 1130-1136.
 72. **Smit J, Kaltashov I, Cotter R, Vinogradov E, Perry M, Haider H, et al.** 2008. Structure of a novel lipid A obtained from the lipopolysaccharide of *Caulobacter crescentus*. *Innate Immun.*, **14**(1):25–37.
 73. **Ireland MME, Karty JA, Quardokus EM, Reilly JP, Brun Y V.** 2002. Proteomic analysis of the *Caulobacter crescentus* stalk indicates competence for nutrient uptake. *Mol Microbiol.*, **45**(4):1029–1041.
 74. **Toro E, Hong S-H, Mcadams HH, Shapiro L.** 2008. *Caulobacter* requires a dedicated mechanism to initiate chromosome segregation. *Proc Natl Acad Sci.*, **105**(40): 15435-15440.
 75. **Montero Llopis P, Jackson AF, Sliusarenko O, Surovtsev I, Heinritz J, Emonet T, et al.** 2010. Spatial organization of the flow of genetic information in bacteria. *Nature*, **466**: 77-82.
 76. **Takacs CN, Poggio S, Charbon G, Pucheault S, Mathieu, Vollmer W, Jacobs-Wagner C.** 2010. MreB Drives De Novo Rod Morphogenesis in *Caulobacter crescentus* via

- Remodeling of the Cell Wall. *J Bacteriol.*, 192(6):1671–1684.
77. **Ginez Vázquez LD.** 2018. Caracterización de la localización de las proteínas tipo OmpA de *Caulobacter crescentus* y su papel en la estabilidad de la membrana externa. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
 77. **Ginez LD, Osorio A, Poggio S.** 2014. Localization of the Outer Membrane Protein OmpA2 in *Caulobacter crescentus* Depends on the Position of the Gene in the Chromosome. *J Bacteriol.*, **196**(15): 2889-2900.
 78. **Kiekebusch D, Thanbichler M.** 2014. Spatiotemporal organization of microbial cells by protein concentration gradients. *Trends Microbiol.*, **22**(2):65–73.
 79. **Tropini C, Rabbani N, Huang K.** 2012. Physical constraints on the establishment of intracellular spatial gradients in bacteria. *BMC Biophys.*, **5**(1):17.
 80. **Jain S, Van Ulsen P, Benz I, Schmidt MA, Fernandez R, Tommassen J, et al.** 2006. Polar Localization of the Autotransporter Family of Large Bacterial Virulence Proteins. *J Bacteriol.*, **188**(13):4841–50.
 81. **Robbins JR, Monack D, McCallum SJ, Vegas A, Pham E, Goldberg MB, et al.** 2001. The making of a gradient: IcsA (VirG) polarity in *Shigella flexneri*. *Mol Microbiol.*, **41**(4):861–72.
 82. **Ngoc Hoa Tran E, Thomas Doyle M, Morona R.** 2013. LPS Unmasking of *Shigella flexneri* Reveals Preferential Localisation of Tagged Outer Membrane Protease IcsP to Septa and New Poles. *PLoS One*, **8**(7): e70508.
 83. **Doyle MT, Grabowicz M, May KL, Morona R.** 2015. Lipopolysaccharide surface structure does not influence IcsA polarity. *FEMS Microbiol Lett.*, **362**:42.
 84. **Scribano D, Petrucca A, Pompili M, Ambrosi C, Bruni E, Zagaglia C, et al.** 2014. Polar Localization of PhoN2, a Periplasmic Virulence-Associated Factor of *Shigella flexneri*, Is Required for Proper IcsA Exposition at the Old Bacterial Pole. *PLoS One*, **9**(2): e90230.
 85. **Shere KD, Sallustio S, Manassis A, D'Aversa TG, Goldberg MB.** 1997. Disruption of IcsP, the major *Shigella* protease that cleaves IcsA, accelerates actin-based motility. *Mol Microbiol.*, **25**(3):451–62.
 86. **May KL, Morona R.** 2008. Mutagenesis of the *Shigella flexneri* Autotransporter IcsA Reveals Novel Functional Regions Involved in IcsA Biogenesis and Recruitment of Host Neural Wiscott-Aldrich Syndrome Protein. *J Bacteriol.*, **190**(13):4666–76.
 87. **Christen B, Abeliuk E, Collier JM, Kalogeraki VS, Passarelli B, Collier JA, et al.** 2011. The essential genome of a bacterium. *Mol Syst Biol.*, **7**:528.
 88. **Behr MG, Schnaitman CA, Pugsley AP.** 1980. Major Heat-Modifiable Outer Membrane Protein in Gram- Negative Bacteria: Comparison with the OmpA Protein of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.*, **143**(2):906–13.
 89. **Nakamura K, Mizushima S.** 1976. Effects of Heating in Dodecyl Sulfate Solution on the Conformation and Electrophoretic Mobility of Isolated Major Outer Membrane Proteins from *Escherichia coli* K-12. *J Biochem.*, **80**: 1411-1422.
 90. **Mullineaux CW, Nenninger A, Ray N, Robinson C.** 2006. Diffusion of Green Fluorescent

- Protein in Three Cell Environments in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.*, **188**(10):3442–3448.
91. **Sánchez-Gorostiaga C, Palacios A, Martínez-Arteaga P, Sánchez R, Casanova M, Vicente M.** 2016. Life without division: physiology of *Escherichia coli* FtsZ-deprived filaments. *MBio*, **7**(5):1620–36.
 92. **Soumpasis DM.** 1983. Theoretical analysis of fluorescence photobleaching recovery experiments. *Biophys J.*, **41**: 95-97.
 93. **Bawono P, Heringa J.** 2014. PRALINE: A versatile multiple sequence alignment toolkit. *Methods Mol Biol.*, **1079**:245–62.
 94. **Aaron M, Charbon G, Lam H, Schwarz H, Vollmer W, Jacobs-Wagner C.** 2007. The tubulin homologue FtsZ contributes to cell elongation by guiding cell wall precursor synthesis in *Caulobacter crescentus*. *Mol Microbiol.*, **64**(4):938–52.
 95. **Ursinus A, Fusinita Van Den Ent, Brechtel S, De Pedro M, Höltje JV, Löwe J, et al.** 2004. Murein (Peptidoglycan) Binding Property of the Essential Cell Division Protein FtsN from *Escherichia coli*. *J Bacteriol.*, **186**(20):6728–37.
 96. **Yahashiri A, Jorgenson MA, Weiss DS.** 2015. Bacterial SPOR domains are recruited to septal peptidoglycan by binding to glycan strands that lack stem peptides. *Proc Natl Acad Sci.*, **112**(36): 11347-11352.
 97. **Steinhauer J, Agha R, Pham T, Varga AW, Goldberg MB.** 1999. The unipolar *Shigella* surface protein IcsA is targeted directly to the bacterial old pole: IcsP cleavage of IcsA occurs over the entire bacterial surface. *Mol Microbiol.*, **32**(2):367–77.
 98. **Ely B.** Genetics of *Caulobacter crescentus*. 1991. *Methods Enzymol.*, **204**(C):372–84.
 99. **Kunkel TA.** 1985. Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection (M13 cloning vectors/silent mutations/in vitro mutagenesis/synthetic oligonucleotides/uracil-containing DNA). *Genetics*, **82**: 488-492.
 100. **Thanbichler M, Iniesta AA, Shapiro L.** 2007. A comprehensive set of plasmids for vanillate- and xylose-inducible gene expression in *Caulobacter crescentus*. *Nucleic Acids Res.*, **35**(20): e137.
 101. **Evinger M, Agabian N.** 1977. Envelope-Associated Nucleoid from *Caulobacter crescentus* Stalked and Swarmer Cells. *J Bacteriol.*, **132**(1): 294-301.
 102. **Osorio A, Camarena L, Cevallos MA, Poggio S.** 2017. A New Essential Cell Division Protein in *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol.*, **199**(8):e00811-16.
 103. **Edelstein AD, Tsuchida MA, Amodaj N, Pinkard H, Vale RD, Stuurman N.** 2014. Advanced methods of microscope control using µManager software. *J Biol Methods*, **1**(2): e10.
 104. **Garner EC.** 2011. MicrobeTracker: quantitative image analysis designed for the smallest organisms. *Mol Microbiol.*, **80**(3):577–9.
 105. **Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW.** 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of Image Analysis HHS Public Access. *Nat Methods*, **9**(7): 671-675.



Establishment of a Protein Concentration Gradient in the Outer Membrane Requires Two Diffusion-Limiting Mechanisms

Luis David Ginez,^a Aurora Osorio,^a Laura Camarena,^a Sebastian Poggio^a

^aInstituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

ABSTRACT OmpA-like proteins are involved in the stabilization of the outer membrane, resistance to osmotic stress, and pathogenesis. In *Caulobacter crescentus*, OmpA2 forms a physiologically relevant concentration gradient that forms by an uncharacterized mechanism, in which the gradient orientation depends on the position of the gene locus. This suggests that OmpA2 is synthesized and translocated to the periplasm close to the position of the gene and that the gradient forms by diffusion of the protein from this point. To further understand how the OmpA2 gradient is established, we determined the localization and mobility of the full protein and of its two structural domains. We show that OmpA2 does not diffuse and that both domains are required for gradient formation. The C-terminal domain binds tightly to the cell wall and the immobility of the full protein depends on the binding of this domain to the peptidoglycan; in contrast, the N-terminal membrane β -barrel diffuses slowly. Our results support a model in which once OmpA2 is translocated to the periplasm, the N-terminal membrane β -barrel is required for an initial fast restriction of diffusion until the position of the protein is stabilized by the binding of the C-terminal domain to the cell wall. The implications of these results on outer membrane protein diffusion and organization are discussed.

IMPORTANCE Protein concentration gradients play a relevant role in the organization of the bacterial cell. The *Caulobacter crescentus* protein OmpA2 forms an outer membrane polar concentration gradient. To understand the molecular mechanism that determines the formation of this gradient, we characterized the mobility and localization of the full protein and of its two structural domains an integral outer membrane β -barrel and a periplasmic peptidoglycan binding domain. Each domain has a different role in the formation of the OmpA2 gradient, which occurs in two steps. We also show that the OmpA2 outer membrane β -barrel can diffuse, which is in contrast to what has been reported previously for several integral outer membrane proteins in *Escherichia coli*, suggesting a different organization of the outer membrane proteins.

KEYWORDS *Caulobacter crescentus*, FRAP, cell wall, limited diffusion, outer membrane, protein concentration gradient

The Gram-negative cell envelope consists of an inner or cytoplasmic membrane (IM), a peptidoglycan cell wall, and an outer membrane (OM) (1). As it occurs with the IM, the OM is constantly being pushed outward by the osmotic pressure of the cell (2). To keep the OM from blebbing out, several proteins bind the OM to the cell wall (3–9). One of these proteins is OmpA, which in *Escherichia coli* is one of the most abundant integral outer membrane proteins (OMPs). This protein has two structural domains, namely, a variable N-terminal integral OM β -barrel domain and a C-terminal peptidoglycan binding domain (PBD); these domains are linked via an Ala-Pro-rich region (7, 10, 11). Crystallographic data from the *Acinetobacter baumannii* OmpA periplasmic domain

Citation Ginez LD, Osorio A, Camarena L, Poggio S. 2019. Establishment of a protein concentration gradient in the outer membrane requires two diffusion-limiting mechanisms. *J Bacteriol* 201:e00177-19. <https://doi.org/10.1128/JB.00177-19>.

Editor Yves V. Brun, Université de Montréal

Copyright © 2019 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Address correspondence to Sebastian Poggio, sepogh@biomedicas.unam.mx.

Received 6 March 2019

Accepted 12 June 2019

Accepted manuscript posted online 17 June 2019

Published 8 August 2019

showed that the PBD binds to the diaminopimelic amino acid present in the peptide of the cell wall, noncovalently tethering the OM to the cell wall (12).

Caulobacter crescentus is a free-living Gram-negative bacterium with a dimorphic cell cycle that starts with a motile nondividing cell that has a single polar flagellum. This cell differentiates into a sessile cell, losing its flagellum and producing at the same position a thin extension of the cell envelope known as the stalk (13). The chromosome of *C. crescentus* is linearly organized within the cell, with the replication origin located at the old (stalked) pole and the terminus near the new pole (14, 15). The genome of *C. crescentus* has two *ompA* genes, both of which are located near the replication origin and, in consequence, near the old cell pole. In a previous work, we showed that the highly expressed OmpA2 protein forms a concentration gradient from the stalk to the new cell pole. This localization pattern depends on the position of the *ompA2* gene in the chromosome and starts forming when the cells are in the swarmer stage, becoming stronger as the cell progresses through the cell cycle and as it ages.

Protein gradients in bacteria are rare but they play an important role in their organization (16). In *C. crescentus*, the presence of OmpA2 and the orientation of its concentration gradient are relevant for the cell physiology and for the synthesis of the stalk (17). Although OMPs are a major component of the OM, there is scarce information about their localization and mobility (18). In *E. coli*, naturally abundant or overexpressed OMPs show an even distribution (19, 20), whereas less abundant proteins have been shown to localize in patches (18, 19, 21, 22) or in particular cases at the cell pole (23). These patches have been suggested to be organized in spirals (24). In contrast with integral inner membrane proteins, experiments of fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) have shown that OMPs and the lipopolysaccharide do not diffuse (20, 25). In *E. coli*, OmpA expressed from a plasmid evenly localizes in the OM and does not exhibit long-range diffusion ($> \sim 100$ nm), even in the absence of its PBD (20). Single-molecule tracking using different labeling techniques has revealed that OMPs can only move inside confined regions and do not show long-range diffusion. This phenomenon as well as the absence of diffusion of abundant OMPs has been proposed to be caused by promiscuous interactions between OMPs (19–21, 24, 26). Integration of newly synthesized OMPs in the OM is accomplished by the BAM complex (27). BAM complexes have been suggested to be arranged in groups of 4 to 6 distributed across the cell, and at least one-third of the OMP patches have colocalized with a BAM complex (21, 22). This organization has led to the suggestion that the BAM complexes form functional assembly precincts in the OM. The assembly precincts are displaced from the middle to the poles of growing cells as new compartments take their place (20, 21, 24, 28, 29). These different reports suggest that the absence of diffusion is common for OMPs and that their restricted mobility in the OM is caused by the β -barrel.

In this work, we show that formation of the OmpA2 gradient depends on both of its domains since the β -barrel and PBD by themselves are unable to form it. Using FRAP assays, we show that the full-length OmpA2 protein does not diffuse and that its immobility is caused by the PBD. Point mutants of the PBD in amino acids involved in peptidoglycan binding showed that the binding of OmpA2 to the peptidoglycan is necessary for localization. Our results suggest that after OmpA2 is translocated to the periplasm, the OmpA2 gradient forms during a brief period of diffusion restricted by the N-terminal β -barrel until the gradient is stabilized by the interaction of the OmpA2-PBD with the cell wall.

(This study was conducted by L. D. Ginez in partial fulfillment of the requirements for a Doctorado en Ciencias Biomédicas degree from the Universidad Nacional Autónoma de México.)

RESULTS

Both OmpA2 structural domains are necessary for gradient formation. In our previous work, we showed that in *C. crescentus*, OmpA2 forms a concentration gradient from the early stages of the cell cycle and it becomes stronger as the cell grows and ages (17). To evaluate the contribution of each of the OmpA2 structural domains to the

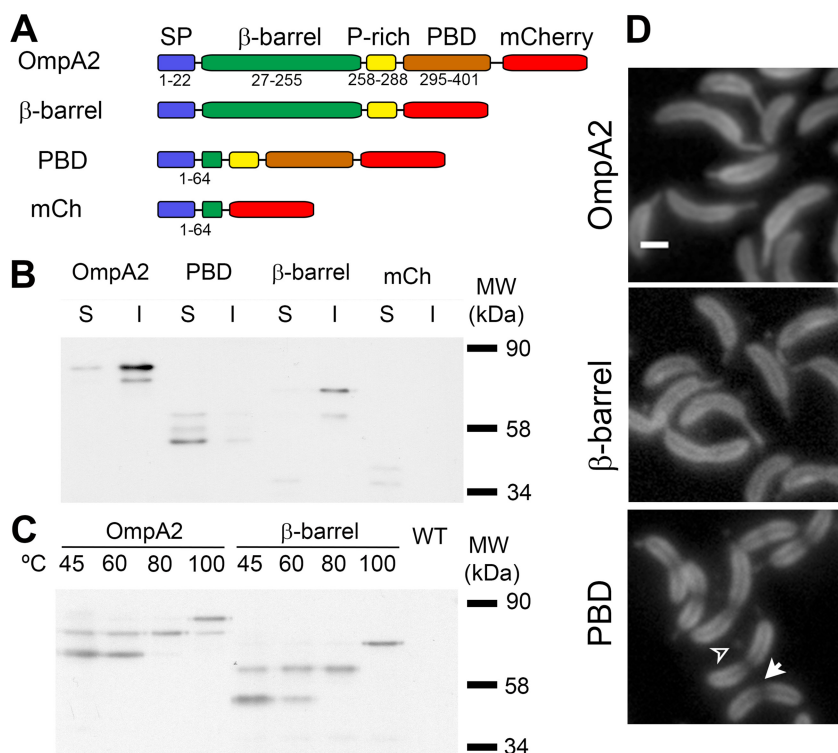


FIG 1 OmpA2 requires both structural domains to form its concentration gradient. The localization, stability, subcellular localization, and folding of the full OmpA2 fluorescent fusion and of the truncated version are shown. (A) Schematic representation of the fluorescent fusions. The length (in residues) is indicated. Periplasmic mCherry was expressed from the *vanA* promoter. SP, signal peptide; P-rich, proline rich linker. (B) Western blot of the soluble (S) and insoluble (I) fractions obtained from cell cultures expressing the proteins indicated in the figure. The following indicated molecular weights correspond to mature proteins: OmpA2-mCh (67 kDa), PBD-mCh (45 kDa), β -barrel-mCh (57 kDa), and periplasmic mCherry (30 kDa). (C) Western blot showing the unfolding pattern of OmpA2 and the β -barrel at the indicated temperatures. Both Western blots were revealed with anti-mCherry antibody. (D) Fluorescence images of cells expressing the indicated fluorescent fusion (OmpA2, OmpA2-mCh, strain LDG1; PBD, PBD-mCh, strain LDG4; β -barrel, β -barrel-mCh, strain LDG3; mCh, periplasmic mCherry, strain LDG5). The arrow in the PBD panel indicates an area with a reduced amount of the protein around the cell division site, and the arrowhead indicates outer membrane vesicles. Cells were grown in PYE to a 0.3 OD_{660} . Scale bar indicates 1 μ m.

formation of the gradient, we substituted the wild-type *ompA2* allele with truncated versions that consisted of only the β -barrel or the C-terminal PBD of OmpA2 fused to the mCherry (mCh) fluorescent protein (Fig. 1A). It should be noted that both proteins were expressed from the same promoter and gene locus and had the same signal peptide as the wild-type protein. The first β -strand of the OmpA2 β -barrel that is just after the predicted signal peptide was included for the PBD-mCh fusion, because without it the fusion protein was not detectable. The stability and subcellular localization of both truncated OmpA2 versions as well as the insertion of the β -barrel in the OM were verified (Fig. 1B and C). As a control, the mCherry protein was fused with the same OmpA2 signal peptide present in the PBD-mCh fusion (Fig. 1A). After cell fractionation (Fig. 1B), we detected two bands for periplasmic mCherry in the soluble fraction. The molecular weight of the most abundant population corresponds to the processed protein without the β -strand. This result shows the OmpA2 β -strand is not enough to recruit mCherry to the inner or outer membrane. Both OmpA2 truncated proteins were stable, and as expected, the β -barrel-mCh fusion was in the insoluble fraction while the PBD-mCh fragment was soluble. We detected several bands for the full-length OmpA2-mCh protein and the truncated versions. For the full and the β -barrel-mCh proteins, the low molecular weight bands are probably the result of partial unfolding, as it has been reported for other integral OMPs (30–35). For the PBD-mCh protein, the less abundant

forms are probably caused by the degradation of the β -strand (Fig. 1A) and the proteolysis of the signal peptide. A similar pattern was observed for the periplasmic mCherry.

To confirm that the β -barrel–mCh fusion was correctly inserted in the OM, we took advantage of the heat modifiability and the anomalous mobility of β -barrels in SDS-PAGE (Fig. 1C). In *E. coli*, the mCherry protein denatures at around 60°C and the OmpA β -barrel unfolds above 80°C (20), allowing the identification of the two β -barrels. We incubated total extracts from strains expressing OmpA2-mCh or the β -barrel–mCh fusions at different temperatures from 45 to 100°C for 15 min. Since both proteins contain two β -barrels, we observed three different bands resulting from the successive denaturation of the fluorescent protein and the membrane domain. Since the truncated version has the same heat modifiability as the OmpA2-mCh protein, we conclude that the β -barrel–mCh fusion is properly assembled in the OM.

The localization of the truncated OmpA2 versions showed that neither of them was able to form a gradient (Fig. 1D), indicating that the formation of the gradient depends on the properties of both domains. Since no wild-type OmpA2 protein was present in the strains expressing the truncated OmpA2 versions, in both cases we observed the presence of outer membrane vesicles (OMVs) (Fig. 1D, arrowhead). Interestingly, cells expressing the PBD-mCh fusion showed a region of reduced fluorescence around the division sites in divisional cells (Fig. 1D, arrow).

OmpA2 is an immobile outer membrane protein. The establishment of the OmpA2 concentration gradient could be the result of continuous diffusion of the protein after its polar insertion in the OM. For this reason, we decided to evaluate the mobility of OmpA2 in a FRAP experiment. For bacteria, this technique is usually done with filamented cells obtained by treatment with antibiotics that inhibit cell division (20, 25, 36). Here, we used slightly filamented cells obtained by depleting the essential division protein FtsZ. In the absence of FtsZ, *C. crescentus* cells can grow and replicate their chromosomes, but they do not divide, becoming filaments. In these elongated cells, OmpA2-mCh formed a concentration gradient from both cell poles (Fig. 2A). This localization pattern could be explained by the expression of OmpA2-mCh from the two opposite *ompA2* loci stabilized at the polar positions by the interaction of the ParB/C complex with PopZ (37), by the dilution of the fusion protein in the rest of the cell caused by cell growth, or by the diffusion of the protein from both poles toward the rest of the cell. After FtsZ depletion, we inhibited translation by adding chloramphenicol and spectinomycin. To determine the diffusion of OmpA2-mCh, we photobleached two regions with different protein concentrations, near the cell pole (not shown), or at the middle of the filament (Fig. 2A, first row). In both cases, we did not detect any fluorescence recovery, even after long time periods (15 min) (Fig. 2A and B, orange dots). To rule out cell damage caused by the laser during photobleaching, we evaluated the diffusion of periplasmic mCherry and the diffusion of FtsN in the IM. FtsN is a division protein with a transmembrane α -helix, and in the absence of FtsZ, it distributes evenly. Under the same experimental conditions, periplasmic mCherry and FtsN maintained their free mobility and the fluorescence recovery was fast, with a recovery half time of less than 10 s (see Fig. S1 in the supplemental material). Our results show that OmpA2 is an immobile OMP in *C. crescentus* and suggest that the concentration gradient is formed by the diffusion of the protein before its position is stabilized.

Position maintenance of OmpA2 depends on its peptidoglycan binding domain. OmpA2 diffusion could be restricted by its interaction with the cell wall or, since in *E. coli* OMPs do not diffuse, by the insertion of the β -barrel in the OM. However, the even distribution of the β -barrel–mCh and PBD-mCh fusions (Fig. 1D) suggests that these domains freely diffuse through the cell. To determine if this was the case, we performed FRAP on filamented cells expressing these proteins. The stability and subcellular localization of the protein fusions in the filamented cells as well as the viability of these cells were verified (see Fig. S2 in the supplemental material). As

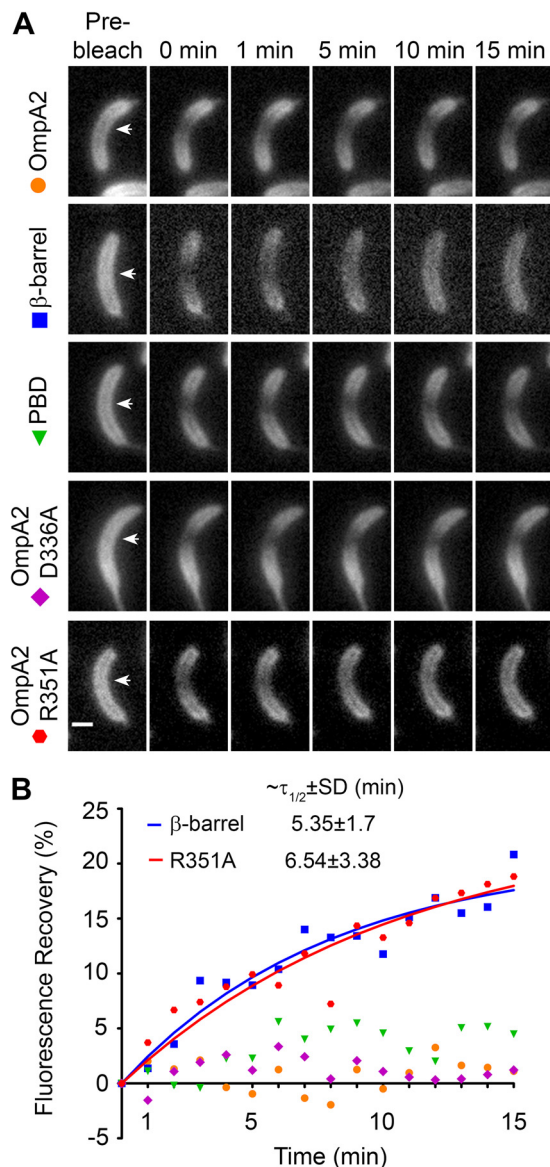


FIG 2 Mobility of OmpA2 and its truncated or point mutant versions. The mobility of the full OmpA2-mCh protein, the two domains fused to mCherry, and the single amino acid variants in the PBD domain of the full protein (OmpA2_{D336A}-mCh and OmpA2_{R351A}-mCh) was determined in FRAP experiments. (A) FRAP assays in filamented cells obtained by FtsZ depletion and treated to inhibit protein synthesis (OmpA2, OmpA2-mCh, strain LDG7; β -barrel, β -barrel-mCh, strain LDG8; PBD, PBD-mCh, strain LDG9; OmpA2 D336A, OmpA2_{D336A}, strain LDG22; and OmpA2 R351A, OmpA2_{R351A}, strain LDG23). Representative cells in different times after photobleaching are shown. Arrows in the first column indicate the selected area for photobleaching. The scale bar indicates 1 μm . (B) Quantification of the fluorescence recovery after photobleaching. The scattered symbols show the recovery of the cells in (A), and the continuous lines show the fitting of the signal of the cells that show recovery (see Materials and Methods for more details). The fluorescence level in the bleached area after the photobleaching (0 minutes) was used as basal level. The $t_{1/2}$ values for β -barrel-mCh and OmpA2_{R351A}-mCh are indicated in the plot and correspond to the mean for at least 10 cells from independent experiments.

expected, both truncated proteins localize evenly in the FtsZ-depleted cells (Fig. 2A), as was observed in the unfilemented cells. After photobleaching, we detected fluorescence recovery only for the β -barrel-mCh fusion (Fig. 2A and B, squares). Adjusting the experimental data to a single-exponential equation (Fig. 2B, blue line), we calculated a recovery half-life ($t_{1/2}$) of 5.35 ± 1.7 min and a diffusion constant of $(2.7 \pm 2) \times 10^{-4} \mu\text{m}^2/\text{s}$ for this truncated protein. In contrast, the OmpA2 PBD does not diffuse (Fig. 2A and B, triangles). Additionally, our data suggest that there is practically no free

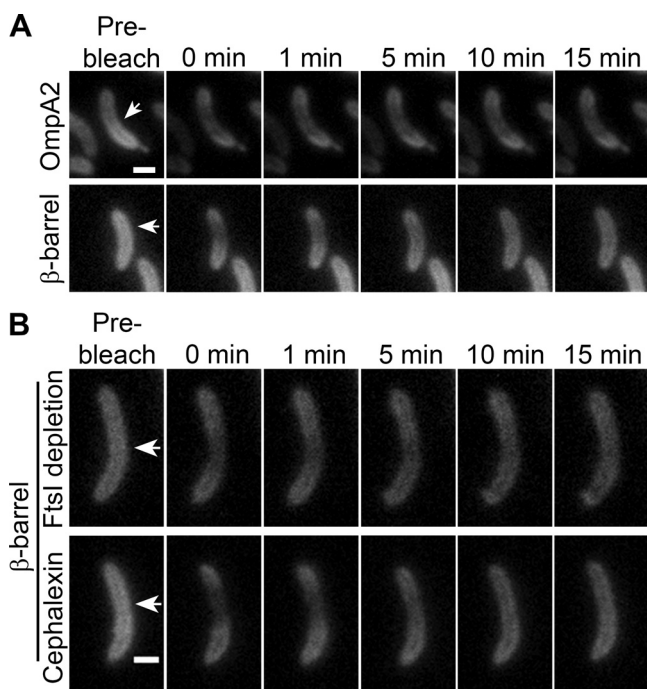


FIG 3 Diffusion of the OmpA2 β -barrel is not caused by FtsZ depletion. The mobility of the complete OmpA2 protein and of the β -barrel were determined in unfilamented cells and for the β -barrel in cells filamented by FtsI depletion or cephalaxin treatment. (A) FRAP assays of OmpA2 (OmpA2-mCh) and the β -barrel (β -barrel-mCh) in unfilamented cells. (B) FRAP of the β -barrel-mCh in filaments obtained by the FtsI depletion or the cephalaxin treatment. Protein synthesis was inhibited as in the experiments in Fig. 2. Arrows in the first column indicate the selected area for photobleaching. The $t_{1/2}$ values for the β -barrel in FtsI and cephalaxin filaments are indicated in the text.

OmpA2-mCh and PBD-mCh protein since the fluorescence of the cells outside the bleached regions practically did not change ($11.7\% \pm 7.9\%$ and $12.4\% \pm 7.2\%$ decrease for OmpA2 and the PBD, respectively), while for the β -barrel, it decreased $33.2\% \pm 19\%$. These results indicate that the diffusion of OmpA2 is mainly restricted by the binding of the protein to the cell wall and that absence of diffusion is not enough to establish the gradient.

Diffusion of the OmpA2 β -barrel in the OM is not caused by FtsZ depletion. In order to rule out that the diffusion of the OmpA2 β -barrel was caused by an abnormal condition of the OM induced by FtsZ depletion, we decided to evaluate the diffusion of OmpA2 and its truncated versions in unfilamented cells. Although the photobleached area occupied almost half the cell, we were able to determine that, in agreement with our previous results, the β -barrel-mCh fusion diffuses while the full protein is immobile (Fig. 3A). For FRAP experiments on bacteria, cells are frequently filamented by preventing division with the penicillin binding protein (PBP3 or FtsI), inhibiting antibiotic cephalaxin (38). The main difference between cell filaments obtained by FtsZ depletion and cephalaxin treatment is that in the last ones the divisome still forms. To determine if the presence of the divisome influenced the mobility of the OmpA2 β -barrel, we evaluated its diffusion in filamented cells obtained by the depletion of FtsI or by treatment with cephalaxin (Fig. 3B). FRAP experiments showed that in filamented cells obtained by both methods, the OmpA2 β -barrel still diffuses (Fig. 3B), with recovery half times of 5.98 ± 4.18 and 4.5 ± 1.6 min for FtsI-depleted and cephalaxin-treated cells (diffusion constants of $[4.6 \pm 2] \times 10^{-4} \mu\text{m}^2/\text{s}$ and $[4.4 \pm 2] \times 10^{-4} \mu\text{m}^2/\text{s}$), respectively. Unexpectedly, we did observe that longer filamentation reduced the mobility of the OmpA2 β -barrel in FtsZ-depleted cells (recovery half time of 9.82 ± 3.8 min), and in FtsI-depleted or cephalaxin-treated cells, it was completely abolished (see Fig. S3A and B in the supplemental material). The viability, as well as the

FRAP of periplasmic mCherry and of mCherry fused to the inner membrane protein FtsN, was not affected in these cells (Fig. S1 and S2).

Binding of OmpA2 to the cell wall is important for protein stability and gradient formation. The even distribution of the β -barrel observed in Fig. 1 shows that the PBD is relevant for the formation of the concentration gradient. To test if PG binding by the PBD or other possible interactions made by this domain were necessary for gradient formation, we substituted for alanine two conserved residues in OmpA2 (D336 and R351) (see Fig. S4 in the supplemental material) that crystallographic and calorimetric data of the *A. baumannii* OmpA PBD have shown to be essential for binding to the peptidoglycan (PG) (12). Both OmpA2-mCh variants (OmpA2_{D336A} and OmpA2_{R351A}), distributed evenly (Fig. 4A), but a few cells expressing OmpA2_{D336A} showed a weak protein gradient (Fig. 4A, arrows, and B). The cells expressing any of the *ompA2-mCh* point mutant versions as the unique *ompA2* copy abundantly produced OMVs (Fig. 4A, first row). A Western blot showed that both proteins carrying these single amino acid substitutions were also slightly unstable (Fig. 4C), suggesting that not only their ability to bind PG but also their folding was affected. It has been suggested that the presence of misfolded proteins in the periplasm induces the formation of OMVs (39); this could explain the increased presence of OMVs in the strains expressing the OmpA2 point mutants. In agreement with these results, it was recently shown that substrate binding (diaminopimelic acid) was required for complete folding of the *A. baumannii* OmpA PBD (40). Since a partially folded PBD domain could be losing its ability to interact with other proteins, we overexpressed the SurA, DegP, or Skp periplasmic chaperones since in *E. coli* these chaperones assist OMP folding in the periplasm (41). The overexpression of any of these chaperones in the strain carrying the wild-type OmpA2-mCh protein did not affect or improve the gradient (Fig. 4A and B). In the case of the cells expressing OmpA2_{D336A}, the protein instability (Fig. 4C) and OMV formation were considerably reduced by these chaperones, but it only fully recovered its competence to form a gradient in the strains overexpressing DegP or Skp, since, although the overexpression of SurA almost restored the number of cells with a gradient, the gradient was less evident (Fig. 4A and B). In contrast, although the OmpA2_{R351A} protein stability improved with the chaperones and, in particular, with the overexpression of Skp (Fig. 4C), OmpA2_{R351A} remained homogeneously localized and the cells continued forming OMVs, although at a smaller amount (Fig. 4A). To directly evaluate if the protein variants with these conserved amino acids are still able to bind PG, we performed FRAP assays in FtsZ-depleted cells. To our surprise, both protein variants behaved in the FtsZ-depleted cells in the same way as in the cells overexpressing the chaperones, i.e., the D336A variant was able to form a gradient, while the R351A was not (Fig. 2A), and the protein stability also improved in the FtsZ-depleted cells (Fig. S2A). Given that the β -barrel by itself can diffuse, we expected a slow mobility of the proteins not able to interact with the PG. As expected from the localization of the proteins, OmpA2_{D336A} did not show any fluorescence recovery and OmpA2_{R351A} showed a recovery half time similar to that of the β -barrel ($t_{1/2}$ of 6.54 ± 3.38 min and diffusion constant of $[2.7 \pm 1.5] \times 10^{-4} \mu\text{m}^2/\text{s}$) (Fig. 2B). These results show that the protein stability of the OmpA2 single amino acid variants can be restored, but the gradient only forms when the PBD can bind to the cell wall, indicating that a stable interaction with the PG and not the presence of the PBD is responsible for the protein immobility necessary for stabilization of the protein gradient. In addition, the PG-binding-induced folding of the PBD is important for protein stability; in fact, the R351 residue establishes crucial interactions with the PG that cannot be compensated by the activity of the chaperones. Further supporting this point, the product of the *ompA2* double point mutant allele replacing both D336 and R351 by alanine was degraded and could not be rescued by the overexpression of the SurA, DegP, or Skp periplasmic chaperones, indicating that substrate binding is indispensable for the correct folding of the PBD. In contrast with the full protein, when the single point mutations were introduced in the PDB-mCh fusion, the resulting proteins were degraded even when

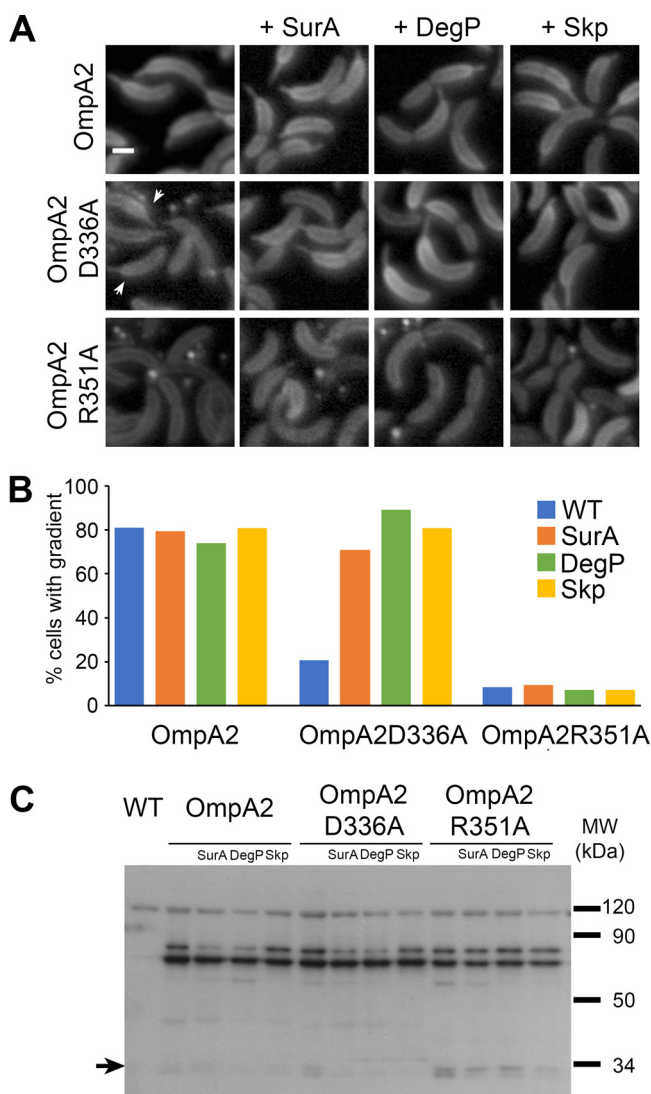


FIG 4 Binding of OmpA2 to PG is essential for gradient formation. The localization and stability of two OmpA2 point mutants were tested in wild-type and chaperone-overexpressing cells (A) Cells expressing OmpA2-mCh or the point mutants OmpA2_{D336A} or OmpA2_{R351A} fused to mCherry in a wild-type background (first column, strains LDG1, LDG11, and LDG12), in cells overexpressing SurA (second column, strains LDG13, LDG16, and LDG19), in cells overexpressing DegP (third column, strains LDG14, LDG17, and LDG20), and in cells overexpressing Skp (fourth column, strains LDG15, LDG18, and LDG21). Arrows indicate cells with a weak gradient in the cells expressing OmpA2_{D336A}. (B) Quantification of the number of cells showing a gradient. The percentage of cells showing a gradient was determined for the strains shown in panel A. The percentages were obtained from at least 100 cells. (C) Western blot α -mCherry showing the stability of OmpA2 point mutants in wild-type and chaperone-overexpressing cells. The arrow indicates the degradation product of the fluorescent fusions (free mCherry). Scale bar = 1 μ m.

the chaperones were overexpressed, indicating that the stability of the single amino acid full-length protein variants greatly depends on the presence of the β -barrel.

Newly synthesized OmpA2 preferentially appears at the old cell pole. The OmpA2 gradient can be clearly seen in old cells (Fig. 1D); however, the profile of the gradient in these cells has been modified by different cellular processes like cell growth and division. If the protein does not diffuse, these processes can generate a gradient, as it can be observed for the PBD-mCh protein (Fig. 1D and 5A). To obtain a better profile of the OmpA2 gradient, we bleached the whole cell body of growing swarmer cells expressing OmpA2-mCh and then determined the appearance of newly synthesized protein by following the fluorescence in single cells (Fig. 5A, top image series).

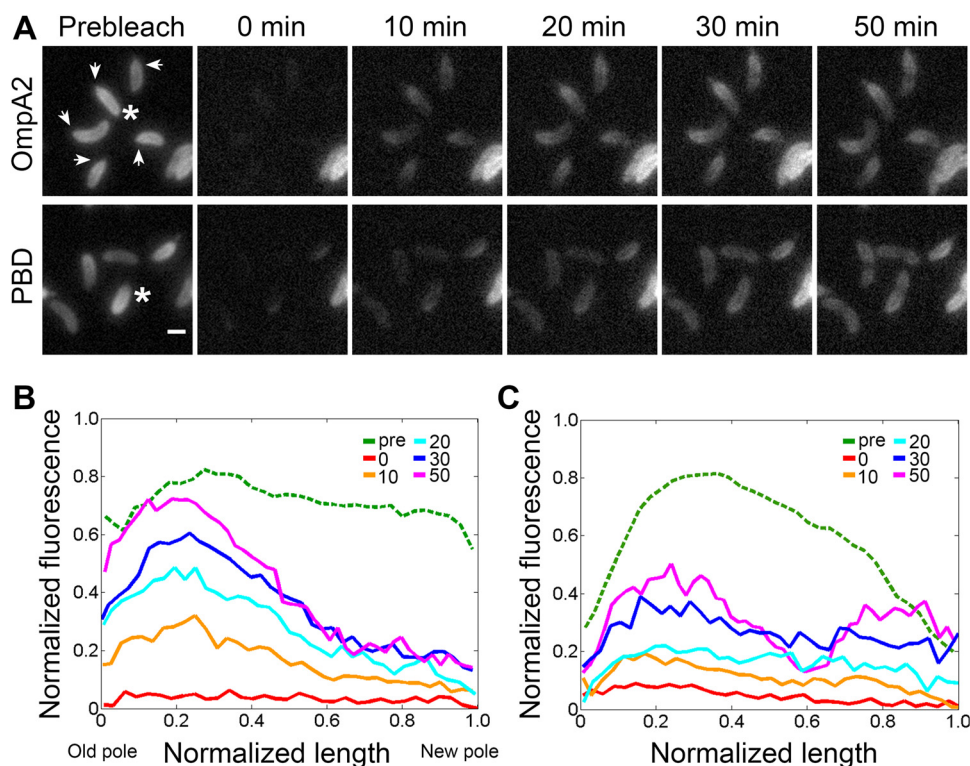


FIG 5 Pattern of appearance of newly synthesized OmpA2 and PBD proteins. The fluorescence pattern of synchronized single cells expressing OmpA2-mCh or PBD-mCh was recorded after complete bleaching. (A) Time lapse of cells expressing OmpA2 (strain LDG24) or PBD-mCh (strain LDG4). Fluorescence was bleached in the whole cell body, and the appearance of newly synthesized protein was followed. Arrows in the prebleach image of the strain expressing OmpA2-mCh indicate the old cell poles assigned by the localization of MipZ-YFP (not shown). The scale bar represents 1 μm . (B and C) Fluorescence intensity profiles of representative cells (marked with asterisks in panel A) expressing OmpA2-mCh or the PBD-mCh, respectively. Cell length was normalized, fluorescence levels were plotted, the fluorescence of the cell before bleaching was scaled down and correspond to one-third of the real one. The time in minutes is indicated.

After bleaching, we observed the gradual recovery of fluorescence and the appearance of a gradient at the old pole detectable 10 minutes after bleaching (Fig. 5B), indicating that the OmpA2-mCh protein is being retained and eventually integrated at the stalked pole. After 30 minutes, the shape of the gradient can clearly be seen showing its highest concentration around the first quarter of the cell, decreasing from this point until it is barely detectable at the opposite pole. The fact that after 30 minutes there is practically no fluorescence recovery at the new pole confirms a limited diffusion of OmpA2 from the moment that it is synthesized in the cytoplasm until its position is stabilized by binding of the PBD to the cell wall. In contrast with the full protein, the fluorescence of bleached cells expressing the PBD-mCh protein was recovered at the same rate along the cell for the first 30 minutes and after that the PBD-mCh is displaced from the division site, creating a dip in the protein concentration (Fig. 5A, bottom picture series, and C). After division, the daughter cells show a protein gradient (Fig. 5A, bottom row, first panel). These results indicate that the OmpA2 gradient is not the result of cell growth or cell division. Since it is likely that the PBD is also being translocated to the periplasm near the cell pole, given that the PBD and full protein fluorescent fusions have the same signal peptide and are expressed from the same position in the chromosome, this result also suggests that the binding of the PBD to the cell wall occurs slowly, giving the protein enough time to diffuse through the periplasm.

DISCUSSION

In a previous work, we proposed that the OmpA2 polar gradient forms before the protein is immobilized by its interaction with the cell wall or by its insertion in the OM

(17). FRAP experiments showed that the full OmpA2 protein does not diffuse, and in consequence, the gradient must form before the protein is anchored. Gradients are normally the result of the continuous diffusion of a molecule from a source, but a gradient formed by an immobile protein could also be the result of uneven dilution or displacement; for this reason, it was important to determine if the static OmpA2 gradient was the result of a different cell process. Full-cell bleaching showed that the OmpA2 gradient formed at the old cell pole and that, in contrast with the gradient formed by the PBD, it was the result of a brief period of diffusion and not of cell growth or division. Since in *C. crescentus* mRNAs do not move from the position of the gene locus (42) and since it is possible that the Sec translocon does not diffuse when its active (43), our model assumes that the OmpA2 diffusion that results in a gradient occurs in the periplasm. Fast engagement of proteins with the Sec system that results in higher concentration of particular transmembrane proteins has been proposed as an important mechanism for the heterogeneous organization of the inner membrane in a mechanism named transertion (44). It has been recently proposed that this mechanism can influence the BAM independent insertion of an OMP in the OM by increasing its local concentration in the periplasm (45). In line with this idea, it has been proposed that a supercomplex forms between the Sec and BAM complexes when an OMP is being translocated, mediated by the simultaneous interaction of the SurA periplasmic chaperone with its substrate and the BAM complex (46, 47). For OmpA2, transertion followed by fast diffusion restriction results in a physiological relevant organization of the protein in the OM.

To determine if any of the two OmpA2 domains was enough for the formation of the gradient, we generated truncated versions of OmpA2. A fluorescent fusion of the β -barrel localized evenly, and in contrast to what has been previously reported in *E. coli* (20), the OmpA2 β -barrel slowly diffuses, indicating that this domain by itself is not enough to maintain the gradient. The absence of OMP diffusion in *E. coli* has been attributed to promiscuous protein interactions, but this idea has only been tested in *in vitro* experiments (21). The diffusion of the β -barrel could be explained by a particularly slippery surface of the protein that reduces its interactions with other proteins. Another possibility is that the properties of the OM are different in *C. crescentus*; in agreement with this idea, the *C. crescentus* OM lipid composition and the structure of the lipid A show relevant differences with that of *E. coli* (48, 49). In contrast with the β -barrel, the PBD does not diffuse, indicating that the interaction of this domain with the cell wall is very stable even without the N-terminal domain. The localization of this domain showed a band of reduced intensity around the division site that was not detected in FtsZ-depleted cells, indicating that its presence was related with active division. Before *C. crescentus* cells start constricting and shortly after the FtsZ ring forms, the cell wall growth changes from a lateral to a zonal growth pattern, in which the cell wall growth concentrates at the sides of the FtsZ ring (50). The peripheral cell wall growth could be diluting or pushing away the cell wall-bound OmpA2 PBD, creating the observed pattern. Additionally, the PBD could be being displaced by other proteins; an obvious candidate is Pal that binds to the same substrate and accumulates at the division site, but other division proteins may also be responsible. Another possibility is a change in the composition of the peptidoglycan; in *E. coli* it has been reported that peptidoglycan stripped of peptides by the activity of the amidases (denuded peptidoglycan) accumulates at the division site (51, 52). This would result in a lower concentration of the PBD binding substrate. Since according to our FRAP data the majority of the PBD is immobile, once the PBD is displaced, the region can only be occupied by new protein. But this can only occur after the division-related process that displaced the PBD has ended, and it would only be visible after the mCherry fluorophore has matured. The fact that this band does not form with the full protein fusion indicates that the presence of β -barrel has a role in keeping OmpA2 at its position in the division site. Despite its tight binding to the cell wall, the PBD does not form a gradient, suggesting that in the absence of the N-terminal domain the PBD has enough time to distribute evenly before binding. Assuming that the PBD fusion is still being translocated at the same position

as the full protein, this indicates that after the full protein is exported to the periplasm, the diffusion of the protein is initially reduced by the interactions made by the β -barrel, at first with the periplasmic chaperones and the Bam complex and later by the reduced mobility of this domain in the OM, giving the PBD time to fold and bind to the cell wall. The presence of the β -barrel could also be relevant to limit the diffusion of the OmpA2 preprotein so that translocation occurs close to the gene locus. Another possible function of the β -barrel could be to help the PBD fold faster. In line with this idea, while the OmpA2 single amino acid variants in the PBD were only slightly unstable and could be rescued by the chaperones, the PBD variants carrying the same substitutions were not stable, indicating that the β -barrel has a role in the folding of PBD either directly or by the recruitment of periplasmic chaperons.

It was previously shown that the D271 and R286 conserved amino acids were essential for substrate binding of the *A. baumannii* OmpA and that binding of the substrate was necessary for normal protein folding (12, 40). Accordingly, the OmpA2 variants of the corresponding conserved amino acids (D336A and R351A) did not form a concentration gradient and were more sensitive to protein degradation. Unexpectedly only the R351 residue was indispensable for substrate binding since the absence of the D336 residue could be compensated by the action of the periplasmic chaperones, suggesting different roles for these two amino acids during folding and substrate binding. However, both amino acids seem to be required for full affinity since cells expressing the OmpA2_{D336A} allele and overexpressing the chaperones still produced a small amount of OMVs. Surprisingly, the stability of the proteins carrying the single amino acid substitutions in the strains overexpressing the chaperones was similar to that in the FtsZ-depleted cells; this result indicates that cell filamentation causes periplasmic stress in the same way as it causes cytoplasmic stress (53). This filamentation-induced stress could also be causing the absence of diffusion of the OmpA2 β -barrel in the overfilamented cells by directly promoting the association of this domain with other proteins as part of the stress response or indirectly if the outer membrane properties are modified.

Full-cell bleaching showed that OmpA2 is being inserted in the OM near the old pole. In *E. coli*, the insertion of OMP occurs preferentially in the lateral cell body and not at the poles (21); however, polar insertion has been reported in the case of a family of autotransporters, including the *E. coli* AIDA-I protein (23). The best-studied case is that of the IcsA protein of *Shigella flexneri*, which forms a polar gradient at the old cell pole (54). Polar localization of IcsA is directed by a signal present in the protein, and it depends on OmpA and PhoN (55–59). It would be interesting to know if OmpA in this bacterium also forms a polar gradient that could direct the insertion of IcsA. In contrast, in *C. crescentus*, the polar insertion of OmpA2 depends on the position of the gene in the cell and the consequent polar translocation of the protein to the periplasm that is then inserted in the OM. If the translocation of OMPs occurs close to where they are being synthesized, as the OmpA2 model suggests, one possible explanation for the OMP medial insertion pattern observed in *E. coli* is the position from which the proteins are being translated and translocated.

The fact that neither of the OmpA2 domains could generate a gradient regardless of either their low or no diffusion shows that the formation of this localization pattern is the result of the combination of the different properties of the domains and their interactions.

MATERIALS AND METHODS

Plasmids, bacterial strains, and growth conditions. Strains and plasmids are listed in Table S1 in the supplemental material, and their construction is explained in the text in the supplemental material. DH5 α or TOP10 *E. coli* strains were used to maintain and purify plasmids. These strains were grown in LB medium with the appropriate antibiotic at 37°C. *C. crescentus* strains were grown at 30°C in peptone-yeast extract (PYE) rich medium or Tris-based M5GG minimal medium supplemented with 50 μ M phosphate (60). Antibiotics were used at the following concentrations (μ g/ml) for *E. coli*: gentamicin, 20; kanamycin, 50; spectinomycin, 50; nalidixic acid, 20; and chloramphenicol, 30. For *C. crescentus*, antibiotics were added at the following concentrations (μ g/ml) for liquid and solid medium, respectively: gentamicin, 2 and 5; kanamycin, 5 and 20; spectinomycin, 15 and 100; and chloramphenicol 2 and 5.

Genetic and molecular biology techniques. All DNA manipulation, analysis, and bacterial transformations were performed according to standard protocols. For a detailed description see the text in the supplemental material. Conjugations and transductions were carried out as previously described (60). Site-directed mutagenesis was carried out by a previously reported protocol (61) with some modifications.

SDS-PAGE, Western blot, and mobility shift assay. For Western blots, samples were mixed with sample buffer (final concentrations of 50 mM Tris [pH 6.8], 1% SDS, 10% glycerol, 2% 2-mercaptoethanol, and 2 mM EDTA) and incubated for 15 min at 45, 60, 80, or 100°C for the mobility shift assays or at 100°C for regular Western blots. SDS-PAGE resolved proteins were transferred to a 0.45- μ m nitrocellulose membrane, incubated for \sim 4 h with a mouse red fluorescent protein (mRFP) polyclonal anti-RFP antibody raised against 6 \times His-tagged mRFP (1:20,000 vol/vol) (17). For detection, an alkaline phosphatase conjugated to an anti-mouse antibody (1:30,000 vol/vol; Sigma) was used together with the CDP-Star/Nitro-block substrate (Thermo Fisher Scientific). All samples were collected from cell cultures at an optical density at 660 nm (OD_{660}) of 0.3, and the protein amount was quantified by Bradford assay (Bio-Rad). An equal amount of protein (3 μ g) was loaded in each lane.

Cell fractionation. To determine the subcellular location of both OmpA2 truncated versions, cell fractionation from exponential cultures (OD_{660} , 0.3) was performed as previously described (62). For a detailed description see the text in the supplemental material.

FRAP and full-cell bleaching experiments. Cells were grown in PYE rich medium overnight at 30°C in the presence of 0.3% (vol/vol) xylose if necessary. The next day, cultures were reinoculated in the same medium and grown up to an OD_{660} of \sim 0.6. For depletion strains, cells were washed three times with PYE medium and diluted to an OD of \sim 0.05. Antibiotic-induced filamentation was achieved by adding cephalixin at a final concentration of 10 μ g/ml to a 1-ml culture at an OD of \sim 0.05. After cells reached the intended cell length (for FtsZ depletion, 1 h or 4 h; for FtsI depletion, 5 and 16 h, for short and long filaments, respectively; and 3 h for cephalixin), translation was inhibited by adding chloramphenicol and spectinomycin at a final concentration of 80 μ g/ml and 300 μ g/ml (for FtsZ depletions in LDG6 strain) or 20 μ g/ml and 75 μ g/ml (for FtsI and cephalixin filaments), respectively. Then, cells were incubated for an additional 1 hour. These antibiotic concentrations were necessary to efficiently block OmpA2 synthesis, and the incubation period allowed the complete maturation of mCherry and OmpA2 in the periplasm. A 1- μ l sample was placed on a 1.5% agarose pad made with M2 1 \times salt solution with the same antibiotic mix. Samples were covered with a coverslide and sealed with a mixture of petrolatum, paraffin, and mineral oil and maintained at 30°C by means of an objective heater (Bioprotechs). Cells were visualized using a Nikon Eclipse Ti inverted epifluorescence microscope equipped with a Micropoint (Andor) FRAP unit and a sCMOS pco.edge camera, controlled with MicroManager 2.0 Beta (63). Photo-bleaching was achieved by using a 590-nm green laser dye. The laser intensity was reduced with a 30/70 beam splitter and by a software-controlled attenuator. These settings allowed to bleach \sim 60% of the OmpA2-mCherry fluorescence within an area of \sim 1.0 μ m². Fluorescence images were acquired at 400 ms using an ND4 filter in order to reduce the mercury lamp intensity and fluorescence loss. The acquisition rate was every minute (for OmpA2 and its mutants) or every second (for periplasmic mCherry and FtsN).

For complete cell bleaching, synchronized wild-type cells growing on 1.5% agarose pads made with PYE medium at 30°C were bleached and visualized under the same conditions described above. Acquisition rate was every 10 minutes. The cells in the images were detected with MicrobeTracker, and fluorescence intensity profiles were obtained using the intprofileall tool. Plots were edited using MATLAB after normalization of the cell length from 0 to 1 for each time.

FRAP analysis. Using ImageJ (64), we constructed 16-bit TIFF stacks from raw images, the background was subtracted, and the intensity of a 15- by 40-pixel selection was obtained from the bleached region, a neighboring nonbleached cell, and the background using the average pixel intensity tool. The intensity of the background was subtracted from both reference and FRAP signals, and the bleaching was corrected. The percentage of fluorescence recovery was calculated using Excel. Normalized FRAP curves were fitted using the MATLAB "cftool" application to the single-exponential equation $I(t) = A(1 - e^{-bt})$, where I , t , A , and b correspond to fluorescence intensity, time, mobile fraction, and fluorescence recovery rate, respectively. Recovery half life ($t_{1/2}$) was determined using the formula $t_{1/2} = \ln(0.5)/-b$. Data were obtained from at least 10 cells from three independent time-lapse experiments. Apparent diffusion coefficients (D) were determined using the classical two-dimensional FRAP equation $D = 0.224 (r^2/t_{1/2})$ (65), where r is the radius of the bleach laser. Because r exceeds cell width, we approximated r from a circular selection covering the bleached area in each analyzed cell.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material for this article may be found at <https://doi.org/10.1128/JB.00177-19>.

SUPPLEMENTAL FILE 1, PDF file, 0.8 MB.

ACKNOWLEDGMENTS

L.D.G. was supported by a fellowship from CONACyT 333933. This study was supported by grant PAPIIT IN203119 and by the Programa de Producción de Biomoléculas.

We thank the Molecular Biology Unit of the IFC and Miguel Tapia who is responsible for the Microscopy Unit of the IIB.

REFERENCES

- Silhavy TJ, Kahne D, Walker S. 2010. The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2:a000414. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000414>.
- Deng Y, Sun M, Shaevitz JW. 2011. Direct measurement of cell wall stress stiffening and turgor pressure in live bacterial cells. *Phys Rev Lett* 107:158101. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.107.158101>.
- Braun V, Wolff H. 1970. The murein-lipoprotein linkage in the cell wall of *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* 14:387–391. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1970.tb00301.x>.
- Braun V, Sieglin U. 1970. The covalent murein-lipoprotein structure of the *Escherichia coli* cell wall. The attachment site of the lipoprotein on the murein. *Eur J Biochem* 13:336–346. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1970.tb00936.x>.
- Cascales E, Bernadac A, Gavioli M, Lazzaroni JC, Lloubes R. 2002. Pal lipoprotein of *Escherichia coli* plays a major role in outer membrane integrity. *J Bacteriol* 184:754–759. <https://doi.org/10.1128/jb.184.3.754-759.2002>.
- Bernadac A, Gavioli M, Lazzaroni JC, Raina S, Lloubes R. 1998. *Escherichia coli tol-pal* mutants form outer membrane vesicles. *J Bacteriol* 180:4872–4878.
- Smith SG, Mahon V, Lambert MA, Fagan RP. 2007. A molecular Swiss army knife: OmpA structure, function and expression. *FEMS Microbiol Lett* 273:1–11. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00778.x>.
- Sonntag I, Schwarz H, Hirota Y, Henning U. 1978. Cell envelope and shape of *Escherichia coli*: multiple mutants missing the outer membrane lipoprotein and other major outer membrane proteins. *J Bacteriol* 136:280–285.
- Henning U, Sonntag I, Hindennach I. 1978. Mutants (*ompA*) affecting a major outer membrane protein of *Escherichia coli* K12. *Eur J Biochem* 92:491–498. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1978.tb12771.x>.
- Bremer E, Cole ST, Hindennach I, Henning U, Beck E, Kurz C, Schaller H. 1982. Export of a protein into the outer membrane of *Escherichia coli* K12. Stable incorporation of the OmpA protein requires less than 193 amino-terminal amino-acid residues. *Eur J Biochem* 122:223–231. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1982.tb05870.x>.
- Pautsch A, Schulz GE. 1998. Structure of the outer membrane protein A transmembrane domain. *Nat Struct Biol* 5:1013–1017. <https://doi.org/10.1038/2983>.
- Park JS, Lee WC, Yeo KJ, Ryu KS, Kumarasiri M, Hesk D, Lee M, Mobashery S, Song JH, Kim SI, Lee JC, Cheong C, Jeon YH, Kim HY. 2012. Mechanism of anchoring of OmpA protein to the cell wall peptidoglycan of the gram-negative bacterial outer membrane. *FASEB J* 26:219–228. <https://doi.org/10.1096/fj.11-188425>.
- Poindexter JS. 1964. Biological properties and classification of the *Caulobacter* group. *Bacteriol Rev* 28:231–295.
- Viollier PH, Thanbichler M, McGrath PT, West L, Meewan M, McAdams HH, Shapiro L. 2004. Rapid and sequential movement of individual chromosomal loci to specific subcellular locations during bacterial DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:9257–9262. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402606101>.
- Thanbichler M, Wang SC, Shapiro L. 2005. The bacterial nucleoid: a highly organized and dynamic structure. *J Cell Biochem* 96:506–521. <https://doi.org/10.1002/jcb.20519>.
- Kiebusch D, Thanbichler M. 2013. Spatiotemporal organization of microbial cells by protein concentration gradients. *Trends Microbiol* 22:P65–P73. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2013.11.005>.
- Ginez LD, Osorio A, Poggio S. 2014. Localization of the outer membrane protein OmpA2 in *Caulobacter crescentus* depends on the position of the gene in the chromosome. *J Bacteriol* 196:2889–2900. <https://doi.org/10.1128/JB.01516-14>.
- Kleanthous C, Rassam P, Baumann CG. 2015. Protein-protein interactions and the spatiotemporal dynamics of bacterial outer membrane proteins. *Curr Opin Struct Biol* 35:109–115. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2015.10.007>.
- Lill Y, Jordan LD, Smallwood CR, Newton SM, Lill MA, Klebba PE, Ritchie K. 2016. Confined mobility of TonB and FepA in *Escherichia coli* membranes. *PLoS One* 11:e0160862. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160862>.
- Verhoeven GS, Dogterom M, den Blaauwen T. 2013. Absence of long-range diffusion of OmpA in *E. coli* is not caused by its peptidoglycan binding domain. *BMC Microbiol* 13:66. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-66>.
- Rassam P, Copeland NA, Birkholz O, Toth C, Chavent M, Duncan AL, Cross SJ, Housden NG, Kaminska R, Seger U, Quinn DM, Garrod TJ, Sansom MS, Piehler J, Baumann CG, Kleanthous C. 2015. Supramolecular assemblies underpin turnover of outer membrane proteins in bacteria. *Nature* 523:333–336. <https://doi.org/10.1038/nature14461>.
- Gunasinghe SD, Shiota T, Stubenrauch CJ, Schulze KE, Webb CT, Fulcher AJ, Dunstan RA, Hay ID, Naderer T, Whelan DR, Bell TDM, Elgass KD, Strugnell RA, Lithgow T. 2018. The WD40 protein BamB mediates coupling of BAM complexes into assembly precincts in the bacterial outer membrane. *Cell Rep* 23:2782–2794. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.04.093>.
- Jain S, van Ulsen P, Benz I, Schmidt MA, Fernandez R, Tommassen J, Goldberg MB. 2006. Polar localization of the autotransporter family of large bacterial virulence proteins. *J Bacteriol* 188:4841–4850. <https://doi.org/10.1128/JB.00326-06>.
- Gibbs KA, Isaac DD, Xu J, Hendrix RW, Silhavy TJ, Theriot JA. 2004. Complex spatial distribution and dynamics of an abundant *Escherichia coli* outer membrane protein, LamB. *Mol Microbiol* 53:1771–1783. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04242.x>.
- Ghosh AS, Young KD. 2005. Helical disposition of proteins and lipopolysaccharide in the outer membrane of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 187:1913–1922. <https://doi.org/10.1128/JB.187.6.1913-1922.2005>.
- Gunasinghe SD, Webb CT, Elgass KD, Hay ID, Lithgow T. 2017. Super-resolution imaging of protein secretion systems and the cell surface of gram-negative bacteria. *Front Cell Infect Microbiol* 7:220. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00220>.
- Ricci DP, Silhavy TJ. 2019. Outer membrane protein insertion by the beta-barrel assembly machine. *EcoSal Plus* <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.ESP-0035-2018>.
- Ursell TS, Trepagnier EH, Huang KC, Theriot JA. 2012. Analysis of surface protein expression reveals the growth pattern of the gram-negative outer membrane. *PLoS Comput Biol* 8:e1002680. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002680>.
- Smit J, Nikaïdo H. 1978. Outer membrane of gram-negative bacteria. XVIII. Electron microscopic studies on porin insertion sites and growth of cell surface of *Salmonella* Typhimurium. *J Bacteriol* 135:687–702.
- Behr MG, Schnaitman CA, Pugsley AP. 1980. Major heat-modifiable outer membrane protein in gram-negative bacteria: comparison with the *ompA* protein of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 143:906–913.
- Reithmeier RA, Bragg PD. 1977. Molecular characterization of a heat-modifiable protein from the outer membrane of *Escherichia coli*. *Arch Biochem Biophys* 178:527–534. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(77\)90223-5](https://doi.org/10.1016/0003-9861(77)90223-5).
- Ohnishi S, Kameyama K, Takagi T. 1998. Characterization of a heat-modifiable protein, *Escherichia coli* outer membrane protein OmpA in binary surfactant system of sodium dodecyl sulfate and octylglucoside. *Biochim Biophys Acta* 1375:101–109. [https://doi.org/10.1016/s0005-2736\(98\)00145-x](https://doi.org/10.1016/s0005-2736(98)00145-x).
- Ohnishi S, Kameyama K. 2001. *Escherichia coli* OmpA retains a folded structure in the presence of sodium dodecyl sulfate due to a high kinetic barrier to unfolding. *Biochim Biophys Acta* 1515:159–166. [https://doi.org/10.1016/s0005-2736\(01\)00410-2](https://doi.org/10.1016/s0005-2736(01)00410-2).
- Nakamura K, Mizushima S. 1976. Effects of heating in dodecyl sulfate solution on the conformation and electrophoretic mobility of isolated major outer membrane proteins from *Escherichia coli* K-12. *J Biochem* 80:1411–1422. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a131414>.
- Heller KB. 1978. Apparent molecular weights of a heat-modifiable protein from the outer membrane of *Escherichia coli* in gels with different acrylamide concentrations. *J Bacteriol* 134:1181–1183.
- Elowitz MB, Surette MG, Wolf PE, Stock JB, Leibler S. 1999. Protein mobility in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 181:197–203.
- Ebersbach G, Briegel A, Jensen GJ, Jacobs-Wagner C. 2008. A self-associating protein critical for chromosome attachment, division, and polar organization in *Caulobacter*. *Cell* 134:956–968. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.07.016>.
- Shigi Y, Matsumoto Y, Kaizu M, Fujishita Y, Kojo H. 1984. Mechanism of action of the new orally active cephalosporin FK027. *J Antibiot (Tokyo)* 37:790–796. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.37.790>.
- McBroom AJ, Kuehn MJ. 2007. Release of outer membrane vesicles by Gram-negative bacteria is a novel envelope stress response. *Mol Microbiol* 63:545–558. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05522.x>.

40. Mushtaq AU, Park JS, Bae SH, Kim HY, Yeo KJ, Hwang E, Lee KY, Jee JG, Cheong HK, Jeon YH. 2017. Ligand-mediated folding of the OmpA periplasmic domain from *Acinetobacter baumannii*. *Biophys J* 112:2089–2098. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.04.015>.
41. Rollauer SE, Soorshjani MA, Noinaj N, Buchanan SK. 2015. Outer membrane protein biogenesis in Gram-negative bacteria. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 370:20150023. <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0023>.
42. Montero Llopis P, Jackson AF, Sliusarenko O, Surovtsev I, Heinritz J, Emonet T, Jacobs-Wagner C. 2010. Spatial organization of the flow of genetic information in bacteria. *Nature* 466:77–81. <https://doi.org/10.1038/nature09152>.
43. Dajkovic A, Hinde E, MacKichan C, Carballido-Lopez R. 2016. Dynamic organization of SecA and SecY secretion complexes in the *B. subtilis* membrane. *PLoS One* 11:e0157899. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157899>.
44. Matsumoto K, Hara H, Fishov I, Mileykovskaya E, Norris V. 2015. The membrane: transertion as an organizing principle in membrane heterogeneity. *Front Microbiol* 6:572. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00572>.
45. Hay ID, Belousoff MJ, Dunstan RA, Bamert RS, Lithgow T. 2018. Structure and membrane topography of the vibrio-type secretin complex from the type 2 secretion system of enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 200:e00521-17. <https://doi.org/10.1128/JB.00521-17>.
46. Babu M, Bundalovic-Torma C, Calmettes C, Phanse S, Zhang Q, Jiang Y, Minic Z, Kim S, Mehla J, Gagarianova A, Rodionova I, Kumar A, Guo H, Kagan O, Pogoutse O, Aoki H, Deineko V, Caufield JH, Holtzapple E, Zhang Z, Vastermark A, Pandya Y, Lai C. C-I, El Bakkouri M, Hooda Y, Shah M, Burnside D, Hooshyar M, Vlasblom J, Rajagopala SV, Golshani A, Wuchty S, F Greenblatt J, Saier M, Uetz P, F Moraes T, Parkinson J, Emili A. 2018. Global landscape of cell envelope protein complexes in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol* 36:103–112. <https://doi.org/10.1038/nbt.4024>.
47. Wang Y, Wang R, Jin F, Liu Y, Yu J, Fu X, Chang Z. 2016. A supercomplex spanning the inner and outer membranes mediates the biogenesis of beta-barrel outer membrane proteins in bacteria. *J Biol Chem* 291:16720–16729. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.710715>.
48. Smit J, Kaltashov IA, Kaltashov IA, Cotter RJ, Vinogradov E, Perry MB, Haider H, Qureshi N. 2008. Structure of a novel lipid A obtained from the lipopolysaccharide of *Caulobacter crescentus*. *Innate Immun* 14:25–37. <https://doi.org/10.1177/1753425907087588>.
49. De Siervo AJ, Homola AD. 1980. Analysis of *Caulobacter crescentus* lipids. *J Bacteriol* 143:1215–1222.
50. Aaron M, Charbon G, Lam H, Schwarz H, Vollmer W, Jacobs-Wagner C. 2007. The tubulin homologue FtsZ contributes to cell elongation by guiding cell wall precursor synthesis in *Caulobacter crescentus*. *Mol Microbiol* 64:938–952. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05720.x>.
51. Ursinus A, van den Ent F, Brechtel S, de Pedro M, Höltje J-V, Löwe J, Vollmer W. 2004. Murein (peptidoglycan) binding property of the essential cell division protein FtsN from *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 186:6728–6737. <https://doi.org/10.1128/JB.186.20.6728-6737.2004>.
52. Yahashiri A, Jorgenson MA, Weiss DS. 2015. Bacterial SPOR domains are recruited to septal peptidoglycan by binding to glycan strands that lack stem peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:11347–11352. <https://doi.org/10.1073/pnas.1508536112>.
53. Sanchez-Gorostiaga A, Palacios P, Martinez-Arteaga R, Sanchez M, Casanova M, Vicente M. 2016. Life without division: physiology of *Escherichia coli* FtsZ-deprived filaments. *MBio* 7:e01620-16. <https://doi.org/10.1128/mBio.01620-16>.
54. Steinhauer J, Agha R, Pham T, Varga AW, Goldberg MB. 1999. The unipolar *Shigella* surface protein IcsA is targeted directly to the bacterial old pole: IcsP cleavage of IcsA occurs over the entire bacterial surface. *Mol Microbiol* 32:367–377. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01356.x>.
55. May KL, Morona R. 2008. Mutagenesis of the *Shigella flexneri* autotransporter IcsA reveals novel functional regions involved in IcsA biogenesis and recruitment of host neural Wiscott-Aldrich syndrome protein. *J Bacteriol* 190:4666–4676. <https://doi.org/10.1128/JB.00093-08>.
56. Ambrosi C, Pompili M, Scribano D, Zagaglia C, Ripa S, Nicoletti M. 2012. Outer membrane protein A (OmpA): a new player in *Shigella flexneri* protrusion formation and inter-cellular spreading. *PLoS One* 7:e49625. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049625>.
57. Scribano D, Petrucca A, Pompili M, Ambrosi C, Bruni E, Zagaglia C, Prosseda G, Nencioni L, Casalino M, Polticelli F, Nicoletti M. 2014. Polar localization of PhoN2, a periplasmic virulence-associated factor of *Shigella flexneri*, is required for proper IcsA exposition at the old bacterial pole. *PLoS One* 9:e90230. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090230>.
58. Doyle MT, Grabowicz M, Morona R. 2015. A small conserved motif supports polarity augmentation of *Shigella flexneri* IcsA. *Microbiology* 161:2087–2097. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000165>.
59. Scribano D, Damico R, Ambrosi C, Superti F, Marazzato M, Conte MP, Longhi C, Palamara AT, Zagaglia C, Nicoletti M. 2016. The *Shigella flexneri* OmpA amino acid residues 188EVQ190 are essential for the interaction with the virulence factor PhoN2. *Biochem Biophys Rep* 8:168–173. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2016.08.010>.
60. Ely B. 1991. Genetics of *Caulobacter crescentus*. *Methods Enzymol* 204:372–384. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(91\)04019-K](https://doi.org/10.1016/0076-6879(91)04019-K).
61. Kunkel TA. 1985. Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:488–492. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.2.488>.
62. Osorio A, Camarena L, Cevallos MA, Poggio S. 2017. A new essential cell division protein in *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol* 199:e00811-16. <https://doi.org/10.1128/JB.00811-16>.
63. Edelstein AD, Tsuchida MA, Amodaj N, Pinkard H, Vale RD, Stuurman N. 2014. Advanced methods of microscope control using μ Manager software. *J Biol Methods* 1:e10.
64. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. 2012. NIH Image to Image J: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9:671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>.
65. Soumpasis DM. 1983. Theoretical analysis of fluorescence photobleaching recovery experiments. *Biophys J* 41:95–97. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(83\)84410-5](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(83)84410-5).