



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

## **Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**“Balsas lipídicas microbianas y su papel en la señalización vía los Sistemas de Dos Componentes”**

### **TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**  
Maestro en Ciencias

### **PRESENTA:**

José Enrique Guzmán Flores

### **TUTOR PRINCIPAL**

Dr. Dimitris Georgellis (Instituto de Fisiología Celular)

### **MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR**

Dra. Soledad Funes Argüello (Instituto de Fisiología Celular)

Dra. Marina Gavilanes Ruiz (Facultad de Química)

Dr. Dimitris Georgellis (Instituto de Fisiología Celular)

**MÉXICO, D. F. Octubre, 2014**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

El presente trabajo se llevó a cabo en el Departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular en el Laboratorio 226 Norte bajo la tutoría del Dr. Dimitris Georgellis.

La presente investigación contó con el apoyo económico de:

— Bacterial Plasma Membrane Microdomains: Control of Two Component System Signaling and Beyond. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) Proyecto 178033.

— Control of Microbial Gene Expression by Extra-cellular Stimuli de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), Proyecto IN206412.

— Beca Nacional del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) para estudios de posgrado (Nivel Maestría), CVU/Becario: 508826/288748.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco al Dr. Dimitris Georgellis por su constante asesoría en el desarrollo de este trabajo y a su tutoría durante el transcurso del programa de Maestría en Ciencias Bioquímicas.

Agradezco al comité tutorial integrado por: Dra. Soledad Funes Argüello, Dra. Marina Gavilanes Ruiz y al Dr. Dimitris Georgellis por su continua asesoría y por la revisión de este escrito.

Agradezco la asesoría metodológica en el desarrollo de este trabajo así como por la revisión de este escrito al Dr. Adrián Fernando Álvarez.

Agradezco el apoyo técnico en el desarrollo de este trabajo a la M. en C. Claudia Rodríguez Rangel.

Al Dr. Antonio Peña Díaz y a los técnicos del laboratorio 306 Oriente, M. en C. Norma Sánchez y a M. en C. Martha Calahorra por las facilidades que otorgaron para la realización de los experimentos relacionados con el fraccionamiento de membranas presentado en este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo de Beca de Maestría durante la realización de este trabajo.

Al Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP) por el apoyo otorgado para la asistencia del Tercer Congreso de Bioquímica y Biología Molecular de Bacterias celebrado del 3 al 7 de octubre 2013 en Cuatro Ciénegas, Coahuila.

# Índice

RESUMEN.....	iv
ABSTRACT.....	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Membranas biológicas.....	1
1.2 Dominios de membrana.....	3
1.3 Balsas lipídicas.....	4
1.4 Proteínas asociadas a balsas lipídicas.....	5
2.1 Balsas lipídicas y su función en la señalización celular.....	7
2.2 Sistemas de dos componentes.....	7
2.3 Sistemas de Dos Componentes en <i>E. coli</i> .....	9
2.4 Composición lipídica en <i>E. coli</i> .....	10
2.5 Resistencia a detergentes y balsas lipídicas.....	11
3. HIPÓTESIS.....	12
4. OBJETIVOS.....	12
4.1 Objetivo general.....	12
4.2 Objetivos particulares.....	12
5. JUSTIFICACIÓN.....	13
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
6.1 Cepas y condiciones de crecimiento.....	14
6.2 Etiquetado de hemaglutinina.....	14
6.3 Formación esferoplastos.....	15
6.4 Fraccionamiento subcelular.....	16
6.5 Obtención de Membranas Resistentes a Detergentes (DRMs).....	16
6.6 SDS-PAGE.....	17
6.7 Inmunoréplica tipo Western blot.....	18
7. RESULTADOS.....	19
7.1 Generación de un marcador de membrana externa: OmpC::HA.....	19
7.2 Formación de esferoplastos.....	19
7.3 Fraccionamiento celular.....	21
7.4 Generación de DRMs.....	24
8. DISCUSIÓN.....	27
9. PERSPECTIVAS.....	33
10. CONCLUSIONES.....	33
11. BIBLIOGRAFÍA.....	34

## RESUMEN

Una característica en común de todas las células vivas, es la presencia de una membrana lipídica que define el límite entre el interior y el exterior de la célula. Las proteínas que se localizan en la membrana cumplen varias funciones esenciales, como la mediación de la transducción de señales y la secreción de proteínas. En células eucariotas, estas proteínas a menudo se localizan en microdominios de membrana comúnmente conocidas como “balsas lipídicas” o “balsas de membrana” enriquecidas en ciertos lípidos, tales como esteroides y esfingolípidos. El hecho de que las células bacterianas, así como sus homólogos eucariontes tengan una arquitectura altamente organizada, plantea la cuestión de cómo las proteínas se localizan en determinados sitios en la membrana de la célula bacteriana y la forma que lo hacen de manera dinámica. En células eucariotas, las proteínas que están implicadas en la formación de balsas lipídicas contienen dominios de tipo SPFH (llamados así por las proteínas que los contienen: *Stomatin*, *Prohibitin*, *Flotilin* y *HflC/K*). Estos dominios no son exclusivos de los eucariontes, ya que se han encontrado en varios géneros bacterianos. Sin embargo, no hay estudios que aborden la cuestión de que si las proteínas que contienen dominios SPFH participan en la localización y organización de las proteínas bacterianas relacionadas a los sistemas de transducción de señal. Este proyecto, tuvo como objetivo desarrollar una técnica para obtener membranas resistentes a detergentes (DRMs-*Detergent Resistant Membranes*) en *Escherichia coli*, con el fin de estudiar su contenido de proteínas y lípidos. Nuestros resultados indican que, al menos una cinasa sensora unida a membrana de la familia de los sistemas de dos componentes BarA, y HflC, una proteína que contiene dominios SPFH se encuentran en los DRMs.

## **ABSTRACT**

A feature common to all living cells is the presence of a lipid membrane that defines the boundary between the inside and the outside of the cell. Proteins that localize to the membrane serve a number of essential functions, such as mediation of signal transduction and protein secretion. In eukaryotic cells these proteins are often localized in membrane microdomains, commonly referred to as “lipid rafts” or “membrane rafts”, enriched in certain lipids, such as sterols and sphingolipids. The fact that the bacterial cells, like their eukaryotic counterparts, have a highly organized architecture raises the question of how proteins localize to particular sites in the bacterial cell membrane and how they do so in a dynamic manner. In eukaryotic cells the proteins that are involved in the formation of lipid rafts contain SPFH domains (Stomatin, Prohibitin, Flotilin and HflC/K). These domains are not exclusive of eukaryotes, as they have also been found in several bacterial genera. However, no studies addressing the question of whether the SPFH containing proteins play a role in the localization and organization of bacterial proteins that are members of signal transduction systems. This project aims at developing a technique for obtaining DRMs (Detergent-Resistant Membranes) in *Escherichia coli*, in order to study their protein and lipid content. Our results indicate that, at least one membrane bound sensor kinase of the two-component family, BarA, and HflC, a SPFH-containing protein, are located in DRMs.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1. 1 Membranas biológicas

Las membranas biológicas están constituidas principalmente por lípidos y proteínas que forman una barrera semipermeable cuya función principal es delimitar el interior y exterior de la célula. A lo largo de la historia, diversos modelos han tratado de explicar la naturaleza, composición y características de las membranas biológicas. El modelo que marcó un paradigma en el estudio actual de las membranas biológicas fue el “modelo del mosaico fluido” de Singer y Nicholson (1972), el cual fue el primero en reconocer que las proteínas anfífilas residen dentro de la bicapa lipídica y que además poseen una estructura dinámica en la membrana; diversos estudios durante esa época corroboraron la capacidad de los componentes de la membrana de transportarse lateralmente (Frye y Edidin, 1970) y que existen cambios en la fluidez de la membrana a través del tiempo (Borochov y Shinitzky, 1976).

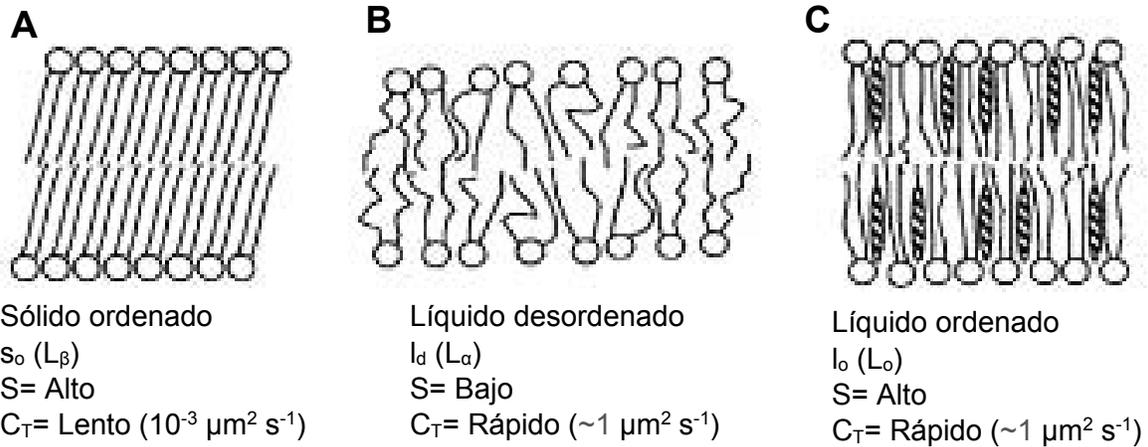
Los fosfolípidos son las moléculas más abundantes que conforman la membrana biológica. Sin embargo, estos lípidos no sólo se limitan a un rol estático en la estructura de la membrana, también participan activamente en los procesos fisiológicos, modifican la estructura de proteínas membranales, además proveen la matriz necesaria para el ensamblaje y función de una gran variedad de procesos catalíticos (Dowhan, 1997). A su vez, se ha descrito que tanto las proteínas solubles como las ancladas a la membrana pueden interactuar con lípidos específicos, dominios de lípidos o afectar a las propiedades globales de la bicapa lipídica (Oursel, *et al.*, 2007; Wilkström, *et al.*, 2008).

Durante mucho tiempo se mantuvo el paradigma respecto a la composición heterogéneamente dinámica de las membranas. Sin embargo, estudios sobre el tráfico de lípidos y transducción de señales sugirieron que tanto los lípidos como las proteínas de membrana no se localizan aleatoriamente en la bicapa lipídica (Lisanti y Rodriguez-Boulán, 1990). Incluso, se ha descrito que las proteínas son “secuestradas” en pequeños compartimientos o plataformas en la membrana, por lo que aumenta la interacción proteína-proteína y de esta manera amplifica la

velocidad de la transducción de señales y otros procesos enzimáticos (Mishra y Joshi, 2007).

En un medio acuoso, la bicapa lipídica que constituye a las membranas biológicas puede existir en diferentes estados físicos de acuerdo con su organización lateral, el grado de ordenamiento y la movilidad de las moléculas lipídicas. Estos diversos estados ocasionan numerosos arreglos espaciales y grados de libertad de cada lípido con respecto a sus vecinos, por lo que diversas fases pueden coexistir a lo largo de la membrana. El tipo de fase adoptada depende de la estructura de los lípidos como longitud y saturación de las cadenas hidrocarbonadas, aunque otros parámetros fisicoquímicos como la temperatura, pH, fuerza iónica pueden afectar la naturaleza de las fases. Los dos extremos de las fases en lípidos son la fase sólido-gel y la líquida (van Meer, *et al.*, 2008).

En la fase sólido-gel ( $L_{\beta}$ ) o también llamada sólido ordenado ( $s_o$ ), las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos muestran una configuración saturada y con alargamiento máximo, dando como resultado una red de lípidos extremadamente compacta y altamente ordenada (S) (Fig. 1a); en consecuencia, la difusión lateral de los lípidos ( $C_T$ ) es fuertemente disminuida. Mientras que en la fase fluida ( $L_{\alpha}$ ) o también llamada líquido desordenado ( $l_d$ ), las cadenas hidrocarbonadas son generalmente insaturadas y menos extendidas (Fig. 1b), por lo que la red de lípidos es laxa y poco ordenada, resultando en altas  $C_T$  y difusión rotacional de los lípidos. Debido a lo anterior, pueden existir diferentes grados de fluidez a lo largo de la membrana de acuerdo con la composición de la misma (van Meer, *et al.*, 2008; Eeman y Deleu, 2010). Los esteroides que se encuentran en las membranas biológicas no son capaces por sí mismos de generar bicapas lipídicas. Sin embargo, cuando estos se intercalan en bicapas ya formadas pueden generar fases de líquido ordenado ( $l_o$ ) que tienen características tanto de la fase sólido-gel como de la líquida (Fig. 1c); esta fase es altamente ordenada, además los valores de  $C_T$  y velocidad de difusión lateral son casi tan altos como en la fase  $l_d$  pero mantienen grados de fluidez menores, como en fase  $s_o$  (van Meer, *et al.*, 2008).



**Figura 1.** Tipos de fase de una bicapa lipídica y características relevantes. a) Fase de sólido ordenado ( $s_o$ ), las cadenas aciladas aún se encuentran insaturadas, generando un estado sólido con características de fluidez reducida y alto grado de ordenamiento. b) Fase de líquido desordenado ( $l_d$ ), las cabezas polares de los fosfolípidos pueden rotar libremente permitiendo una fluidez alta pero un grado de ordenamiento menor. c) Fase de líquido ordenado ( $l_o$ ), las cadenas aciladas de los fosfolípidos se encuentran estabilizadas por esteroides, permitiendo un alto grado de ordenamiento por lo que su fluidez se reduce considerablemente, pero mantiene la velocidad de difusión lateral como en la fase  $l_d$ . S: entropía,  $C_T$ : coeficiente de difusión lateral de lípidos. Modificado de Munro, 2003.

## 1.2 Dominios de membrana

Una consecuencia de los múltiples estados de fluidez de la membrana, es que los componentes de las mismas pueden estar organizados en una distribución lateral heterogénea. Provocando la creación de arreglos ordenados que difieren en la composición de lípidos y proteínas con respecto del resto de la membrana. La existencia de áreas en la membrana con diferente composición y arquitectura molecular está directamente relacionada con los múltiples roles y la generación de límites físicos en diversos procesos fisiológicos, además de que estas áreas son altamente dinámicas a través del tiempo. Estos complejos son mejor conocidos como “dominios de membrana” (Simons e Ikonen, 1997; Sonnino y Prinetti, 2013).

La presencia de estos dominios es evidente en algunos tipos de células polarizadas, por ejemplo, existen macrodominios en la membrana basolateral y apical de las células epiteliales los cuales se extienden por varios micrómetros; aunque morfológicamente parecidos, estos macrodominios están especializados para

funciones específicas dependiendo de la línea celular. La heterogeneidad lateral de la membrana no sólo incluye dominios relativamente grandes, también está presente en una escala que abarca pocos micrómetros e inclusive nanómetros de longitud, estos pequeños complejos son llamados “microdominios” (Sonnino y Prinetti, 2013).

### **1.3 Balsas lipídicas**

Los primeros intentos por explicar las diferencias en la organización de la membrana plasmática, además de la localización de lípidos y proteínas, condujeron a la propuesta de pequeñas áreas en la membrana se encontraban en fase  $l_o$ , por lo que permanecían “flotando” en superficies más grandes de fases  $l_d$ , haciendo una analogía: “parecidas a las balsas en agua” (Simons y van Meer, 1988; Brown y Rose, 1992). Los reportes de Simons e Ikonen (1997), propusieron que existían microdominios de membrana en células epiteliales polarizadas, los cuales contenían diferente composición lipídica y grados de fluidez a lo largo de la membrana a los que llamaron “balsas lipídicas” (del inglés “lipid rafts”).

El postulado central de la existencia de estos dominios se basa en el hecho de que los lípidos de membrana se ensamblan de una manera dinámica. Esto se debe a que los esteroides (p. ej. colesterol) se intercalan firmemente entre los lípidos con cadenas hidrocarbonadas saturadas (p. ej. esfingolípidos), dando como resultado una organización similar a la fase  $s_o$ ; por otro lado, los lípidos que rodean a las balsas lipídicas mayoritariamente son insaturados (Simons y Toomre, 2000).

La definición de una balsa lipídica ha variado a lo largo del tiempo, sin embargo, en el “*Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function*” celebrado en 2006, se logró establecer una definición consenso en la que: la balsa lipídica debe ser pequeña (10-220nm de diámetro), heterogénea, altamente dinámica, enriquecida en esteroides y esfingolípidos, además de compartimentalizar procesos celulares y ser estabilizadas por interacciones proteína-proteína y proteína-lípido (Pike, 2006).

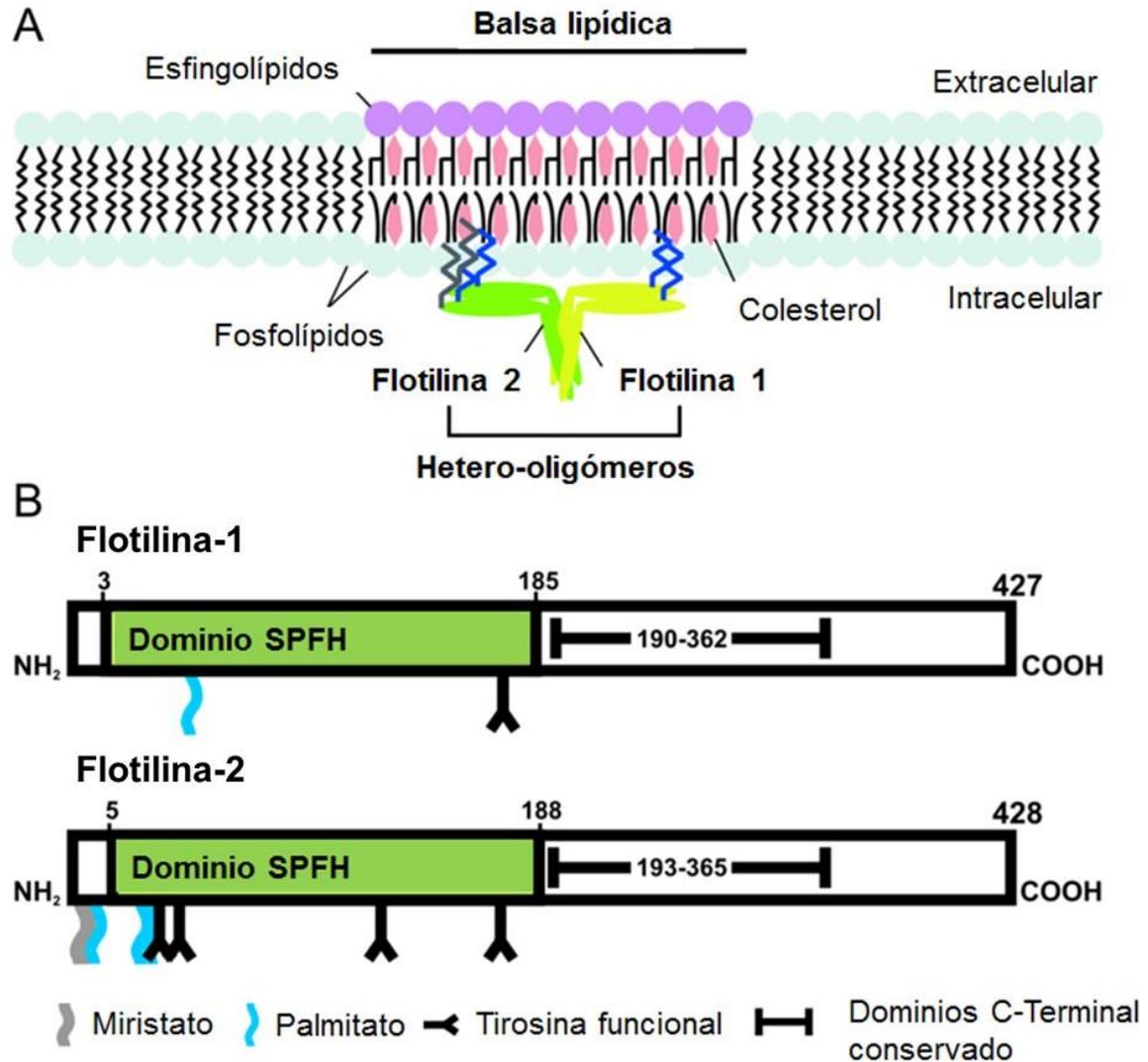
Se ha descrito que la formación e integridad de estos microdominios lipídicos en la membrana pueden estar estabilizados por proteínas transmembranales con dominios en común (Fig. 2A; Simons y Toomre, 2000; Browman *et al.*, 2007).

#### **1.4 Proteínas asociadas a balsas lipídicas**

Gran parte de los estudios sobre proteínas asociadas a las balsas lipídicas en eucariotes recaen en las Flotilinas. Se ha descrito que la Flotilina-1 y la Flotilina-2 están involucradas en diversos sistemas de transducción de señales, rearrreglo del citoesqueleto y tráfico vesicular (Bickel *et al.*, 1997; Ludwig *et al.*, 2010; Otto y Nichols, 2011). A su vez, los miembros de la familia de las Flotilinas pertenecen a una superfamilia que presenta el dominio conservado SPFH (*Stomatin, Prohibitin, Flotilin* y *HflC/K*) o también conocido como dominio PHB (*Prohibitin*). Se ha planteado que las proteínas que poseen estos dominios tienen diversas funciones como: participar activamente en la formación y mantenimiento de la propia balsa lipídica, generar estructuras altamente especializadas, actuar como potenciadores y moduladores de las actividades de las cinasas, además de ser chaperonas y contribuir en la regulación de canales iónicos (Browman *et al.*, 2007).

El dominio SPFH de las Flotilinas constituye la mayor parte del extremo N-terminal de las proteínas, mientras que en el extremo C-terminal se encuentra otro dominio altamente conservado sólo en la subfamilia de las Flotilinas y no en otras proteínas con dominio SPFH (Otto y Nichols, 2011); este último dominio contiene una región alfa-hélice que participa en la oligomerización para formar homo- y heterotetrámeros estables (Fig. 2B; Solis *et al.*, 2007). También, hay indicios que las Flotilinas son capaces de unirse a la membrana y ser estabilizadas por modificaciones en los ácidos grasos, especialmente por miristoilación y palmitoilación (Neumann-Giesen, *et al.* 2004).

Además, las balsas lipídicas contienen conjuntos de proteínas que pueden modificar el tamaño y composición del microdominio en respuesta a estímulos intra- o extracelulares; esto favorece interacciones específicas entre proteínas y puede resultar en la activación de cascadas de señalización (Simons y Toomre, 2000; Otto y Nichols, 2011).



**Figura 2.** Características generales de las Flotilinas A) La Flotilina-1 y la Flotilina-2 están asociadas a microdominios de membrana (balsas lipídicas). Las balsas lipídicas son dominios de membrana que son altamente dinámicos y que están enriquecidos de esfingolípidos y esteroides. La Flotilina-1 y 2 se unen a la cara intracelular de la membrana por acilación. La Flotilina-1 es capaz de unirse por miristoilación, mientras que ambas Flotilinas se unen por palmitoilación. B) Las Flotilinas contienen en la región N-Terminal un dominio homólogo con la familia de las prohibitinas y estomatinas, por otro lado, la región C-Terminal contiene un dominio con repetidos EAEA necesarios para la oligomerización. Modificado de: Kurrle *et al.*, 2012

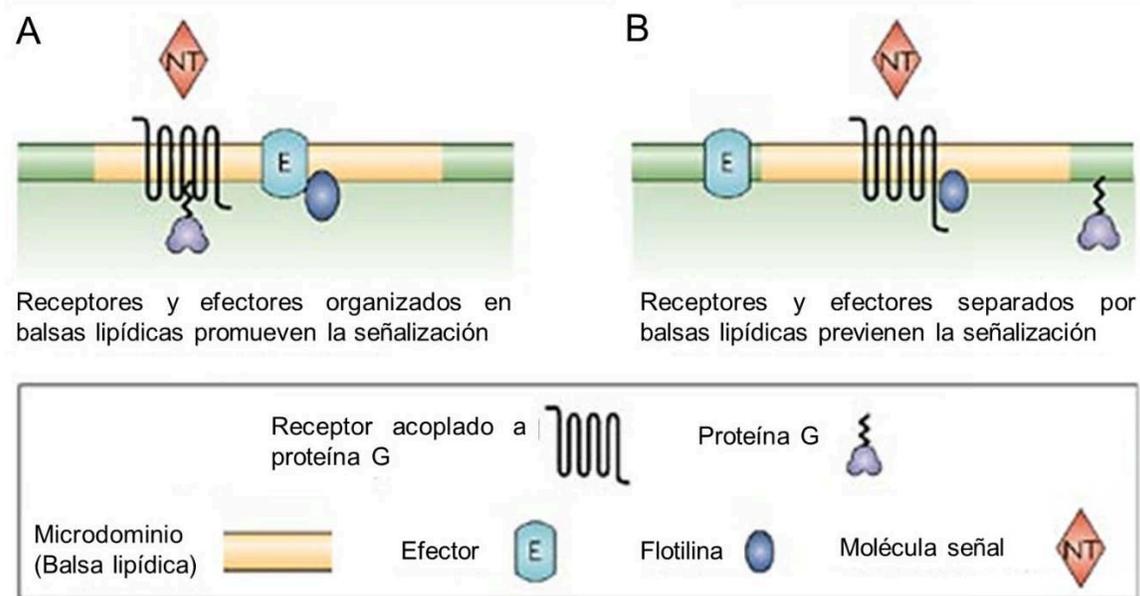
## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1 Balsas lipídicas y su función en la señalización celular**

La transducción de señales es iniciada por complejas interacciones proteína-proteína entre ligandos, receptores y cinasas (por mencionar algunos). Cada vez es más claro que la membrana celular participa activamente en este proceso. Se ha descrito que las balsas lipídicas son capaces de regular la señalización proporcionando microambientes ricos en componentes lipídicos y proteínicos relacionados con rutas de señalización. La activación es inducida tanto como por la agregación y la estabilización de estos microdominios, como por una mayor asociación de los receptores y efectores los cuales son responsables de promover la integración de las señales. Además de mediar la estabilización de las balsas lipídicas, existen reportes de que las Flotilinas tienen la capacidad de reclutar moléculas de señalización dentro de estos microdominios, promoviendo interacciones cinéticas favorables y exacerbando la transducción de señal (Fig. 3A; Simons y Toomre, 2000; Laude y Prior, 2004; Struemer, 2011). Alternativamente, se ha descrito que las balsas también pueden inhibir las interacciones entre las moléculas separándolas en compartimentos e inhibiendo la cascada de señalización (Lim y Yin, 2005). Actualmente se desconoce el papel de las proteínas con dominios SPFH en células procariotas.

### **2.2 Sistemas de dos componentes**

La respuesta a señales externas por parte de los organismos es una cualidad vital para los mismos. La habilidad para procesar la información en respuesta a un estímulo depende de complejas redes de transducción de señales, que permiten el control de la expresión génica y la regulación de la actividad proteica. En los procariontes una de las principales vías de señalización son los sistemas de dos componentes (Alex y Simon, 1994). Estos sistemas generan una respuesta fisiológica frente a determinados estímulos ambientales, a través de reacciones de fosfotransferencia entre una histidina cinasa (generalmente anclada en la membrana) y un regulador de respuesta (citósólico) (Cohen, 2002).

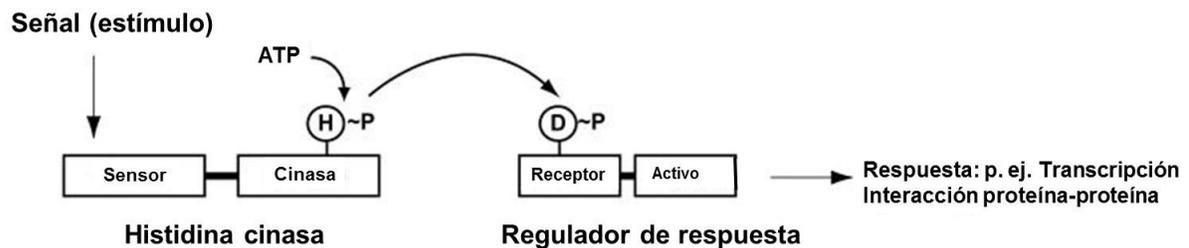


**Figura 3.** Mecanismos de control de la cascada de señalización en microdominios de membrana. a) Las Flotilinas pueden reclutar moléculas de señalización dentro de las balsas lipídicas, varios receptores acoplados a proteínas G, proteínas G y efectores de señalización pueden encontrarse en las balsas lipídicas lo que suministra un espacio delimitado en donde se aumentan las interacciones entre las moléculas dando como resultado una amplificación en la cascada de señalización. b) Alternativamente, las balsas pueden separar a las moléculas de señalización ocasionando una disminución o inhibición total de la señal. Modificado de Allen *et al.*, 2007.

El mecanismo canónico por el cual se transduce la señal comienza con la presencia de un estímulo ambiental específico que permite que la cinasa se autofosforile en un residuo de histidina cuya reacción es dependiente de ATP. Posteriormente, se transfiere el grupo fosforilo a un residuo de aspartato del regulador de respuesta, el cual a su vez funciona como regulador transcripcional permitiendo de esta manera controlar la expresión de diversos genes blanco (Fig. 4). Cuando el estímulo decae, el sistema se inactiva por la defosforilación de la histidin cinasa y del regulador de respuesta. De manera similar a la mayoría de las vías de señalización, los sistemas de dos componentes poseen una arquitectura modular que les proporciona versatilidad en la regulación e integración de la señal (Koretke *et al.*, 2000).

La actividad de los sistemas de dos componentes está regulada en diferentes niveles: dependiendo del nivel de fluctuación del propio estímulo (Stock, *et al.* 2000)

y de las actividades de fosfatasa y autofosfatasa (Aiba, *et al.* 1989; Hess, *et al.*, 1988). Las histidina cinasas pueden ser reguladas por diversas proteínas auxiliares que influyen en el nivel de fosforilación del regulador de respuesta (Stock, *et al.* 2000).



**Figura 4.** Diagrama de un sistema de dos componentes canónico. Al recibir y procesar un estímulo, la histidina cinasa se autofosforila en un residuo conservado de histidina, el grupo fosforilo es transferido a un dominio receptor del regulador de respuesta. La fosforilación del dominio receptor activa el regulador de respuesta y puede ejecutar varias tareas celulares como la expresión génica, catalizar reacciones metabólicas o modificar interacciones de proteína-proteínas. Modificado de: Sherker *et al.* 2005.

### 2.3 Sistemas de Dos Componentes en *E. coli*

La mayoría de los sistemas de dos componentes en *E. coli* son canónicos y se encuentran codificados en operones (una histidina cinasa y su respectivo regulador de respuesta; Skerker, *et al.*, 2005). *E. coli* posee al menos 62 marcos de lectura abiertos (ORFs) que codifican para alguno de los miembros de sistemas de dos componentes, de los cuales 32 corresponden a reguladores de respuesta, 23 corresponden a cinasas ortodoxas y 5 a cinasas híbridas. A excepción de CheA y NtrB, todas las histidina cinasas de estos sistemas se encuentran ancladas en la membrana interna (Mizuno, 1997). En la tabla 1 se resume brevemente la función y señal de activación de algunos sistemas de dos componentes.

**Tabla 1.** Ejemplos de sistemas de dos componentes que posee *E. coli*

Sistema	Función	Señal	Referencia
ArcB-ArcA	Regulación de la expresión génica bajo diferentes condiciones respiratorias	Estado redox de las quinonas	Georgellis <i>et al.</i> 2001 Malpica <i>et al.</i> 2004 Álvarez <i>et al.</i> 2013
BarA-UvrY	Regula la expresión de los sRNAs CsrB y CsrC que antagonizan con la regulación de CsrA.	Formato, acetato, ácidos grasos de cadena corta.	Suzuki <i>et al.</i> 2002; Chavez <i>et al.</i> 2010.
CpxA-CpxR	Expresión de porinas OmpC y OmpF	Estrés celular	Batchelor <i>et al.</i> , 2005
NtrB-NtrC	Activa la transcripción de <i>nifA</i> , <i>glnA</i> y otros operones responsables en la fijación y asimilación de nitrógeno.	NrtB está regulada por <i>glnB</i> que inhibe la actividad cinasa y activa la actividad fosfatasa.	Song <i>et al.</i> 2004.
PhoP-PhoQ	Adaptación en ambientes limitantes de Mg <sup>2+</sup> y a otras condiciones de estrés	Responde a niveles de Mg <sup>2+</sup> y Ca <sup>2+</sup>	Groisman, 2001.

#### 2.4 Composición lipídica en *E. coli*

Los fosfolípidos que constituyen a las membranas difieren entre las especies. En el caso de *E. coli*, cerca del 70-80% corresponde a fosfatidil etanolamina, 20-25% a fosfatidil glicerol y 5% a difosfatidil glicerol (cardiolipina); además constituyen cerca del 10% del peso seco de la bacteria (De Siervo, 1969; Cronan, 2003). Los lípidos en menor concentración de importancia incluyen los precursores del ácido fosfatídico, CDP-diacilglicerol, fosfatidil serina y fosfatidilglicerol fosfato (Raetz, 1986). Para cada uno de estos lípidos, pueden existir varias especies moleculares con las cadenas aciladas de diferente longitud, insaturación y análogos (p.ej ciclopropano; Cronan, 2003). Por ejemplo, la fosfatidil etanolamina que se encuentra en membrana externa, se compone principalmente de ácidos grasos saturados a diferencia de la membrana interna que posee ácidos grasos insaturados (Lugtenberg y Peters, 1976).

## 2.5 Resistencia a detergentes y balsas lipídicas

Desde hace tiempo, se ha observado que en ciertas condiciones, los componentes de la membrana no son solubilizados a altas concentraciones de ciertos detergentes (Yu, *et al.*, 1973). Esta cualidad ha sido ampliamente explotada para el estudio de las balsas lipídicas a través de la formación de membranas resistentes a detergentes (*DRM*, por las siglas en inglés de *Detergent-Resistant Membranes*) ya que permite aislar a las proteínas y lípidos asociados a estos microdominios (Brown, 1994; Jacobson *et al.*, 2007). La técnica se basa en la obtención de membranas insolubles al tratamiento a baja temperatura con detergentes no iónicos como el Tritón X-100 (TX-100) o CHAPS que posteriormente son recolectados por flotación a través de ultracentrifugación en gradientes de densidad (Brown y Rose, 1992; Mellgren, 2007).

El mecanismo de obtención de DRM se basa en la obtención de la fase ordenada ( $l_o$ ) de la membrana. Estudios en modelos membranales sugieren que el empaquetamiento compacto de los lípidos en la fase  $l_o$  o en gel previene la incorporación de detergente dentro de la bicapa. Por lo que la utilización de Tritón X-100 solubiliza específicamente la fase  $l_d$  permitiendo que la fase  $l_o$  permanezca relativamente sin cambios en forma de DRMs (Brown, 2006). Si bien, la técnica no es apropiada para caracterizar el tamaño y la dinámica de las balsas lipídicas, resulta un procedimiento útil, ya que puede proporcionar una evidencia de la existencia de las balsas lipídicas, además de obtener un panorama general de la composición tanto lipídica como proteica de estos microdominios de membrana. Además, se ha descrito que las Flotilinas pueden ser identificadas en las fracciones correspondientes a DRMs (Bickel *et al.*, 1997), por lo que suelen ser usadas como marcadores positivos.

Durante mucho tiempo, las Flotilinas han sido utilizadas como marcadores de balsas lipídicas debido a que generalmente son insolubles al tratamiento por detergente. Además, recientemente se ha puesto en manifiesto que algunas Flotilinas participan activamente en numerosos procesos de señalización, además de que regulan mecanismos de organización de las balsas lipídicas (Babuke y Tikkanen, 2007).

### **3. HIPÓTESIS**

*E. coli* posee microdominios de membrana enriquecidos en proteínas con dominios SPFH que permiten la ubicación específica de sistemas de señalización de dos componentes.

### **4. OBJETIVOS**

#### **4.1 Objetivo general**

- Purificar a la membrana interna de *E. coli* y posteriormente aislar membranas resistentes a detergentes (DRMs) para la identificación de sistemas de dos componentes localizados en ellas.

#### **4.2 Objetivos particulares**

- Construir una proteína marcada con un epítoto de hemaglutinina como marcador de proteína de membrana externa
- Purificar membrana interna de *E. coli*
- Aislar DRMs bajo diferentes condiciones de solubilización.
- Identificar los sistemas de dos componentes asociados a DRMs.

## 5. JUSTIFICACIÓN

Las balsas lipídicas y las proteínas que las conforman han sido ampliamente identificadas y caracterizadas en células eucariotes. Existe poca información sobre estructuras similares en bacterias, sin embargo, se sabe que *E. coli* posee varias proteínas con dominios SPFH, homólogas a las Flotilinas eucariotas. Las proteínas con dominios SPFH que tiene *E. coli* son: HflC, HflK, YbbK y YqiK, que se localizan en la membrana interna. Además, en estudios preliminares del grupo de investigación se ha comprobado que mutantes en estas Flotilinas afectan la actividad de la cinasa sensora BarA por un mecanismo aún no conocido. Debido a la amplia distribución de los dominios conservados de SPFH entre los diferentes dominios de la vida, se sugiere un origen común y posiblemente una homología funcional de todas las proteínas que contienen dicho dominio.

Además, se ha observado que algunas proteínas de membrana están distribuidas heterogéneamente en las bacterias, por lo que aumenta nuestro interés en identificar si las proteínas con dominios SPFH bacterianas están relacionadas con la función y localización de complejos proteínicos de señalización.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Cepas y condiciones de crecimiento

Las cepas de *E. coli* y plásmidos usados en este estudio se muestran en la tabla 2.

**Tabla 2.** Características relevantes de las cepas y plásmidos utilizados.

Cepa	Características relevantes	Origen
MG1655	Cepa silvestre	Stock laboratorio
JW4133	$\Delta hflC725::Kan^R$	Baba, 2006 <i>et al.</i>
JW5536	$\Delta arcB738::Kan^R$	Baba, 2006 <i>et al.</i>
MC4100	$\Delta barA::Tc^R$	Stock laboratorio
MG1655 <i>ompC::HA</i>	<i>ompC::HA Cm<sup>R</sup></i>	En este trabajo
MG1566 <i>hflC::HA</i>	<i>hflC::HA Cm<sup>R</sup></i>	Stock laboratorio
pKD46	Recombinasa Red, promotor inducible por arabinosa, Amp <sup>R</sup>	Datsenko, 2000 <i>et al.</i>
pSU314	Cm <sup>R</sup> , HA-tag	Datsenko, 2000 <i>et al.</i>
pSU315	Km <sup>R</sup> , HA-tag	Datsenko, 2000 <i>et al.</i>

A menos que se especifique lo contrario, las cepas de *E. coli* fueron crecidas en medio Luria-Bertani (LB) a 37°C en agitación constante a 250r.p.m., adicionando marcador de selección según sea el caso.

### 6.2 Etiquetado de hemaglutinina

Se realizó un etiquetado con un epítipo de hemaglutinina (HA) en el extremo carboxilo terminal de OmpC de acuerdo a la técnica reportada por Uzzau, *et al.*, (2001). Brevemente, se diseñaron dos oligonucleótidos para amplificar por PCR la secuencia que codifica el epítipo de HA junto con un casete de resistencia usando como templados los plásmidos pSU314 y pSU315 flanqueado por dos secuencias de 40pb idénticas a las secuencias que se encuentran alrededor del codón de paro del gen que codifica para OmpC. El producto amplificado por PCR se transformó en la célula receptora que contenía el plásmido auxiliar pKD46. El etiquetado se llevó a cabo por recombinación homóloga, la recuperación de la cepa se realizó en medio SOC (2% Triptona, 0.5% extracto de levadura, 10mM NaCl, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM glucosa) y se seleccionaron las colonias gracias al casete de resistencia utilizado.

La verificación del inserto se realizó por PCR y posteriormente por Western blot contra HA. Los oligonucleótidos utilizados se enlistan en la tabla 3.

**Tabla 3.** Oligonucleótidos utilizados para el etiquetado por epítipo de hemaglutinina.

<i>ompC-HA-Fw</i>	5'-CACTGATAACATCGTAGCTCTGGGTCTGGTTTACCAGTTCTATCCGTATGATGTTCT-3'
<i>ompC-HA-Rv</i>	5'-AAAAAGGGCCCGCAGGCCCTTTGTTTCGATATCAATCGAGAGAATATCCTCCTTAGTTC-3'

### 6.3 Formación esferoplastos

Los esferoplastos fueron generados a partir de una modificación de la técnica descrita por Renner *et al.* (2011). Para ello, se realizó un cultivo de toda la noche de la cepa MG1655 wt, OmpC::HA o HflC::HA. Posteriormente se inocularon 10 mL del precultivo en 1 L de medio fresco de LB; luego fue incubado a 37°C en agitación (250 r.p.m.) hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> de 0.5, se agregó 150 µL de ampicilina (50 mg·mL<sup>-1</sup>) para alcanzar una concentración final de 7.5 µg·mL<sup>-1</sup>. Se continuó incubando por 3 h en las mismas condiciones hasta observar células alargadas al microscopio. Las células alargadas fueron recolectadas por centrifugación a 4,000 x g, 4°C por 15 min en un rotor GSA (Sorvall). Luego, las células fueron resuspendidas suavemente con la ayuda de una barra magnética en 7.5 mL de una solución fría de 1M sacarosa, 0.2 M Tris-HCl, pH 8.0. Posteriormente, se agregó 2.5 mL de una solución de 1 M sacarosa, 0.2 M Tris-HCl pH 8.0, 4 mM EDTA, 60 mg·mL<sup>-1</sup> lisozima. Las células fueron resuspendidas invirtiendo suavemente el tubo 5-8 veces. Se incubó en hielo y cada 5 min se tomaron 10 µL de la suspensión, se agregó 90 µL de agua estéril y se resuspendió suavemente con pipeta, se observó la muestra al microscopio para confirmar la formación de esferoplastos (generalmente de 5-10 minutos después de añadir la solución con lisozima). A continuación se generó un choque osmótico con resto de la suspensión inicial agregando agua estéril adicionada con DNasa, para generar una concentración final de 0.1 M sacarosa e invirtiendo suavemente por 10-15 veces. Los esferoplastos se analizaron nuevamente por microscopia óptica y fueron recolectados por centrifugación a 3,500 x g a 4°C por 30 min.

#### **6.4 Fraccionamiento subcelular**

La pastilla de esferoplastos fue resuspendida suavemente en 10mL de una solución amortiguadora (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 20% sacarosa m/m). Las células se lisaron pasándolas 3 veces a través de una prensa de French a 20,000 psi, las células sin romper y los restos celulares fueron eliminados por centrifugación a 15,000 x g por 30 min a 4°C. Se recolectó el sobrenadante y se colocó 5 mL en un gradiente discontinuo de sacarosa: 10 mL 50% (m/m), 5 mL 46%, 10 mL 42%, 10 mL 36%, 5 mL 32%, 10 mL 27%. Todas las soluciones de sacarosa fueron preparadas con una solución amortiguadora de fraccionamiento (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA). Los gradientes fueron centrifugados a 38,000 r.p.m (~113,000 xg) por 12 h a 4°C en un rotor 45Ti (Beckman-Coulter). Se recolectaron fracciones de 1.5mL, posteriormente se midió la absorbancia (DO<sub>280</sub>), además se calculó el porcentaje de sacarosa de cada una de ellas a través de un refractómetro. Se tomaron las fracciones representativas del fraccionamiento y se realizó una inmunoréplica tipo Western blot contra marcadores de proteínas solubles (DnaK), de membrana interna (ArcB) y de membrana externa (OmpC).

#### **6.5 Obtención de Membranas Resistentes a Detergentes (DRMs)**

Las fracciones que correspondieron a membrana interna del fraccionamiento subcelular fueron diluidas con una solución amortiguadora fría (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA) hasta alcanzar una concentración de sacarosa cercana a 10% (m/m), posteriormente fue centrifugada a 38,000 r.p.m. (~113,000 x g) por 2 h a 4°C en un rotor SW40 (Beckman-Coulter). Se decantó el sobrenadante y en caso de ser necesario, la pastilla fue almacenada a -20°C hasta su uso. La pastilla fue resuspendida en 500 µL de solución fría de amortiguador TNE (50mM Tris-HCl pH 7.4, 150mM NaCl, 5mM EDTA). Se cuantificó proteína total por el método de Bradford de acuerdo a las instrucciones del proveedor (Sigma-Aldrich) realizando una curva estándar con BSA. Se colocó volumen equivalente a 500 µg de proteína microsomal en un tubo para ultracentrifugación (manteniéndolo en hielo) y se añadió TNE para alcanzar el volumen adecuado para la reacción (Tabla 4). Las diferentes condiciones de solubilización se realizaron agregando diferentes cantidades de Tritón X-100 (10%), p.ej. para la relación 6:1 se agregó 30 µL Tritón

X-100 (3,000 µg) a 500 µg de proteína microsomal. En cada uno de los ensayos se mantuvo la concentración final de Tritón X-100 a 1%, las cantidades y relaciones ensayadas se enlistan en la Tabla 4. Después de agregar el Tritón X-100, las membranas fueron incubadas en hielo por 30 min, posteriormente se agregó TNE hasta alcanzar un volumen de 1270 µL, luego se agregó 2.54 mL de Optiprep 60% y se mezcló suavemente en vortex durante 30 s. A continuación, se colocó cuidadosamente por encima del primer gradiente 6.171 mL de Optiprep 30%, el cual fue preparado mezclando partes iguales de Optiprep 60% (Axis-Shield) y TNXE (TNE+ 1% Tritón X-100), en seguida se puso 1.016 mL de TNXE. Los gradientes fueron centrifugados a 38,000 r.p.m (182,000 x g) por 2 h a 4°C en un rotor SW 40Ti (Beckman-Coulter). Se recolectaron fracciones de 1 mL y se almacenaron a 4°C.

**Tabla 4.** Condiciones para la solubilización de membrana interna.

Relación (Tritón/membrana)	Membrana+TNE (µL)	Tritón X-100 (µL)	V <sub>TOT</sub> (µL)
6:1	270	30	300
7:1	315	35	350
8:1	360	40	400
9:1	405	45	450
10:1	450	50	500
11:1	495	55	550

## 6.6 SDS-PAGE

Las proteínas se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE). Las muestras se calentaron a 95°C por 5 min en un amortiguador de carga (100 mM Tris-base, 4% SDS, 0.2% azul de bromofenol, 20% glicerol, 10% β-mercaptoetanol) y corridas en un gel separador de 8% u 12% según el tamaño de proteína a evaluar en una solución amortiguadora 1X SDS-PAGE (25mM Tris-HCl, 192mM Glicina, 1% SDS) a 50 V durante 30 min y posteriormente a 100 V hasta lograr una separación adecuada.

### **6.7 Inmunoréplica tipo Western blot**

Las transferencias a membrana de nitrocelulosa se realizaron en cámara húmeda con amortiguador frío de transferencia 1X (250 mM Tris-HCl pH 8.5, 192 mM Glicina) a 100 V por 1h a 4°C, se confirmó la transferencia tiñendo la membrana con rojo Ponceau y lavando el excedente de colorante con agua destilada. La membrana fue desteñida lavando una vez con una solución de TBS-Tween 1x (25 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20). Posteriormente se bloqueó la membrana en una solución de TBS-Tween+5% leche baja en grasas en agitación suave a temperatura ambiente por una hora. Se lavó una vez por un minuto con una solución de TBS-Tween para retirar el exceso de leche y posteriormente fue incubado con el anticuerpo primario anti-DnaK, anti-ArcB, anti-BarA o anti-HA (Dilución 1:10,000) según el caso por toda la noche. Posteriormente se lavó el primer anticuerpo 3 veces por 10 minutos con una solución de TBS-Tween y se incubó con el anticuerpo secundario (acoplado a peroxidasa de rábano) a una dilución 1:10,000 por 1 h, luego se volvió a lavar con una solución de TBS por tres veces. El revelado se realizó en cuarto oscuro, incubando la membrana por 30 s con soluciones quimioluminiscientes (Luminol/Peróxido) y posteriormente expuestas de 5 s a 1 min en una película para revelado.

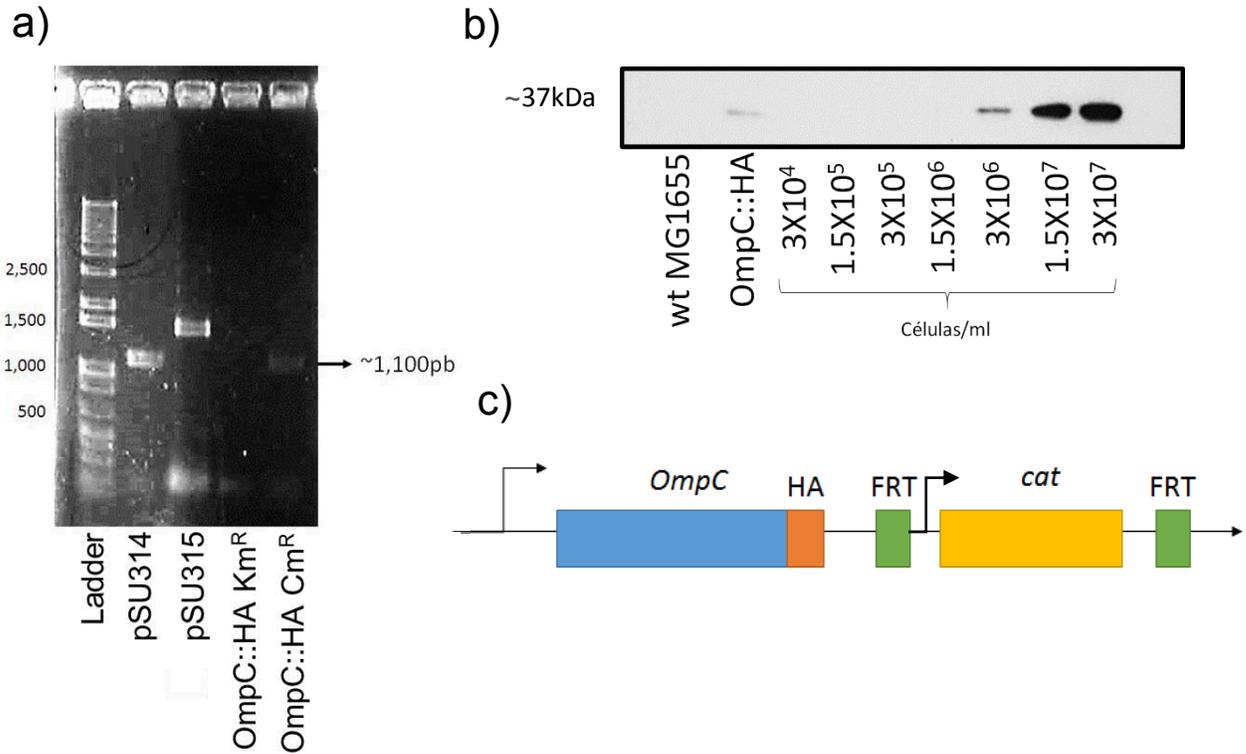
## 7. RESULTADOS

### 7.1 Generación de un marcador de membrana externa: OmpC::HA

Con el objetivo de generar un marcador para proteínas de membrana externa, se generó una cepa con un epítipo de HA en el carboxilo terminal de OmpC. Se amplificaron los casetes de resistencia Cm<sup>R</sup> y Kn<sup>R</sup> usando como templado los plásmidos pSU314 y pSU315 respectivamente. Se obtuvieron dos productos de aproximadamente 1,100 y 1,600 pb los cuales fueron transformados por electroporación en una cepa *wt* MG1655 que expresaba la recombinasa Red del fago  $\lambda$  en el plásmido pKD46 para su incorporación al cromosoma receptor por recombinación homóloga. Se realizó la recuperación de la cepa en medio SOC y se sembraron en placas de LB adicionando el marcador de resistencia necesario; se obtuvieron colonias Cm<sup>R</sup>. La integración del epítipo de HA en OmpC en la cepa receptora fue comprobada por PCR utilizando los oligos *ompC*-HA-Fw y *ompC*-HA-Rw que flanquean la región de interés, obteniéndose un producto de PCR de aproximadamente 1,100 pb cuyo peso corresponde al casete de Cm<sup>R</sup> y al epítipo de HA (Fig. 4A). Adicionalmente, se realizó una inmunoréplica tipo Western blot contra HA para corroborar la inserción del epítipo de HA, los resultados indicaron una señal con un peso aproximado a 37kDa (Fig. 4B).

### 7.2 Formación de esferoplastos

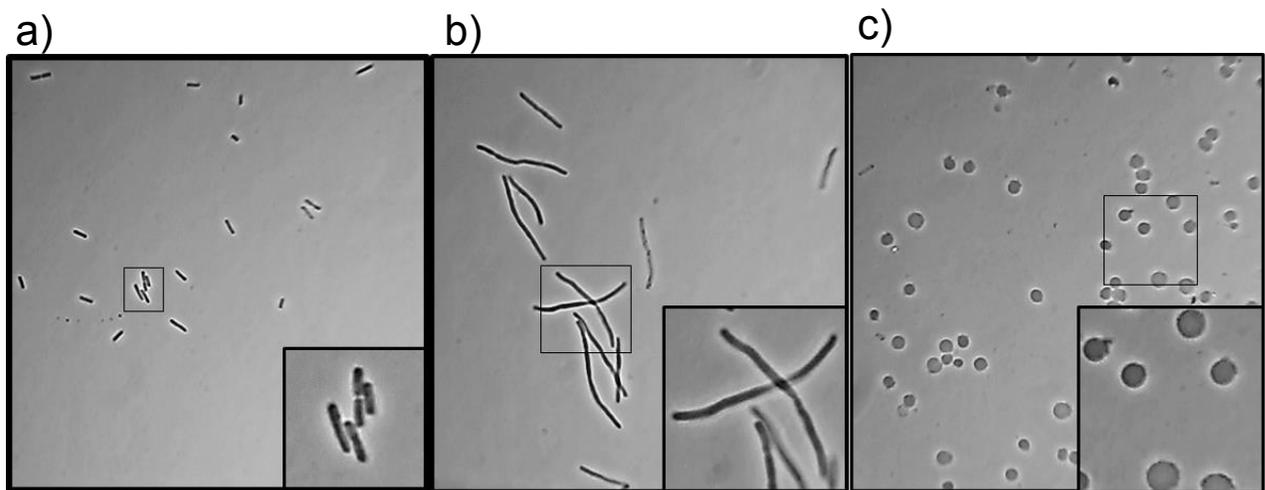
La generación de esferoplastos se realizó añadiendo ampicilina a un cultivo de *E. coli* en fase exponencial temprana (DO<sub>600</sub>= 0.5) para obtener células filamentosas. Se observó por microscopía óptica que existe un alargamiento considerable en comparación con las células no tratadas (Fig. 5A y B). Estas células filamentosas fueron recolectadas por centrifugación suave y resuspendidas en un amortiguador frío, antes de ser tratadas con lisozima+EDTA e incubadas en hielo (Ver sección 6.3).



**Figura 4.** Etiquetado de OmpC para marcador de membrana externa con un epítipo de HA a) Se amplificó por PCR la región del casete de resistencia de pSU314 y pSU315, el epítipo de HA y la región que codifica el carboxilo terminal de OmpC. Se obtuvieron dos productos de aproximadamente 1,100 y 1,500 pb, los productos fueron transformados en la cepa receptora y se obtuvieron colonias con el marcador de resistencia. Sólo algunas colonias Cm<sup>R</sup> fueron positivas a la integración del amplicón cuyo producto correspondía aproximadamente a 1,100 pb. b) Inmunoréplica tipo Western blot contra HA con diferentes concentraciones celulares, se observó un producto de aproximadamente 37 kDa correspondiente al peso molecular de OmpC. c) Esquema de la construcción generada, el epítipo de HA se encuentra en el mismo marco de lectura de OmpC en la región carboxi-terminal, seguido del casete de resistencia a Cm flanqueado por sitios FRT (*Flp Recombinase Target*).

Posteriormente se produjo un choque osmótico y se observó la muestra bajo el microscopio óptico. Se comprobó que el rendimiento de obtención de esferoplastos fue cercano al 100%, aproximadamente 5-10 min después de la incubación con lisozima+EDTA (Fig. 5C). Los esferoplastos fueron centrifugados a baja velocidad y resuspendidos suavemente en una solución amortiguadora fría. Es importante notar que después de la resuspensión se encontraron algunas células fantasmas (“ghost

cells”) las cuales carecen de contenido citosólico, es decir, se lisaron anticipadamente. La aparición de células fantasma aumenta si se incrementa el tiempo de incubación con lisozima+EDTA o si son resuspendidas fuertemente. Finalmente los esferoplastos se lisaron utilizando una prensa de French, el lisado fue clarificado por centrifugación, el sobrenadante obtenido fue separado y almacenado a 4°C.



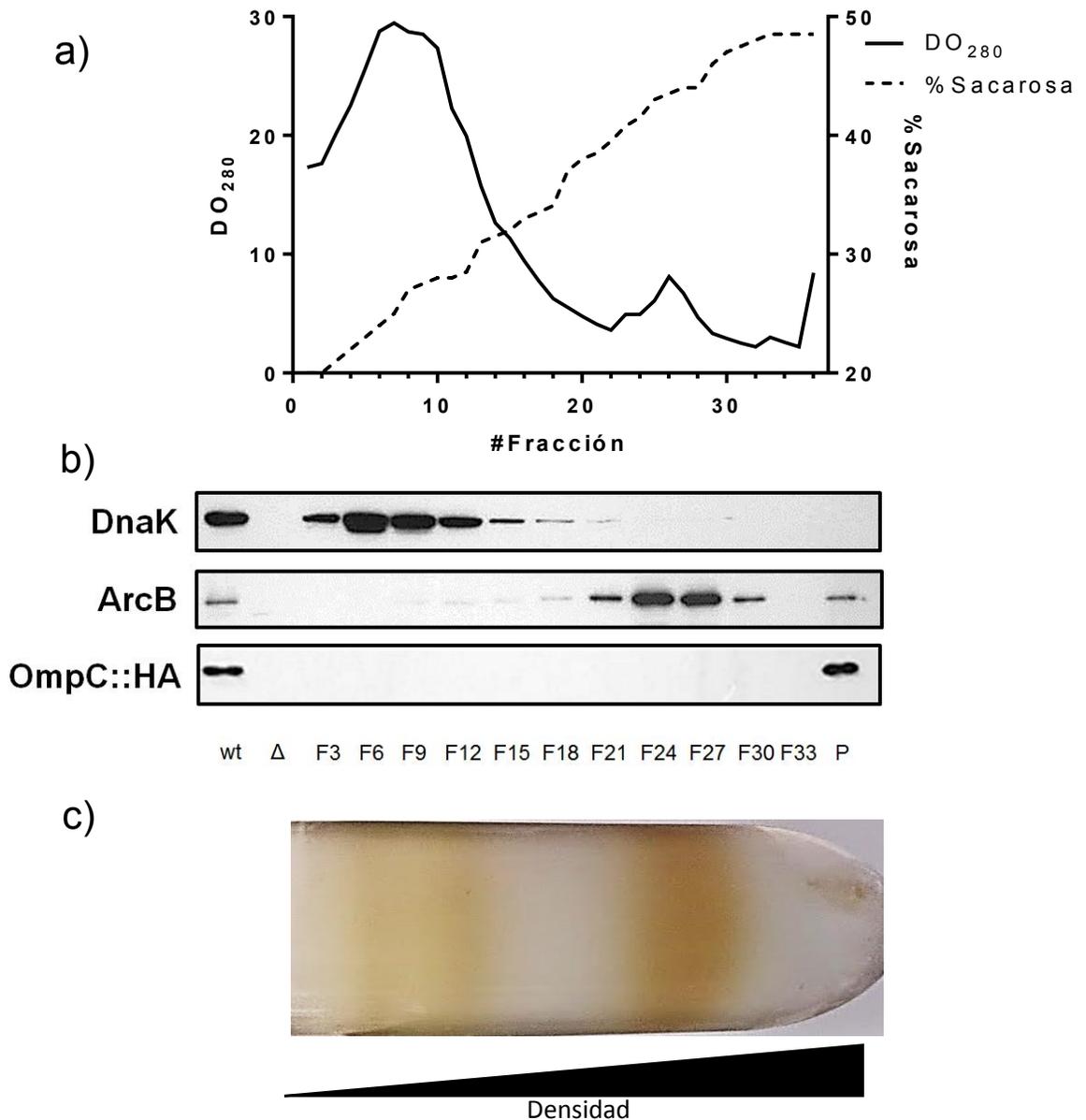
**Figura 5.** Pasos en la generación de esferoplastos. a) Células sin tratamiento, b) células tratadas con ampicilina con apariencia filamentosas ya que no son capaces de dividirse, en este punto la pared celular de la bacteria se encuentra desestabilizada, c) para completar la generación de esferoplastos, las células filamentosas son tratadas con lisozima+EDTA que permite degradar los peptidoglicanos restantes, y se realiza un choque osmótico. Todas las imágenes fueron tomadas utilizando el mismo objetivo (100x) y se encuentran a la misma escala.

### 7.3 Fraccionamiento celular

Con el objetivo de separar las fracciones membranales y proteínas solubles, el sobrenadante anterior fue colocado en un gradiente de sacarosa y centrifugado toda la noche a 38,000 r.p.m. Después de la centrifugación, se observaron dos bandas visibles en el gradiente y una pastilla en el fondo del tubo (Fig. 6C). Se separaron

fracciones de 1.5 mL y la proteína fue cuantificada por absorbancia a 280 nm. Los resultados indican la presencia de tres picos en las fracciones 8, 24 y 36 (la última correspondiente a la pastilla que fue resuspendida en 1.5 mL de solución de fraccionamiento). Se realizó una inmunoréplica tipo Western blot contra las proteínas DnaK, ArcB y OmpC::HA usándolas como marcadores de proteínas solubles, membrana citoplasmática (interna) y de membrana externa, respectivamente. Los resultados indican que DnaK se encuentra mayoritariamente en las fracciones 3-15, mientras que el marcador de proteína de membrana interna (ArcB) corresponde a las fracciones 21-30, por otro lado OmpC::HA se localizó en el fondo del gradiente (en forma de pastilla, Fig. 6B); estos resultados corresponden al perfil de absorción obtenido (Fig. 6A) y a las bandas observadas a simple vista (Fig. 6C). Es importante destacar que no hay señal del marcador de proteína de membrana externa en las demás fracciones del gradiente, por lo que las proteínas de membrana externa se localizan exclusivamente en la pastilla. Esto hace suponer que no existe contaminación de membrana externa en las fracciones de la membrana interna. Las fracciones 21-30 correspondientes a membrana interna, se encontraron en el intervalo del gradiente de 38.8 al 47% de sacarosa, mientras que las proteínas solubles se encontraron en el de 20-32%, por otro lado, las proteínas de membrana externa pudieron atravesar el gradiente correspondiente a la concentración de 50% por lo que se encontraban en la pastilla. Por lo tanto, se recolectaron y mezclaron las fracciones 21-30 y fueron diluidas con la solución fría de fraccionamiento (ver sección 6.4) hasta alcanzar una concentración aproximada de 10% de sacarosa. Entonces, fueron centrifugadas para obtener el paquete membranal. La membrana interna fue almacenada a -20°C hasta su uso.

### Fraccionamiento *E. coli*

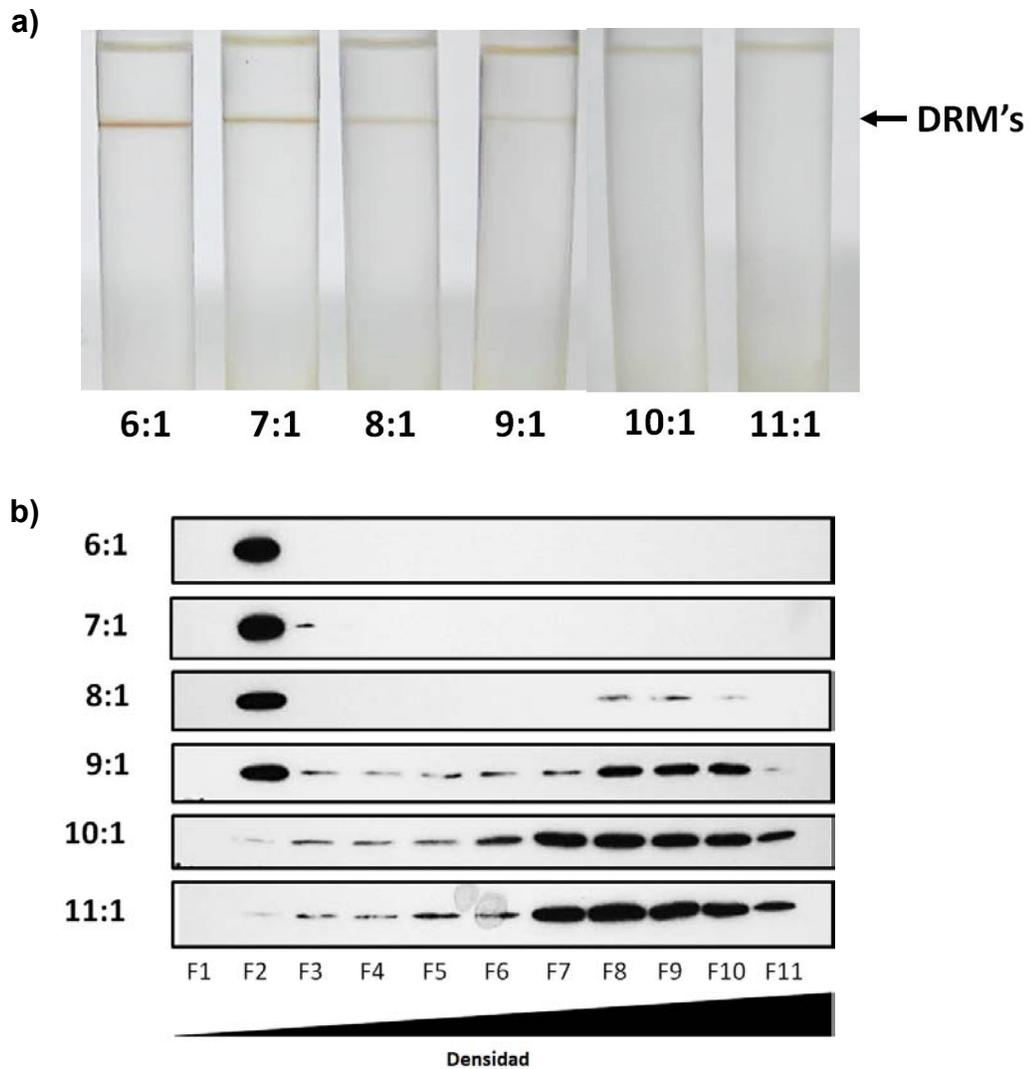


**Figura 6.** Fraccionamiento celular de esferoplastos de *E. coli*. a) La cuantificación de proteínas por  $DO_{280}$  revela tres picos localizados en la fracción 8, 24 y 36. La concentración de sacarosa en la que se encuentran los primeros dos picos corresponde a 25 y 45% respectivamente. b) La inmunodetección revela que DnaK se encuentra mayoritariamente en las fracciones 3-15 las cuales corresponden a proteínas solubles, mientras que ArcB se encuentra enriquecida en las fracciones 21-30 que corresponden a proteínas de membrana interna, por último, OmpC::HA se encuentra en el fondo del gradiente en forma de pastilla donde se localiza la membrana externa. c) Las fracciones que contenían las bandas visibles en el gradiente corresponden a los datos obtenidos en el perfil de proteínas e inmunodetección. wt: MG1655; OmpC::HA,  $\Delta$ :  $\Delta dnaK$ ,  $\Delta arcB$ ,  $\Delta ompC$ , según la proteína a evaluar; P: Pastilla

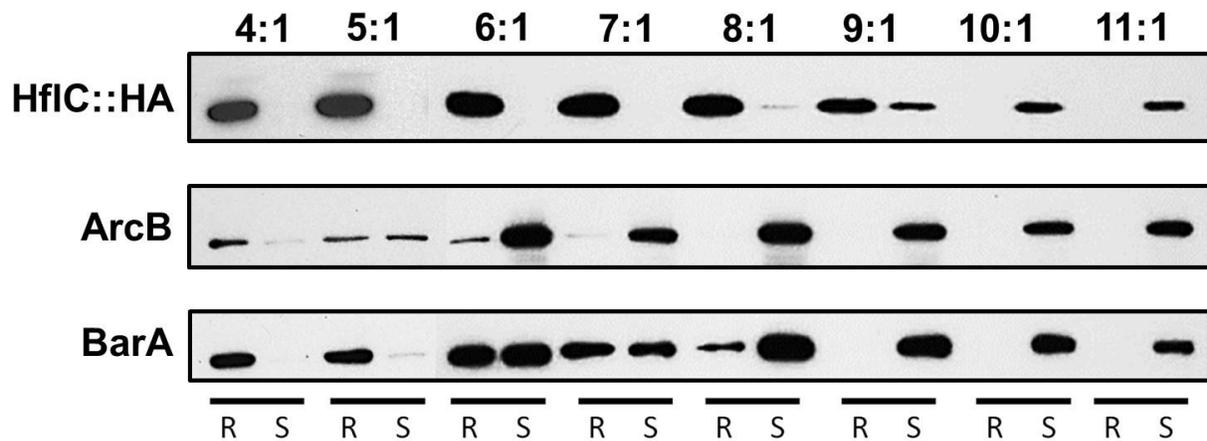
#### **7.4 Generación de DRMs**

Para determinar la condición adecuada para la generación de DRM's se procedió a realizar diversos ensayos en los que probaron diferentes relaciones de Tritón X-100/proteína microsomal. Los DRM's se obtuvieron por flotación ya que después de la centrifugación se encuentran entre la interfaz del Optiprep y el TXNE, mientras que las proteínas solubilizadas permanecen en el fondo del gradiente. A simple vista se puede observar una banda que se localiza en la fracción 2 (Fig. 7A). La inmunoréplica tipo Western blot contra HflC::HA revela que esa Flotilina se encuentra insoluble en forma de DRM en la condición 8:1, mientras que a partir de la relación 9:1 se comienza a solubilizar, esto es más evidente en las condiciones de mayor concentración de detergente (Fig. 7B).

A continuación, se analizaron muestras equivalentes, tratadas con diferentes relaciones de Tritón X-100/proteína microsomal, detectando por inmunorélicas tipo Western blot a las cinasas sensoras de los sistemas de dos componentes ArcB/ArcA y BarA/UvrY. Los resultados muestran que BarA se encuentra insoluble en la condición 5:1 y se mantiene en concentraciones similares en las fracciones resistentes y solubles en Tritón X-100 en la condición 6:1 y 7:1, mientras que en la condición 8:1 se encuentra totalmente solubilizada. Por otro lado, ArcB se encuentra insoluble en la condición 4:1, mientras que en la condición 5:1 se comienza a solubilizar y se encuentra completamente solubilizada en la condición 6:1 (Fig. 8). Si bien, BarA no logra resistir las concentraciones de detergente de la misma manera que HflC es interesante que su resistencia sea mayor que ArcB.



**Figura 7.** Generación de membranas resistentes a detergentes (DRMs). a) Se ensayaron diferentes condiciones de solubilización de las proteínas marcadoras variando las relaciones de Tritón X-100/proteína microsomal. Los DRMs se obtienen por flotación en un gradiente continuo de Optiprep y se recolectan fracciones de 1mL, la fracción 2 corresponde a DRM's y puede observarse a simple vista. b) La inmunodetección contra HflC::HA es usada como marcador de DRMs, la cual revela que a partir de la condición 9:1, HflC:HA comienza a solubilizarse; mientras que en la condición 10:1 y 11:1 se encuentra totalmente solubilizada.



**Figura 8.** Ubicación de las cinasas sensoras ArcB y BarA bajo diferentes condiciones de solubilización, variando la cantidad de Tritón X-100 (bajo diferentes volúmenes de reacción) y manteniendo constante la cantidad de proteína microsomal (500µg) y la concentración final de Tritón X-100 (1%). Se observa que algunas las cinasas que componen a los sistemas de señalización de dos componentes pueden encontrarse en la fracción correspondiente a DRMs. R: Fracción Resistente (DRM), S: Fracción Soluble.

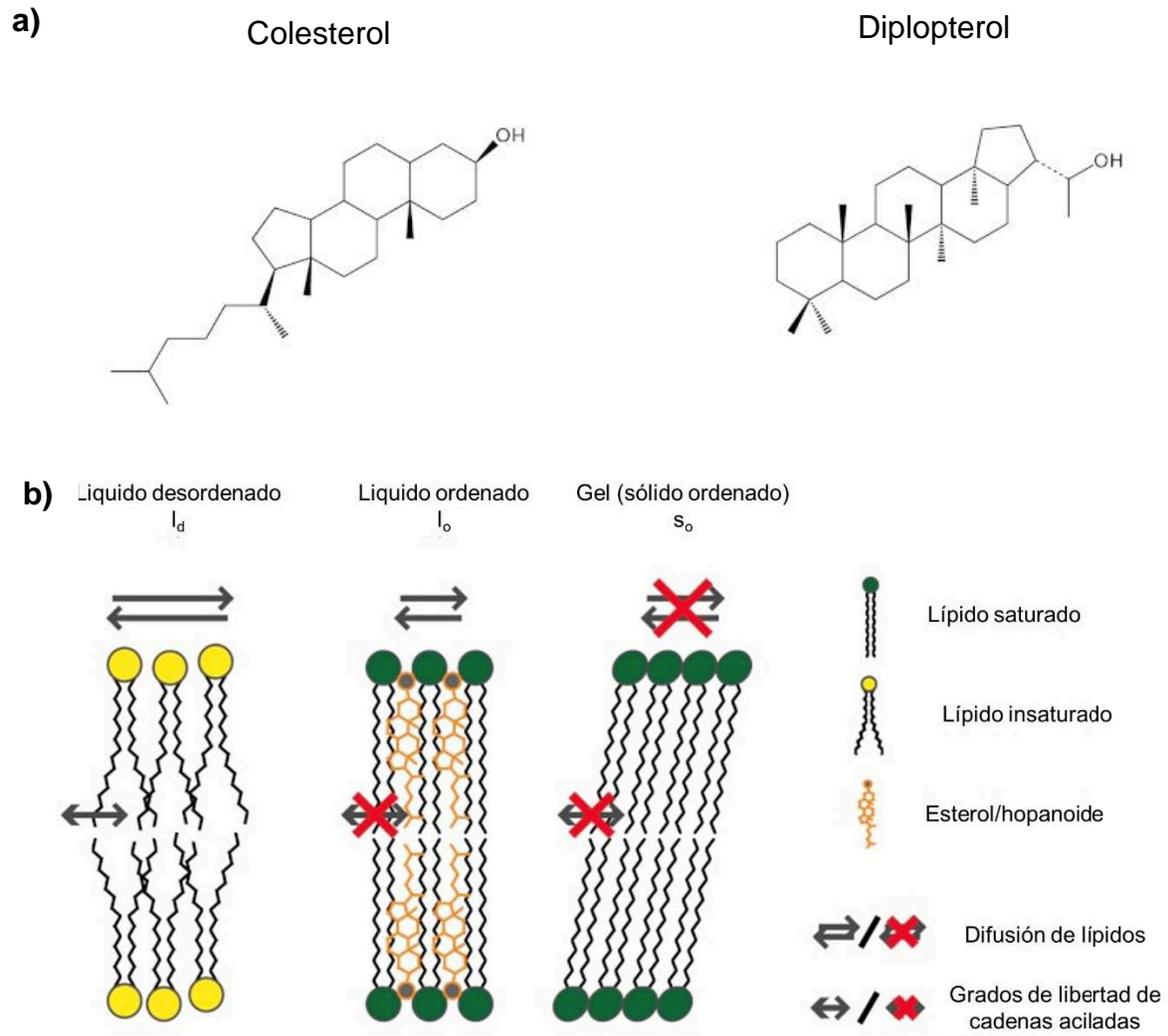
## 8. DISCUSIÓN

La posibilidad de aislar DRMs de *E. coli* abre las puertas para entender cómo es que la formación de microdominios membranales regula la función de los sistemas de dos componentes en este organismo. Por lo tanto, se desarrolló un protocolo reproducible que permite la purificación de DRMs a partir de cultivos de *E. coli*.

En un primer paso, es necesario eliminar la pared celular para formar esferoplastos. En este sentido, se probaron dos métodos alternativos en los que sólo se usó ampicilina (Hirokawa, 1962) o lisozima+EDTA (Birdsell y Cota-Robles, 1967). En los ensayos que se usó solo ampicilina se obtuvo una baja formación de esferoplastos (<50%). El uso de lisozima+EDTA necesitó una cantidad mayor de lisozima de la reportada para la generación de esferoplastos, además resultó en una mayor lisis anticipada y en una aparición de células fantasmas (datos no mostrados). En este estudio se utilizó una técnica, la cual es una modificación a la reportada por Renner, *et al.* (2011), basada en la generación de células alargadas (filamentosas) por la utilización de un  $\beta$ -lactámico como la ampicilina para desestabilizar la pared celular impidiendo el correcto ensamblado de la misma, antes de realizar una digestión con lisozima+EDTA. Utilizando este protocolo combinado se obtuvo un mejor rendimiento en la formación de esferoplastos sin los inconvenientes de la aparición de células fantasmas.

Se ha documentado ampliamente que la transición hacia la fase  $l_0$  depende crucialmente de las propiedades de los esteroides en la membrana y a su vez que la generación de DRMs se debe a la formación de estas fases de líquido ordenado. También, se ha descrito que las bacterias a excepción del género *Mycoplasma* carecen de esteroides en la membrana (Razin, 1975; Duforc, 2008), por lo que esto supondría una limitante en la formación de microdominios en la bacteria. Sin embargo, hay reportes de que los hopanoides presentes en las bacterias como el diplopterol tienen la capacidad de ordenar lípidos saturados y formar fases de tipo  $l_0$  similares a sus contrapartes eucariotas, pues comparten estructuras y características similares (Fig. 9; Saenz, *et al.*, 2012). Sin embargo, no hay reportes respecto a la existencia de hopanoides o estructuras similares en *E. coli*.

Se ha propuesto que el mecanismo en el cual las proteínas con dominios SPFH se localizan en secciones específicas en la membrana es por el anclaje en la membrana a ciertos ácidos grasos modificados, especialmente por ácido mirístico y ácido palmítico (Neumann-Giesen, *et al.* 2004), por lo que es posible que en bacterias el mecanismo sea similar.



**Figura 9.** Características de los hopanoides que se encuentran en membranas bacterianas y que sugieren que podrían funcionar de manera equivalente al colesterol en membranas eucariontes. a) Estructura química del colesterol (esterol) y diploptero (hopanoide), los cuales comparten características estructurales y funcionales en la membrana, los hopanoides son más frecuentes en bacterias aeróbicas. b) Los hopanoides tienen la capacidad de estabilizar y reclutar lípidos saturados para generar fases  $l_o$ , en las que los grados de libertad de las cadenas aciladas se ven reducidos como en la fase  $s_o$ , pero manteniendo su alta velocidad de difusión en la membrana como sucede en la fase  $l_d$ .

Se ha documentado que en las membranas bacterianas también se presenta una distribución heterogénea de sus componentes, por ejemplo, algunos receptores de quimiotaxis se localizan polarmente en *E. coli* (Maddock y Shapiro, 1993), lo que sugiere una compartimentalización en la membrana similar a las células eucariotas. En éstas últimas, la actividad de la señalización celular que se localiza en la membrana depende de parámetros geométricos como el área de superficie y la curvatura, los cuales pueden afectar la concentración local de sistemas de transducción de señales y de esta manera generar una actividad aumentada en respuesta a un estímulo (Schmick y Bastiaens, 2014). Los resultados de Renner *et al.*, (2011) sugieren que la localización de la proteína MinD (relacionada con procesos de división celular) se efectúa en grandes regiones celulares con curvatura negativa (polos) y muestra una asociación dependiente de la localización de lípidos específicos (en especial de la cardiolipina). Por otro lado, López y Kolter (2010) describen que se encuentran balsas lipídicas con funciones similares a las de eucariotes en *Bacillus subtilis*, además, la eliminación de las proteínas con dominios SPFH conduce a una señal defectuosa en una vía de transducción de señales mediada por la histidina cinasa KinC.

Debido a la definición de balsas lipídicas *E. coli* carecería de ellas, ya que la membrana no contiene esteroides y esfingolípidos como en sus contrapartes eucariotas (Cronan, 2003). Sin embargo, los resultados preliminares de localización de proteínas con dominios SPFH en los polos del grupo de investigación y la obtención de DRMs con enriquecimiento específico de proteínas, sugiere que *E. coli* posee microdominios análogos a balsas lipídicas. Por lo que se debe de tener precaución al denominar a estos microdominios como “balsas lipídicas”.

Se ha descrito que la asociación entre los dominios SPFH y la membrana, además de la oligomerización entre las Flotilinas favorece en gran medida la resistencia a la solubilización de la membrana por tratamientos a detergentes (Solis, *et al.*, 2007). También, que la estabilidad de las Flotilinas 1 y 2 en eucariotes es interdependiente, es decir, que la ausencia de una de ellas conduce a una reducción

del resto de las otras y en consecuencia, también se ven reducidas las balsas lipídicas (Babuke, *et al.*, 2009; Frick *et al.*, 2007). Por lo que es posible que HflC y HflK se comporten de la misma manera en *E. coli*. Las evidencias muestran que la sobreexpresión en conjunto de la Flotilina-1 y Flotilina-2 en células eucariontes genera el reclutamiento de nuevos microdominios con características similares a los originales, pero si sólo es expresada una sola flotilina no sucede el mismo fenómeno (Frick, *et al.*, 2007). Esto sugiere que el co-ensamblaje de ambas Flotilinas es suficiente para generar microdominios, por lo que es necesario una maquinaria fina de regulación transcripcional y transduccional que permita incrementar o disminuir el número de microdominios de manera dinámica cuyo mecanismo aún es desconocido en *E. coli*.

Hay que tener en consideración, que las fracciones de DRMs no necesariamente corresponden a microdominios que se encuentran en células vivas. Ya que la extracción con detergentes para la generación de DRMs ocurre a bajas temperaturas y puede modificar el comportamiento de las fases de la membrana, las cuales son altamente dependientes de la temperatura. Esto puede ocasionar que los microdominios pre-existentes en las membranas se expandan reclutando proteínas y lípidos inexistentes en el dominio original pudiendo explicar el comportamiento de BarA en este trabajo, pues en la condición 6:1 y 7:1 de solubilización se aprecia la misma cantidad de proteína soluble e insoluble. También, es posible que no existan microdominios, y que el enfriamiento pueda ocasionar que se formen debido a un cambio de fase en la membrana (Brown, 2006). Para prevenir la posible generación de estructuras artificiales de lípidos ordenados por surfactantes como el Tritón X-100 y remover proteínas débilmente asociadas a la membrana, se sugiere ensayar el uso de amortiguadores basados en carbonato alcalino para obtener preparaciones de membranas flotantes libres de detergente (Song, *et al.* 1996).

Se ha propuesto que las proteínas eucariotas con una alta afinidad por los ambientes de la fase  $l_o$ , generalmente contienen modificaciones post-traduccionales que favorecen la unión y estabilización de las balsas lipídicas, principalmente

productos de la acilación y prenilación (Melkonian, *et al.*, 1999). Por otro lado, otra propuesta es que las proteínas se localizan en las balsas lipídicas debido a que termodinámicamente su estructura está más favorecida en aquél microambiente (Almeida, *et al.*, 2005). También, se ha descrito que el plegamiento, estructura y función de las proteínas de membrana pueden ser influenciados por los ambientes lipídicos que las rodean, tal es el caso del canal de amonio (AmtB) y de potasio (KsAK) (Lee, 2004; Laganowsky, *et al.* 2014) por lo que no se descarta que los sistemas de dos componentes en *E. coli* pudieran ser influenciados de la misma manera.

Datos preliminares en nuestro grupo de trabajo muestran que HflC/HflK se localizan en los polos de la bacteria, por lo que es posible que algunos sistemas de dos componentes también se ubiquen en dicha área, localización favorecida por la curvatura negativa de la bacteria, la cual incluso puede afectar la concentración local de estos sistemas y modificar su actividad. En este trabajo se muestra que BarA presenta una resistencia mayor a la solubilización por detergentes, por lo que es posible que BarA co-localice con HflC/HflK en los polos o con alguna otra proteína con dominio SPFH.

Hasta el momento se desconoce el mecanismo por el cual las proteínas con dominios SPFH se unen a regiones particulares de la membrana. Es posible que se deba a un fenómeno pasivo en donde termodinámicamente las proteínas sean más estables en los microdominios, o en su defecto se deba a modificaciones en las cadenas aciladas de los lípidos de membrana. HflC y HflK tienen similitud con las proteínas eucariontes Flotilina 1 y 2, además de que existen reportes de que HflC y HflK son capaces de formar oligómeros (Akiyama *et al.*, 1995), lo cual hace posible que estos oligómeros pudieran estabilizar a los microdominios de una manera similar a lo que sucede con las Flotilinas de eucariontes.

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que BarA soporta concentraciones elevadas de detergente, aunque no tan elevadas como HflC. Sin embargo, BarA resiste concentraciones más elevadas que ArcB, por lo que es posible que BarA sea reclutado en estos microdominios. Esto tendrá que ser

confirmado afinando más la técnica (utilizando otros detergentes o una técnica alternativa libre de ellos) para la obtención de fracciones de DRMs. Cabe destacar que sólo se usaron como marcadores dos de los más de treinta sistemas de dos componentes que tiene *E. coli*, pero no se descarta que otras proteínas transductoras pudieran estar presentes en estas fracciones resistentes a detergentes.

## 9. PERSPECTIVAS

- Obtener DRMs libres de detergentes para prevenir la posible generación de estructuras artificiales.
- Analizar la proteómica y lipidómica de las fracciones los DRMs.
- Realizar ensayos de co-localización de las proteínas con dominios de SPFH y sistemas de dos componentes.
- Evaluación de mutaciones dirigidas hacia los dominios SPFH de las Flotilinas de *E. coli* y determinar su papel en la resistencia a detergentes.
- La purificación de DRMs permitirá generar un panorama general de la proteómica y lipidómica de posibles microdominios de la membrana interna de *E. coli*

## 10. CONCLUSIONES

- Se estableció un protocolo que permitió separar correctamente las membranas de *E. coli*.
- Es posible purificar dominios membranales resistentes a tratamientos con Tritón X-100 que sugieren la existencia de microdominios de membrana parecidos a las balsas lipídicas en *E. coli*.
- La cinasa sensora BarA se encuentra presente en los DRMs purificados.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

AIBA H, Mizuno T, Mizushima S. (1989). Transfer of phosphoryl group between two regulatory proteins involved in osmoregulatory expression of the *ompF* and *ompC* genes in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*. 264:8563-7

AKIYAMA Y, Yoshihisa T, Ito K. (1995). FtsH, a membrane-bound ATPase, forms a complex in the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *J Biol Chem*. 270:23485-90

ALEX LA, Simon MI (1994). Protein histidine kinases and signal transduction in prokaryotes and eukaryotes. *Trends Genet*. 10:133-8.

ALVAREZ AF, Rodriguez C, Georgellis D (2013). Ubiquinone and menaquinone electron carriers represent the yin and yang in the redox regulation of the ArcB sensor kinase. *J Bacteriol*. 195:3054-61.

BABA T, Ara t, Hasegawa M, Takai Y, Okumura Y, Baba M, Datsenko KA, Tomita B, Wanner BL, Mori H. (2006). Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol* 2:1-11

BABUKE T, Tikkanen R (2007). Dissecting the molecular function of reggie/flotillin proteins. *Eur J Cell Biol*. 86:525-32.

BATCHELOR E, Walthers D, Kenney LJ, Goulian M (2005). The *Escherichia coli* CpxA-CpxR envelope stress response system regulates expression of the porins *ompF* and *ompC*. *J Bacteriol*. 187:5723-31.

BICKEL PE, Scherer PE, Schnitzer JE, Oh P, Lisanti MP, Lodish HF (1997). Flotillin and epidermal surface antigen define a new family of caveolae-associated integral membrane proteins. *J Biol Chem*. 272:13793-802.

BROWMAN DT, Hoegg MB, Robbins SM (2007). The SPFH domain-containing proteins: more than lipid raft markers. *Trends Cell Biol*. 17:394-402

BROWN D, Rose J (1992). Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell*. 68:533-44.

BROWN D (1994). GPI-anchored proteins and detergent-resistant membrane domains. *Braz J Med Biol Res*. 27:309-15.

BROWN D (2006). Lipid rafts, detergent-resistant membranes, and raft targeting signals. *Physiology (Bethesda)*.21:430-9.

CHAVEZ RG, Alvarez AF, Romeo T, Georgellis D. (2010). The physiological stimulus for the BarA sensor kinase. *J Bacteriol*. 192:2009-12.

- COHEN P (2002). The origins of protein phosphorylation. *Nature Cell Biol.* 4:E127-E130.
- CRONAN JE (2003). Bacterial membrane lipids: where do we stand? *Annu Rev Microbiol.* 57:203-24.
- DATSENKO KA, Wanner BL (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:6640-5.
- De SIERVO AJ. Alterations in the phospholipid composition of *Escherichia coli* B during growth at different temperatures *J Bacteriol.* 100:1342-9
- DOWHAN W (1997). Molecular basis for membrane phospholipid diversity: Why are there so many lipids? *Annu Rev Biochem.* 66:199–232.
- DUFOURC EJ (2008). Sterols and membrane dynamics. *J Chem Biol.* 1: 63–77.
- EEMAN M, Deleu M (2010). From biological membranes to biomimetic model membranes. *Biotechnol Agron Soc Environ.* 14:712-36
- FRICK M, Bright NA, Riento K, Bray A, Merrified C, Nichols BJ (2007). Coassembly of flotillins induces formation of membrane microdomains, membrane curvature, and vesicle budding. *Curr Biol.* 17:1151-6.
- FRYE LD, Edidin M (1970). The rapid intermixing of cell surface antigens after formation of mouse-human heterokaryons. *J Cell Sci.* 7:319-35
- GEORGELLIS D, Kwon O, Lin EC (2001). Quinones as the redox signal for the arc two-component system of bacteria. *Science.* 292:2314-6.
- GROISMAN EA (2001). The pleiotropic two-component regulatory system PhoP-PhoQ. *J Bacteriol.* 183:1835-42.
- HESS JK, Oosawa K, Kaplan N, Simon MI (1988). Phosphorylation of three proteins in the signaling pathway of bacterial chemotaxis. *Cell.* 53:79-87.
- HIROKAWA H (1962). Biochemical and cytological observations during the reversing process from spheroplasts to rod-form cells in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 84:1161-8.
- KIM PD, Firshein W (2000). Isolation of an inner membrane-derived subfraction that supports in vitro replication of a mini-RK2 plasmid in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 182:1757-60.
- KORETKE KK, Lupas AN, Warren PV, Rosenberg M, Brown JR (2000). Evolution of two-component signal transduction. *Mol Biol Evol.* 17:1956-70.

KURRLE N, John B, Meister M, Tikkanen R (2012). Function of Flotillins in Receptor Tyrosine Kinase Signaling and Endocytosis: Role of Tyrosine Phosphorylation and Oligomerization. Chapter 10: "Protein Phosphorylation in Human Health", Edited by Cai Huang, InTech Publisher. ISBN 978-953-51-0737-8

LAGANOWSKY A, Reading E, Allison TM, Ulmschneider MB, Degiacomi MT, Baldwin AJ, Robinson CV (2014). Membrane proteins bind lipids selectively to modulate their structure and function. *Nature*. 510:172-5

LAUDE AJ, Prior IA (2004). Plasma membrane microdomains: organization, function and trafficking. *Mol Membr Biol*. 21:193-205.

LIM KI, Yin J (2005). Localization of receptors in lipid rafts can inhibit signal transduction. *Biotechnol Bioeng*. 90:694-702.

LISANTI MP, Rodriguez-Boulan E (1990). Glycophospholipid membrane anchoring provides clues to the mechanism of protein sorting in polarized epithelial cells. *Trends Biochem Sci*. 15:113-8.

LÓPEZ D, Kolter R (2010). Functional microdomains in bacterial membranes. *Genes Dev*. 24:1893-902

LUDWIG A, Otto GP, Riento K, Hams E, Fallon PG, Nichols BJ (2010). Flotillin microdomains interact with the cortical cytoskeleton to control uropod formation and neutrophil recruitment. *J Cell Biol*. 191:771-81

LUGTENBERG EJ, Peters R (1976). Distribution of lipids in cytoplasmic and outer membranes of *Escherichia coli* K12. *Biochim Biophys Acta*. 441:38-47.

MADDOCK JR, Shapiro L (1993). Polar location of the chemoreceptor complex in the *Escherichia coli* cell. *Science*. 259:1717-23.

MALPICA R, Franco B, Rodriguez C, Kwon O, Georgellis D (2004). Identification of a quinone-sensitive redox switch in the ArcB sensor kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101:13318-23.

MELKONIAN KA, Ostermeyer AG, Chen JZ, Roth MG, Brown DA. (1999). Role of lipid modifications in targeting proteins to detergent-resistant membrane rafts. Many raft proteins are acylated, while few are prenylated. *J Biol Chem*. 274:3910-7.

MELLGREN RL (2008). Detergent-resistant membrane subfractions containing proteins of plasma membrane, mitochondrial, and internal membrane origins. *J Biochem Biophys Methods*. 70:1029-36

MISHRA S, Joshi PG (2007). Lipid raft heterogeneity: an enigma. *J Neurochem*. 103 Suppl 1:135-42.

- MIZUNO T (1997). Compilation of all genes encoding two-component phosphotransfer signal transducers in the genome of *Escherichia coli*. *DNA Res.* 1997 Apr 28;4:161-8.
- NEUMANN-GIESEN C, Falkenbach B, Beicht P, Claasen S, Lüers G, Stuermer CA, Herzog V, Tikkanen R. (2004). Membrane and raft association of reggie-1/flotillin-2: role of myristoylation, palmitoylation and oligomerization and induction of filopodia by overexpression. *Biochem J.* 378:509-18.
- MUNRO S. (2003). Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell.* 115:377-88.
- OTTO GP, Nichols BJ (2011). The roles of flotillin microdomains--endocytosis and beyond. *J Cell Sci.* 124:3933-40.
- OUREL D, Loutelier-Bourhis C, Orange N, Chevalier S, Norris V, Lange CM. (2007). Lipid composition of membranes of *Escherichia coli* by liquid chromatography/tandem mass spectrometry using negative electrospray ionization. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 21:1721-8.
- PIKE LJ (2006). Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *J Lipid Res.* 47:1597-8.
- RAETZ CR (1986). Molecular genetics of membrane phospholipid synthesis. *Annu Rev Genet.* 20:253-95
- RAZIN S (1975). Cholesterol incorporation into bacterial membranes. *J Bacteriol.* 124: 570-572.
- RENNER LD, Weibel DB (2011). Cardiolipin microdomains localize to negatively curved regions of *Escherichia coli* membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:6264-9.
- SÁENZ JP, Sezgin E, Schwille P, Simons K (2012). Functional convergence of hopanoids and sterols in membrane ordering. *Proc Natl Acad Sci USA.* 109:14236-40
- SCHMICK M, Bastiaens P (2014). The interdependence of membrane shape and cellular signal processing. *Cell.* 156:1132-8.
- SIMONS K, van Meer G (1988). Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry.* 27:6197-202.
- SIMONS K, Ikonen E (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature.* 1997 Jun 5; 387:569-72.
- SIMONS K, Toomre D (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 1:31-39.

- SKERKER JM, Prasol MS, Perchuk BS, Biondi EG, Laub MT (2005). Two-component signal transduction pathways regulating growth and cell cycle progression in a bacterium: a system-level analysis. *PLoS Biol.* 3:e334
- SONG KS, Li Shengwen, Okamoto T, Quilliam LA, Sargiacomo M, Lisanti MP (1996). Co-purification and direct interaction of Ras with caveolin, an integral membrane protein of caveolae microdomains. Detergent-free purification of caveolae microdomains. *J Biol Chem.* 271:9690-7.
- SONG Y, Peisach D, Pioszak AA, Xu Z, Ninfa AJ. (2004) Crystal structure of the C-terminal domain of the two-component system transmitter protein nitrogen regulator II (NRII; NtrB), regulator of nitrogen assimilation in *Escherichia coli*. *Biochemistry*;43:6670-8.
- SONNINO S, Prinetti A (2013). Membrane domains and the "lipid raft" concept. *Curr Med Chem.* 20:4-21.
- STOCK AM, Robinson VL, Goudreau PN. (2000). Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem.* 69:183-215
- STUERMER CA, Langhorst MF, Wiechers MF, Legler DF, Von Hanwehr SH, Guse AH, Plattner H (2004). PrPc capping in T cells promotes its association with the lipid raft proteins reggie-1 and reggie-2 and leads to signal transduction. *FASEB J.* 18:1731-3
- TANNER W. (2011). In Plant and Animal Cells, Detergent-Resistant Membranes Do Not Define Functional Membrane Rafts. *Plant Cell.* 23:1191–93.
- THEIN M, Sauer G, Paramasivam N, Grin I, Linke D. (2010). Efficient subfractionation of gram-negative bacteria for proteomics studies. *J Proteome Res.* 9:6135-47.
- UZZAU S, Figueroa-Bossi N, Rubino S, Bossi L. (2001). Epitope tagging of chromosomal genes in Salmonella. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:15264-9.
- VAN MEER G, Voelker DR, Feigenson GW. (2008). Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9:112-24.
- YU J, Fischman DA, Steck TL (1973). Selective solubilization of proteins and phospholipids from red blood cell membranes by nonionic detergents. *J Supramol Struct.* 1(3):233-48.