

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Caracterización del mecanismo de localización de DipM en
Caulobacter crescentus.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A:

Thelma Isabel Arenas Rodríguez

**DIRECTOR DE TESIS:
Dr. Sebastián Poggio Ghilarducci**

CIUDAD DE MÉXICO, 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

1. Datos del Alumno
Thelma
Isabel
Arenas
Rodríguez
310112622
UNAM, Facultad de Ciencias, Biología.

2. Datos del tutor
Sebastián
Poggio
Ghilarducci

3. Datos del Sinodal 1
Claudia
Andrea
Segal
Kischinevzky

4. Datos del sinodal 2
José
Eduardo
Rodríguez
Bustamante

5. Datos del sinodal 3
Saúl
Cano
Colín

6. Datos del sinodal 4
Ángela
Victoria
Forero
Forero

7. Datos del trabajo escrito
Caracterización del mecanismo de localización de DipM en *Caulobacter crescentus*
pp. 75
2021

Para Javier Arenas

Agradecimientos

Este trabajo se realizó bajo la tutoría del Dr. Sebastián Poggio Ghilarducci en el Departamento de Biología Molecular y Biotecnología con el financiamiento parcial del programa de Producción de Biomoléculas en microorganismos en el Instituto de Investigaciones Biomédicas y el programa PAPIIT IN203119.

Agradezco a las instituciones públicas que me han permitido estudiar bajo el espíritu liberador de que el conocimiento se comparte. Gracias UNAM, gracias, Facultad de Ciencias.

A mi tutor, Sebastián Poggio que con tanta paciencia me espero a que escribiera la tesis, espero pronto empecemos a escribir otra. A la Dra. Laura Camarena y a la Dra. Clelia Domenzain por sus observaciones, consejos y contribuciones a este proyecto.

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

Un agradecimiento muy especial a la QFB Aurora Osorio Franco, por compartirme tantas técnicas como historias.

Por último, agradezco a mi familia y amigos ya que sin ellos este trabajo no hubiera sido posible.

Índice

Contenido

Introducción	10
Envoltura celular bacteriana	10
División celular bacteriana	13
Síntesis del Peptidoglicano.....	17
Hidrólisis del peptidoglicano	19
Síntesis del peptidoglicano durante la elongación y la división celular.	21
Características de <i>Caulobacter crescentus</i>	23
Regulación de los genes de división y otros eventos del ciclo celular en <i>Caulobacter crescentus</i>	25
División celular en <i>Caulobacter crescentus</i>	26
DipM es una proteína de división temprana de <i>Caulobacter crescentus</i>	29
Los dominios LysM se unen a carbohidratos.	33
Localización de proteínas con dominios LysM.	36
Hipótesis.....	38
Objetivo	38
Objetivos particulares	38
Materiales y Métodos	39
Cepas bacterianas, plásmidos y condiciones de crecimiento utilizados	39
Técnicas de biología molecular y Western Blot.	39
Diseño de oligonucleótidos.....	39
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	39
Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa (QIAquick gel extraction).....	40
Digestión enzimática de productos de PCR y plásmidos.....	40
Ligación de un fragmento de DNA y un plásmido.....	41
Transformación por electroporación.	41
Purificación de plásmidos mediante minipreparaciones hervidas.	41
Purificación de plásmidos con el Kit QIAprep Spin Miniprep (columnas QIAGEN).....	42
Propagación de bacteriófagos y transducciones en <i>C. crescentus</i>	42
Microscopía de fluorescencia.....	43
Ensayo de inmunodetección por Western-blot.	43

Resultados	50
La localización de DipM depende del primer tándem de dominios LysM.	50
Predicción de los aminoácidos de DipM involucrados en la unión con la pared.....	54
Discusión	62
Conclusiones	64
Anexo 1. Resultados adicionales	65
DipM-mCherry no se localiza en el sitio de la división cuando se abaten la expresión de FtsI, aun cuando FtsN está presente.....	65
Conclusiones adicionales	67
Materiales adicionales	67
Bibliografía	69

Introducción

Envoltura celular bacteriana

Las bacterias poseen una envoltura celular compuesta por una membrana interna (MI), una pared celular de peptidoglicano (PG), y en algunos casos una membrana externa (ME) (Figura 1). La envoltura celular protege contra los cambios del ambiente, permite interactuar con otros organismos, mantiene y delimita la forma celular. La presencia de una o dos membranas de la envoltura celular permite clasificar a las bacterias en dos grandes grupos. El primer grupo es el de las bacterias Gram negativas, las cuales tienen dos membranas, una externa y la otra interna. El segundo grupo es el de las bacterias Gram positivas, las cuales tienen sola una membrana (MI). Las membranas internas están compuestas por glicerolípidos. Su función es encapsular el citoplasma y limitar el paso de moléculas. A diferencia de la membrana interna, la membrana externa tiene una estructura asimétrica. La monocapa interna está compuesta solo por fosfolípidos y la monocapa externa está compuesta además de fosfolípidos por lipopolisacáridos (Silhavy et al., 2010).

En el caso de las bacterias Gram negativas, la pared celular de peptidoglicano se localiza entre las dos membranas. La pared de peptidoglicano es un polímero que recubre la superficie bacteriana, determina la forma y mantiene la integridad celular. La estructura base del peptidoglicano consiste en hebras de glicano entrelazadas por péptidos (Figura 2A). Cada hebra de glicano contiene repeticiones de dos sacáridos (N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico) unidos entre sí por un enlace glicosídico β -1,4. Existen algunas modificaciones en los sacáridos, las modificaciones pueden ser: N-desacetilaciones, O-acetilaciones y N-glicosilaciones. En el Carbono 3 del residuo del ácido N-acetilmurámico, hay una sustitución de un pentapéptido compuesto generalmente por los residuos: L-Alanina, ácido D-Glutámico, ácido meso-Diaminopimélico, D-Alanina y D-Alanina. Existen diferencias

en la composición del pentapéptido en los diferentes grupos bacterianos. Las hebras de glicano se entrelazan por la unión de los pentapéptidos. Generalmente, un pentapéptido se unirá a otro en el residuo D-Alanina (posición 4 del pentapéptido) y el residuo del aminoácido ácido meso-diaminopimélico (posición 3 del pentapéptido), este tipo de unión se conoce como 4-3. Las uniones del pentapéptido 4-3 pueden cambiar según el grupo bacteriano, con menor frecuencia puede ocurrir el enlace 3-3. (Cabeen & Jacobs-wagner, 2005).

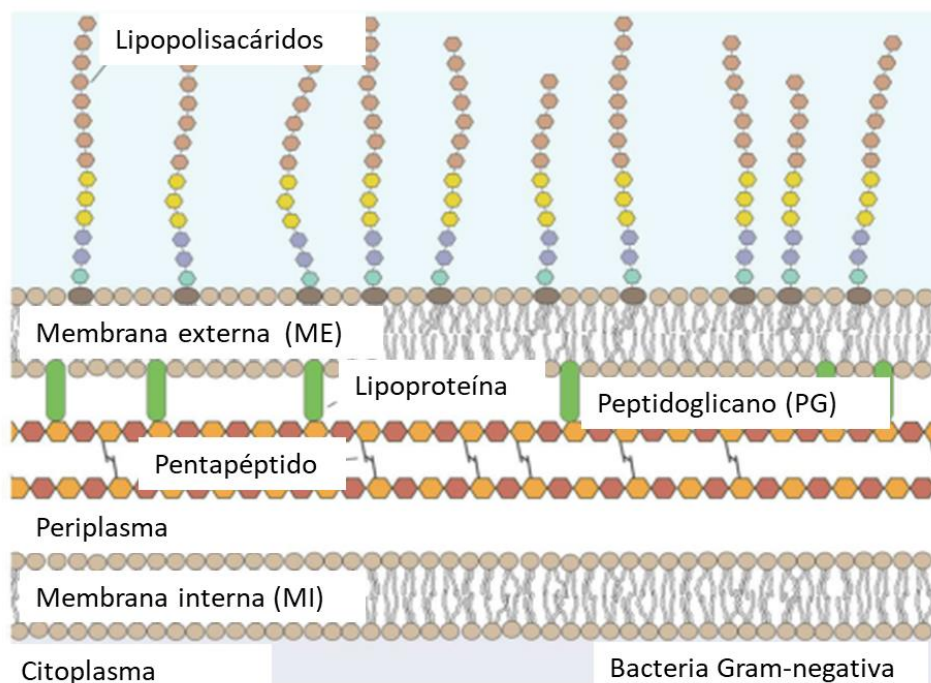


Figura 1. Envoltura celular en bacterias Gram negativas. La envoltura celular bacteriana se compone de varias capas que protegen y delimitan a la célula. La membrana interna está en contacto con el interior de la célula y se compone principalmente de fosfolípidos. La membrana externa se compone por fosfolípidos y lipopolisacáridos, esta membrana se encuentra en contacto con el exterior de la célula. En conjunto, las dos membranas delimitan un espacio acuoso llamado periplasma, en donde se aloja la pared celular de peptidoglicano, la cual delimita la forma de la célula y ayudar a resistir los cambios osmóticos del medio (Auer & Weibel, 2017).

A pesar de que la estructura química de esta macromolécula es bien conocida, sus propiedades físicas han dificultado la determinación de la arquitectura del peptidoglicano (Romaniuk et al., 2015; Vollmer & Seligman, 2010). Actualmente, el uso de modelos matemáticos, crio-microscopía electrónica (CryEM) y datos de difracción de rayos X han apuntado a que en las bacterias Gram negativas las hebras de glicano corren paralelas, respecto al eje de la célula, mientras que los péptidos cruzan perpendicularmente las cadenas de glicano (Fig. 2B). Se estima que cada hebra de glicano, representa una hélice en donde cada vuelta se conforma por cuatro unidades de disacárido, exponiendo en cada vuelta 4 pentapéptidos (Fig. 2A). Los pentapéptidos forman un enlace peptídico con otro pentapéptido proveniente de una cadena de azúcares vecina, formando así una red, que cubre y proporciona la forma celular bacteriana (Figura 2B) (Koch, 1998) (Dmitriev et al., 2005) (Vollmer & Seligman, 2010).

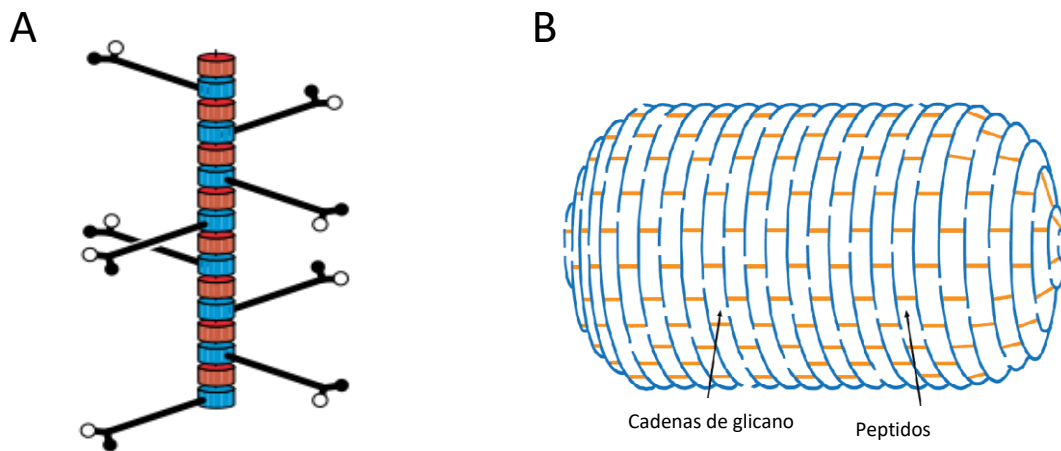


Figura 2. Estructura general de la pared celular de peptidoglicano. 2A. Vista general de una hebra de glicano. Las unidades de sacárido se representan con bloques de color azul y rojo. Los bloques rojos representan el sacárido N-acetilglucosamina y los bloques azules el sacárido N-acetil-murámico. Las líneas de color negro representan los péptidos que entrelazan las cadenas de glicano; los círculos negros representan los grupos carboxilos terminales y los grupos aminos terminales se representan en círculos blancos. **2B Arquitectura del peptidoglicano.** Esta representación está basada en modelo *scaffold*, un modelo que propone que las cadenas de glicano corren paralelas al eje transversal de la célula, caso contrario con los péptidos, los que corren perpendiculares a las cadenas de glicano (Modificado de Dmitriev et al., 2005).

División celular bacteriana

Actualmente se sabe que la división celular en bacterias requiere la presencia de un complejo multiprotéico llamado divisoma, conformado por aproximadamente 30 proteínas; 12 son proteínas esenciales para la división. Las proteínas esenciales están conservadas en los diferentes grupos bacterianos, se reclutan jerárquicamente por medio de interacciones proteína-proteína, característica que ha permitido dividir las proteínas de división temprana y tardía. Las proteínas que componen el divisoma tienen funciones específicas dentro de la célula. Las funciones del divisoma son diversas, pero en esencia, permiten que las bacterias invaginen las membranas, la pared celular de peptidoglicano crezca y se recorte para separar a las dos células hijas (Nanninga, 1991) (Choquet et al., 2006) (Egan & Vollmer, 2013). El reclutamiento de los componentes esenciales en la parte media de la célula, muestra una dependencia lineal que comienza con FtsZ y termina con FtsW (Figura 3) (Aarsman et al., 2005).

En la primera etapa de la división bacteriana se reclutan proteínas del citoplasma. La primera proteína en localizarse es FtsZ. La proteína se polimeriza y forma un anillo el cual será el andamio para el reclutamiento de las siguientes proteínas de división (Lutkenhaus, 2007). FtsZ es un homólogo de la tubulina eucarionte y requiere de GTP para polimerizarse y formar un arreglo lineal de monómeros. Los monómeros de FtsZ se combinan y forman un anillo discontinuo (anillo-Z) a la mitad de la célula (Monahan et al., 2014). La localización de FtsZ ocurre por la inhibición de la polimerización del anillo-Z mediada por la presencia de las proteínas Min. En el caso de *Escherichia coli* las proteínas MinC/MinD/MinE forman un complejo inhibidor que oscila de polo en polo, la ausencia de las proteínas Min en el sitio de la división permite que FtsZ sea reclutada. Para que el anillo Z se mantenga estable es necesario que se ancle a la membrana interna, lo cual ocurre por la interacción de FtsZ con proteínas citoplásmicas que se asocian a la membrana. En particular

con la proteína esencial de membrana, FtsA. Esta es una proteína esencial que junto con otras proteínas accesorias como ZipA en *E. coli*, anclan el anillo a la membrana interna. En ausencia de las proteínas accesorias, el recambio de los monómeros de FtsZ aumenta, disminuyendo la tasa de constricción (Buss et al., 2015). Una vez que se ha anclado el anillo Z a la membrana interna, se reclutan el complejo FtsEX y la proteína FtsK, terminando el reclutamiento de proteínas de división temprana (Aarsman et al., 2005).

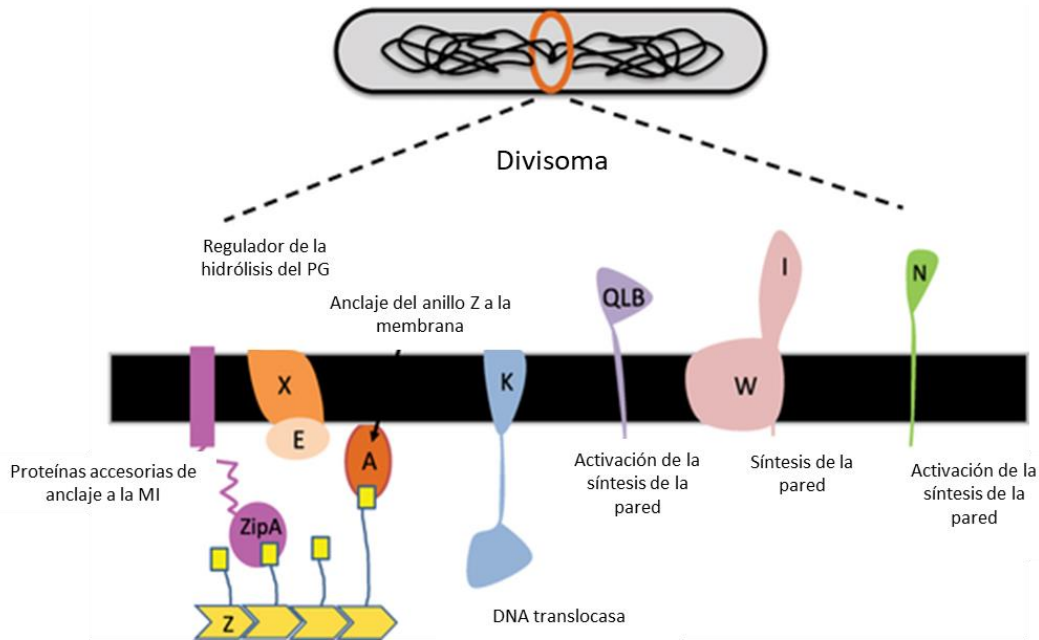


Figura 3. Modelo del divisoma propuesto para *Escherichia coli*. Representación gráfica de las interacciones y posición de las proteínas descritas en el modelo de división de *E. coli*. FtsZ (Z) es la primera proteína en localizarse. Forma un anillo que será el andamio para el reclutamiento de las siguientes proteínas de división. Con ayuda de las proteínas ZipA y FtsA (A) el anillo se ancla a la membrana. Seguido del anclaje del anillo se reclutan las proteínas reguladoras de la hidrólisis de la pared: FtsE (E) y FtsX (X). El reclutamiento de proteínas de división termina con FtsK, proteína que ayuda a la segregación del cromosoma. Posteriormente, hay una etapa de elongación celular (en algunos casos), seguida del reclutamiento de las proteínas de división tardía como el complejo FtsQLB (QLB), FtsW (W), FtsI (I) y FtsN (N). En su mayoría, las proteínas de división tardía están involucradas en la síntesis e hidrólisis del peptidoglicano, una de las capas de la envoltura celular más difíciles de invadir. Modificado de Lutkenhaus, 2007.

Las proteínas de división tardía son en su mayoría proteínas integrales de membrana, transmembranales expuestas principalmente al periplasma o solubles de periplasma (Ursinus et al., 2004; Weiss, 2015). El reclutamiento de proteínas tardías comienza con el complejo esencial QLB conformado por las proteínas FtsQ, FtsL y FtsB (Aarsman et al., 2005). Sus funciones son: estabilizar el anillo, interactuar con otras proteínas y activar la síntesis del peptidoglicano durante la división (Microbiol, 2016). Después de la participación del complejo QLB se recluta la proteína FtsN, la proteína estabiliza el anillo y activa la síntesis del peptidoglicano. La activación de la síntesis del peptidoglicano ocurre por la interacción de FtsN con la sintasa de peptidoglicano FtsI (también conocida como PBP3) y con el regulador de la síntesis PBP1B (Mu et al., 2007). El reclutamiento de proteínas de división tardía incluye a NlpD y a EnvC. Estas dos proteínas han sido caracterizadas como reguladoras de la hidrólisis de la pared mediada por amidasas y son reclutadas mediante su interacción con distintas proteínas del divisoma. Las amidasas AmiA, AmiB y AmiC, hidrolizan el enlace que existe entre el ácido N-acetilmurámico y el pentapéptido del peptidoglicano. La hidrólisis del peptidoglicano es necesaria para separar a las dos células hijas y su actividad potencialmente deletérea está regulada por las proteínas EnvC y NlpD. La proteína periplásmica EnvC activa a AmiA y AmiB. La lipoproteína de membrana externa NlpD activa a AmiC. En ausencia de cualquiera de estas cinco proteínas las células muestran defectos importantes en la división. Además de la síntesis e hidrólisis de la pared es necesario mantener la estabilidad de la envoltura durante el proceso de división, para lo cual se recluta el complejo Tol-Pal. El complejo se compone de TolB, TolQ, TolR y TolA y la lipoproteína pal. TolQ y TolR son proteínas transmembranales de membrana interna, Pal se encuentra anclada a la membrana externa y TolB es una proteína soluble de periplasma. En conjunto, estas proteínas permiten la estabilidad de la envoltura manteniendo interacciones entre ellas y las tres capas de la envoltura celular. Finalmente, se recluta FtsW, la cual transporta desde el citoplasma hacia el periplasma los precursores para la formación del peptidoglicano (Typas et al., 2011).

El proceso de división en las bacterias involucra el establecimiento del sitio de división, en algunos casos la elongación de la célula a los lados del futuro sitio de división, la finalización de la segregación del cromosoma, la invaginación de las distintas capas de la envoltura celular, lo que en algunos casos resulta en la generación de un septo que separa a las dos células hijas y finalmente, la eliminación de la pared que une a las dos células. Esta serie de eventos ocurren en todas las bacterias con ayuda de las proteínas de división, un conjunto de las cuales son esenciales y que están ampliamente distribuidas. Sin embargo, diferencias en las características de la estructura de la envoltura celular, variaciones en la morfología, diferencias en la regulación de los distintos eventos o la presencia de diferentes proteínas accesorias hacen que el modelo de división de *E. coli* no sea universal. Por ello, el estudio de la división celular en diferentes organismos ha permitido comprender mejor este proceso. Tal es el caso de *Caulobacter crescentus*. El estudio del ensamblaje de las proteínas en *C. crescentus*, ha permitido determinar que el reclutamiento de proteínas de división no es necesariamente estrictamente lineal (Goley et al., 2011), como el que se ha propuesto en *E. coli* (Aarsman et al., 2005). En *C. crescentus* la división ocurre en módulos. La replicación y la segregación del cromosoma está coordinada con la formación del anillo Z a mitad de la célula. Entre *E. coli* y *C. crescentus* el orden de reclutamiento es distinto. Además, el conjunto de proteínas que componen al divisoma es diferente. Las diferencias que existen entre las dos especies permiten entender las distintas funciones del divisoma, así como las adaptaciones que tienen las bacterias asociadas a los diferentes hábitats que tienen las bacterias.

Síntesis del Peptidoglicano

Durante el crecimiento celular y la división, la superficie de la bacteria se extiende por la síntesis e incorporación del peptidoglicano (Typas et al., 2011). La síntesis del peptidoglicano comienza en el citoplasma con la síntesis de los precursores UDP-GlcNAc y UDP-MurNAc. En el citoplasma se adiciona un pentapéptido al UDP-MurNAc. La reacción es catalizada por: MurA, MurB, MurC, MurD, MurE y MurF. Una vez añadido el pentapéptido, la transferasa MraY une al UDP-pentapéptido-MurNAc con el lípido I (undecaprenil-pirofosforil). A su vez, la glicosiltransferasa MurG se une al GlcNAc con el lípido I. Esta serie de reacciones forman el undecaprenil-pirofosforil-MurNAc-pentapéptido-GlcNAc mejor conocido como el lípido II. El lípido II se transporta a través de la membrana citoplasmática hacia el periplasma. Durante la división, el transporte hacia el periplasma ocurre por FtsW. Una vez que el lípido II ha sido transportado hacia el periplasma, las penicillin binding proteins (PBPs) se encargan de polimerizar y unir las cadenas de glicano (Figura 4) (Cabeen & Jacobs-wagner, 2005).

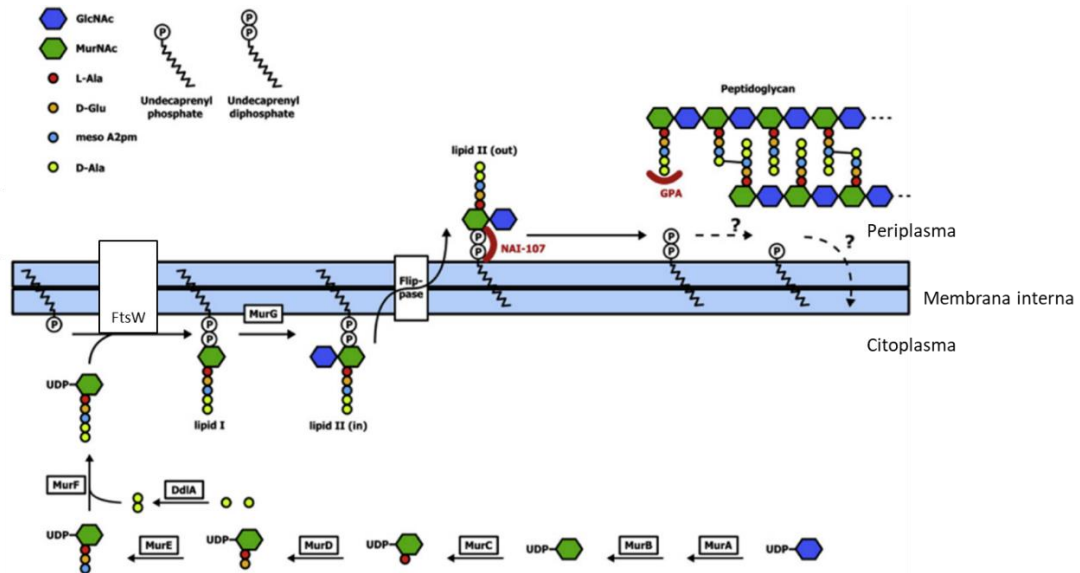


Figura 4. Síntesis del peptidoglicano. El UDP-MurNac es modificado por una serie de reacciones catalizadas por las proteínas Mur (MurA, MurB, MurC, MurD, MurE, Mur F). Esta serie de reacciones ocurren en el citoplasma para de adicionar el pentapéptido L-A,D-G, mesA2mp,D-A,D-A en el grupo L-lactolil del ácido N-acetilglucosamina. Una vez modificado, se unen entre ellos el UDP-MurNac y el UDP-GlcNac, a su vez el disacárido se une al lípido II para ser transportados al periplasma. FtsW y RodA son las flipasas encargadas de la traslocación hacia el espacio periplásmico. Una vez en el periplasma las proteínas con actividad de glicosiltransferasa (PBPs) catalizan la polimerización de las hebras nacientes de peptidoglicano. Una vez que se polimerizan las hebras de glicano, son conectadas entre sí por reacciones catalizadas por enzimas de tipo transpeptidasa (PBP) (Modificado de Unsleber et al., 2019).

Las PBPs por sus siglas en inglés (Penicillin Binding Proteins) son llamadas así por ser el blanco de antibióticos beta-lactámicos. Las PBPs tienen dominios que permiten interacciones que regulan su actividad y dominios que permiten llevar a cabo su actividad catalítica. Se dividen en tres clases según su actividad: la clase A es de proteínas bifuncionales; es decir, tienen dominios con actividad glicosiltransferasa (GTasa) y transpeptidasa (TPasa). Los dominios con actividad de glicosiltransferasa son los que polimerizan cadenas de glicano provenientes del lípido II. Los dominios con actividad transpeptidasa permite la unión e incorporación de las hebras de glicano al conectarlas con el pentapéptido (Egan & Vollmer, 2013) (Figura 5). El dominio TPasa requiere de un pentapéptido donador a un

pentapéptido, el cual perderá en el último residuo D-alanina. El péptido aceptor debe tener el grupo amino secundario del ácido diaminopimérico libre. Se conoce que para que la actividad TPasa funcione adecuadamente es necesaria la actividad GTasa. La clase B es de proteínas monofuncionales con dominios TPasa (Vollmer & Bertsche, 2008). Estas proteínas tienen en el extremo N-terminal un cruce transmembranal seguido de un dominio no catalítico, generalmente este dominio ejerce una función regulatoria (Egan & Vollmer, 2013). Por último, en la clase C se encuentran proteínas monofuncionales que en *E. coli* tienen actividad de peptidasas. Durante el ciclo celular, la pared debe crecer para elongar y dividir a las células. La etapa de formación del peptidoglicano en el citoplasma es idéntica para la elongación y para la división. Sin embargo, la elongación y la división tienen diferencias en cuanto a las enzimas que participan durante la formación del peptidoglicano. En *E. coli* las proteínas de clase A, PBP1A y PBP1B son las más abundantes y reconocidas para la síntesis del peptidoglicano. PBP2 y PBP3 son de la clase B. La clase B funciona en pares y son esenciales para la elongación celular y para la división celular, respectivamente.

Hidrólisis del peptidoglicano

A diferencia de la elongación, durante la división celular es necesario remodelar la pared de peptidoglicano. El remodelaje de la pared hace referencia al crecimiento e hidrólisis. Durante la división, es necesario cambiar la dirección de crecimiento de la pared y recortar la pared celular de peptidoglicano para separar las dos células hijas. En *E. coli* hay al menos 13 proteínas periplásmicas que hidrolizan activamente la pared (Typas et al., 2011). Las hidrolasas pueden ser del tipo lítico-transglicosilasa (LT), endopeptidasa o amidasa (Figura 5). Las LTs son enzimas periplásmicas que recortan el enlace glicosídico β ,1-4 entre la N-acetilglucosamina y el ácido N-acetilmurámico. Esta familia de enzimas mantienen la dinámica de la pared, ya que su actividad regula procesos como la expansión durante el crecimiento celular, la hidrólisis durante la formación de estructuras celulares (como la formación de pili, flagelo o sistema de secreción), o para el reciclaje de los

muropéptidos durante la esporulación (Dik et al., 2018). En *E. coli* hay al menos seis LTs activas. La redundancia funcional permite que en ausencia de alguna de ellas no se comprometa la viabilidad celular (Pazos M., Peters K., 2019). Otras enzimas que hidrolizan el peptidoglicano son las endopeptidasas. Estas enzimas recortan el enlace amida entre los residuos de aminoácidos del pentapéptido. De acuerdo con el tipo de sustrato se clasifican en DD-Epasas y LD-Epasas. Las DD-epasas hidrolizan el enlace 4-3, mientras que las LD-Epasas hidrolizan el enlace 3-3 (Pazos M., Peters K., 2019). Esta familia de enzimas se ha estudiado principalmente en bacterias Gram Positivas. Las endopeptidasas están relacionadas con la hidrólisis de la pared durante la división. Su actividad catalítica es dependiente de la coordinación con iones metálicos (Bhattacharjee et al., 2016). En el caso de *E. coli* se conoce que las proteínas de división FtsN y el complejo FtsEX activan a las proteínas regulatorias de amidasas: EnvC y NlpD. Ambas endopeptidasas tienen en el C-terminal un dominio LytM. Los dominios LytM son del tipo endopeptidasas y se sabe que coordinan con Zn^{+2} para ejercer su función catalítica. (Vermassen et al., 2019). Sin embargo, se piensa que los dominios LytM en el C-terminal de EnvC y NlpD no son catalíticamente activos. Esta idea viene tras realizar un alineamiento y observar que los aminoácidos conservados para la coordinación con el Zn^{+2} no están en EnvC y NlpD. Además de que no se ha detectado actividad catalítica en ensayos *in vitro*. NlpD activa a la amidasa, AmiC y EnvC activa a las amidasas AmiA y AmiB (Egan & Vollmer, 2013). Ambas endopeptidasas regulan la actividad catalítica de las hidrolasas del peptidoglicano a través de sus dominios LytM catalíticamente inactivos. En *E. coli* hay 5 amidasas, de las cuales solo tres participan en la división. La inactivación de las tres amidasas produce células filamentosas que no se separan una de otra. Una mutante sencilla o doble mutante tienen fenotipos intermedios. Las amidasas también coordinan iones metálicos para llevar a cabo su actividad catalítica (Pazos & Peters, n.d.).

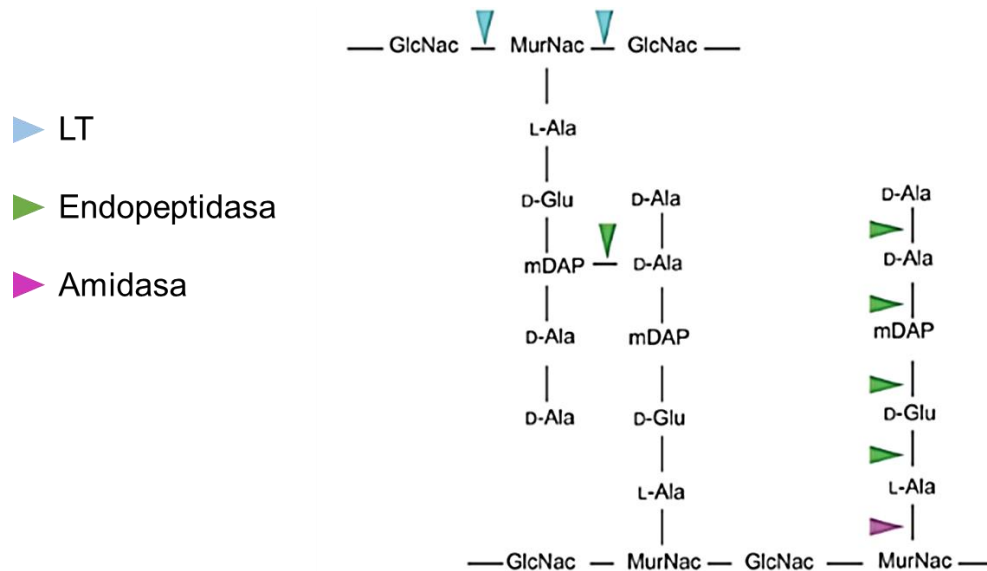


Figura 5. Hidrolasas del peptidoglicano. Los diferentes sitios de recorte de los tres tipos de enzimas. Los triángulos azules representan el corte del enlace β 1-4 que realizan las enzimas del tipo lítico-transglicosilasas (LT). Los triángulos verdes representan el corte del enlace peptídico que ocurre encatalizan las enzimas del tipo endopeptidasas. Cabe destacar que el recorte puede ocurrir en cualquiera de los residuos de aminoácidos del pentapéptido, el sitio específico caracteriza a las diferentes familias de endopeptidasas. Finalmente, los triángulos rosas representan el recorte que ocurre entre el ácido N-Acilmurámico y L-Ala en la posición uno (Vermassen et al., 2019).

Síntesis del peptidoglicano durante la elongación y la división celular.

MreB es una proteína homóloga de la actina eucariote. MreB está encargada de reclutar la maquinaria biosintética de la pared al interactuar con MreC, MreD, MurG y RodZ formar el elangosoma (Fig. 6). Durante la elongación, MreB se localiza a lo largo de toda la célula. La síntesis de la pared durante la elongación ocurre a manera de parches dispersos a lo largo de toda la célula. Las bacterias cocoides como *Staphylococcus aureus* no tienen MreB y el crecimiento de las células se limita al crecimiento de los polos durante la división (Typas et al., 2011). Durante la elongación en *E. coli*, PBP2 es la sintetasa principal de la pared. PBP2A y PBPH son las sintetetasas principales en *B. subtilis* (Den Blaauwen et al., 2008). Las sintetetasas de peptidoglicano involucradas en la división son PBP3 (FtsI) y PBP1B

(Fig. 6). Ambas proteínas se reclutan en la etapa tardía y son esenciales para la división. Cuando comienza la formación del divisoma, MreB es reclutado al sitio de la división, deteniendo la elongación a manera de parches. En algunas bacterias, entre el reclutamiento de proteínas tempranas y tardías hay una etapa de crecimiento que elonga a las células (Aaron et al., 2007; Miguel & Biologi, 1997). Este tipo de crecimiento es llamado crecimiento periférico y ocurre en la periferia del anillo Z (Fig. 6). Existe evidencia genética que sugiere que MreC y MreD controlan el crecimiento periférico (Land & Winkler, 2011). La importancia en el tipo de crecimiento es variable en distintas bacterias. Por ejemplo, la etapa de crecimiento de tipo periférico es más evidente en bacterias como *C. crescentus* y es mucho menor en *E. coli*.

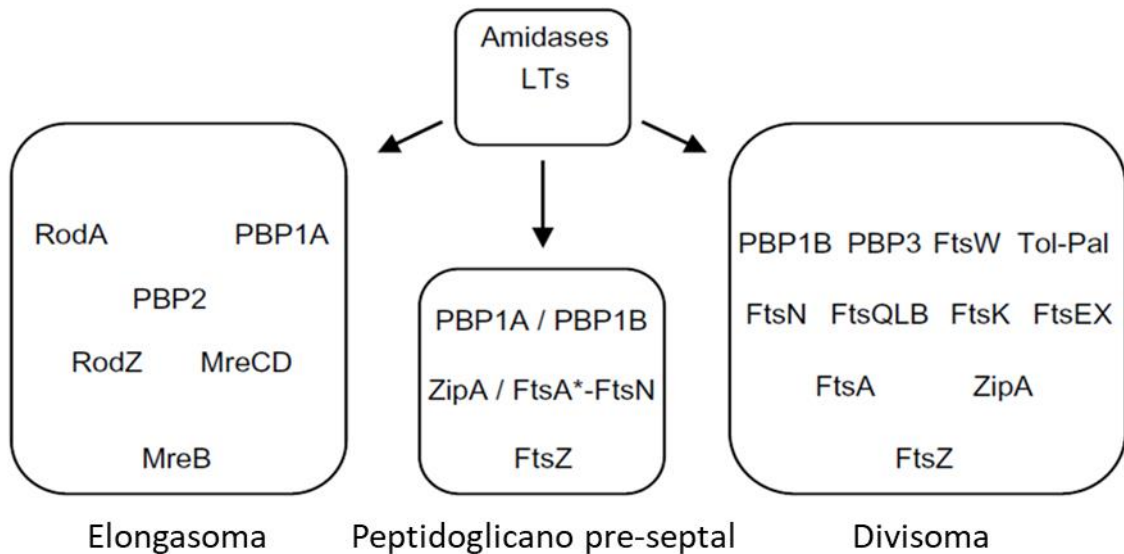


Figura 6. Proteínas que participan en la elongación, crecimiento periférico (peptidoglicano pre-septal) y divisoma. Diagrama que muestra las principales proteínas que participan en el crecimiento por elongación, crecimiento periférico (o pre-septal) y división. Para el caso del elongasoma la proteína reclutadora es MreB, ella se encarga de reclutar a la maquinaria biosintética de peptidoglicano (incluyendo a RodA, PBP2, PBP1A, MreCD y RodZ). En el caso del crecimiento pre-septal poco se conoce sobre las proteínas involucradas en la síntesis. Se conoce que es dependiente de la localización y ensamblaje del anillo Z, por ello que se asocia con FtsZ, FtsA, ZipA. Se piensa que podrían estar involucradas PBP1A y PBP1B como las principales sintetisas de peptidoglicano. Finalmente, el divisoma requiere en su gran mayoría de proteínas tardías de división para poder remodelar una de las capas más complicadas: el peptidoglicano. FtsZ, FtsA y ZipA son necesarias para la presencia del anillo. FtsN, FtsQLB, PBP1B promueven la activación de la síntesis del peptidoglicano a través de PBP3 (FtsI).

Características de *Caulobacter crescentus*

Caulobacter crescentus es una bacteria Gram negativa del grupo de las α -proteobacterias, de vida libre que habita en ambientes oligotróficos. La bacteria *C. crescentus* se caracteriza por tener un ciclo de vida con dos tipos celulares (Figura 7). Los dos tipos celulares de *C. crescentus*, tienen diferencias morfológicas y fisiológicas. La célula hija motil llamada célula nadadora tiene un flagelo polar y un pili. El otro tipo celular es una célula sésil llamada célula prostecada, la cual

presenta en uno de sus polos una extensión de la envoltura celular llamada prosteca. Esta estructura maximiza la superficie de contacto sin aumentar el volumen celular, permitiendo captar mejor los nutrientes del medio oligotrófico. En la punta de la prosteca hay una matriz adhesiva de polisacáridos (Holdfast) que es secretada para anclar a la célula prostecada. Las diferencias morfológicas entre la célula prostecada y la célula nadadora sirven como marcadores que permiten distinguir a la célula madre de la célula hija, característica que hace a *C. crescentus* un modelo para el estudio de la división celular. Además, se pueden separar las células nadadoras de las células prostecadas. Con esta característica se puede hacer el seguimiento de la localización de proteínas fluorescentes a lo largo del ciclo celular en una población homogénea (Collier, 2019). Los cambios morfológicos en *C. crescentus* están asociados a la expresión de 500 genes (Laub et al. 2000; Zhou et al. 2015). La diferenciación celular de *C. crescentus* involucra varios niveles de regulación: transcripcional, postranscripcional, postraducciona l y de localización subcelular. Los genes que son regulados tienen que ver con el establecimiento y mantenimiento de la polaridad, la segregación del DNA, la elongación y la división celular (Sundararajan & Goley, n.d.)

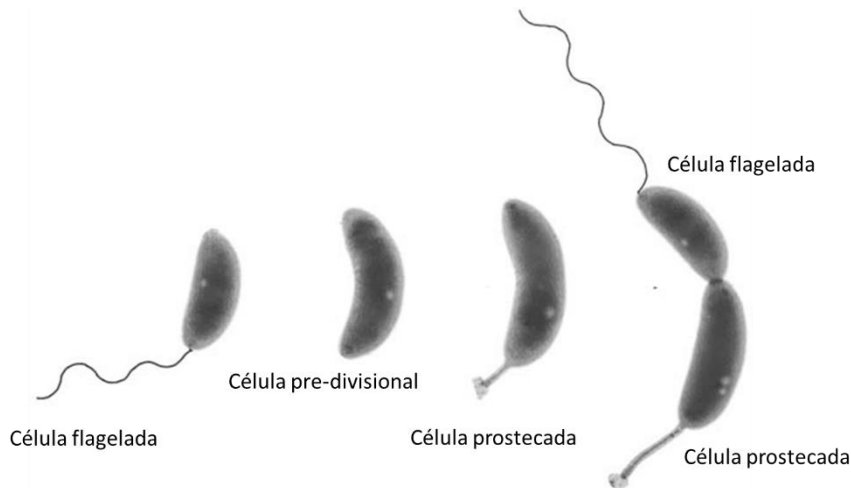


Figura 7. Ciclo celular de *Caulobacter crescentus*. Fotomicrografías de diferentes estadios del ciclo celular de *Caulobacter crescentus*. El ciclo comienza con células flageladas. La célula flagelada pierde el flagelo y el pili. En su lugar, se forma una extensión de la envoltura celular llamada prosteca. La célula prostecada es la única que puede dividirse y formar células flageladas. Las células flageladas para dividirse inician el proceso de diferenciación a células prostecadas.

Regulación de los genes de división y otros eventos del ciclo celular en *Caulobacter crescentus*.

En *Caulobacter crescentus* se coordina la expresión de los genes de división con los eventos del ciclo celular. CtrA es un factor transcripcional que regula genes involucrados en la diferenciación celular y su presencia en la célula nadadora evita que la proteína de división FtsZ se transcriba y se forme el divisoma. Algunas otras proteínas de división son bloqueadas transcripcionalmente por la presencia de CtrA como las proteínas de división MipZ, FtsK o AmiC. Para la transición de célula nadadora a célula predivisional es necesario que el regulador maestro DnaA y la metilasa CcrM estén presentes. DnaA contribuye a la transcripción de FtsZ y CcrM regula el estado de metilación del promotor de FtsZ. En células prostecadas, CtrA es degradada por las proteasas ClpXP and ClpAP (Figura 8) (Collier, 2019).

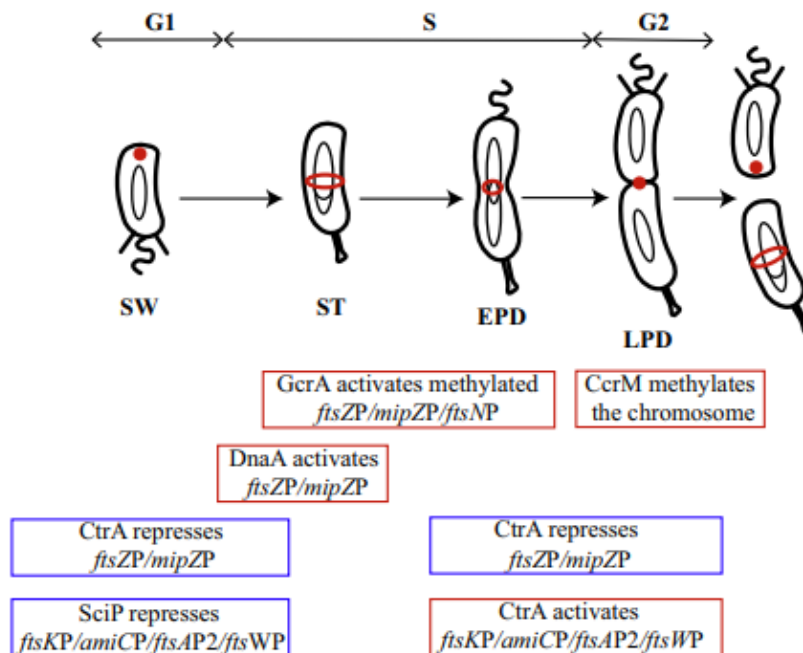


Figura 8. Expresión de los principales reguladores en los diferentes estadios del ciclo celular de *Caulobacter crescentus*. CtrA y SciP son factores de transcripción que promueven los diferentes cambios de la diferenciación celular. Al inicio del ciclo (G1), las células flageladas expresan CtrA y SciP, las cuales bloquean la transcripción de genes involucrados en la división (FtsZ, MipZ, AmiC, FtsK, FtsW, FtsA) En la fase S del ciclo celular, CtrA y SciP se degradan para permitir que el factor de transcripción DnaA y la metilasa GcrA activen la expresión génica de proteínas de división como FtsZ, MipZ y FtsN. Al final del ciclo celular CtrA se vuelve a transcribir para detener la transcripción de proteínas de división temprana, pero si para la activación de la transcripción de proteínas de división tardía. (Tomada de Collier, 2019)

División celular en *Caulobacter crescentus*

En general, el proceso de la división está coordinado en tiempo y espacio con otros eventos del ciclo celular. En *C. crescentus*, al inicio del ciclo celular, FtsZ se localiza en el polo no flagelado de las células. Al comenzar la diferenciación celular, comienza la replicación del cromosoma. El inicio de la replicación hace que una copia del centrómero *parS* se segregue al polo opuesto. Esta segregación involucra la partición de la localización de la proteína ParB, la cual concentra en los polos a MipZ, un regulador negativo de la polimerización de FtsZ. MipZ forma un gradiente

que aumenta en los polos y disminuye a mitad de la célula, este gradiente localiza a FtsZ a la mitad de la célula. A diferencia de otras bacterias, en *C. crescentus* la segregación del cromosoma y la posición del anillo Z están acopladas a los eventos del ciclo celular (Kiekeleybusch & Thanbichler, 2014). El anillo Z se ancla en la membrana interna con ayuda de FzIA, ZapA, FtsE y FzIC (Goley et al., 2011). Una vez anclado, se reclutan componentes involucrados en la síntesis de la pared durante la elongación (Figura 9). En *C. crescentus* la etapa de crecimiento periférico es más evidente que en otras bacterias. Se sabe que MurG y MreB son proteínas que están localizadas en las periferias de FtsZ y se piensa que elongan a la células por medio del crecimiento periférico (Aaron et al., 2007). A la par del reclutamiento de MurG y MreB, se recluta la proteína DipM, que se ha propuesto que regula la hidrólisis de la pared durante la división. En *E. coli* o *B. subtilis* el reclutamiento de componentes de la hidrólisis de la pared ocurre en la etapa tardía. Posteriormente, otras proteínas como Tol-pal, FtsA, FtsN, FtsQ, FtsK, FtsL, FtsB, FtsI, FtsW y Dipl son reclutadas en el sitio de la división (Goley et al., 2011). En *C. crescentus*, el tiempo en el que el divisoma está presente, durante el ciclo celular es más largo en comparación con otras bacterias. Este evento sugiere diferencias en la regulación del divisoma y explica la etapa tan larga por la cual las células se elongan por medio de crecimiento periférico (Aaron et al., 2007). Es notable que hay diferencias en el reclutamiento, así como en los componentes del divisoma comparado con *E. coli*. Hay ausencia de proteínas accesorias y presencia de algunas otras que no se habían descrito para otras bacterias. Tal es el caso de DipM una proteína de división presente en *C. crescentus* y ausente en *E. coli*.

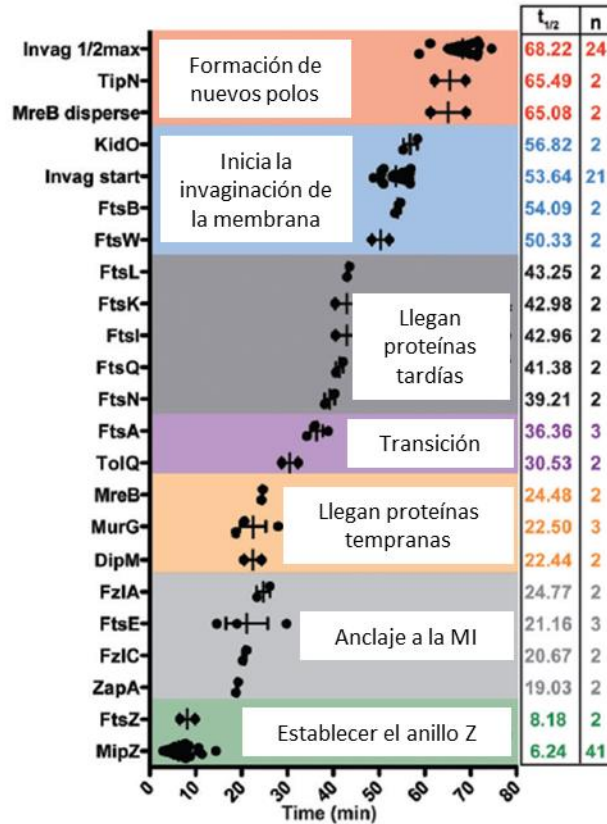


Figura 9. Tiempos de reclutamiento de las proteínas de división en *Caulobacter crescentus*.

Para la determinación de los $t^{1/2}$ de la localización se tomó en cuenta que el ciclo celular de *C. crescentus* dura 90 minutos. A diferencia del ensamblaje del divisoma de *E. coli*, en *C. crescentus* hay siete estadios durante la división. El primer estadio comienza con el establecimiento del sitio de la división, el segundo tiene que ver con el reclutamiento de las proteínas que se unen a FtsZ para anclar el anillo a la membrana. El tercero y cuarto estadio tiene que ver con el ensamblaje de componentes de división con funciones diversas en los que destacan proteínas esenciales del remodelaje de la pared. El quinto estadio involucra un retraso en el reclutamiento para permitir el crecimiento periférico (pre-septal) y marca el inicio del reclutamiento de proteínas de división tardía. El sexto paso involucra el inicio de la invaginación de las membranas y es notorio que en este punto comienza la constricción celular. Finalmente, en el séptimo paso se identifican los nuevos polos a través de la localización diferencial de TipN. Modificado de Goley et al., 2011

DipM es una proteína de división temprana de *Caulobacter crescentus*.

En *C. crescentus* se propuso originalmente que la proteína DipM estaba encargada de la remoción de la pared durante la división (Möll et al., 2010). Esta idea proviene de observar el fenotipo de la mutante en DipM, la cual produce células filamentosas. La pared se acumula a lo largo de todo el cuerpo celular e, incluso en algunos sitios la acumulación forma un septo que separa a dos células hijas (Goley et al., 2010; Möll et al., 2010; Poggio et al., 2010). Probablemente, las zonas con mayor acumulación fueron sitios de división en donde el peptidoglicano no terminó de hidrolizarse (Figura 10).

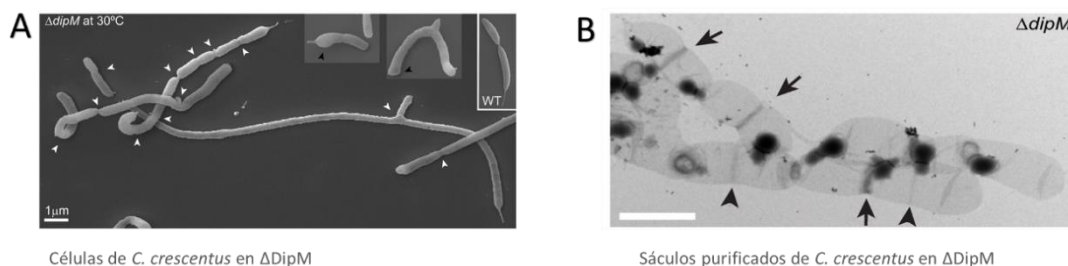


Figura 10. Fenotipo de la mutante en DipM. A. Foto micrografías electrónicas de barrido de la mutante en DipM. Las cabezas de flecha señalan sitios de constricción (Poggio et al., 2010). B. Fotomicrografía electrónica de transmisión del peptidoglicano purificado (sáculos) de una cepa mutante en DipM. Las flechas y puntas de flecha señalan los sitios en donde se formaron septos. Modificado de Poggio, 2010.

Al igual que EnvC y NlpD, DipM tiene en el extremo C-terminal un dominio LytM de peptidasa. Como ya se mencionó, este tipo de endopeptidasas se caracterizan por tener una firma de tres aminoácidos (HEXXH) que coordinan con Zn^{+2} . El dominio LytM de DipM no tiene los aminoácidos conservados para poder coordinar el metal, por lo que se sugiere que DipM es un regulador de la hidrólisis de la pared, tal como las proteínas homólogas de *E. coli* EnvC y NlpD. Sin el dominio LytM, DipM puede localizarse, pero no puede llevar a cabo la función reguladora. Además, se sabe que la expresión del dominio LytM complementa parcialmente el fenotipo de una mutante en DipM, indicando que el dominio N-terminal es necesario para aumentar

la eficiencia del dominio LytM (Goley et al., 2010; Möll et al., 2010; Poggio et al., 2010).

En el extremo N- terminal de DipM hay cuatro dominios LysM arreglados en dos tándems. Cada tándem está separado por regiones ricas en prolinas. Los dominios LysM se unen a polisacáridos, en particular al N-acetilglucosamina, uno de los disacáridos que forman parte de la estructura del peptidoglicano. En otras proteínas, se ha descrito que los dominios LysM dirigen a las enzimas hacia su sustrato, favoreciendo la unión de la proteína hacia el sitio de acción (Buist et al., 2008). En el caso de DipM, los dominios LysM permiten que DipM se localice en el sitio de la división o en la base de la prosteca (Figura 11) (Goley et al., 2010; Möll et al., 2010; Poggio et al., 2010).

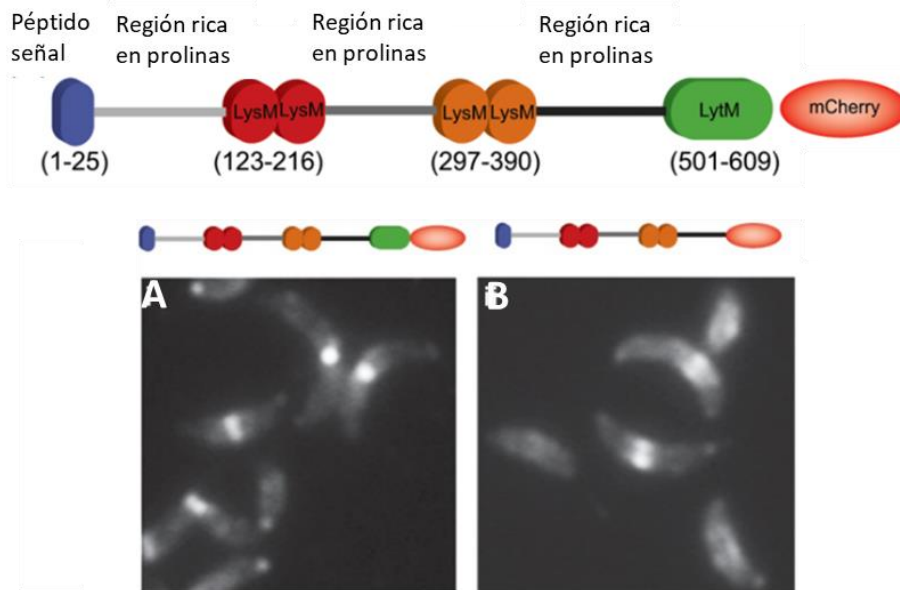


Figura 11. DipM se localiza en el sitio de la división y en la base de la prosteca. Fotomicrografías de epifluorescencia de la proteína de fusión DipM-mCherry. 11A. La versión fluorescente de DipM se localiza en el sitio de la división y en la base de la prosteca. 11B. La versión fluorescente de 4 dominios LysM se localiza en el sitio de la división y en la base de la prosteca (Poggio et al., 2010).

DipM también se localiza en la base de la prosteca justo cuando la prosteca comienza a extenderse. En un ciclo celular de 120 min, DipM se localiza en la base de la prosteca desde los 30 minutos. A los 60 min, la proteína comienza a localizarse en el sitio de la división. Cuando la bacteria está en las últimas etapas de la división, DipM se ve reclutada por completo en el sitio de la división (Figura 11) (Möll et al., 2010; Poggio et al., 2010).

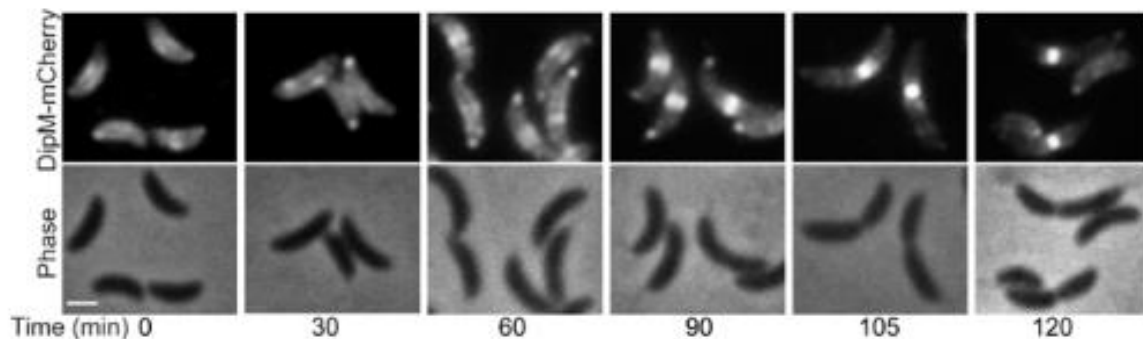


Figura 12. Localización de DipM a lo largo del ciclo celular. Fotomicrografías de epifluorescencia de células sincronizadas de *C. crescentus*. A partir de un cultivo de células sincronizadas (tiempo 0) se evaluó la localización de DipM-mCherry en diferentes estadios del ciclo celular (30, 60, 90 105 y 120 minutos). Modificada de Poggio et al; 2010

Se ha propuesto que la localización de DipM es dependiente de FtsN (Möll et al., 2010). Esta afirmación proviene de un experimento en donde se evaluó la localización de DipM-Venus en una condición que abate la expresión de FtsN. En este experimento, se observó que la localización de DipM se ve afectada por la ausencia de FtsN. Cabe destacar que FtsN tiene un rol fundamental en la activación de la síntesis de la pared durante la división; en *E. coli* se ha descrito que FtsN es necesaria para reclutar a la endopeptidasa inactiva EnvC (Weiss, 2015). Con estos antecedentes, se ha propuesto que la localización de DipM ocurre por la interacción con FtsN, sin embargo, es poco probable que FtsN reclute a DipM, ya que FtsN es una proteína de división tardía y a diferencia de DipM, FtsN se recluta en las últimas etapas de la división.

Sobre la localización de DipM se sabe que es la porción N-terminal es necesaria para la localización de la proteína. En el extremo C-terminal, DipM cuenta con un dominio LytM, el cual es importante para la función de la proteína. Sin embargo, el dominio LytM no es necesario para la localización de la proteína (Figura 13B). Además, se conoce que cuatro dominios LysM se localizan en el sitio de la división (Figura 13C). Dos dominios LysM del primer tándem son suficientes para localizar en el sitio de la división, aunque no forman una banda en el sitio de la división tan fuerte como lo hace la versión con cuatro dominios LysM (Figura 13-13C). Sin embargo, un solo dominio LysM del primer tándem no es suficiente para localizar a la proteína (Figura 13 D-E). Por otro lado, el segundo tándem LysM es incapaz de localizar a la proteína, a pesar de compartir un gran porcentaje de identidad con el primer tándem (Figura 13F). Cabe destacar que se ha comprobado que los dominios LysM se unen al peptidoglicano en ensayos *in vitro* (Möll et al., 2010), lo cual nos hace pensar que la localización de DipM requiere la unión del peptidoglicano pre-septal por medio de los domions LysM.

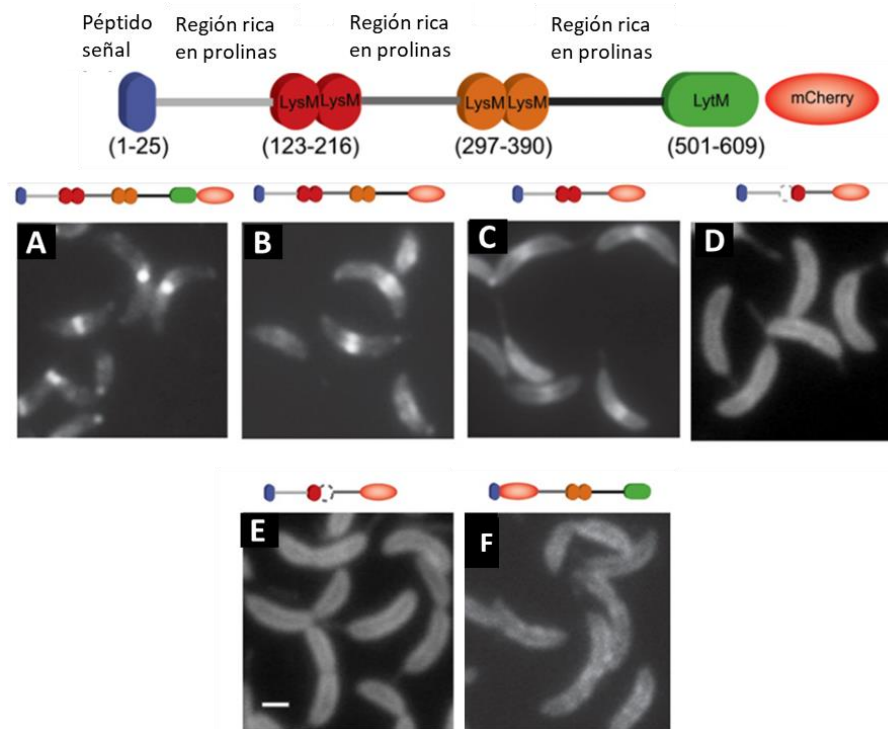


Figura 13. La localización de DipM es dependiente del primer tándem LysM. Fotomicrografías de fluorescencia de versiones truncas de la fusión DipM-mCherry. **13A.** Localización de DipM-mCherry (Versión completa de la proteína) **13B.** Localización de los cuatro dominios LysM-mCherry. Esta versión indica que los dominios LysM no requieren el dominio LytM para localizarse. **13C.** Localización del primer tándem de dominios LysM-mCherry. El primer tándem puede localizar por si solo a la proteína. **13D-E.** Localización del segundo y primer dominio LysM-mCherry. Esta versión nos dice que es necesaria la presencia de los dominios en tándem para localizar a la proteína. **13F.** Localización de la proteína del segundo tándem de dominios LysM-mCherry. Esta versión nos dice que el segundo tándem es incapaz de localizar a la proteína por si sola.

Los dominios LysM se unen a carbohidratos.

El primer dominio LysM fue descubierto en el fago de *Bacillus* f29. El genoma del fago codifica para una proteína de 44 residuos de aminoácidos y es esencial para la lisis celular (Garvey *et al.*, 1986). Hoy se conoce que los dominios LysM están presentes en desde virus hasta eucariontes (PFAM PF01476). Estos dominios se encuentran principalmente en enzimas líticas bacterianas como en hidrolasas de peptidoglicano como peptidasas, quitinasa y en menor medida en enzimas de tipo

esterasas, reductasas y nucleosidasas. Pueden estar un solo dominio o bien en tándem como el caso de DipM. En el caso de las proteínas con solo un dominio LysM, estos van a estar separados por espaciadores. Los residuos de aminoácidos más abundantes en los espaciadores son serina, treonina, ácido aspártico o prolina (Buist et al., 2008) (Bayram et al., 2015).

El estudio de proteínas con dominios LysM se remite a las múltiples funciones que tienen estas proteínas (Figura 14). Una de las más estudiadas es la participación de los dominios LysM en el reconocimiento de hospederos. Algunas plantas utilizan proteínas con dominios LysM como parte del sistema de reconocimiento contra patógenos. Estos dominios pueden unir quitina, componente principal de la pared celular de hongos, este reconocimiento activa una cadena de señales que preparan el sistema inmune de las plantas para combatir contra la posible infección (Bayram et al., 2015). Algunos estudios sobre la caracterización de la unión de los dominios LysM indican que el N-acetilglucosamina pudiera ser el ligando más común en los dominios LysM, al menos para aquellos dominios que están presentes en proteínas bacterianas (Wong et al., 2014).

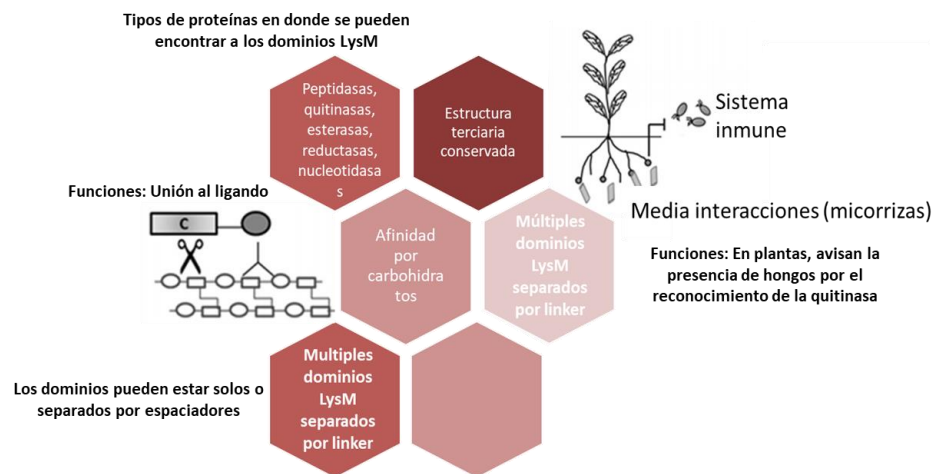


Figura 14. Funciones de los dominios LysM. Los dominios LysM unen con gran afinidad carbohidratos. Esta unión permite que proteínas catalíticas se acerquen a su sitio de acción, también permite que plantas reconozcan la presencia de hongos, lo cual es fundamental para el establecimiento de micorrizas o la activación del sistema inmune de las plantas.

Caracterización de la dinámica de unión de los dominios LysM.

La determinación de la estructura terciaria de la primera proteína con dominios LysM fue la transglicosilasa, MltD (Bateman & Bycroft, 2000). La proteína tiene un motivo estructural $\beta\alpha\beta$. La estructura de MltD ha servido como molde para la resolución de la estructura terciaria de otras proteínas como YkuD de *Bacillus subtilis* o del receptor CVNH-LysM de un Ascomiceto (Buist et al., 2008). Las tres proteínas tienen dos residuos de glicina muy importantes para la unión al sustrato. En otro trabajo realizado en *Medicago trunculata* se describieron características físicas de los dominios LysM. En *Medicago trunculata* hay un receptor cinasa NFP con tres dominios LysM. El primer dominio LysM está positivamente cargado pero el segundo es predominantemente negativo. Esto sugiere que, en esta proteína, cada dominio LysM tiene características de unión distintas. Por otro lado, en este mismo receptor cinasa se ha intentado predecir el sustrato preferencial usando como modelo a la transglicosilasa, MltD. Mediante dinámica molecular se determinó que los dominios LysM de *M. trunculata* pueden preferir diferencialmente entre N-acetilglucosamina O-acetilada o no O-acetilada. Esta preferencia puede cambiar según el estado de glicosilación de la proteína (Arrighi et al., 2006). Finalmente, uno de los trabajos más detallados sobre la dinámica de unión de los dominios LysM es el de la proteína Quitinasa A de *Pterys ryukensis*. Usando técnicas de calorimetría de titulación isotérmica (ITC) identificaron que un solo dominio LysM une con mayor afinidad oligómeros con más de cuatro unidades de N-acetilglucosamina. En este trabajo describieron la estructura terciaria de la proteína unida a un oligómero de cuatro unidades de N-acetilglucosamina. También identificaron la región de la proteína que interactúa con la pared. La región que comprende entre la primera hélice y segunda beta se forma por un surco enriquecido de aminoácidos hidrofóbicos. Además entre la segunda beta y alfa hélice hay una región con aminoácidos que también participan en la unión al sustrato (Figura 15). En este trabajo, se identificaron al menos 10 residuos de aminoácidos que conforman estas zonas. Se cambiaron estos residuos por alaninas y se evaluó la unión al sustrato. Solo los residuos de aminoácidos mutados en C94,

C71 y Y72 perdieron la capacidad de unir oligómeros de N-acetilglucosamina. En resumen, este trabajo es el primero en caracterizar la unión de un dominio LysM a N-acetilglucosamina (Ohnuma, 2007).

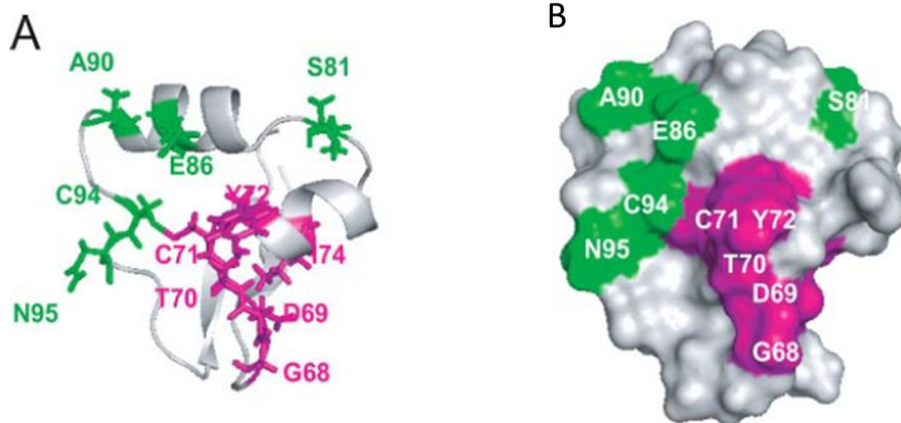


Figura 15. Estructura terciaria del segundo dominio LysM de Quitinasa A. Los aminoácidos marcados en verde y rosa son aquellos que interactúan con un oligosacárido de N-acetilglucosamina. A. Elementos de estructura secundaria del primer tándem LysM. B. Modelo que representa la superficie molecular del dominio LysM (Ohnuma, 2007).

Localización de proteínas con dominios LysM.

El estudio de la localización de proteínas con dominios LysM a través de microscopia de fluorescencia ha revelado que estos dominios favorecen la localización de proteínas catalíticas hacia los sitios de interés. Un ejemplo de ello es la proteína AcmA, que se une específicamente al peptidoglicano que crece en los polos de *L. lactis*. Se ha sugerido que la localización celular de AcmA se debe a que los dominios LysM no unen el peptidoglicano porque está recubierto por ácidos teicoicos. En Gram positivas, la pared celular se encuentra recubierta por ácidos teicoicos en casi todo el cuerpo celular (excepto en los polos y sitio de la división) (Steen et al., 2003). El mismo mecanismo de localización se ha sugerido para la endopeptidasa LytF de *B. subtilis*. Esta proteína tiene 3 dominios LysM en el C-terminal. La localización celular de LytF ha revelado un patrón de localización similar al de AcmA. En LytF se ha comprobado en ensayos *in vitro* que la proteína se une

con más afinidad al peptidoglicano libre de ácidos teicoicos (Figura 16). Los dominios LysM llevan a la proteína LytF hacia el sitio de la división tras reconocer diferencialmente el peptidoglicano (Yamamoto et al., 2008).

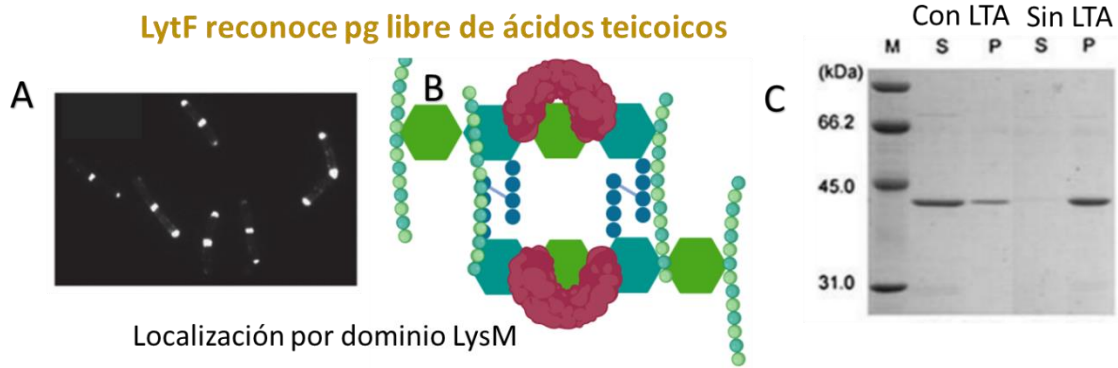


Figura 16. Localización de LytF de *B. subtilis*. El modelo de localización propuesto para LytF. **16A** LytF se localiza en el sitio de la división y en los polos (Yamamoto et al., 2008). **16B.** En el modelo de localización propuesto para LytF, los dominios LysM no pueden unirse al peptidoglicano que ha sido modificado con ácidos teicoicos. Durante el crecimiento pre-septal, la inserción de ácidos teicoicos es una de las últimas etapas durante la síntesis del peptidoglicano, la ausencia de ácidos teicoicos permite que LytF se localice en el sitio de la división cuando su actividad peptidasa es requerida. **16C.** Western Blot anti FLAG. S=sobrenadante P=pellet. Ensayos de unión de LytF-FLAG con peptidoglicano purificado con y sin ácidos teicoicos. En este western se comprueba la incapacidad de los dominios LysM de unirse al peptidoglicano que esta modificado con ácidos teicoicos. Modificada de (Yamamoto et al., 2008).

Hipótesis

La localización de DipM depende de la unión con el peptidoglicano que se sintetiza en el sitio de la división.

Objetivo

Caracterizar el mecanismo de localización de DipM en *Caulobacter crescentus*.

Objetivos particulares

1. Obtener versiones truncas de DipM y evaluar su localización *in vivo* en *C. crescentus*
2. Predicción de los residuos involucrados en de DipM con el peptidoglicano.
3. Obtener mutantes puntuales en los aminoácidos de DipM que presuntamente estén involucrados en el reconocimiento del peptidoglicano.
4. Evaluar la localización *in vivo* de las mutantes puntuales de DipM en *C. crescentus*.

Materiales y Métodos

Cepas bacterianas, plásmidos y condiciones de crecimiento utilizados

Todas las cepas de *E. coli* fueron crecidas en medio LB (1L: 10g bactotripton, 5g extracto de levadura y 10g NaCl) con su respectivo antibiótico a 37°C en agitación. Los cultivos en medio sólido contenían 15g/L de Bacto agar. Las cepas de *C. crescentus* crecieron en PYE a 30°C en agitación (1L: 2g bactopectona, 1g extracto de levadura, 1mL MgSO₄ 1M, 0.5mL CaCl₂ 1M).

Cuando fue necesario, se indujo la expresión de los genes que se encuentran en segunda copia a partir del promotor VanA con 1/100 v/v de una solución de ácido vanílico 30mM o a partir del promotor XylR con 1/100 v/v de una solución de xilosa al 30%. Los plásmidos y cepas utilizadas en este trabajo están enlistados en las tablas 1 y 2.

Técnicas de biología molecular y Western Blot.

Diseño de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos fueron diseñados en el programa DNAMAN. El diseño tomó en cuenta los siguientes criterios: 1) Que la temperatura media de desnaturalización (T_m) fuera similar para cada par de oligos, 2) Que el tamaño de los oligos fuera entre 19 y 24 nucleótidos 3) Que la ausencia de estructura secundaria 4) Adición de CAAA en la región 5'. Las secuencias de los oligonucleótidos se enlistan en la tabla 3.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las reacciones se realizaron con 17µl H₂O, 25µl Buffer 2X, 5µl dNTPs 2mM, 1.5µl de cada oligonucleótido 100pm, 100ng de DNA cromosómico de la cepa CB15N o 100pg de DNA plasmídico, 0.5µl DNA Polimerasa PRIME STAR (Takara). El programa utilizado constó de 5 pasos:

1. Desnaturalización inicial del DNA: 95°C por 3 min
2. Desnaturalización del DNA: 95°C por 30 seg
3. Alineamiento de los oligos: 58°C por 30 seg
4. Elongación a 72°C (un minuto por cada 1000 pares de bases)
5. 72°C por 10 min.

Los pasos 2, 3 y 4 se repiten 30 veces.

Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa (QIAquick gel extraction).

Las muestras resultantes del PCR se corren en un gel de agarosa al 1%. El gel se tiñió con bromuro de etidio (BrEt) a una concentración de 0,5 g / ml. Posteriormente se cortó la banda de interés con ayuda de una lámpara de luz U.V. de longitud de onda larga. Para disolver el gel, se añadió 500 µl de buffer captura y se incubó por 15-30 min a 65°C. Después, se colocó la solución en una columna QIAquick y se centrifugó a 10,000 rpm por 30 seg. Posteriormente se agregaron 500 µl de Buffer de lavado y se centrifugó por 1 minuto a 10,000 rpm. Se desechó el sobrenadante y se centrifugó por segunda otra vez. Finalmente se colocó la columna en un tubo de plástico de 1.5ml, se agregaron 40 µl de agua ultrapura libre de DNAsas en el centro de la columna y se centrifugó a máxima velocidad por un min para precipitar al fonde de la columna el DNA purificado. El DNA se cuantificó por espectrofotometría a 260 nm y se corroboró la integridad del producto purificado por electroforesis en geles de agarosa.

Digestión enzimática de productos de PCR y plásmidos.

Las reacciones de restricción incluyen agua ultrapura libre de DNAsas, buffer específico para cada enzima y el DNA (Ya sea de origen plasmídico o productos de

PCR). Las reacciones se incuban a 37°C por al menos 2 horas. Después de cada digestión se comprueba la estabilidad del DNA por medio de electroforesis en geles de agarosa. Al finalizar la digestión, estas se inactivaron a 80° durante 15 min. Las digestiones realizadas se enlistan en la tabla 4.

Ligación de un fragmento de DNA y un plásmido.

Las reacciones de ligación incluyen 4.5 µl H₂O, 1 µl de Buffer 10X, 1.5 µl de ATP 10mM, plásmido 1 µl 100ng, fragmentos de DNA 2 µl y 0.5 µl de ligasa. Esta mezcla se incubaba a 16°C por al menos 2 horas. Es recomendable mantener la estequiometría en una relación 1:3 entre el plásmido y el fragmento. Las ligaciones realizadas se enlistan en la tabla 5.

Transformación por electroporación.

Se requieren células electro competentes preparadas previamente, las cuales están libres de sales, resuspendidas en glicerol y crio preservadas a -70°C. En una celda de electroporación se colocan 40 µl y 1 µl del producto de ligación. Se da un pulso rápido de 1.8kV para el caso de *E. coli* y 1.6kV para el caso de *C. crescentus* en un equipo de electroporación. Inmediatamente después se permitió la recuperación de las células agregando 1 ml de medio de cultivo (LB o PYE) y se incubó por una hora a la temperatura de crecimiento indicada para cada organismo. Al paso de una hora, las células se concentraron por centrifugación y se dispersan con una espátula en una caja petri con el medio y el antibiótico de selección específicos para cada caso.

Purificación de plásmidos mediante minipreparaciones hervidas.

Para seleccionar la presencia del plásmido de interés se prepararon mini preparaciones hervidas. Para ello vertió 1 ml de cultivo estacionario a un tubo de

centrífuga de 1.5ml. Se centrifugó y se desechó el sobrenadante. Se resuspendió en 300µl de solución STET (8% v/v de sacarosa, 50 mM de EDTA pH 8.0, 5% v/v tritón y 50mM Tris-HCl pH 8.0) y 20µl de lisozima 10 mg/ml. La mezcla se agitó en vórtex durante 5 seg. Luego se hirvió por otros 45 seg. Posteriormente se centrifugó 15 min a 13,000 rpm a temperatura ambiente. El sobrenadante se cambió a otro tubo de centrífuga de 1.5 ml y se agregó 300µl de isopropanol. Se agitó en vórtex y se dejó reposar por 10 min en hielo. Después se centrifuga en frío (4°C) durante 20 min a 14, 000 rpm. Se decantó el sobrenadante y la pastilla formada se lavó con etanol al 70%. Se deja secar el pellet a 65°C durante 20 min. Finalmente se añaden 40µl de H₂O de agua ultra pura libre de DNAasas.

Purificación de plásmidos con el Kit QIAprep Spin Miniprep (columnas QIAGEN).

Se centrifugó 10 ml de cultivo en fase estacionaria por 6 minutos a 4,500 rpm. Una vez centrifugado, se añadió al pellet 750µl de buffer P1 y 20µl de RNAsa 10mg/ml. La mezcla se agitó con vórtex y se trasladó a tres tubos Eppendorf en partes iguales. Se agregó a los tubos 300µl de buffer P2 y se agitó cuidadosamente por inversión. Se dejó reposar 5 minutos. Posteriormente se agregaron 350µl de buffer N3. Se centrifuga 20 minutos a 1400 rpm a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se desechó el pellet. El sobrenadante se vació a una columna QIAGEN. Se centrifugó 1 min a temperatura ambiente. Se añadieron 500µl de buffer PB y se centrifugo 30 seg a 10,000 rpm. Posteriormente 750µl de buffer PE, la columna se centrifugó dos veces por un minuto para asegurarse que se removieron todos los excesos de etanol en. Finalmente la columna se pone colocó en un tubo de centrífuga de 1.5 ml y se le agregan 50 µl de H₂O dejando reposar por 1 minuto, después se centrifugo a 8,000 rpm durante 1 min.

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

Una alícuota de 200 µl de un cultivo de PYE en fase estacionaria de la cepa donadora de *C. crescentus*, se infectó por 30 min con diferentes cantidades de bacteriófago CR30, desde $10^{-2}ufc / g$ hasta $10^{-4}ufc / g$,. Estas diluciones se

mezclaron con PYE agar suave (PYE con 0.3% de agar. El agar se funde y luego se enfría a 45-50°C), el cual se vierte por inversión sobre una caja con medio sólido PYE y se incuba a 30°C toda la noche. Al día siguiente se seleccionó la dilución en la que se formaron de placas de lisis con mayor confluencia. Se retiró el PYE- agar suave para lavarlo con 4 ml de PYE y 100 µl de cloroformo en agitación constante durante 1 hora. Se recuperó el sobrenadante después de centrifugar y se agregaron otros 100 µl de cloroformo. El DNA viral se inactivó por irradiación con luz UV durante un minuto. Estos bacteriófagos se ocupan para transducir diferentes alelos de interés en cepas receptoras. Para transducir, se tomó una alícuota de 200 µl en medio rico PYE de la cepa receptora y se mezcló con 50 µl del bacteriófago durante 30 min a temperatura ambiente y luego se dispersó con una espátula sobre una caja con PYE con el antibiótico de selección.

Microscopía de fluorescencia.

Las imágenes de microscopía de fluorescencia se obtuvieron mediante un microscopio Nikon E600 acoplado a una cámara Hamamatsu ORCA-ER. Las células se inmovilizaron sobre una película de agarosa al 1.5% disuelta en un buffer de sales M2 1X y se observaron a 1,000 aumentos con contraste de fases. La fluorescencia de las diferentes fusiones se detectó mediante el filtro mCherry nm/610nm. Las imágenes se procesaron con Image J. El procesamiento de las imágenes incluía el ajuste del brillo y la remoción del fondo negro en segundo plano,

Ensayo de inmunodetección por Western-blot.

Para este ensayo se preparan extractos totales a partir de cultivos de *C. crescentus* crecidos a una densidad óptica de 0.3 D.O. (660nm). Para ello se concentró 1 ml de cultivo por centrifugación y se removió el sobrenadante. Se resuspendió en buffer de fosfatos M21X. Se sonicaron las células dos veces por 10 seg. Todos los extractos proteicos se cuantificaron por ensayos de Bradford (BioRad) y la cantidad

de proteína total cargada en los geles de acrilamida fue ajustada a 3 µg de proteína. A los extractos proteicos se les agregó 1 volumen de Magic mix 2X (Magic mix para 10 mL: 1mL Tris 1M pH 6.8, 2mL glicerol 100%, 2mL SDS 10%, 80µl EDTA 0.5M, H₂O, azul de bromofenol y 200µl β-mercaptoetanol) y se hirvieron por 5 min. Estos fueron los extractos totales que se separaron por electroforesis en un gel de acrilamida (Gel separador 12%: 2mL Acrilamida Bisacrilamida, 1.875mL Tris 1M pH 8.8, 50µl SDS 10%, 40µl Persulfato de amonio 10%, 1mL H₂O, 3µl solución TEMED; Gel concentrador: 4%: 0.335mL Acrilamida Bisacrilamida, 0.3125mL Tris 1M pH 6.8, 25µl SDS 10%, 25µl Persulfato de amonio 10%, 1.8mL H₂O, 1,5µl solución TEMED). El gel corrió a 25 mA con buffer de proteínas (para 1L de buffer de proteínas: 14.4g Glicina, 3g Tris Base, 10mL SDS 100%). Una vez que se corrió el gel, se transfirió a una membrana de nitrocelulosa con buffer de transferencia (buffer de Transferencia 1L: 0.32g Carbonato de sodio, 0.84g Bicarbonato de sodio, 200mL Metanol y aforar con agua fría a 1 L.) La transferencia se realizó superponiendo la membrana semihúmeda al gel con carga durante una hora a 250mA. Posteriormente, la membrana se bloqueó con una solución de TBS Tween20 1x- y leche semidescremada en polvo al 1% durante 1 hora con agitación (TBS Tween 1x 500mL: 50mL TBS 10x en 450mL de agua, añadir 500 mL de Tween). Se hicieron 3 lavados, cada lavado tuvo un lapso de 15 minutos con TBS Tween. Posteriormente se incubó a la membrana con anticuerpo primario. El cual es un anticuerpo primario monoclonal anti-RFP generado contra mCherry y se colocó en una proporción 1:30,000. Este anticuerpo se incubó durante 1 hora. Después después se lavó 3 veces con TBS-Tween20. Posteriormente, se añadió el anticuerpo secundario anti- igG de ratón en una proporción 1:15, 000 durante una hora. Posteriormente se después se lavó 3 veces con TBS-Tween, Después del último lavado se agregó a la superficie de la membrana una solución de Nitro-tropix (900µl tropix y 100µl tropix nitroblock) durante 5 minutos. Como último paso, la membrana se revela en placas R-X, con exposición de 5, 10, 15 minutos, dependiendo de la banda que se desee observar.

Tabla 1. Plásmidos utilizados en este trabajo.

Plásmido	Descripción	Referencia
pVCHYC4	Plásmido integrativo en el locus Van:: <r< td=""> <td>Martin Thanbichler. et., al, 2007</td> </r<>	Martin Thanbichler. et., al, 2007
PVCHYC4::LysM1	Plásmido para expresar LysM1	Este trabajo
PVCHYC4::LysM2	Plásmido para expresar LysM2	Este trabajo
PVCHYC4::LysM3	Plásmido para expresar LysM3	Este trabajo
PVCHYC4::LysM4	Plásmido para expresar LysM4	Este trabajo
PVCHYC4::LysM4Y155A	Plásmido para expresar la versión LysM4 con el cambio Y155A	Este trabajo
PVCHYC4::LysM4F182A	Plásmido para expresar la versión LysM4 con el cambio F182A	Este trabajo
PVCHYC4::LysM4F188A	Plásmido para expresar la versión LysM4 con el cambio F188A	Este trabajo
PVCHYC4::LysM4H297A	Plásmido para expresar la versión LysM4 con el cambio H297A	Este trabajo
PVCHYC4::LysM4Y312A	Plásmido para expresar la versión LysM4 con el cambio Y312A	Este trabajo
PVCHYC4::LysM4Y347A	Plásmido para expresar la versión LysM4 con el cambio Y347A	Este trabajo
PVCHYC4::LysM4F362A	Plásmido para expresar la versión LysM4 con el cambio F362A	Este trabajo

Tabla 2. Cepas utilizadas en este trabajo

Cepas	Descripción	Referencias
Top10	Cepa de Escherichia coli usada para clonación	Invitrogen
CB15N	Cepa sincronizable de C. crescentus derivada de la cepa silvestre CB15	Evinger M. y Agabian N., 1977
TH4	Cepa de C. crescentus que expresa bajo el promotor de vanílico dos dominios LysM con una fusión de mCherry en el C-terminal CB15N vanR::pVLysM2mCherry	Este trabajo
TH5	Cepa de C. crescentus que expresa bajo el promotor de vanílico tres dominios LysM con una fusión de mCherry en el C-terminal CB15N vanR::pVLysM3mCherry	Este trabajo
TH6	Cepa de C. crescentus que expresa bajo el promotor de vanílico cuatro dominios LysM con una fusión de mCherry en el C-terminal CB15N vanR::pVLysM4mCherry	Este trabajo
TH7	Cepa de C. crescentus que expresa bajo el promotor de vanílico los dominios LysM 2 y 3 con una fusión de mCherry en el C-terminal CB15N vanR::pVLysM2-3mCherry	Este trabajo
TH8	Cepa de C. crescentus que expresa bajo el promotor de vanílico los dominios LysM 3 y 4 con una fusión de mCherry en el C-terminal CB15N vanR::pVLysM3-4mCherry	Este trabajo
TH 155	Cepa de C. crescentus que expresa la versión LysM4mCherry con el cambio Y155A CB15N vanR::pVLysM4 Y155A	Este trabajo

TH 182	Cepa de <i>C. crescentus</i> que expresa la versión LysM4mCherry con el cambio F182A CB15N vanR::pVLysM4 F182A	Este trabajo
TH 188	Cepa de <i>C. crescentus</i> que expresa la versión LysM4mCherry con el cambio F188A CB15N vanR::pVLysM4 F188A	Este trabajo
TH 297	Cepa de <i>C. crescentus</i> que expresa la versión LysM4mCherry con el cambio H297A CB15N vanR::pVLysM4 H297A	Este trabajo
TH 312	Cepa de <i>C. crescentus</i> que expresa la versión LysM4mCherry con el cambio Y312A CB15N vanR::pVLysM4 Y312A	Este trabajo
TH 347	Cepa de <i>C. crescentus</i> que expresa la versión LysM4mCherry con el cambio Y347A CB15N vanR::pVLysM4 Y347A	Este trabajo
TH 362	Cepa de <i>C. crescentus</i> que expresa la versión LysM4mCherry con el cambio F362A CB15N vanR::pVLysM4 F362A	Este trabajo

Tabla 4. Digestiones realizadas

Nombre	Descripción	Digestión	Especificaciones
PVCHYC4	Plásmido Martin Thanbichler. et., al, 2007	Ndel/EcoR	Ambas enzimas se digieren por 4 horas con buffer 4 de NEB A 37°
LysM1	Producto de PCR que amplifica el primer dominio de dominios LysM	Ndel/EcoR	Ambas enzimas se digieren por 4 horas con buffer 4 de NEB A 37°

LysM2	Producto de PCR que amplifica el primer tándem de dominios LysM	NdeI/EcoR I	Ambas enzimas se digieren por 4 horas con buffer 4 de NEB A 37°
LysM3	Producto de PCR que amplifica los tres dominios LysM	NdeI/EcoR I	Ambas enzimas se digieren por 4 horas con buffer 4 de NEB A 37°
LysM4	Producto de PCR que amplifica ambos tándems de dominios LysM	NdeI/EcoR I	Ambas enzimas se digieren por 4 horas con buffer 4 de NEB A 37°
dipM155Y-A	Producto de PCR que amplifica el plásmido PVCHYC4::LysM4 con la mutación puntual Y155A	DpnI	Se digirió por 4 horas con Buffer Cutsmart de NEB a 37°
dipM188F-A	Producto de PCR que amplifica el plásmido PVCHYC4::LysM4 con la mutación puntual Y188A	DpnI	Se digirió por 4 horas con Buffer Cutsmart de NEB a 37°
dipM182F-A	Producto de PCR que amplifica el plásmido PVCHYC4::LysM4 con la mutación puntual Y182A	DpnI	Se digirió por 4 horas con Buffer Cutsmart de NEB a 37°
dipM312F-A	Producto de PCR que amplifica el plásmido PVCHYC4::LysM4 con	DpnI	Se digirió por 4 horas con Buffer Cutsmart de NEB a 37°

	la mutación puntual F312A		
dipM297H-A	Producto de PCR que amplifica el plásmido PVCHYC4::LysM4 con la mutación puntual H297A	Dpnl	Se digirió por 4 horas con Buffer Cutsmart de NEB a 37°
dipM347Y-A	Producto de PCR que amplifica el plásmido PVCHYC4::LysM4 con la mutación puntual Y347A	Dpnl	Se digirió por 4 horas con Buffer Cutsmart de NEB a 37°
dipM362F-A	Producto de PCR que amplifica el plásmido PVCHYC4::LysM4 con la mutación puntual F362A	Dpnl	Se digirió por 4 horas con Buffer Cutsmart de NEB a 37°

Tabla 5. Ligaciones realizadas

Nombre	Fragmento	Plásmido
PVCHYC4::LysM1	LysM1	PVCHYC4
PVCHYC4::LysM2	LysM2	PVCHYC4
PVCHYC4::LysM3	LysM3	PVCHYC4
PVCHYC4::LysM4	LysM4	PVCHYC4

Resultados

La localización de DipM depende del primer tándem de dominios LysM.

Dado que la localización de DipM depende del primer tándem y no así del segundo, nos preguntamos si los tándems de dominios LysM tienen diferencias significativas en su estructura primaria, y que estas diferencias expliquen las diferencias en la localización de la proteína. Para ello hicimos un alineamiento de la estructura primaria para comparar ambos tándems. Realizamos un alineamiento de la estructura primaria para comparar los dos tándems (Figura 17). El alineamiento de la estructura primaria fue realizado con el programa ClustalW2 (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) y fue analizado con el programa JalView. Con alineamiento observamos que el primer y segundo tándem de dominios LysM tienen un 60% de identidad en su secuencia. Sin embargo, a pesar del alto porcentaje de identidad, solo el primer tándem de dominios LysM es capaz de localizarse. Para saber un poco más sobre la dinámica en del primer y segundo tándem de dominios LysM, decidimos evaluar la localización de algunas versiones trucas. El resultado de estas versiones nos podría ayudar a corroborar lo que ya se sabía de los dominios LysM y a entender si es el arreglo en tándem lo que permite la localización de la proteína, o bien si la presencia de dos dominios LysM es suficiente para localizar a la proteína aunque estos no estén en tándem. Para cumplir este objetivo, decidimos hacer versiones trucas recombinantes de los dominios LysM. Estas versiones expresan los dos tándems de los dominios LysM, (Figura 18A) solo el segundo tándem de dominios LysM, (figura 18B) un solo dominios LysM, (figura 18C) solo el segundo tándem de dominios LysM, (figura 18D) el primer tándem de dominios LysM y el primer dominio LysM del segundo tándem (figura 18E) y finalmente el segundo dominio del primer tándem y el primer dominio del segundo tándem (figura 18F). Estas versiones se expresan como segunda copia

desde el cromosoma y su expresión está regulada por un promotor inducible con ácido vanílico (Figura 18).

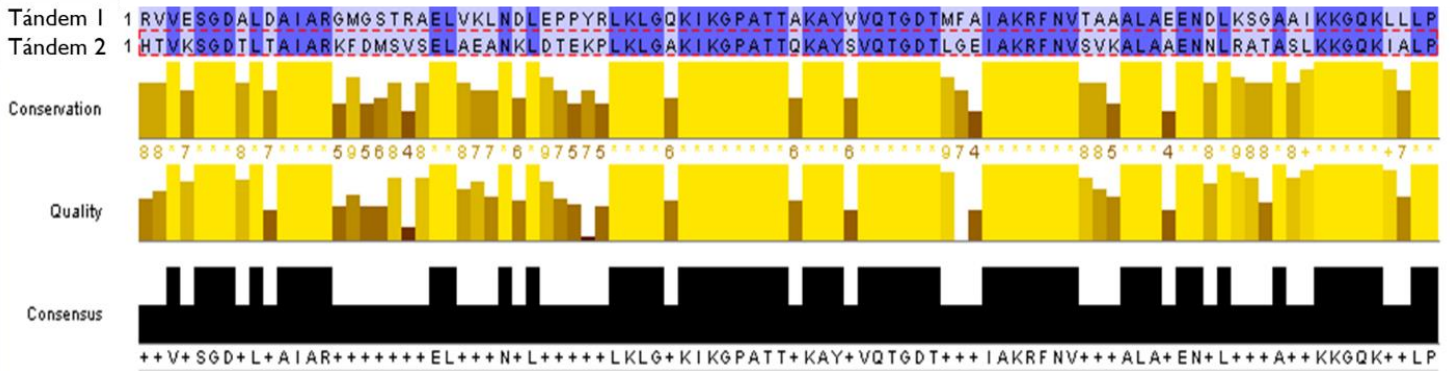


Figura 17. Alineamiento de la estructura primera de los dominios LysM. El alineamiento con el programa ClustalW mostró un 60% de identidad entre la secuencia del tándem 1 y la secuencia del tándem 2.

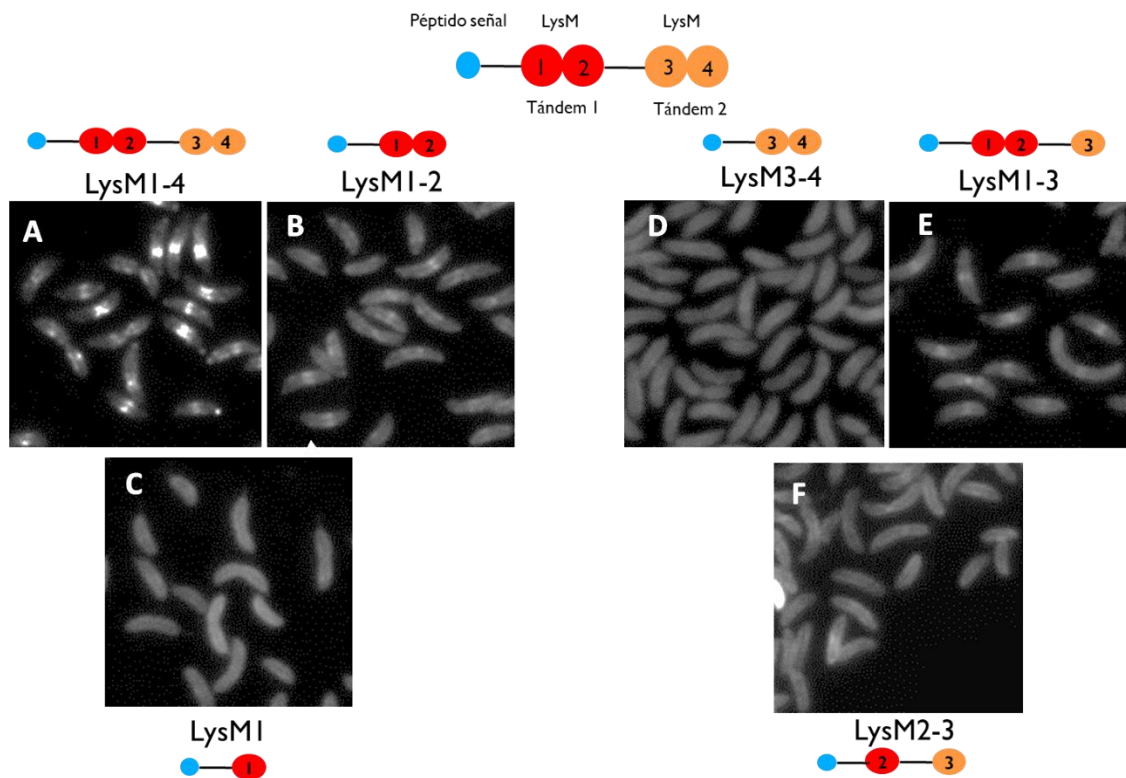


Figura 18. La localización de DipM depende del arreglo del primer tándem. Fotomicrografías de fluorescencia de las versiones truncas de los dominios LysM-mCherry. A. Cuatro dominios LysM pueden localizarse en el sitio de la división **B.** Dos dominios LysM del primer tándem son suficientes para localizarse en el sitio de la división, aunque no forman una banda de localización tan fuerte como lo hacen cuatro dominios **C.** Un solo dominio LysM no es suficiente para localizar. **D.** El segundo tándem LysM es no puede localizarse **E.** Tres dominios LysM localizan mejor a la proteína que dos dominios. **F.** Los dominios 2 y 3 no pueden localizarse en el sitio de la división.

Nuestros resultados mostraron que los cuatro dominios LysM pueden localizar a la proteína DipM en el sitio de la división sin que sea necesaria la presencia del dominio C-terminal (LytM) (figura 18A). Además el primer tándem puede localizarse en el sitio de la división, aunque la localización no es tan fuerte como la de la versión que tiene ambos tándems (Figura 18B). Otro dato que recuperamos de nuestros

resultados es que si separamos el primer tándem y solo expresamos un solo dominio LysM, este no puede localizarse (Figura 18C) y finalmente el segundo tándem de dominios LysM no puede localizarse por sí solo. Este conjunto de resultados corroboran lo reportado anteriormente (Goley et al., 2010; Möll et al., 2010; Poggio et al., 2010). Por otro lado, siguiendo con los resultados obtenidos, la versión que expresa el segundo dominio del primer tándem y el primer dominio del segundo tándem no puede localizarse en el sitio de la división (figura 18F) sugiriendo que es la presencia en tándem y no la cantidad de dominios LysM lo que permite la localización. Finalmente la adición de un dominio LysM al primer tándem de dominios LysM parece mejorar la localización (figura 18E). Para asegurarnos de que estas versiones truncas son estables decidimos hacer un western blot anti-mCherry para corroborar que no haya productos de degradación y que los pesos estimados (en KD) sean similares a los detectados en el western blot (figura 19).

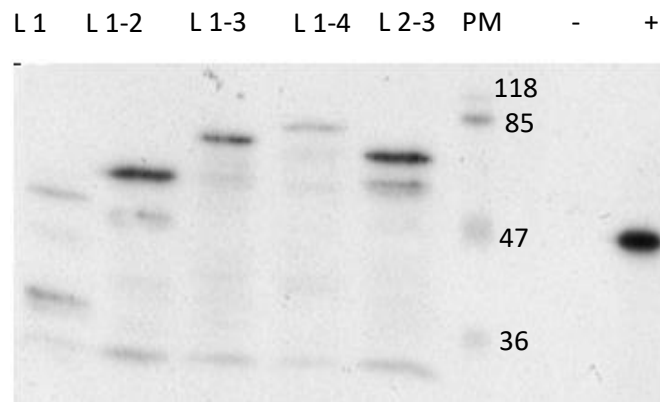


Figura 19. Western Blot anti-mCherry de las versiones truncas de DipM. Western Blot anti-mCherry 1:15,000. A. Carril con un extracto total de la cepa que expresa un solo dominio LysM (L1) con un peso aproximado de 48KD B. Carril con un extracto total de la cepa que expresa el primer tandem de dominios LysM. (L 1-2) con un peso aproximado de 54 KD C. Carril con un extracto total de la cepa que expresa el primer tandem de dominios LysM y el pirmer dominio LysM, del Segundo tandem. con un peso aproximado de 67 KD (l 1-3) D. Carril con un extracto total de la cepa que expresa dos tandem de dominios LysM (L1-4) con un peso aproximado de 72 KD. E. Carril con un extracto total de la cepa que expresa el Segundo dominio LysM del primer tandem y el primer dominio del segundo tandem (L 2-3) con un peso aproximado de 60 KD.

Predicción de los aminoácidos de DipM involucrados en la unión con la pared.

Los dominios LysM son necesarios para la localización de DipM en el sitio de la división. Estos dominios se han caracterizado por su habilidad de interactuar con carbohidratos, como los que encuentran en la pared celular de peptidoglicano. Hecho que nos sugiere que la capacidad que presentan los dominios LysM esta relacionada a su capacidad de unir a la pared celular de peptidoglicano. Otra posibilidad es explique la necesidad de los dominios LysM para la localización de la DipM, es que estos dominios estén interactuando con algún otro componente del divisioma y esta interacción tenga como resultado la localización a mitad de la célula. Para evaluar esta posibilidad, decidimos buscar bio-informáticamente los posibles sitios de unión a la pared, y con ello determinar experimentalmente si estos aminoácidos afectan la localización de los dominios LysM.

Para predecir los residuos de aminoácidos que pudieran participar en la unión con la pared, decidimos tomar como base algunos otros dominios LysM en donde ya se conocieran los residuos importantes para la interacción con la pared. Uno de los trabajos más detallados es el del Ohnuma y coladores. En este trabajo, se detalla la interacción del primer dominio LysM de la proteína quitinasa A, una proteína con dos dominios LysM. A diferencia de DipM, QuitinasaA no tiene los dominios LysM arreglados en tándem. Estos dominios están separados por un conector rico en serinas, tirosinas y prolinas. Por otro lado, en el extremo C-terminal de QuitinasaA, se encuentra un dominio catalítico encargado de la degradación de quitina. En este trabajo (Ohnuma, 2007) describieron la estructura terciaria del segundo dominio LysM de Quitinasa A y los aminoácidos que participan en la unión con un oligómero de N-acetilglucosamina, unidad fundamental de la quitina. Experimentos con el sustrato permitieron demostrar que un solo dominio LysM pueden unir cadenas de N-acetilglucosamina con más de cuatro unidades en el oligómero, ya que fue imposible detectar alguna interacción cuando se adiciona un monómero o algún otro

oligosacárido de menor tamaño. Sobre el sitio de unión del sustrato, se sabe que los residuos de aminoácidos S17, G21, A42, C34 y N45 participan en la unión del sustrato. Estos aminoácidos forman un surco que en presencia del sustrato cambian su desplazamiento químico en experimentos de Resonancia Magnética Nuclear, sugiriendo una interacción con el sustrato. Otro dato sobre ensayos de interacción con el sustrato es que los residuos C34, C13 y Y14 afectan considerablemente la unión a oligómeros de N-acetilglucosamina. Se piensa que el rol de las cisteínas consiste en mantener la estabilidad de la proteína a través de la formación de los puentes disulfuro, por ello cuando se sustituyen los residuos por alanina, los dominios LysM de Quitinasa A ya no pueden unir N-acetilglucosamina. Lo mismo se observó con el residuo Y72, el cual favorece la unión de N-acetilglucosamina a través de interacciones por apilamiento de anillos aromáticos (Ohnuma, 2008) (Asensio et al., 2013; Hudson et al., 2015; Jana et al., 2016) (Study et al., 2008).

Con estos antecedentes decidimos identificar en DipM los aminoácidos que participan en la unión con la pared, usando como molde a la proteína Quitinasa A de *Pteris Ryukyensis*. Para lograr este objetivo, hicimos un primer acercamiento alineando de la estructura primaria con Clustal W de cada dominio LysM del primer tándem de DipM y del segundo dominio LysM de la Quitinasa A (Figura 19). El alineamiento mostró un 20% de identidad del primer dominio LysM de DipM y el dominio LysM de Quitinasa A, el segundo dominio LysM tiene un 18% de identidad con el dominio LysM de Quitinasa A (figura 19). A pesar de su bajo % de identidad, ambos dominios conservan varios aminoácidos que podrían ser importantes para la localización, sobre todo aquellos que estén conservados y identificados en Quitinasa A como importantes para la interacción con sus sustrato. Algunos de estos residuos podrían ser las cisteínas, sin embargo los dominios LysM de DipM no cuentan con estos residuos en su estructura. Otros residuos de interés son los aminoácidos que se encuentran la región del surco. Los aminoácidos en la región del surco de Quitinasa A no son idénticos en los dominios LysM, solo los residuos G12 y D13 del primer dominio LysM y los residuos G9 y G10 están conservados en la región que alinea con el surco. Aunque estos dos residuos (G12 y G13) son

buenos candidatos, no indican que estén en el surco ya que esta estructura se forma a partir de la estructura terciaria de la proteína. Por esta razón decidimos modelar la estructura terciaria para encontrar la posible región de unión al sustrato.

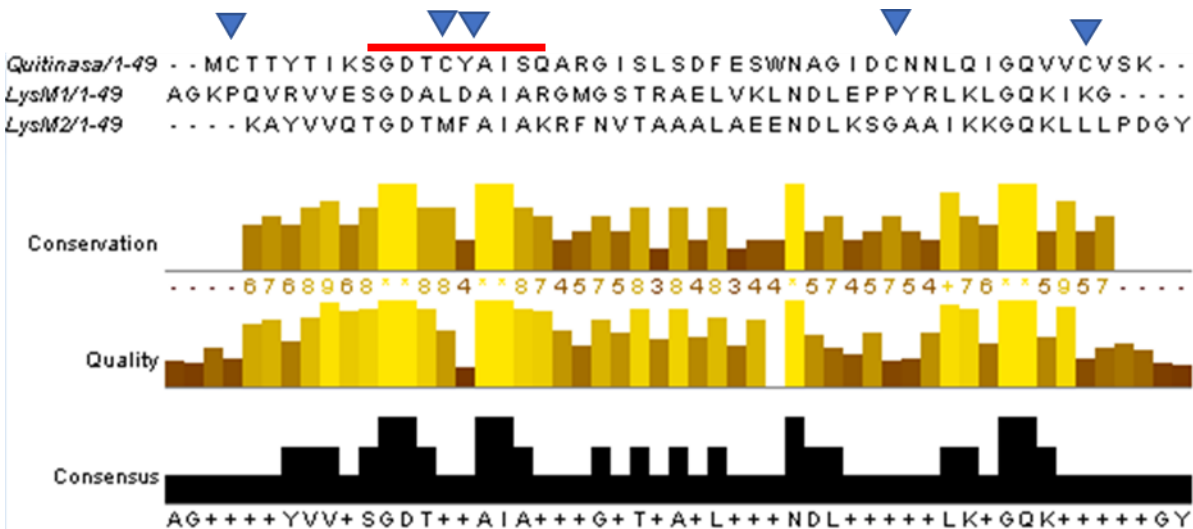


Figura 19. Alineamiento de los tándems LysM de DipM y del dominio LysM en quitinasa A. El alineamiento se realizó con Clustal W. Los triángulos azules destacan los residuos que interactúan con su sustrato en quitinasa A. La región roja destaca los residuos que conforman el surco y que son relevantes para la unión con el sustrato en quitinasa A

Para seguir indagando sobre los presuntos aminoácidos implicados en la unión, decidimos modelar el primer tándem de dominios LysM con el servidor I-TASSER (Figura 20). Lo primero que hicimos fue localizar la zona de unión reportada para quitinasa A en la estructura terciaria del primer tándem de DipM. Esta zona debería estar entre la primera beta y la primera hélice y la vuelta que esta entre la segunda beta y la segunda hélice. Una vez que detectamos esta zona en los dominios LysM de DipM, observamos que los residuos alineados en la estructura primaria con quitinasa A fueran los mismos. La zona de la primera hélice y del primer giro coinciden con la zona esperada en el reconocimiento (Figura 21). Los aminoácidos S11, G12, D13 del primer tándem y los aminoácidos G8 y D9 del segundo tándem están presentes en la región de la estructura terciaria propuesta en quitinasa A.

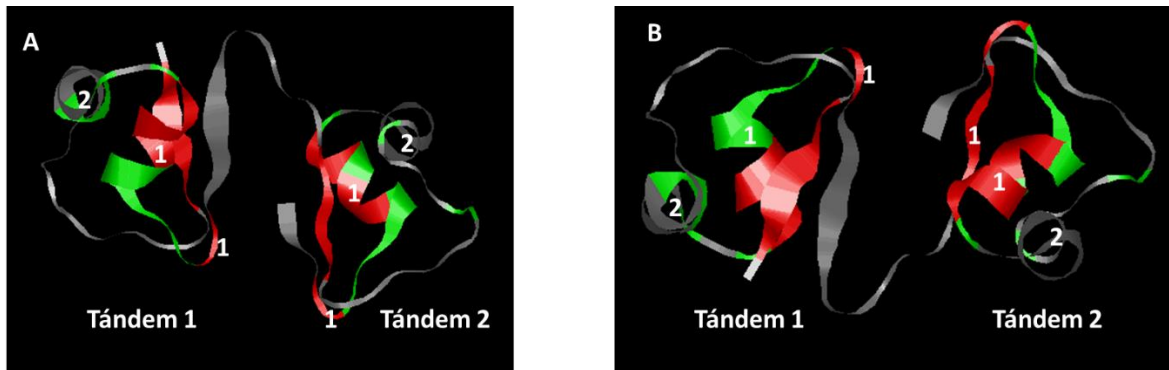


Figura 21. Modelado del primer tándem de dominios LysM. El modelaje de los dominios LysM se elaboró con el servidor I-TASSER con un R-Value Free de 0.137. En rojo se marcan la zona propuesta como el sitio de unión en la proteína quitinasa A. En verde se marcan los aminoácidos que alinean con la estructura primaria de la proteína quitinasa A. **A.** Vista superior. **B.** Vista inferior.

El resto de los aminoácidos detectados a través del alineamiento de la estructura primaria de quitinasa A y que interactúan con el sustrato, están dispersos en los otros elementos de estructura secundaria (figura 22) por lo que tomar los aminoácidos que alinean con la estructura primaria de Quitinasa A no parecía ser el mejor acercamiento. Revisando otros trabajos de dominios LysM, encontramos que han propuesto zonas de unión que no coinciden con lo reportado para quitinasa A (Bateman & Bycroft, 2000; Mulder et al., 2006). Por ejemplo, Mulder et. al., proponen que el sitio de unión esta entre la hebra beta uno y la hélice uno. Esta discrepancia nos puso a dudar sobre si los residuos alineados con quitinasa A son los probables sitios de unión en DipM. Revisando trabajos de proteínas que unen carbohidratos a través de dominios, destacamos la importancia de los residuos aromáticos. Se sabe que el apilamiento de anillos es una interacción no covalente dependiente de interacciones π necesarias para la interacción con carbohidratos (Asensio et al., 2013; Jana et al., 2016). Dado que existe evidencia de la importancia de los residuos aromáticos y que en la proteína quitinasa también destacaron su importancia,

decidimos realizar mutagénesis dirigida a los residuos de aminoácidos que estuvieran entre la región del primer y segundo dominio LysM para ambos tándems.

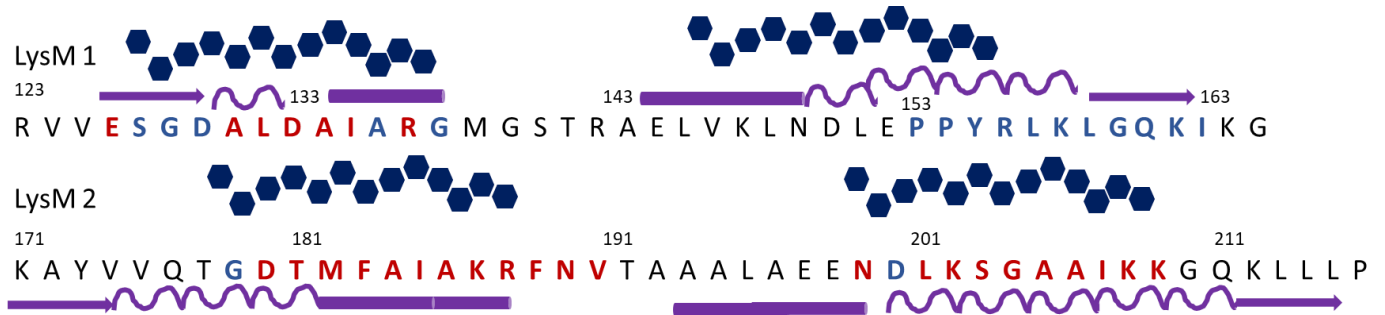


Figura 22. Predicción de los elementos de estructura secundaria de LysM1 y LysM2. La predicción de los elementos de estructura secundaria se elaboró con el servidor I-TASSER y PSIPRED. Las flechas indican hebras beta plegadas, los lazos destacan los giros y regiones carentes de estructura secundaria y finalmente los cilindros indican hélices alfa. Los hexágonos marcan la zona del surco que alberga al sustrato en quitinasa A. Los aminoácidos azules destacan aquellos residuos que se encuentran relacionados con la unión con la pared, y que se alinean con la estructura primaria con Quitinasa A.

En el primer dominio LysM hay un solo residuo aromático (Y155) el cual está dentro de la región modelada de la segunda hélice y la segunda hebra beta. Esta región alinea con el surco de quitinasa A, lo cual lo hace un buen candidato. En el segundo dominio LysM hay dos residuos aromáticos (F182 y F188). Se encuentran en la región estimada de la hélice uno, es la zona que coincide con la zona de unión propuesta para quitinasa A, convirtiéndolos en buenos candidatos. A manera de control, decidimos mutar otros aminoácidos que estuvieran en el segundo tándem, para reducir la localización, pero sin afectar la unión preferencial que tiene el primer tándem (Fig. 23). Para la elección del segundo tándem seguimos el mismo principio. Tomamos todos los aminoácidos aromáticos que se encontraran en esta región. Seleccionamos los residuos H297 y Y312 del tercer dominio LysM. Los residuos Y346 y F362 fueron seleccionados del cuarto dominio LysM. Los residuos seleccionados fueron cambiados por alanina por mutagénesis dirigida. Estas

mutantes puntuales se realizaron en un plásmido que expresa como segunda copia ambos dominios LysM (LysM 1-4).

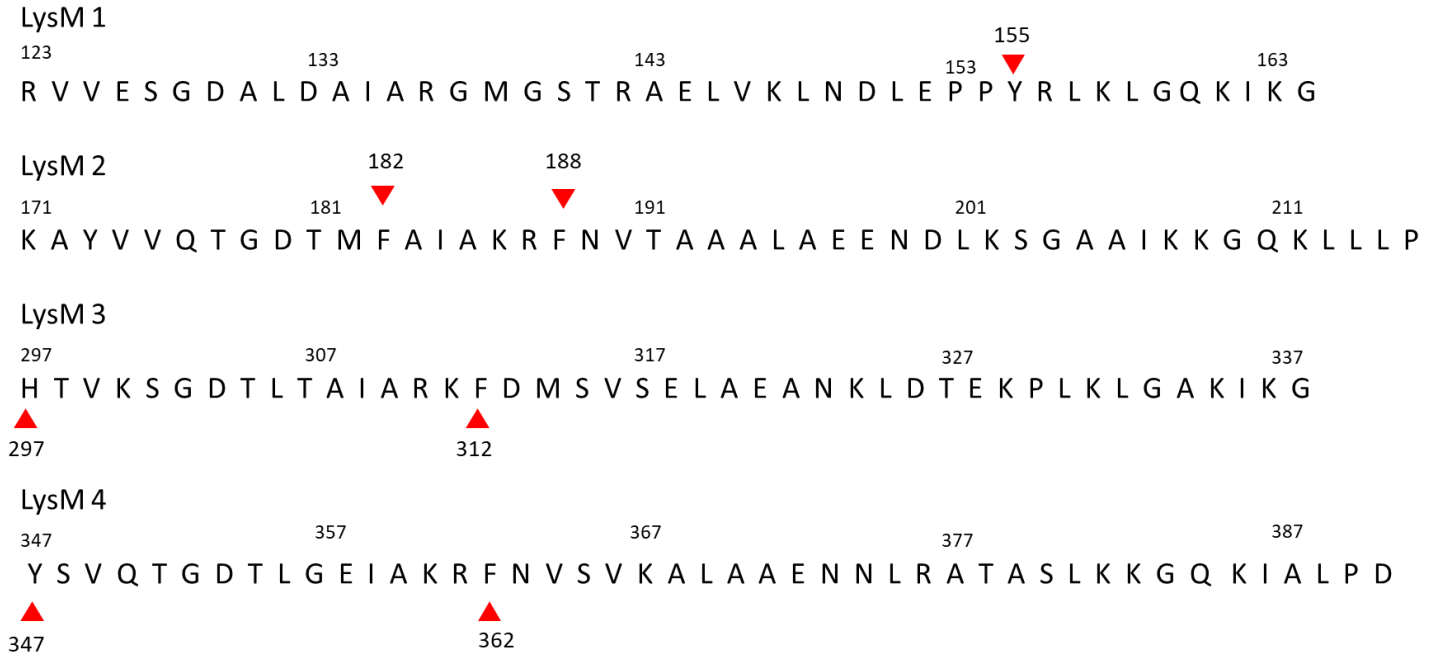


Figura 23. Aminoácidos mutados en este trabajo. Estructura primaria de los dominios LysM por separado. En rojo destacamos los aminoácidos que fueron seleccionados.

Las versiones mutantes se realizaron mediante quick change en un plásmido integrativo, inducible por vanílico que fusiona en el C-terminal a la proteína roja fluorescente mCherry. Estas versiones se introdujeron en la cepa silvestre (CB15N) y se expresaron como segunda copia desde el cromosoma. Con el fin de evaluar la localización de las versiones mutante puntual, las llevamos al microscopio de fluorescencia y comparamos su localización con la versión parental (LysM 1-4) y una versión que expresa únicamente el primer tándem de dominios LysM (LysM 1-2). Las versiones que asemejen la localización de LysM 1-4, muy probablemente no sufrieron alguna afectación con la mutación puntual, en cambio aquellas que tengan cambios en el segundo tándem y asemejen la localización de LysM 1-2 muy

probablemente estarán afectadas por disminuir la afinidad al sustrato, pero no dejarán de localizarse dado que el primer tándem quedó intacto.

Las mutantes que vieron más afectadas su localización en el sitio de la división son Y155A y F188A en el primer tándem y F362A en el segundo tándem. Estas versiones mostraron una disminución en la fluorescencia en el sitio de división y un incremento en la fluorescencia alrededor del cuerpo celular. Para el caso de la versión F182A y F312A, se observó una disminución de la fluorescencia, pero todavía hay una buena parte de la proteína que se encuentra localizada en el sitio de la división. Por otro lado, la versión F362A, también tuvo una reducción de la fluorescencia y una disminución en la localización del sitio de la división. Las mutaciones en la H297 y la Y347 tuvieron un efecto menor en la localización de la proteína, ya que su localización asemeja mucho a la versión parental.

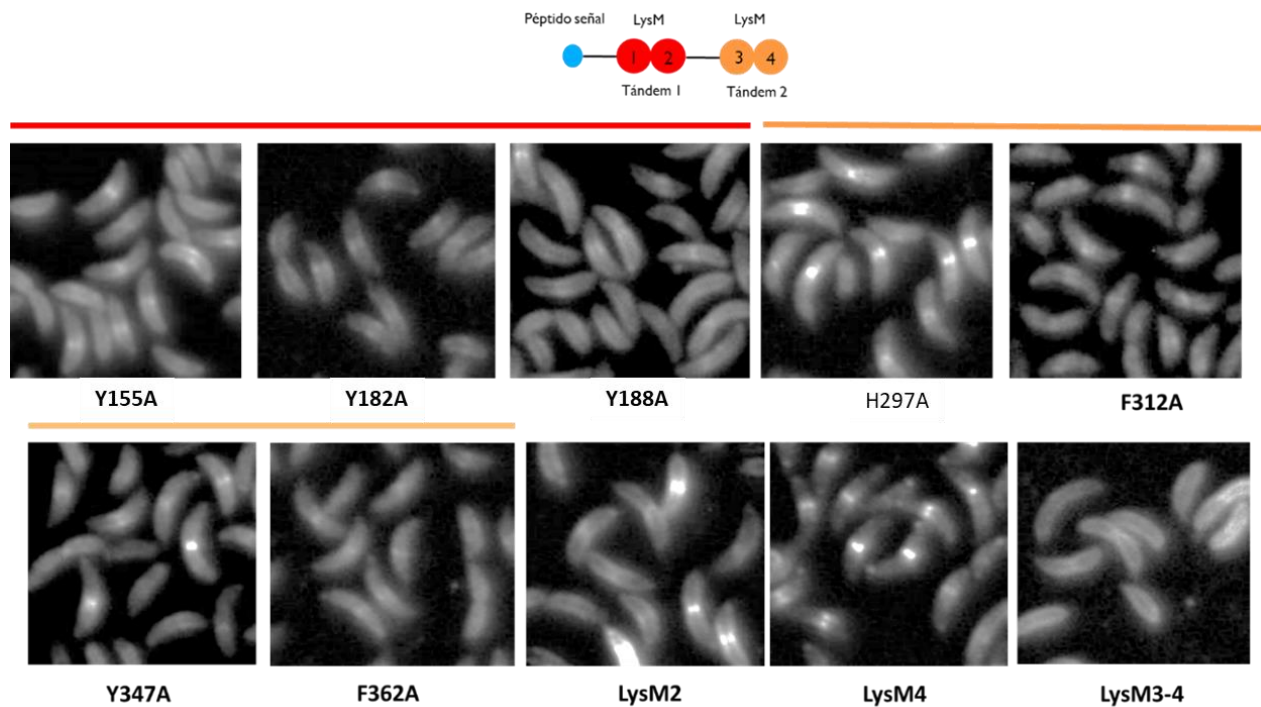


Figura 24 Mutantes puntuales en los residuos aromáticos de los dominios LysM. Las líneas en rojo representan que los residuos cambiados por alaninas en el primer tándem de dominios LysM. Las líneas en naranja muestran los residuos cambiados por alaninas en el segundo tándem.

Una posible causa para la deslocalización de las mutantes puntuales es la inestabilidad de la proteína y su consecuente degradación, resultado de los cambios en los aminoácidos originales. La degradación podría resultar en una aparente deslocalización, que tuviera como resultado la acumulación de mCherry en el periplasma libre o todavía fusionada a fragmentos no funcionales de DipM. Para evaluar la estabilidad de las versiones mutadas se realizó un Western Blot anti-mCherry (Figura 25).

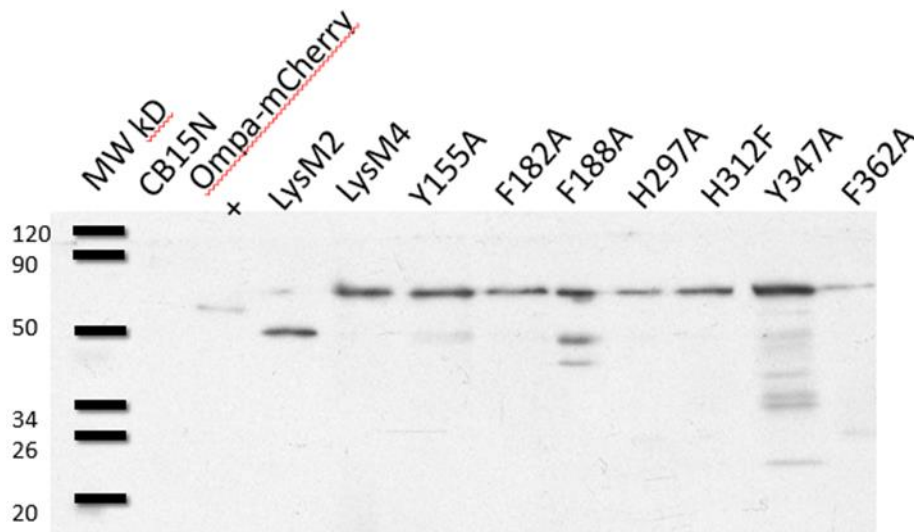


Figura 25. Estabilidad de mutantes puntuales de DipM. Western Blot anti-mCherry 1:15,000 de las versiones que expresan los dominios LysM4-mCherry con las diferentes mutaciones puntuales. LysM4-mCherry con un peso estimado de 80 KDa. OmpA es el control positivo para una proteína fluorescente que da señal con el anticuerpo mCherry y CB15N es un extracto total de la cepa silvestre, la cual no da señal y es el control negativo del experimento.

Las mutantes Y155 y F188 mostraron ligeras bandas de degradación, estas señales de degradación no son tan fuertes, como la banda del peso esperado, por lo que la afectación en la localización en el sitio de la división no tiene que ver con la estabilidad de la versión. Otra mutante afectada es la Y347A, a pesar de la inestabilidad detectada por Western Blot, la versión Y347A se localiza de manera similar a la silvestre. Sugiriendo que la versión es funcional.

Discusión

Los resultados de este trabajo han permitido establecer la importancia de los dominios LysM para la localización de DipM en el sitio de la división. La localización de DipM requiere de la presencia del primer tándem LysM, el segundo tándem aunque es importante, no tiene el reconocimiento preferencial que tiene el primer tándem de dominios LysM. Cabe destacar que el reconocimiento preferencial del primer tándem no está relacionado con el número de dominios, si no con el arreglo en tándem. Además, aunque el segundo tándem de dominios LysM no tiene el reconocimiento preferencial, parece colaborar con la localización de la proteína, ya que la adición de un dominio LysM al primer tándem parece aumentar la cantidad de proteína localizada al sitio de la división. Este resultado era esperado ya que se ha visto que el aumento en el número de dominios LysM favorece la afinidad por quitina en la proteína ClsW de *B. subtilis* (Wong et al., 2014) Sin embargo aún falta saber un poco más sobre la interacción con la pared en estas versiones con dominios LysM, además de una cuantificación de la fluorescencia al sitio de la división para corroborar que efectivamente, en el caso de LysM 1-3 hay más fluorescencia en el sitio de la división que en LysM 1-2.

Por otro lado, con la información disponible en el momento, se buscaron los residuos que pudieran estar involucrados en la unión con la pared. Cabe destacar que para esta búsqueda bioinformática es necesario tomar en cuenta trabajos más recientes. Poco después de que se realizara la parte experimental de este trabajo, se publicaron otros trabajos en donde se identificaban los aminoácidos involucrados en la unión entre distintos dominios LysM de diversas proteínas con distintos sustratos. El uso de la proteína quitinasa A como molde para la identificación de los dominios LysM es un buen acercamiento, sin embargo existen otras proteínas que podrían tener mayor similitud para la identificación de los aminoácidos relevantes en la unión del sustrato como por ejemplo: NlpC de *Thermus thermophilus*. Esta proteína es una amidasa que tiene en el extremo C-terminal un dominio

catalítico de tipo amidasa (NlpC). En la región N-terminal hay dos dominios LysM arreglados en tándem, cada tándem tiene una región entre dominios de 7 residuos de aminoácidos (Wong et al., 2015), igual que DipM. La presencia de más de un dominio LysM es frecuente. Sin embargo, el arreglo en tándem no es común. Por lo que, NlpC de *T. thermophilus* podría ser un mejor candidato para la identificación de los aminoácidos que participan en la unión con el peptidoglicano. Otra proteína que podría aportar pistas sobre los aminoácidos que unen al peptidoglicano es AtlA de *Enterococcus faecalis*. En AtlA se ha identificado que los dominios LysM no solo interactúan con la N-acetilglucosamina, sino que la interacción también ocurre con el pentapéptido que une a las hebras de glicano (Dellarole et al., 2014). Estas nuevas interacciones describen un grupo más amplio de aminoácidos implicados en la unión con la pared. Además de la predicción por medio de métodos bioinformáticos, podrían diseñarse métodos experimentales para la detección de estos aminoácidos, como mutantes puntuales azarosas o algunos otros más complejos que tienen que ver con la determinación de la estructura de la proteína y la detección de los residuos que interactúan con la pared.

Las mutantes Y155A y F188A afectan la localización de DipM en el sitio de la división. Ambas mutantes puntuales caen en el primer tándem de dominios LysM, cerca de la región entre los dominios LysM del primer tándem. La afectación en la localización podría sugerir que en esta región se encuentra el sitio de unión a la pared. Otra posibilidad es que los residuos de aminoácidos Y155 y F188 no participen en la unión a la pared y que su función sea estructural. Esto implicaría que, al cambiarlos por alaninas, hayamos afectado la conformación de la proteína y por ende el sitio de unión a la pared. Para determinar el rol de los aminoácidos Y155 y F188 es necesario determinar la afinidad por la pared mediante otros experimentos, los cuales podrían ser experimentos *in vivo* como FRAP o bien interacciones *in vitro* con el peptidoglicano y la proteína purificada con sus diferentes versiones.

En su conjunto, en este trabajo hemos destacado la importancia de los dominios LysM. Los cuales pudieran localizar a la proteína por interacciones con la pared celular de peptidoglicano.

Conclusiones

1. La localización de DipM en el sitio de la división depende del arreglo que tiene el primer tándem de dominios LysM.
2. La presencia de un dominio LysM al primer tándem mejora la localización en el sitio de la división del primer tándem
3. Los residuos Y155 y F188 son importantes para la localización de DipM en el sitio de la división

Anexo 1. Resultados adicionales

DipM-mCherry no localiza en células que abaten la expresión de FtsI, aun cuando FtsN está presente.

El modelo tradicional del reclutamiento de proteínas de división hace énfasis en las interacciones proteína-proteína. Estas interacciones son las responsables del reclutamiento al sitio de la división (Aarsman et al., 2005). Sin embargo, se ha observado que el reclutamiento no es del todo lineal y que en algunas proteínas el reclutamiento no depende de interacciones proteína-proteína (Weiss, 2015). En el caso de DipM, existe la propuesta de que FtsN es la responsable del reclutamiento de DipM. Para poner a prueba un mecanismo de localización dependiente de interacciones proteína-proteína, decidimos evaluar la localización de DipM en células que no expresan a la proteína de división FtsI, así como la localización de FtsN-mCherry en este mismo fondo genético. La localización de FtsN-mCherry nos sirve para determinar si los efectos en la localización de DipM son causantes por la ausencia de FtsN o por la ausencia de FtsI. Para lograr este objetivo, fusionamos en el C- terminal de FtsN y DipM a la proteína roja fluorescente mCherry. Ambas versiones están en segunda copia y bajo un promotor inducible por ácido vanílico. Las versiones FtsN-mCherry y DipM-mCherry se introdujeron en una cepa de *C. crescentus* mutada en el locus nativo de FtsI, y con una copia de FtsI en el cromosoma bajo el control de un promotor regulado por xilosa (Cepas TH1 y TH2). Con esta cepa podemos tener células viables que detienen la expresión de FtsI al retirar la xilosa del cultivo. Una vez que obtuvimos las dos cepas, mediante microscopía de fluorescencia observamos con y sin xilosa la localización de DipM-mCherry y FtsN-mCherry (Fig. S1). Ambas proteínas se localizaron en el sitio de la

división cuando FtsI está presente (+xilosa). Cuando se retira la xilosa del medio de cultivo, al paso de las horas los niveles de FtsI disminuyeron. Al ser una proteína esencial, las células se filamentan. Una vez que las células están filamentadas, mediante microscopía de fluorescencia observamos la localización de FtsN-mCherry y DipM-mCherry. La proteína FtsN-mCherry se localizó en el sitio de la división en ausencia de FtsI (-xilosa). Ocurre lo contrario con DipM-mCherry, la proteína no se localizó en el sitio de la división en ausencia de FtsI (-xilosa). Estos resultados nos sugieren que DipM necesita de FtsI para localizarse. Sin embargo, esta dependencia podría no tener que ver con su interacción, puesto que también se ha reportado que requiere de FtsN para localizar a DipM (Möll et al., 2010).

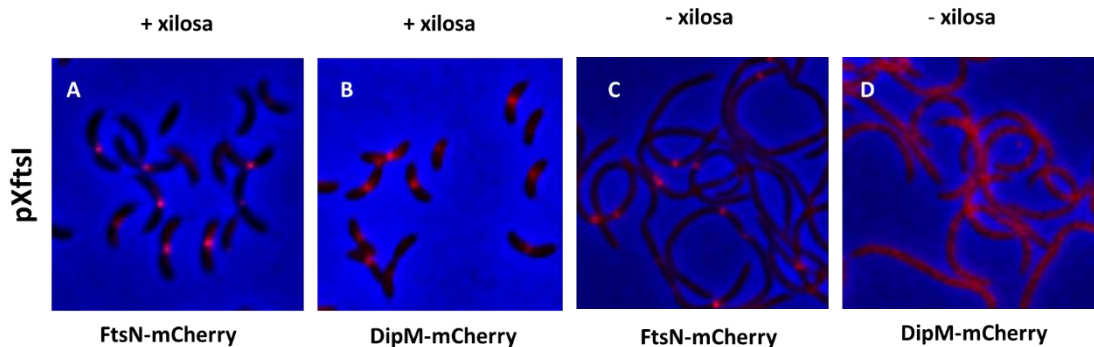


Figura S1. DipM-mCherry no se localiza en células abatidas de FtsI aun cuando FtsN está presente. Sobre lape del campo claro y fluorescente de células con FtsN-mCherry y DipM-mCherry con y sin la expresión de FtsI (con+ y sin- xilosa). **A.** FtsN-mCherry se localiza en el sitio de la división cuando FtsI está presente (+xilosa) **B.** DipM-mCherry se localiza en el sitio de la división cuando FtsI está presente (+xilosa) **C.** FtsN-mCherry se localiza en el sitio de la división cuando FtsI no está (-xilosa). **D.** La localización de DipM-mCherry se deslocaliza cuando FtsI no está (-xilosa).

Conclusiones adicionales

4. A localización de DipM no depende principalmente de su interacción con FtsN
5. DipM requiere de FtsI para localizarse en el sitio de la división

Materiales adicionales

Tabla 4. Oligos utilizados

Nombre	Secuencia	Descripción
1996F1 Sacl	CAAGAGCTCAGCGCCGCCGACGCG TCGACG	Oligo Forward para clonar desde el inicio de DipM
1996R1E coRI	CAAGAATTCTCGCGGGGCAGCACC AGCGCCGGATC	Oligo reverso para clonar hasta el final de DipM. Lleva codón de stop.
FtsNF1N del	CAACATATGAGAGATGGCGTGCGC GGTCCCAAC	Oligo para clonar FtsN sin cruce transmembranal
FtsNR1E coRI	CAAGAATTCGGAAGGCGGCCCAT CAGAAGG	Oligo para clonar hasta el final de FtsN
ftsI del F1 SpeI	CAAAC TAGTACCTGGCCGAGGTGA TCGAGC	Oligo para clonar la región río arriba de FtsI
ftsI del r1 HindIII	CAAAGCTTCCGGGACCCAGGTTC GAGAGG	Oligo para clonar la región río arriba de FtsI
ftsI del F2 HindIII	CAAAGCTTTCGCCAACTCGCCCA AGAACG	Oligo para clonar la región río abajo de FtsI
ftsI del R2 EcoRI	CAAGAATTCGCCGAACACCGCGA TCAGC	Oligo para clonar la región río abajo de FtsI
ftsI ts F1	GGTCTACGAGATGGGCGCGACCTT CAAGGCCTTC	Oligo para clonar FtsI sin cruce transmembranal
ftsI ts R1	GAAGGCCTTGAAGGTCGCGCCCAT CTCGTAGACC	Oligo para clonar hasta el final de FtsI. Lleva codón de stop.

Tabla 5. Plásmidos utilizados

Plásmido	Descripción
PVCHYC2::DipM	Plásmido para expresar DipM-mCherry desde un promotor inducible con vanílico.
PVCHYN4::FtsN	Plásmido para expresar FtsN-mCherry desde un promotor inducible con vanílico
PXTCYC5::FtsI	Plásmido para expresar FtsI desde un promotor inducible por xilosa
PNPTS::updownFtsIS pc	Plásmido para realizar mutante por ablación en el locus de FtsI

Tabla 6. Cepas utilizadas

Cepas	Descripción
TH1	Cepa de depleción en FtsI con FtsNmCherry CB15N xyIR::FtsI ΔFtsI:: ΩSpc vanR::pVFtsNmCherry
TH2	Cepa de depleción en FtsI con DipMmCherry CB15N xyIR::FtsI ΔFtsI:: ΩSpc vanR::pVDipMmCherry
TH3	Cepa de <i>C. crescentus</i> que expresa bajo el promotor de vanílico un dominio LysM con una fusión de mCherry en el C-terminal CB15N vanR::pVLysM1mCherry

Bibliografía

- 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*. 64, 938–952. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05720.x>
- Aarsman, M. E. G., Piette, A., Fraipont, C., Vinkenvleugel, T. M. F., & Nguyen-distèche, M. (2005). *Maturation of the Escherichia coli divisome occurs in two steps*. 55, 1631–1645. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04502.x>
- Asensio, J. L., Ardá, A., Cañada, F. J., & Jiménez-Barbero, J. (2013). Carbohydrate-aromatic interactions. *Accounts of Chemical Research*, 46(4), 946–954. <https://doi.org/10.1021/ar300024d>
- Auer, G. K., & Weibel, D. B. (2017). *Bacterial Cell Mechanics*. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b00346>
- Bateman, A., & Bycroft, M. (2000). *The Structure of a LysM Domain from E. coli Membrane-bound Lytic Murein Transglycosylase D (MltD)*. 1113–1119. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.3778>
- Bayram, G., Lisa, A., Ugur, O., Verena, S., & Seiboth, S. (2015). *Molecular diversity of LysM carbohydrate - binding motifs in fungi*. 103–113. <https://doi.org/10.1007/s00294-014-0471-9>
- Bhattacharjee, N., Feliks, M., & Field, M. J. (2016). *Catalytic Mechanism of Peptidoglycan Deacetylase: A Computational Study*. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.6b10625>
- Buist, G., Steen, A., Kok, J., & Kuipers, O. P. (2008). *Micro Review LysM , a widely distributed protein motif for binding to (peptido) glycans*. 68(April), 838–847.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06211.x>

Buss, J., Coltharp, C., Shtengel, G., Yang, X., Hess, H., & Xiao, J. (2015). A Multi-layered Protein Network Stabilizes the Escherichia coli FtsZ-ring and Modulates Constriction Dynamics. *PLoS Genetics*, 11(4), 1–24.

<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005128>

Cabeen, M. T., & Jacobs-wagner, C. (2005). *BACTERIAL CELL SHAPE*. 3(August), 601–610. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1205>

Choquet, R., Reboulet, A. M., Pradel, R., Gimenez, O., & Lebreton, J. D. (2006). *M-SURGE 1 . 8 User ' s Manual (Multistae SURvival Generalized Estimation)*. 27(April), 207–215. <https://doi.org/10.1128/JB.188.1.19>

Collier, J. (2019). BBA - Gene Regulatory Mechanisms Cell division control in *Caulobacter crescentus* ☆. *BBA - Gene Regulatory Mechanisms*, 1862(7), 685–690. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2018.04.005>

Dellarole, M., Baxter, N. J., Rouget, J., Dimitrov, J. D., Fukase, K., Wang, N., Fujimoto, Y., Hounslow, A. M., Foster, S. J., & Williamson, M. P. (2014). *Molecular basis for bacterial peptidoglycan recognition by LysM domains*. <https://doi.org/10.1038/ncomms5269>

Den Blaauwen, T., De Pedro, M. A., Nguyen-Distèche, M., & Ayala, J. A. (2008). Morphogenesis of rod-shaped sacculi. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(2), 321–344. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00090.x>

Dik, D. A., Marous, D. R., Fisher, J. F., Mobashery, S., Dame, N., & States, U. (2018). *HHS Public Access*. 52(5), 503–542. <https://doi.org/10.1080/10409238.2017.1337705>.Lytic

Dmitriev, B., Toukach, F., & Ehlers, S. (2005). *Towards a comprehensive view of the bacterial cell wall*. 13(12). <https://doi.org/10.1016/j.tim.2005.10.001>

Egan, A. J. F., & Vollmer, W. (2013). *The physiology of bacterial cell division*. 1277, 8–28. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06818.x>

- Goley, E. D., Comolli, L. R., Fero, K. E., Downing, K. H., & Shapiro, L. (2010). *DipM links peptidoglycan remodelling to outer membrane organization in Caulobacter*. *77*(June), 56–73. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07222.x>
- Goley, E. D., Yeh, Y., Hong, S., Fero, M. J., Abeliuk, E., Mcadams, H. H., & Shapiro, L. (2011). *Assembly of the Caulobacter cell division machine*. *80*(May), 1680–1698. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07677.x>
- Hudson, K. L., Bartlett, G. J., Diehl, R. C., Agirre, J., Gallagher, T., Kiessling, L. L., & Woolfson, D. N. (2015). Carbohydrate-Aromatic Interactions in Proteins. *Journal of the American Chemical Society*, *137*(48), 15152–15160. <https://doi.org/10.1021/jacs.5b08424>
- Jana, S., Hamre, A. G., Wildberger, P., Holen, M. M., Eijsink, V. G. H., Beckham, G. T., Sørli, M., & Payne, C. M. (2016). Aromatic-Mediated Carbohydrate Recognition in Processive *Serratia marcescens* Chitinases. *Journal of Physical Chemistry B*, *120*(7), 1236–1249. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b12610>
- Kiekebusch, D., & Thanbichler, M. (2014). Spatiotemporal organization of microbial cells by protein concentration gradients. *Trends in Microbiology*, *22*(2), 65–73. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2013.11.005>
- Koch, A. L. (1998). *Orientation of the peptidoglycan chains in the sacculus of Escherichia coli*. 689–701.
- Land, A. D., & Winkler, M. E. (2011). *The Requirement for Pneumococcal MreC and MreD Is Relieved by Inactivation of the Gene Encoding PBP1a* □ †. *193*(16), 4166–4179. <https://doi.org/10.1128/JB.05245-11>
- Lutkenhaus, J. (2007). *Assembly Dynamics of the Bacterial MinCDE System and Spatial Regulation of the Z Ring*. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.103004.142652>
- Microbiol, M. (2016). *HHS Public Access*. *95*(6), 925–944.

<https://doi.org/10.1111/mmi.12905.A>

- Miguel, A., & Biologi, C. De. (1997). *Murein Segregation in Escherichia coli* †. *179*(9), 2823–2834.
- Modell, J. W., Kambara, T. K., Perchuk, B. S., & Laub, M. T. (2014). *A DNA Damage-Induced , SOS-Independent Checkpoint Regulates Cell Division in Caulobacter crescentus*. *12*(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001977>
- Möll, A., Schlimpert, S., Briegel, A., Jensen, G. J., & Thanbichler, M. (2010). *DipM , a new factor required for peptidoglycan remodelling during cell division in Caulobacter crescentus*. *77*(June), 90–107. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07224.x>
- Monahan, L. G., Liew, A. T. F., Bottomley, A. L., & Harry, E. J. (2014). Division site positioning in bacteria: One size does not fit all. *Frontiers in Microbiology*, *5*(FEB), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00019>
- Mu, P., Ewers, C., Bertsche, U., Anstett, M., Kallis, T., Breukink, E., Fraipont, C., Terrak, M., Nguyen-diste, M., & Vollmer, W. (2007). *The Essential Cell Division Protein FtsN Interacts with the Murein (Peptidoglycan) Synthase PBP1B in Escherichia coli* *. *282*(50), 36394–36402. <https://doi.org/10.1074/jbc.M706390200>
- Mulder, L., Lefebvre, B., Cullimore, J., & Imberty, A. (2006). LysM domains of *Medicago truncatula* NFP protein involved in Nod factor perception. Glycosylation state, molecular modeling and docking of chitooligosaccharides and Nod factors. *Glycobiology*, *16*(9), 801–809. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwl006>
- Nanninga, N. (1991). Cell division and peptidoglycan assembly in *Eschenchia coli*. *Molecular Microbiology*, *5*(4), 791–795. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1991.tb00751.x>
- Pazos, M., & Peters, K. (n.d.). *Peptidoglycan*. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-18768-2>

- Poggio, S., Takacs, C. N., Vollmer, W., & Jacobs-Wagner, C. (2010). A protein critical for cell constriction in the Gram-negative bacterium *Caulobacter crescentus* localizes at the division site through its peptidoglycan-binding LysM domains. *Molecular Microbiology*, 77(1), 74–89. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07223.x>
- Romaniuk, J. A. H., Cegelski, L., Way, R., & Cegelski, L. (2015). *Bacterial cell wall composition and the influence of antibiotics by cell-wall and whole-cell NMR. figure 1.*
- Silhavy, T. J., Kahne, D., & Walker, S. (2010). *The Bacterial Cell Envelope*. 1–16.
- Study, A. S., Of, C., & Site, T. H. E. C. (2008). *LysM Domains from Pteris ryukyuensis Chitinase-A A STABILITY STUDY AND CHARACTERIZATION OF THE CHITIN-BINDING SITE **. 283(8), 5178–5187. <https://doi.org/10.1074/jbc.M707156200>
- Sundararajan, K., & Goley, E. D. (n.d.). *Cytoskeletal Proteins in Caulobacter crescentus : Spatial Orchestrators of Cell Cycle Progression , Development , and Cell Shape*. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-53047-5>
- Typas, A., Banzhaf, M., Gross, C. A., & Vollmer, W. (2011). From the regulation of peptidoglycan synthesis to bacterial growth and morphology. *Nature Publishing Group*, 10(2), 123–136. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2677>
- Unsleber, S., Wohlleben, W., & Stegmann, E. (2019). Diversity of peptidoglycan structure—Modifications and their physiological role in resistance in antibiotic producers. *International Journal of Medical Microbiology*, 309(6), 151332. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2019.151332>
- Ursinus, A., Ent, F. Van Den, Brechtel, S., Pedro, M. De, Lo, J., & Vollmer, W. (2004). *Murein (Peptidoglycan) Binding Property of the Essential Cell Division Protein FtsN from Escherichia coli*. 186(20), 6728–6737. <https://doi.org/10.1128/JB.186.20.6728>
- Vermassen, A., Leroy, S., Talon, R., Provot, C., Popowska, M., & Desvaux, M.

- (2019). *Cell Wall Hydrolases in Bacteria : Insight on the Diversity of Cell Wall Amidases , Glycosidases and Peptidases Toward Peptidoglycan*. 10(February). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00331>
- Vollmer, W., & Bertsche, U. (2008). Murein (peptidoglycan) structure, architecture and biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1778(9), 1714–1734. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.06.007>
- Vollmer, W., & Seligman, S. J. (2010). *Architecture of peptidoglycan : more data and more models*. *January*, 59–66. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2009.12.004>
- Weiss, D. S. (2015). *Micro Commentary Last but not least : new insights into how FtsN triggers constriction during Escherichia coli cell division*. 95(January), 903–909. <https://doi.org/10.1111/mmi.12925>
- Wong, J. E. M. M., Alsarraf, H. M. A. B., Kaspersen, J. D., Pedersen, J. S., Stougaard, J., Thirup, S., & Blaise, M. (2014). Cooperative binding of LysM domains determines the carbohydrate affinity of a bacterial endopeptidase protein. *FEBS Journal*, 281(4), 1196–1208. <https://doi.org/10.1111/febs.12698>
- Wong, J. E. M. M., Midtgaard, R., Gysel, K., Thygesen, M. B., Sørensen, K. K., Jensen, K. J., & Stougaard, J. (2015). *An intermolecular binding mechanism involving multiple LysM domains mediates carbohydrate recognition by an endopeptidase research papers*. 592–605. <https://doi.org/10.1107/S139900471402793X>
- Yamamoto, H., Miyake, Y., Hisaoka, M., Kurosawa, S., & Sekiguchi, J. (2008). *The major and minor wall teichoic acids prevent the sidewall localization of vegetative DL -endopeptidase LytF in Bacillus subtilis*. 70(September), 297–310. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06397.x>

