



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**ANÁLISIS PROTEÓMICO DE MEMBRANAS RESISTENTES A DETERGENTES
(DRM) EN *Escherichia coli***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

M. en C. José Enrique Guzmán Flores

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Dimitris Georgellis (Instituto de Fisiología Celular)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Marina Gavilanes Ruiz (Facultad de Química)

Dra. Maria Soledad Funes Arguello (Instituto de Fisiología Celular)

Ciudad de México. Mayo, 2019



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.

ANÁLISIS PROTEÓMICO DE MEMBRANAS RESISTENTES A DETERGENTES (DRM) EN *Escherichia coli*

RECONOCIMIENTOS

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

El comité tutorial que asesoró el desarrollo de este trabajo estuvo formado por:

Dr. Dimitris Georgellis	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dra. Marina Gavilanes Ruiz	Facultad de Química, UNAM
Dra. Maria Soledad Funes Argüello	Instituto de Fisiología Celular, UNAM

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 de la expresión génica microbiana por estímulos extracelulares. De la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), # IN209918.

— Organización y función de microdominios membranales bacterianos. De la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), # IN208718.

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

— Apoyo económico del Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) para la asistencia a congresos nacionales e internacionales.

Esta tesis fue defendida en examen presentado el día _____

El jurado de examen de Doctorado estuvo constituido por:

Presidente	Dra. Herminia de Jesús Loza Tavera	FQ, UNAM
Vocal	Dr. Sebastián Poggio Ghilarducci	IIB, UNAM
Vocal	Dr. Diego González Halphen	IFC, UNAM
Vocal	Dr. Otto Geiger	CGG, UNAM
Secretario	Dr. Luis Servín González	IIB, UNAM

PMDCB/2817/2018

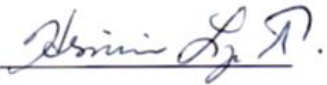
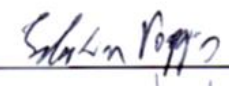

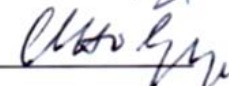

SINODALES DESIGNADOS

Presente

Estimado académico:

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del día **12 de noviembre** del presente año, conocieron la solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **DOCTORADO EN CIENCIAS** del/la estudiante **Guzmán Flores José Enrique**, con la tesis "**Análisis proteómico de membranas resistentes a detergentes (DRM) en Escherichia coli**", dirigida por el/la Dr(a). **Georgellis Dimitris**.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado en el que se encuentra usted incluido:

		Acepto	Fecha	firma
PRESIDENTE	Loza Tavera Herminia de Jesús	Si <input checked="" type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	27/11/18	
VOCAL	Poggio Ghilarducci Sebastián	Si <input checked="" type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	28/11/18	
VOCAL	González Halphen Diego	Si <input checked="" type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	27/11/18	
VOCAL	Geiger Otto	Si <input checked="" type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	28/11/18	
SECRETARIO	Servín González Luis	Si <input checked="" type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	28/11/18	

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA, HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 13 de noviembre de 2018



COORDINADORA
Dra. ANA BRÍGIDA CLORINDA ARIAS ÁLVAREZ

ABREVIATURAS

CHAPS	<i>3-[(3-<u>ch</u>olamidopropyl)dimethyl<u>a</u>mmonio]-1-<u>p</u>ropane<u>s</u>ulfonate</i> 3-[(3-colamido propil) dimetil amonio]-1-propan sulfonato
CL	<u>C</u> ardio <u>l</u> ípina
DRM	<u>D</u> etergent- <u>R</u> esistant <u>M</u> embranes – Membranas resistentes a detergentes
GL	<u>G</u> licol <u>l</u> ípidos
LC-MS/MS	<u>L</u> iquid <u>C</u> hromatography- <u>M</u> ass/ <u>M</u> ass (tandem) spectrometry - cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem
L _d	Fase <u>L</u> íquido <u>d</u> esordenado
L _o	Fase <u>L</u> íquido <u>o</u> rdenado
LPS	<u>L</u> ipopolis <u>a</u> cárido
MDCK	<u>M</u> adin- <u>D</u> arby <u>C</u> anine <u>K</u> idney - Riñón de canino Madin-Darby
MI	<u>M</u> embrana <u>I</u> nterna
ME	<u>M</u> embrana <u>E</u> xterna
PE	<u>P</u> hosphatidyl <u>e</u> thanolamine - Fosfatidiletanolamina
PG	<u>P</u> hosphatidyl <u>g</u> lycerol - Fosfatidilglicerol
PHB	<u>P</u> ro <u>h</u> ibitin
S _o	Fase <u>S</u> ólido <u>o</u> rdenado
SPFH	<u>S</u> tomatin, <u>P</u> rohibitin, <u>F</u> lotillin, <u>H</u> fIC/K
TM(D)	<u>T</u> rans <u>m</u> embrane <u>D</u> omains – Dominios Transmembrana

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1 Membranas biológicas bacterianas.....	3
1.2 Organización de las membranas biológicas.....	5
2. ANTECEDENTES	9
2.1 Dominios de membrana: balsas lipídicas.....	9
2.2 Membranas resistentes a detergentes.....	10
2.3 Flotilinas como marcadores de balsas lipídicas.....	12
2.4 Proteínas asociadas a microdominios membranales bacterianos.....	15
3. JUSTIFICACIÓN	17
4. HIPOTESIS	18
5.1 Objetivo general.....	18
5.2 Objetivos particulares.....	18
6. MATERIALES Y MÉTODOS	19
6.1 Cepas y condiciones de crecimiento.....	19
6.2 Generación de esferoplastos.....	21
6.3 Fraccionamiento subcelular.....	22
6.4 Western blot.....	22
6.5 Microscopia de fluorescencia.....	23
6.6 Aislamiento de DRM.....	23
6.7 Microscopía electrónica.....	24
6.8 Digestión de proteínas por tripsinización.....	25
6.9 Análisis por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem LC-MS/MS.....	25
6.10 Búsqueda y análisis en la base de datos (Uniprot).....	27
6.11 Análisis de proteínas <i>in silico</i>	27
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
7.1 Purificación de membrana interna de <i>E. coli</i>	28
7.2 Integridad de los microdominios de membrana al generar esferoplastos.....	29
7.3 Aislamiento de DRM a partir de la MI de <i>E. coli</i>	31

7.4 Análisis de la ultraestructura de MI y DRM.....	33
7.5 Identificación y ubicación subcelular de proteínas asociadas a DRM de <i>E. coli</i>	34
7.6 Análisis por función de proteína.....	37
7.7 Sistemas de dos componentes en DRM de <i>E. coli</i>.....	46
7.8 Validación del análisis proteómico.....	48
8. CONCLUSIONES	50
9. PERSPECTIVAS	51
10. ANEXOS	52
11. REFERENCIAS	53

RESUMEN

La capacidad de las membranas biológicas para compartimentalizar diversos procesos fisiológicos como la transducción de señales, tráfico vesicular y la secreción de proteínas ha llevado al estudio de estructuras conocidas como balsas lipídicas o microdominios de membrana. Estos microdominios se componen de proteínas y lípidos especializados y han sido descritos en una gran variedad de células eucariontes. Una de las técnicas usadas para caracterizar bioquímicamente estos microdominios, es la obtención de membranas resistentes a detergentes (*DRM-Detergent-Resistant Membranes*). Se ha reportado que las proteínas que contienen el dominio conservado SPFH (*Stomatin*, *Prohibitin*, *Flotillin*, *HflK/C*) se encuentran en las preparaciones de DRM, por lo que son utilizadas frecuentemente como marcadores de balsas lipídicas. Debido a que estas proteínas con dominio SPFH también se han identificado en cromosomas bacterianos, incluyendo a *Escherichia coli*, se plantea la pregunta si existen estructuras similares a balsas lipídicas en células procariontes.

En este trabajo, desarrollamos un protocolo para el aislamiento de DRM a partir de membranas de *Escherichia coli*. La membrana interna (MI) se separó de la membrana externa (ME) y se trató con diferentes relaciones detergente/proteína para determinar la condición óptima de solubilización. Las fracciones de DRM se separaron y recolectaron mediante flotación a través de un gradiente continuo de Optiprep, las fracciones recolectadas se verificaron utilizando a las proteínas con dominios SPFH como marcadores. El contenido proteico de los DRM se identificó mediante el análisis por espectrometría de masas, encontrando al menos 79 proteínas que se encontraron enriquecidas en la fracción de DRM. Las proteínas identificadas parecen estar involucradas en diversos procesos celulares como transporte y secreción de proteínas, síntesis de ATP, metabolismo de lípidos y señalización celular.

ABSTRACT

The capability of biological membranes to compartmentalize various physiological processes such as signal transduction, vesicular traffic, and protein secretion, has led to the study of structures known as lipid rafts or membrane microdomains. These microdomains are composed of specialized proteins and lipids and have been described in a wide variety of eukaryotic cells. One of the techniques used in the biochemical characterization of these microdomains is the generation of Detergent-Resistant Membranes (DRM). It has been reported that proteins containing the conserved SPFH domain (Stomatin, Prohibitin, Flotillin, HflK/C) are found in DRM preparations, and therefore these proteins are typically used as lipid raft markers. Because such SPFH domain containing proteins have been identified in bacterial chromosomes, including *Escherichia coli*, raises the question whether similar membrane structures are present in prokaryotic cells.

In this work, we developed a protocol for DRM isolation from *Escherichia coli* membranes. The inner membrane (IM) was separated from the outer membrane (OM) and treated by various detergent/protein ratios to determine the optimal condition of solubilization. DRM fractions were separated and collected by flotation through an Optiprep continuous gradient and verified using the SPFH containing proteins as markers. The protein cargo of DRM was identified by mass spectrometry analysis, and it was found that at least 79 proteins were enriched in the DRM fraction. The identified proteins appear to be involved in various cellular processes, such as protein transport and secretion, energy biosynthesis, lipid metabolism, and cellular signaling.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Membranas biológicas bacterianas

Las membranas biológicas están constituidas principalmente por lípidos de naturaleza anfipática y proteínas asociadas que forman una barrera semipermeable la cual delimita el interior y exterior de la célula. Una de las familias de lípidos más abundantes y estudiadas en las membranas son los llamados glicerofosfolípidos compuestos por: dos ácidos grasos unidos a un esqueleto de glicerol, un grupo fosfato y una cabeza polar variable que determina el tipo de glicerofosfolípido. Algunos glicerofosfolípidos que destacan en la composición de las membranas bacterianas son: la fosfatidiletanolamina (PE), el fosfatidilglicerol (PG), la cardiolipina (CL), el lisil-fosfatidil-glicerol (LPG), el fosfatidilinositol (PI), el ácido fosfatídico (PA) y la fosfatidilserina (PS). Además de los lípidos anteriormente mencionados, las bacterias son capaces de formar otros lípidos libres de fósforo como: los lípidos de ornitina (OL), los sulfolípidos, el diacilgliceril-N,N,N-trimetilhomoserina (DGTS), los glicolípidos (GL), el diacilglicerol (DAG), los hopanoides (HOP), la fosfatidilcolina (PC), entre otros (Geiger *et al.*, 2013; Sohlenkamp & Geiger, 2016).

Desde hace más de 100 años, la tinción de Gram ha permitido clasificar a las bacterias en dos grandes grupos según las características y composición de la envoltura celular, de acuerdo con su capacidad de retener el colorante cristal violeta en su envoltura celular. Posteriormente, la llegada de la microscopía electrónica permitió poner en evidencia las diferencias morfológicas de las bacterias Gram negativas y positivas (Fig.1). En las bacterias Gram positivas se pueden identificar dos estructuras que envuelven a la bacteria: la pared celular (compuesta por peptidoglicano) y la membrana citoplásmica o membrana interna (MI). Por otro lado, en las bacterias Gram negativas, adicionalmente a la MI y a la pared celular, contienen una membrana externa (ME) que recubre a las células (Silhavy *et al.*, 2010). Existen diferencias significativas en la composición de estas estructuras membranales, la cara interna de la ME está compuesta de fosfolípidos (PL); mientras que la cara externa es rica en glucolípidos, principalmente

lipopolisacáridos (LPS) (Kamio & Nikaido, 1976). Por otro lado, la MI está compuesta mayoritariamente por los glicerofosfolípidos anteriormente mencionados. Sin embargo, también se ha observado asimetría en la distribución de lípidos entre las caras de la bicapa lipídica que conforman la MI, habiendo mayor cantidad de PE en la cara interna y de PG en la cara externa (Rothman & Kennedy, 1977). Además, la CL se acumula predominantemente en los polos de las bacterias de tipo bacilar. Ésta distribución preferente de la CL en las regiones cóncavas del bacilo es consistente con la forma cónica predicha de una molécula de CL (debido a una cabeza polar relativamente pequeña en comparación a la porción hidrofóbica), permitiéndose localizar en las regiones con curvatura negativa como en el caso de *E. coli* (Renner & Weibel, 2011).

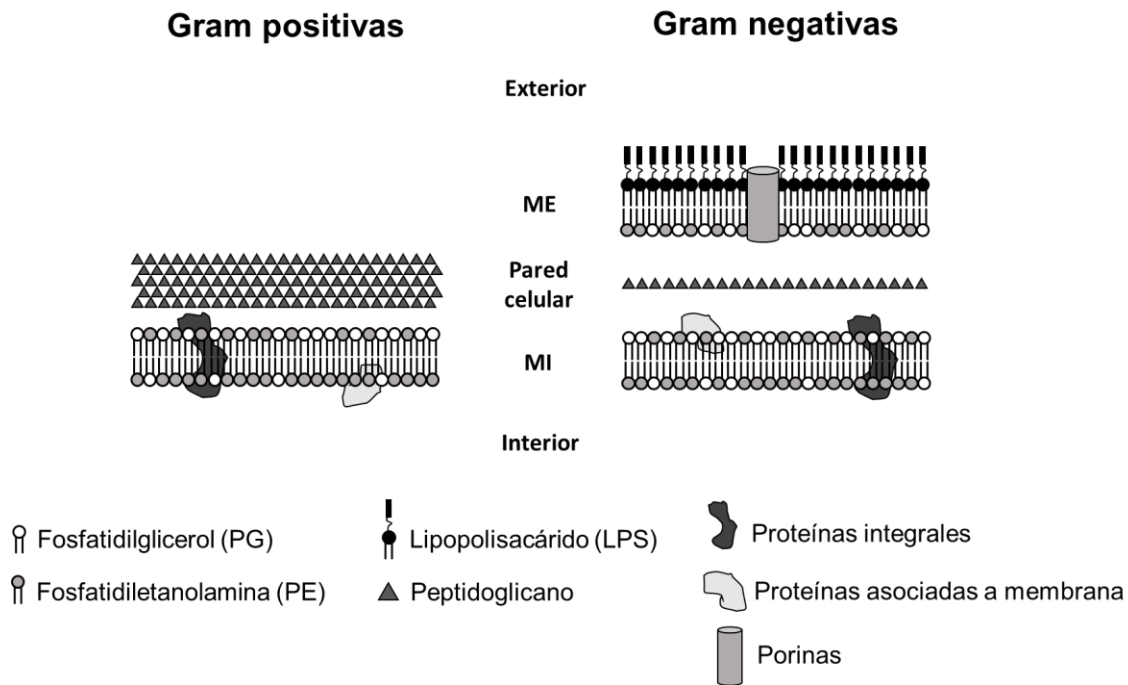


Figura 1. Esquema de la distribución de los componentes estructurales de las bacterias Gram positivas y Gram negativas. En ambos casos, las células poseen una membrana interna compuesta de diversas clases de lípidos y proteínas que varían según la especie bacteriana. Otra característica que comparten es la presencia de una pared celular, la cual es más gruesa en las bacterias Gram positivas. Por último, la característica más diferenciadora en esta clasificación es la presencia de una envoltura externa (membrana externa) rica en LPS que sólo poseen las bacterias Gram negativas.

La distribución y presencia de los lípidos difiere notablemente entre géneros y especies bacterianas. Por ejemplo, en *E. coli* la PE representa cerca del 75% del porcentaje total de lípidos, mientras que el PG y CL representan el 15% y 5% respectivamente (Cronan, 2003). En *Pseudomonas aeruginosa*, los porcentajes de PE, PG y CL corresponden al 60%, 21% y 11% respectivamente (Gilleland & Lyle, 1979). Finalmente, en *Bacillus subtilis* el porcentaje de PE, PG y CL es de 12%, 70% y 4% respectivamente; además de presentar otros lípidos como GL (5%), mono DAG (2%), entre otros (Clejan *et al.*, 1986). Sin embargo, estas proporciones de lípidos pueden cambiar de acuerdo a las condiciones y fases de crecimiento de la bacteria. Es importante destacar que la composición de membrana de *E. coli* es relativamente simple y no es representativa de la gran variedad de lípidos que pueden contener las membranas bacterianas.

Además de los lípidos, las proteínas también constituyen un componente mayoritario en las membranas bacterianas. Estudios por predicción de secuencia han determinado que cerca del 20-30% de los genes de genomas bacterianos codifican para proteínas integrales de membrana (Krogh *et al.*, 2001). En el caso de *E. coli*, se ha predicho que cerca de 1,000 de los 4,288 genes en su cromosoma codifican para alguna proteína integral que posee al menos un cruce transmembranal (TM) (Daley *et al.*, 2005; Krogh *et al.*, 2001). Sin embargo, algunas lipoproteínas, así como proteínas solubles citosólicas (que no poseen TM) pueden ser reclutadas en la membrana según la demanda de diversos procesos celulares (Luirink *et al.*, 2012; Papanastasiou *et al.*, 2013).

1.2 Organización de las membranas biológicas

A lo largo de la historia, se ha tratado de explicar la naturaleza, composición y distribución de las membranas biológicas empleando diversos modelos. El modelo del mosaico fluido marcó un paradigma en el estudio de las membranas biológicas (Singer & Nicolson, 1972), al reconocer que las proteínas anfipáticas residen dentro de la bicapa lipídica y poseen una estructura dinámica, asumiendo una distribución

homogénea de los componentes a lo largo de la membrana. En esa época, diversos estudios corroboraron la capacidad de los componentes de la membrana de difundir lateralmente (Frye & Edidin, 1970).

Durante mucho tiempo se mantuvo el paradigma respecto a la distribución homogénea de los componentes de las membranas, como lo sugería el modelo del mosaico fluido. Sin embargo, estudios en células eucariontes 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 & Rodriguez-Boulon, 1990). En bacterias, a través de diversas técnicas de tinción de lípidos, se han observado regiones específicas en la membrana cuya composición lipídica difiere con el resto de la bicapa. Por ejemplo, en *E. coli* se han puesto en evidencia porciones de la membrana enriquecidas en PE, así como otras regiones enriquecidas en una mezcla de PG y CL (Fishov & Woldringh, 1999). Adicionalmente, se ha determinado que la CL se enriquece principalmente en los polos y los septos de las células en división. Lo anterior se ha observado en géneros y especies bacterianas diversas como *E. coli* (Mileykovskaya & Dowhan, 2000), *Pseudomonas putida* (Bernal *et al.*, 2007), *B. subtilis* (Kawai *et al.*, 2004) y *Mycobacterium tuberculosis* (Maloney *et al.*, 2011).

En un medio acuoso, los lípidos que constituyen las membranas biológicas pueden 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 re-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 y fuerza iónica pueden afectar la naturaleza de las fases. Los dos extremos de los estados de los lípidos son la fase sólido-gel y la líquida (van Meer *et al.*, 2008). Además, se ha descrito que tanto las proteínas solubles como las asociadas a la membrana pueden interactuar con lípidos

específicos o dominios de lípidos y de esta manera afectar a las propiedades globales de la bicapa lipídica (Deol *et al.*, 2004; Lee, 2003).

En la fase sólido-gel (L_{β}) 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. 2a); en consecuencia, la difusión lateral de los lípidos (C_T) está fuertemente disminuida. Mientras que en la fase fluida (L_{α}) o también llamada líquido desordenado (l_d), las cadenas hidrocarbonadas son generalmente insaturadas y menos extendidas (Fig. 2b), por lo que la red de lípidos es laxa y poco ordenada, resultando en una C_T y difusión rotacional de los lípidos alta. Debido a lo anterior, pueden existir diferentes grados de fluidez a lo largo de la membrana de acuerdo a la composición de la misma (Siontorou *et al.*, 2017; van Meer *et al.*, 2008). Los esteroides, que se encuentran principalmente en las membranas biológicas de eucariontes, 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 la líquida (Fig. 2c); 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). La mayoría de las membranas bacterianas carecen de esteroides en su membrana.

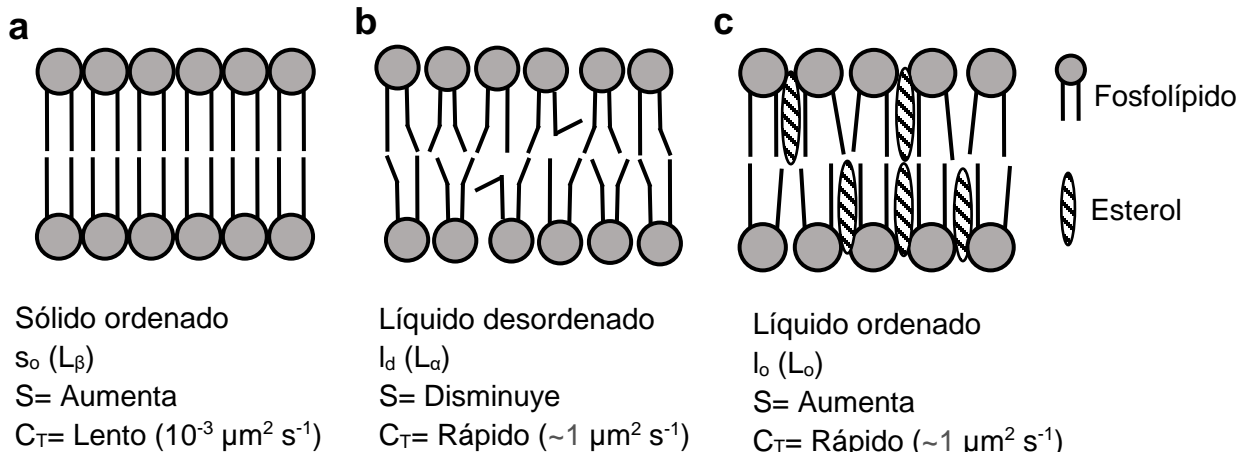


Figura 2. Tipos de fase de membrana y características relevantes. a) Sólido ordenado (s_o), las cadenas de los ácidos grasos se encuentran saturadas generando un estado sólido con características de fluidez reducida y alto grado de ordenamiento. b) Líquido desordenado (l_d), las cabezas polares de los fosfolípidos pueden rotar libremente permitiendo una fluidez alta pero un grado de ordenamiento menor. c) Líquido ordenado (l_o) las cadenas aciladas de los fosfolípidos se encuentran estabilizadas por esteroides u otros lípidos 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.

2. ANTECEDENTES

2.1 Dominios de membrana: balsas lipídicas

Una consecuencia de los múltiples estados de fluidez de la membrana es que los componentes que conforman la fase l_0 pueden estar organizados en una distribución heterogénea, provocando la creación de plataformas o dominios que difieren en composición de lípidos y proteínas con respecto del resto de la membrana. La presencia de estos dominios de membrana es evidente en algunos tipos de células eucariontes polarizadas. Por ejemplo, existen dominios en la membrana basolateral y apical de las células epiteliales los cuales se extienden por varios micrómetros. Aunque morfológicamente parecidos, estos dos dominios membranales tienen funciones específicas dependiendo de la línea celular (Mazzone *et al.*, 2006; Simons & Van Meer, 1988; Stoops & Caplan, 2014). 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 que pequeñas áreas en la membrana se encontraban en fase l_0 , por lo que permanecían “flotando” en superficies más grandes de fases l_d , haciendo una analogía: “parecidas a las balsas en agua” (Brown & Rose, 1992; Simons & Van Meer, 1988). Los reportes de Simons & Ikonen (1997), propusieron que existen microdominios de membrana en células epiteliales polarizadas, los cuales contienen diferentes composiciones de lípidos y grados de fluidez a lo largo de la membrana, a los que llamaron “balsas lipídicas”. Desde que surgió este concepto, la definición de balsa lipídica ha ido cambiando a lo largo de los años, hasta que en el *Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function*, celebrado en 2006, se logró establecer una definición consensuada. Según dicha definición, la balsa lipídica debe ser pequeña (10-220 nm), heterogénea, altamente dinámica, enriquecida en esteroides y esfingolípidos, además de compartimentar procesos celulares y ser estabilizada por interacciones proteína-proteína y proteína-lípido (Pike, 2006). Si bien esta definición describe de manera completa a los microdominios de membrana de células eucariontes, descarta la posibilidad de que las membranas bacterianas contengan balsas lipídicas, ya que la gran mayoría de las bacterias carecen de esteroides y esfingolípidos en sus membranas. Sin embargo recientemente, a través de diversas

técnicas y enfoques, se han identificado dominios membranales similares a las balsas lipídicas en diversos géneros bacterianos como: *Staphylococcus aureus* (López & Kolter, 2010), *Bacillus anthracis* (Somani *et al.*, 2016), *Bacteroides fragilis* (An *et al.*, 2011), *Borrelia burgdorferi* (LaRocca *et al.*, 2013).

2.2 Membranas resistentes a detergentes

La herramienta más empleada para el estudio de la composición de dominios membranales es la extracción por detergentes no iónicos como el Tritón X-100. La técnica se basa en las propiedades fisicoquímicas que le permiten a la membrana mantener o perder su composición y estructura por tratamientos con detergentes. Esto se debe a que el tratamiento con detergentes puede afectar a la mayoría de las interacciones lípido-lípido de la membrana biológica, sin embargo, una pequeña porción de la membrana es capaz de resistir al tratamiento con detergentes y puede recuperarse como DRM (Brown, 2006) (Fig. 3a). Se ha sugerido que los DRM preparados con Tritón X-100, posiblemente se originan al extraer la fase l_0 de la membrana debido al alto empaquetamiento de los lípidos (Brown & London, 1998). También, la extracción con detergente es capaz de alterar las interacciones lípido-proteína, de tal manera que gran parte de las proteínas de membrana se solubilizan. Por otro lado, sólo algunas proteínas conservan su asociación con los lípidos y pueden recuperarse en DRM. La asociación de una proteína-lípido en forma de DRM puede indicar una fuerte interacción de la proteína con los dominios de fase l_0 (Brown & London, 1998). Por lo tanto, uno de los primeros métodos para la caracterización bioquímica de las balsas lipídicas fue el análisis de las fracciones enriquecidas en DRM.

Los DRM han sido ampliamente caracterizados en células eucariontes y usualmente son preparados con los detergentes Tritón X-100 (Brown & Rose, 1992) y CHAPS (Alfalah *et al.*, 2005). Sin embargo, también se ha documentado el uso de otros detergentes como Brij 58 y Brij 98 (Williamson *et al.*, 2010), Lubrol WX (Delaunay *et al.*, 2008). Incluso se han reportado preparaciones libres de detergentes empleando

carbonato de sodio (Macdonald & Pike, 2005). Sin embargo, existen evidencias en modelos eucariontes de que las proteínas enriquecidas en las fracciones de DRM pueden variar de acuerdo con el detergente empleado para solubilizar a la membrana. Un ejemplo es el receptor de transferrina, el cual se enriquece cuando se usa Tritón X-100 y CHAPS pero se solubiliza al usar Brij 98, Brij 96, Brij 58, Lubrol WX y Tween 20 (Schuck *et al.*, 2003).

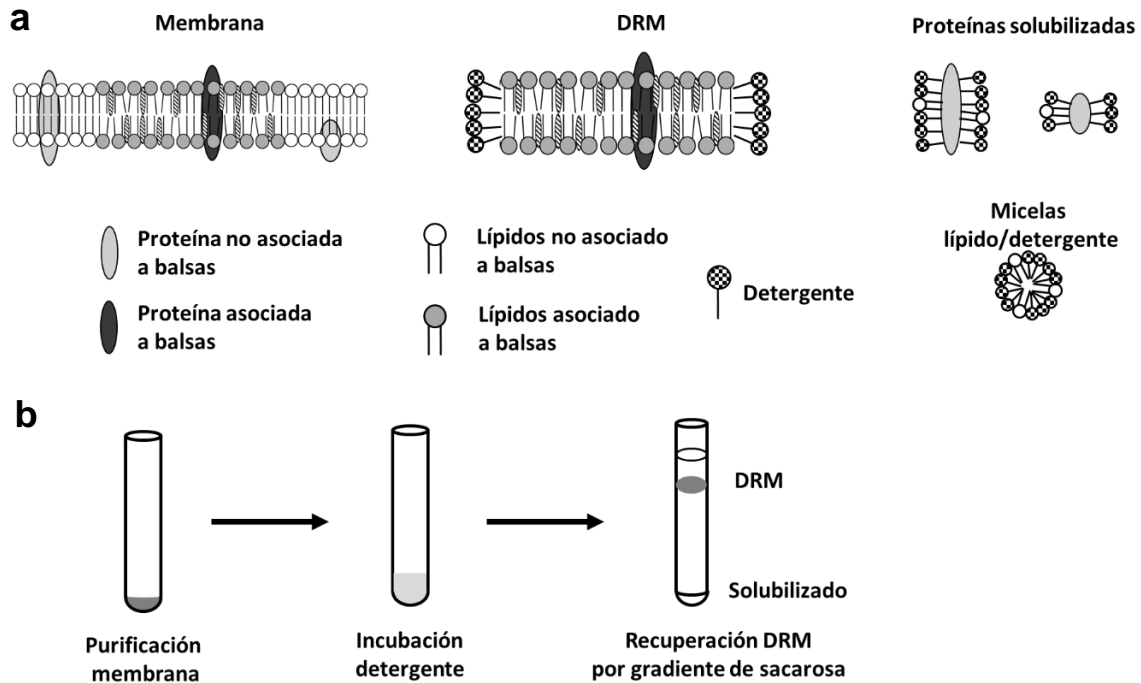


Figura 3. Obtención de DRM. a) Las balsas lipídicas pueden ser extraídas por tratamientos con detergentes; el alto grado de compactación de los componentes permite que los dominios de membrana resistan la solubilización con detergentes. Aquellos componentes que no forman parte de las balsas lipídicas son solubilizados. b) Representación esquemática para la extracción de DRM. Los DRM son obtenidos a partir de preparaciones de membrana y posteriormente por tratamiento con detergente (usualmente Tritón X-100 o CHAPS), luego son recuperados en un gradiente de sacarosa u Optiprep. Debido a la alta relación lípido/proteína los DRM flotan y pueden recuperarse en las fracciones superiores del gradiente.

La solubilización empleando 1% de Tritón X-100 a 4°C, suele ser usada en diversas preparaciones debido al mayor rendimiento al recolectar las fracciones enriquecidas en DRM. Ya que existe una relación alta de lípido/proteínas, los DRM poseen una baja densidad y pueden ser recuperados en gradientes de sacarosa u Optiprep (Fig. 3b). Frecuentemente pueden ser recuperados en la interfaz correspondiente entre 5%-30% del gradiente (Babiychuk & Draeger, 2006; Magee & Parmryd, 2003; Nebl *et al.*, 2002). Otro parámetro crítico para el aislamiento de los DRM es la selección adecuada de la proporción detergente/proteína membranal, que debe adaptarse según la naturaleza de la membrana biológica (Schuck *et al.*, 2003). Por ejemplo, existen reportes en donde se usa una relación detergente/proteína 15:1 para la preparación de DRM de hojas de *Nicotiana tabacum* (Mongrand *et al.*, 2004), por otro lado, se ha reportado una proporción de 8:1 para preparaciones similares en hojas de *Arabidopsis thaliana* (Borner *et al.*, 2005). Además, se reportó una relación de 12.5:1 como la condición óptima para las preparaciones de DRM a partir de membranas plasmáticas de *Phaseolus vulgaris*, hojas de *N. tabacum* y germinación de embriones de *Zea mays* (Carmona-Salazar *et al.*, 2011). Finalmente, los DRM de neutrófilos bovinos se han recuperado en proporciones entre 5:1 y 10:1 (Nebl *et al.*, 2002), mientras que una relación 3:1 fue suficiente para el aislamiento DRM de células epiteliales (células MDCK) (Delaunay *et al.*, 2008).

2.3 Flotilinas como marcadores de balsas lipídicas

Las flotilinas son proteínas recurrentemente identificadas en los DRM obtenidos de diferentes tipos celulares. Estas proteínas pertenecen a una super-familia que se caracteriza por contener el dominio SPFH (*Stomatin*, *Prohibitin*, *Flotillin* y *HflC/K*) o también conocido como dominio PHB (*Prohibitin*) (Tavernarakis *et al.*, 1999). Las proteínas con este dominio tienen funciones diversas en distintos organismos y tejidos, pero comparten la particularidad de comportarse como proteínas membranales con la capacidad de oligomerizar para formar microdominios. Las células de mamíferos tienen dos flotilinas, denominadas flotilina-1 (Flo-1) y flotilina-2 (Flo-2), que tienen una identidad de aminoácidos de alrededor del 50% entre sí.g

El dominio SPFH de Flo-1 y Flo-2 constituyen la mayor parte del extremo N-terminal, mientras que en el extremo C-terminal se encuentra otro dominio altamente conservado sólo en las familias de las flotilinas y no en otras proteínas con dominio SPFH (Otto & Nichols, 2011) (Fig. 4a). Este último dominio contiene una región alfa-hélice que participa en la oligomerización para formar homo- y hetero-tetrámeros estables (Fig. 4b) (Solis *et al.*, 2007). Curiosamente, Flo-1 y Flo-2 carecen de cruces transmembranales y se asocian a la membrana por modificaciones postraduccionales, particularmente miristoilación y palmitoilación (Neumann-Giesen *et al.*, 2004). Como parte integral de las balsas lipídicas, las flotilinas tienen diversas funciones, como son participar activamente en la formación y mantenimiento de la balsa lipídica, 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). Debido a que estas proteínas son componentes invariables de las balsas lipídicas, suelen ser usadas como marcadores de estos microdominios membranales.

Además de estar presente en las proteínas de mamíferos Flo-1 y Flo-2, el dominio SPFH está ampliamente conservado y distribuido tanto en células eucariontes como procariontes (Browman *et al.*, 2007; Tavernarakis *et al.*, 1999). Se estima que más del 90% de los genomas bacterianos pueden tener por lo menos una proteína con este dominio (Hinderhofer *et al.*, 2009). En el genoma de *E. coli* se han identificado 4 genes que codifican proteínas que contienen el dominio SPFH: HflC, HflK, Ybbk (QmcA) y YqiK, las cuales se encuentran en la membrana interna de la bacteria. Mientras que en *B. subtilis* dos proteínas, recientemente denominadas FloA y FloT, presentan dicho dominio. En general, a diferencia de Flo-1 y Flo-2, las proteínas con dominio SPFH de bacterias son proteínas integrales de membrana, con uno o más cruces transmembranales (Hinderhofer *et al.*, 2009). A pesar de que las membranas bacterianas carecen de lípidos especializados característicos de balsas lipídicas eucariontes (esfingolípidos y colesterol), se ha demostrado que presentan microdominios membranales funcionales en los que residen las proteínas con dominio SPFH. Al igual que en células eucariontes, estas proteínas organizan la formación de estos microdominios, reclutando proteínas con diferentes funciones

celulares como señalización y secreción (Bach & Bramkamp, 2013; Mielich-Süss *et al.*, 2017)

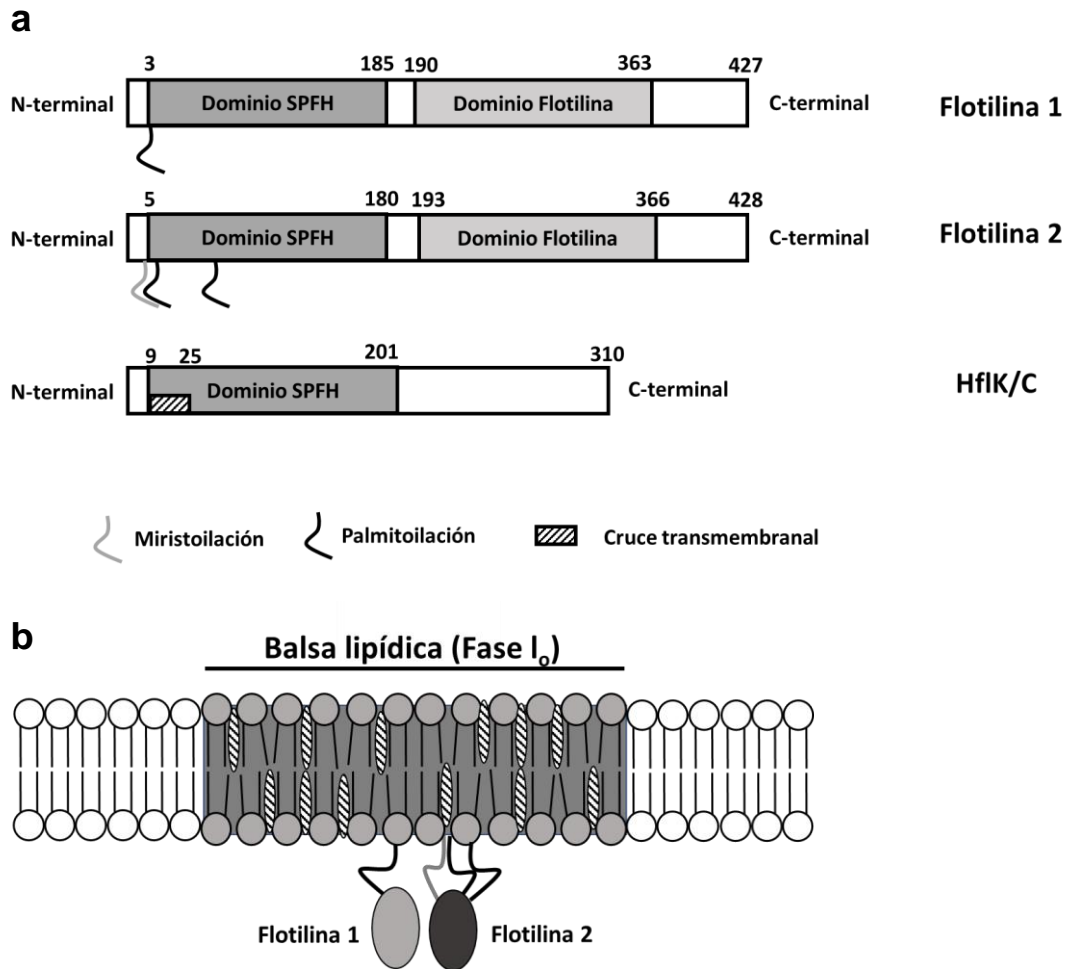


Figura 4. Estructura y componentes de una balsa lipídica. a) Estructura de las proteínas que contienen dominios SPFH. Se muestra la ubicación de los dominios SPFH en proteínas eucariontes: flotilina 1 y 2, adicionalmente estas proteínas contienen un dominio conservado cerca del C-terminal; por otro lado, las proteínas bacterianas que poseen dominios SPFH (HflK/C) se asocian a la membrana por cruces transmembranales en lugar de modificaciones postraduccionales y no poseen otro dominio conservado. b) Esquema de la composición de una balsa lipídica eucarionte, el microdominio está enriquecido en esteroides y esfingolípidos confiriéndole características similares a una fase l_o , estos dominios de membrana están frecuentemente asociados a proteínas que contienen el dominio SFPH, las cuales son usados como marcadores de balsas lipídicas. En la imagen se muestran algunas proteínas SPFH que se anclan a la membrana por modificaciones postraduccionales como la miristoilación o palmitoilación.

2.4 Proteínas asociadas a microdominios membranales bacterianos

Al igual que en el estudio de balsas lipídicas eucariontes, la obtención y caracterización por DRM ha sido una de las principales herramientas para el análisis de microdominios membranales bacterianos. Dominios de membrana con características similares a balsas lipídicas de eucariontes, fueron identificados en primera instancia en *B. subtilis* (López & Kolter, 2010). Para diferenciarlos de las balsas lipídicas eucariontes, fueron denominados microdominios de membrana funcionales (FMM) (López & Kolter, 2010). En ese estudio, López y Kolter identificaron dos proteínas que contienen el dominio SPFH: FloT (YuaG) y FloA (YqfA) y observaron que se encuentran localizadas en focos discretos a lo largo de la membrana. Además, encontraron que éstas se asocian espacial y funcionalmente con una vía de señalización mediada por un sistema de dos componentes (KinC-Spo0A) que está involucrada en la formación de biopelículas. El análisis proteómico de DRM obtenidos de membrana plasmática de *B. subtilis* reveló la presencia de proteínas de señalización (histidina cinasas y quimiorreceptores), proteínas involucradas en la biosíntesis de la pared celular, así como transportadores y proteínas de secreción, además de ambas proteínas con dominio SPFH (Bach & Bramkamp, 2013; López & Kolter, 2010). Por otro lado, se ha demostrado que algunas de estas proteínas co-localizan e interactúan directamente con FloT y/o FloA. Finalmente, se encontró una dependencia funcional de las proteínas con dominios SPFH y la histidina cinasa KinC, así como con la maquinaria Sec de translocación de proteínas (Bach & Bramkamp, 2013; López & Kolter, 2010; Schneider *et al.*, 2015).

En estudios posteriores se han realizado aproximaciones del contenido de los FMM bacterianos, analizando los DRM obtenidos de membranas de bacterias como *B. subtilis*, *S. aureus* (López & Kolter, 2010) y *B. burgdorferi* (Toledo *et al.*, 2015). Los resultados indican el enriquecimiento de algunas proteínas con funciones en común en las fracciones de DRM de estos microorganismos, como las proteínas que contienen dominio SPFH que, por lo tanto y al igual que en balsas lipídicas eucariontes, se utilizan como marcadores de FMM; proteínas con funciones de

secreción (SecD, SecY y SecA), componentes estructurales del flagelo (FlaA, FlaB, FlgE), algunas proteasas (FtsH y HtrA), cinasas sensoras (KinC, PhoR, ResE, Walk) y generación de energía (AtpD, AtpG, SA1909-11), entre otras (Lopez & Koch, 2017). Las proteínas encontradas en los DRM bacterianos tienen funciones similares a las identificadas en DRM eucariontes. Esto permite suponer que los FMM bacterianos, a pesar de que carecen de esfingolípidos y colesterol, son estructuras análogas y funcionalmente semejantes a las balsas lipídicas de células eucariontes.

Datos preliminares en nuestro grupo de trabajo, sugieren que algunas mutaciones en los genes que codifican para proteínas que contienen el dominio SPFH en *E. coli* pueden afectar la actividad y regulación del sistema de dos componentes BarA/UvrY. El sistema BarA/UvrY de *E. coli* regula la expresión de los RNA pequeños no codificantes (sRNA) CsrB y CsrC, los cuales secuestran e inactivan a una proteína de regulación global CsrA, la cual participa en la regulación del metabolismo del carbono, formación de biopelículas, motilidad y expresión de factores de virulencia; sugiriendo que las proteínas con dominios SPFH podrían regular sistemas de transducción de señales en *E. coli* por un mecanismo hasta el momento desconocido. Debido a lo anterior, nuestro grupo de trabajo está interesado en determinar si existen estructuras análogas a balsas lipídicas en *E. coli* y determinar el contenido proteínico de estas.

3. JUSTIFICACIÓN

Las balsas lipídicas y las proteínas que las conforman han sido ampliamente identificadas y caracterizadas en células eucariontes. Estudios demuestran que la formación de estos microdominios promueve la compartimentalización y regulación de diversos procesos celulares incluyendo la transducción de señales. Una de las técnicas empleadas para la caracterización y estudio de los microdominios de membrana es la obtención de DRM. Se ha observado que usualmente en estas preparaciones se enriquecen proteínas que poseen un dominio conservado denominado SPFH, diversos autores sugieren que estas proteínas están involucradas en la formación y mantenimiento de los microdominios de membrana.

Recientemente se han caracterizado algunas estructuras similares a balsas lipídicas en bacterias, pero no existe información sobre ellas en bacterias Gram negativas como *E. coli*, la cual codifica en su genoma un grupo de proteínas con dominio SPFH. Estudios previos en nuestro grupo de trabajo sugieren que la mutación de estas proteínas afecta la actividad y regulación del sistema de transducción de señales BarA/UvrY por un mecanismo aún no conocido.

Debido a la amplia distribución de los dominios conservados de SPFH entre los diferentes reinos, se sugiere un origen común y posiblemente una homología funcional de todas las proteínas que contienen dicho dominio. El hecho que nuestro modelo de estudio posea proteínas con dominio SPFH y que la mutación de estas proteínas afecta la señalización vía sistema de dos componentes, aumenta nuestro interés en determinar si *E. coli* posee microdominios de membrana y determinar qué proteínas se encuentran en éstos.

4. HIPOTESIS

Las bacterias Gram negativas como *E. coli* poseen microdominios de membrana en la membrana interna que compartimentan proteínas involucradas en diversas funciones celulares.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Analizar la composición de los microdominios de membrana a través de la obtención de DRM en *E. coli*.

5.2 Objetivos particulares

1. Purificar la membrana interna de *E. coli* por medio de la generación de esferoplastos y gradiente de sedimentación.
2. Determinar las condiciones adecuadas para obtener DRM de la MI de *E. coli* empleando diferentes condiciones de solubilización.
3. Identificar las proteínas presentes en los microdominios de membrana de *E. coli* por espectrometría de masas.
4. Validar el análisis proteómico por microscopía de fluorescencia y ensayos de tipo Western blot.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6. 1 Cepas y condiciones de crecimiento

Las cepas y plásmidos usados en este trabajo se enlistan en la tabla 1.

Tabla 1. Cepas y plásmidos empleados en este trabajo

Cepa	Características	Referencia
MG1655	Cepa silvestre	Cepario del laboratorio
OmpC-HA	MG1655 <i>ompC::HA Kan^R</i>	En este trabajo
HflC-HA	MG1655 <i>hflC::HA Kan^R</i>	Cepario del laboratorio
HflK-HA	MG1655 <i>hflK::HA Kan^R</i>	Cepario del laboratorio
QmcA-3xFLAG	MG1655 <i>ybbK::3xFLAG Cm^R</i>	En este trabajo
QmcA-mCherry	MG1655 <i>hflC::HA, ybbK::3xFLAG qmcA::mCherry Kan^R</i>	En este trabajo
YidC-mCherry	MG1655 <i>hflC::HA, ybbK::3xFLAG yidC::mCherry Kan^R</i>	En este trabajo
Plásmidos		
pKD46	<i>P_{araB} Lambda Red (exo, bet, gam) Amp^R</i>	Datsenko & Wanner, 2000
pSU315	Secuencia etiqueta HA Kan ^R	Uzzau <i>et al.</i> , 2001
pSUB11	Secuencia etiqueta 3xFLAG Cm ^R	Uzzau <i>et al.</i> , 2001
pMXFL1	Secuencia etiqueta mCherry Kan ^{Rre}	Cepario laboratoio
pBADRBS/barA-mCherry	<i>araC, P_{BAD}::6xHis::barA-mCherry Amp^R</i>	Cepario del laboratorio
pBAD/glnP-mCherry	<i>araC, P_{BAD}::glnP::mCherry Amp^R</i>	En este trabajo
pACT3 BAD/barA-mCherry	<i>araC, P_{BAD}::barA-mCherry Cm^R</i>	Cepario del laboratorio
pACT3 BAD/glnP-mCherry	<i>araC, P_{BAD}::glnP-mCherry Cm^R</i>	En este trabajo
pACT3 BAD/acrA-mCherry	<i>araC, P_{BAD}::acrA-mCherry Cm^R</i>	En este trabajo
pACT3 BAD/aas-mCherry	<i>araC, P_{BAD}::aas-mCherry Cm^R</i>	En este trabajo
pACT3 BAD/rbbA-mCherry	<i>araC, P_{BAD}::rbbA-mCherry Cm^R</i>	En este trabajo

Para construir las cepas OmpC-HA y QmcA-3xFlag se realizó un etiquetado con un epítipo de hemaglutinina (HA) o 3xFLAG en el extremo carboxilo terminal de las proteínas OmpC y QmcA (YbbK) a través de recombinación homóloga usando el sistema de recombinasa Red (Datsenko & Wanner, 2000; Uzzau *et al.*, 2001). Para ello, se generó un producto de PCR empleando oligonucleótidos que contenían una secuencia semejante a la región a reemplazar y un molde de DNA que contiene la secuencia codificadora del epítipo de HA o 3xFLAG (pSU315 y pSUB11 respectivamente) flanqueado por sitios FRT y un casete de resistencia. Los oligonucleótidos empleados fueron: ompC-HA-Fw y ompC-HA-Rv; ybbK-3xFLAG-Fw y pKD-ybbK-Rv, respectivamente (la secuencia de los oligonucleótidos empleados en este trabajo se muestran en el apartado de anexos). Las células receptoras que previamente contenían el plásmido auxiliar pKD46, se transformaron con el producto de PCR y se seleccionaron colonias resistentes a la resistencia del casete, verificándolas por PCR y Western blot para confirmar el etiquetado. De manera similar, para generar las cepas QmcA-mCherry y YidC-mCherry el producto de PCR se obtuvo usando los oligonucleótidos pFluor-ybbK-Fw y pKD-ybbK-Rv; yidC-Flou-Fw y pKD-yidC-Rv respectivamente, usando el plásmido pMXFL1 como molde que contiene la proteína fluorescente mCherry.

Para construir el plásmido pACT3 BAD/glnP-mCherry, el gen *glnP* fue amplificado por PCR usando los oligonucleótidos glnP-EcoR1-Fw y glnP-SacI-Rv usando ADN cromosomal de la cepa MG1655 como molde. El producto de PCR fue clonado dentro de los sitios de restricción EcoRI y SacI del plásmido pBADRBS/barA-mCherry obteniendo el plásmido pBAD/glnP-mCherry. El gen etiquetado *glnP::mcherry* fue liberado usando los sitios de corte EcoRV y HindIII y subclonado dentro del plásmido pACT3 BAD/barA-mCherry entre los sitios de corte EcoRV y HindIII dando como resultado el plásmido pACT3 BAD/glnP-mCherry.

Para construir los plásmidos pACT3 BAD/aas-mCherry, pACT3 BAD/acrA-mCherry y pACT3 BAD/rbbA-mCherry, los genes *aas*, *acrA* y *rbbA* fueron amplificados por PCR usando los oligonucleótidos aas-NdeI-Fw y aas-SacI-Rv, acraA-NdeI-Fw y acra-SacI-Rw, rbbA-NdeI-Fw y rbbA-SacI-Rv, respectivamente. Los fragmentos

fueron clonados dentro de los sitios NdeI y SacI en el plásmido pACT3 BAD/gInP-mCherry para reemplazar el gen *glnP* con *aas*, *acrA* y *rbbA* respectivamente.

Las células de *E. coli* (cepa MG1655 y derivados) se cultivaron rutinariamente a 37°C en medio LB. Los medios se complementaron con antibióticos en las siguientes concentraciones: cloranfenicol, 25 µg/ml; ampicilina, 100 µg/ml; kanamicina, 50 µg/ml cuando fuera necesario según el marcador de resistencia empleado.

6.2 Obtención de esferoplastos

Los esferoplastos fueron obtenidos a partir de una modificación de la técnica descrita por Renner & Weibel (2011). Para ello, se realizó un cultivo de toda la noche y posteriormente se inocularon 10 ml del precultivo en 1 L de medio fresco de LB. Luego, fue incubado a 37°C en agitación continua (250 RPM) hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0.4, se agregó 200 a 1,000 µl de ampicilina (10 mg/ml) según la cepa usada, para alcanzar una concentración final entre 2-10 µg/ml. Se incubó por 3 horas en las mismas condiciones hasta observar células filamentosas al microscopio. Las células alargadas fueron recolectadas por centrifugación a 3,500 RPM (~1200 RCF) a 4°C por 15 minutos en un rotor JA-14 (Beckman Coulter). Luego, las células fueron resuspendidas suavemente con la ayuda de una barra magnética en 7.5 ml de una solución fría de 1 M sacarosa, 0.2 M Tris-Base, pH 8.0. Posteriormente, se agregó 2.5 ml de una solución de 1 M sacarosa, 0.2 M Tris-Base, 4mM EDTA, 60mg/ml lisozima, pH 8.0. La mezcla fue resuspendida invirtiendo suavemente el tubo 5-8 veces hasta homogenizar la mezcla. La muestra se incubó en hielo y cada 5 minutos se tomaron 10 µl del resuspendido, se agregó 90 µl de agua estéril y se resuspendió suavemente con pipeta, posteriormente se observó al microscopio para confirmar la formación de esferoplastos (generalmente de 5-10 minutos después de añadir la solución con lisozima). Luego, 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 y se invirtió suavemente por 10-15 veces. La formación de esferoplastos fueron confirmados nuevamente por microscopía óptica y estos fueron recolectados por centrifugación

a 3,000 RPM (~900 RCF) a 4°C por 30 minutos en un rotor JA-14 (Beckman Coulter).

6.3 Fraccionamiento subcelular

La pastilla de esferoplastos fue resuspendida suavemente en 10 ml de una solución amortiguadora (20 mM Tris-Base, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 20% sacarosa m/m, pH 7.4). Las células fueron pasadas a través de una prensa de French a 20,000 psi enfriada previamente a 4°C. Las células sin romper y los restos celulares fueron eliminados por centrifugación a 11,000 RPM (~10,000 RCF) a 4°C por 30 minutos en un rotor JA-25.50 (Beckman Coulter). Posteriormente, se recolectó el sobrenadante y se colocó 5 ml de este en la parte superior de 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-Base, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH 7.4). Los gradientes fueron centrifugados a 38,000 RPM (~113,000 RCF) por 12 horas a 4°C en un rotor 45Ti (Beckman Coulter). Se recolectaron fracciones de 1.5ml, posteriormente se midió la A_{280} y se cuantificó por refractometría el porcentaje de sacarosa para cada una de ellas. Se tomaron las fracciones representativas del fraccionamiento y se realizó Western blot contra marcadores de proteínas solubles (DnaK), MI (ArcB) y ME (OmpC).

6.4 Western blot

Volúmenes iguales (10 μ l) de fracciones representativas de gradientes DRM se separaron mediante SDS-PAGE (gel de poliacrilamida al 10%) y las proteínas se transfirieron a un filtro Hybond-ECL (Amersham Biosciences). El filtro se equilibró en un buffer TTBS (Tris 25 mM, NaCl 150 mM y Tween-20 al 0.1%) durante 10 minutos y se incubó con un amortiguador de bloqueo (5% p/v de leche en TTBS) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se utilizaron anticuerpos monoclonales contra el epítipo HA para HfIC: HA o 3XFLAG para las fusiones 3XFLAG de Aas, AcrA, GlnP y RbbA (Sigma Aldrich) a una dilución de 1: 10.000 en el filtro y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. El anticuerpo unido se detectó

utilizando un anticuerpo IgG anti-ratón conjugado con peroxidasa de rábano (Sigma Aldrich) usando una dilución de 1:10,000 y el sistema de detección Immobilon Western (Millipore).

6.5 Microscopia de fluorescencia

Se inmovilizaron células de fase exponencial (DO_{600} de 0,8) sobre portaobjetos de agarosa. El contraste de fase y las micrografías fluorescentes se tomaron en un microscopio Olympus BX51 y una cámara Evolution VF Color Cooled (Media Cybernetics). El conjunto de filtros mCherry comprendía un filtro de excitación de 538-580 nm y un filtro de emisión de 582-682 nm. Las imágenes fluorescentes se capturaron utilizando tiempos de exposición de 1 segundo y utilizando un rango de visualización idéntico en todas las muestras. Las imágenes fueron procesadas con ajustes idénticos empleando ImageJ (Schneider *et al.*, 2012).

6.6 Aislamiento de DRM

Las fracciones que correspondieron a MI del fraccionamiento anteriormente mencionado fueron diluidas con una solución amortiguadora fría (20 mM Tris-Base, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH 7.4) hasta alcanzar una concentración de sacarosa cercana a 10% (m/m), posteriormente fue centrifugada a 38,000 RPM (~113,000 RFC) por 1 hora a 4°C. Se decantó el sobrenadante y en caso de ser necesario la pastilla de membranas fue almacenada a -20°C hasta su uso. Luego, la pastilla fue resuspendida en 500 μ l de solución fría de amortiguador TNE (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH 7.4). Se cuantificó proteína total por Bradford de acuerdo con las instrucciones del proveedor (Sigma-Aldrich), realizando una curva estándar con albúmina de suero bovino (BSA). Para determinar la condición adecuada para obtener DRM en *E. coli*, se utilizaron diferentes condiciones de solubilización, para ello se colocó volumen equivalente a 500 μ g de proteína de la fracción membranal en un tubo para ultracentrifugación (manteniéndolo en hielo) y diferentes cantidades de Tritón X-100 (10%), p.ej. para la relación 6:1 se agregó 30 μ l Tritón X-100 (3,000 μ g) a 500 μ g de proteína membranal. 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 2. Después de agregar el Tritón, las membranas fueron incubadas en hielo por 30 minutos, posteriormente se agregó amortiguador TNE hasta alcanzar un volumen de 1270 μ l, luego se agregó 2.54 ml de Optiprep 60% y se mezcló en vórtex durante 30 segundos. 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% y TNXE (TNE+1% Tritón X-100), en seguida se puso 1.5 ml de TNXE. Los gradientes fueron centrifugados a 38,000 RPM (182,000 RFC) por 2 horas a 4°C en un rotor SW 40Ti. Se recolectaron fracciones de 1 ml y se almacenaron a -20°C.

Tabla 2. Condiciones ensayadas para la solubilización de membrana interna.

Relación (Detergente/ proteína membranar)	Membrana (μ g proteína total)	Tritón X-100 (μ g)	V _{TOT} (μ l)
6:1	500	3,000	300
7:1	500	3,500	350
8:1	500	4,000	400
9:1	500	4,500	450
10:1	500	5,000	500
11:1	500	5,500	550

6.7 Microscopía electrónica

Las muestras de MI y DRM se prepararon como describió anteriormente (Carmona-Salazar *et al.*, 2011). Brevemente, las muestras se centrifugaron y las pastillas membranales se fijaron con 1 ml de glutaraldehído al 2.5% (v/v) en una solución amortiguadora de fosfato 100 mM (pH 7.0) y se lavaron con la misma solución de 4 a 5 veces. Los sedimentos se fijaron con tetróxido de osmio (1%) durante 2 horas a 4°C y se lavaron con la solución amortiguadora de fosfato de 4 a 5 veces. Posteriormente, las muestras se deshidrataron con etapas sucesivas de lavado con etanol (30–100% v/v) y con un lavado final de óxido de propileno. Finalmente, se realizó una inclusión en óxido de propileno-Epon (1:1) durante 48 horas a 60°C. Se obtuvieron cortes ultrafinos de 70–80 nm (Reichert Jung, Leica) y se observó en un microscopio electrónico (JEOL 1200-EXII) operado a 60–80 kV.

6.8 Digestión de proteínas por tripsinización

Se realizó una precipitación de proteínas empleando ácido tricloroacético (TCA) para concentrar las muestras y eliminar el triton X-100 en las muestras de DRM. Para ello, a 20 µg de proteína total (de MI o DRM según correspondiera) se le agregó 100 µl de una solución amortiguadora TE 10X (100 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA disódico, pH 8.0) y 100 µl de TCA al 72%. Las muestras se incubaron en hielo durante 2 horas, luego se centrifugaron a 14,000 RPM, 10 minutos a 4 °C en una centrifugadora de mesa refrigerada. Se desechó el sobrenadante y la pastilla obtenida se resuspendió en 1 ml de acetona fría y se incubó durante la noche a -20 °C. Luego, la mezcla se centrifugó a 14.000 RPM, 10 minutos a 4 °C; el sobrenadante se desechó y la pastilla se secó a temperatura ambiente durante 20 minutos. Las proteínas precipitadas se re-solubilizaron en 10 µl de una solución de urea 6M. Las muestras se redujeron agregando 2.5 µL de una solución de reducción (45 mM DTT, 100 mM bicarbonato de amonio) durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente se alquiló la muestra agregando 2.5 µL de la solución de alquilación (100 mM yodoacetamida, 100 mM bicarbonato de amonio) durante 20 minutos a 24°C incubando en oscuridad. Previo a la digestión con tripsina, se agregó 20 µL de agua para reducir la concentración final de urea a 2 M. La digestión de proteínas se realizó agregando 10 µL de la solución de tripsina (5 ng/µL de grado de secuenciación de Promega, 50 mM bicarbonato de amonio) a cada muestra y se incubó a 37°C durante 18 horas. Para detener la reacción se agregó 5 µL de ácido fórmico al 5%. Los extractos de proteínas se secaron por centrifugación al vacío y se almacenaron a -20 °C hasta el análisis por LC-MS/MS.

6.9 Análisis por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem LC-MS/MS

Las digestiones obtenidas anteriormente se re-solubilizaron con agitación en 10 µl de ácido fórmico al 0.2% durante 15 minutos. La desalinización y la limpieza de las muestras se realizó utilizando puntas de pipeta ZipTip C18 (Millipore, Billerica, MA). Las muestras se secaron en centrífuga al vacío y luego se re-solubilizaron en agitación empleando 10 µl de ACN al 2% y ácido fórmico al 1% durante 15 minutos.

La mezcla de péptidos se separó mediante cromatografía líquida (LC) utilizando una columna de fase inversa C18. Una columna capilar de sílice fundida Self-Pack PicoFrit 75 μm ID (New Objective, Woburn, MA) fue empacada con el material C18 Jupiter 5 μm de fase inversa 300 Å (Phenomenex, Torrance, CA). Esta columna se instaló en el sistema Easy-nLC II (Proxeon Biosystems, Odense, Dinamarca). Los péptidos separados fueron directamente electropulverizados en un espectrómetro de masas cuadrupolo de trampa iónica lineal (LTQ) Orbitrap Velos (ThermoFisher Scientific, Bremen, Alemania) equipado con una fuente de iones de nanoelectrospray Proxeon. Las soluciones utilizadas para la cromatografía fueron ácido fórmico al 0.2% (disolvente A) y 100% de ACN/ácido fórmico al 0.2% (disolvente B). Las muestras se cargaron en la columna con un flujo de 600 nL/min y se eluyeron con un gradiente de pendiente 2 con un flujo de 250 nL/min. El solvente B primero aumentó de 2 a 40% en 100 minutos y luego de 40 a 80% de B en 20 minutos.

La adquisición de datos por LC-MS/MS se realizó utilizando un ciclo de eventos de diecisiete exploraciones que comprende una MS de exploración completa para el evento de exploración adquirido en el Orbitrap. La resolución de masa para la EM se estableció en 60,000 (m/z 400) y se usó para activar los dieciséis eventos adicionales de MS/MS adquiridos en paralelo en la trampa de iones lineales para los dieciséis iones más intensos. El rango de relación de masa sobre carga fue de 360 a 1700 para la exploración de MS con un valor objetivo de 1,000,000 de cargas y de $\sim 1/3$ de la relación m/z principal a 2,000 para la exploración de MS/MS con un valor objetivo de 10,000 cargas. Los eventos de exploración dependientes de los datos utilizaron un tiempo máximo de llenado de iones de 100 ms y 1 microscan. Los iones objetivo ya seleccionados para MS/MS se excluyeron dinámicamente durante 31 s después de 2 conteos. Los voltajes de nanopulverización y S-lens se ajustaron a 1.3–1.8 kV y 50 V, respectivamente. La temperatura capilar se fijó a 250°C. Las condiciones de MS/MS fueron: energía de colisión normalizada, 35 V; activación q, 0.25; Tiempo de activación, 10 ms.

6.10 Búsqueda y análisis en la base de datos (Uniprot)

Los archivos de datos sin procesar (raw) de los espectros de fragmentación se convirtieron en archivos mzXML mediante la herramienta de software RawConverter (He *et al.*, 2015) y se compararon con la base de datos UniProt (descargada el 18 de agosto de 2017; Proteome ID: UP000000625) que consiste en la secuencia de cepa *E. coli* MG1655 (4,306 entradas), utilizando el motor de búsqueda Comet en la suite Trans Proteome Pipeline (TPP) (Deutsch *et al.*, 2010) con los siguientes parámetros; las tolerancias de masa iónica del precursor de péptidos monoisotópicos y productos de fragmentación fueron 3 Da y 1 Da respectivamente; la oxidación de las metioninas (+16) se consideró como modificación variable, se permitieron dos fracturas de escisión. Se consideró que una proteína se identificó positivamente cuando la probabilidad de ProteinProphet era >0.99 y se asignaron al menos cuatro péptidos únicos.

6.11 Análisis de proteínas *in silico*

La predicción de dominios transmembrana (TM) y péptido de señal se llevó a cabo utilizando el servidor TOPCONS (<http://topcons.cbr.su.se/>) (Tsirigos *et al.*, 2015). Para las modificaciones postranscripcionales (palmitoylation, N-Myristoylation, farnesylation y geranylgeranylation) se realizaron predicciones utilizando el software GPS-Lipid 1.0 (Xie *et al.*, 2016) con un umbral de parámetro medio. Para el anclaje de membrana anfipático en el plano se usó la herramienta Amphipaseek del servidor NPS @ (Combet *et al.*, 2000).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Purificación de membrana interna de *E. coli*

Las proteínas con dominio SPFH que posee *E. coli* se localizan en la membrana interna (MI) (Hinderhofer *et al.*, 2009), lo que sugiere que los microdominios de membrana podrían localizarse exclusivamente en ésta. Por otro lado, la membrana externa (ME) de *E. coli* está compuesta de lipopolisacáridos, lo que le confiere resistencia natural a la solubilización por detergentes como el tritón X-100 (Thein *et al.*, 2010), el cual es usualmente empleado para obtener preparaciones de DRM. Debido a lo anterior, la obtención de MI purificada era un requisito esencial previo para obtener DRM. Para ello, un cultivo de fase exponencial ($DO_{600}=0.4$) fue incubado con dosis subletal de ampicilina para obtener células filamentosas, posteriormente las células fueron recolectadas y tratadas con EDTA-lisozima. Luego, se realizó un choque osmótico para obtener esferoplastos, los cuales son células que carecen de pared celular (Fig. 5a). Debido a los componentes estructurales de la MI, esta es más flexible a comparación de la ME, lo que permite a la MI resistir cambios en la turgencia permitiendo una mejor separación de los componentes subcelulares al realizar un choque osmótico. Los esferoplastos fueron tratados en una prensa de French y el lisado fue resuelto en un gradiente discontinuo de sacarosa por ultra centrifugación. Después del centrifugado, dos bandas y una pastilla fueron visibles en el gradiente (Fig. 5b). Se recolectaron fracciones de 1.5 ml y se cuantificó la proteína contenida en ellos, los resultados indicaron 3 picos en las fracciones 8, 24 y 36 (Fig. 5c). Se realizó un Western blot contra las proteínas DnaK, ArcB y OmpC-HA, usándolas como marcadores de proteínas solubles, MI y ME respectivamente. Los resultados indican que DnaK se encuentra mayoritariamente en las fracciones 3-15, mientras que el marcador de proteína de MI (ArcB) en las fracciones 21-30, y el marcador de proteínas de ME (OmpC:HA) se localizó en la pastilla del gradiente (Fig. 5d). Estos resultados sugieren una separación óptima de los componentes subcelulares. Las fracciones enriquecidas en MI fueron recolectadas y almacenadas.

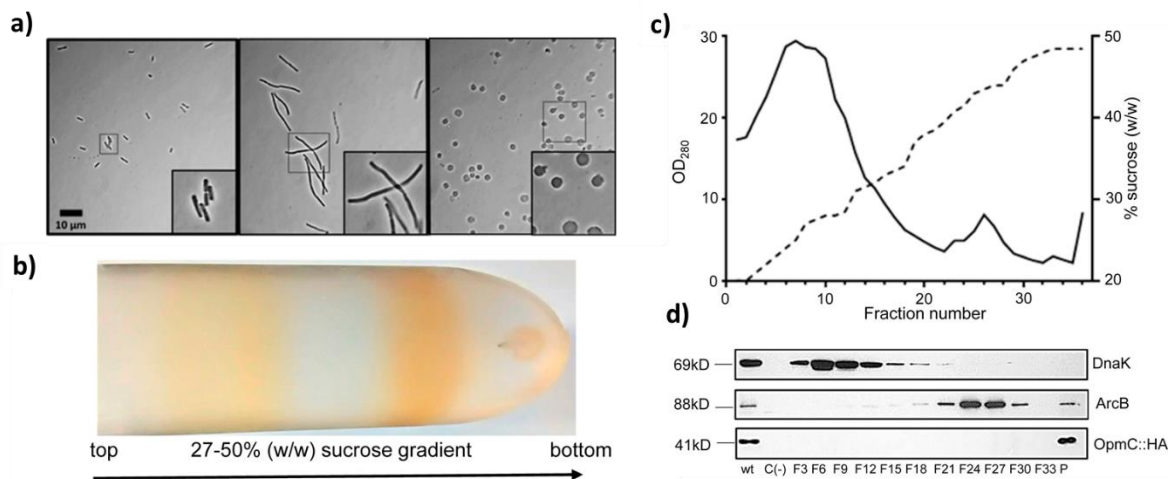


Figura 5. Aislamiento de membrana interna. **a)** Pasos en la formación de esferoplastos en *E. coli*, panel izquierdo: células en fase exponencial sin tratamiento, panel central: células filamentosas obtenidas 3 horas después de adicionar una dosis subletal de ampicilina, panel derecho: esferoplastos generados por tratamiento de EDTA/lisozima y choque osmótico. **b)** El lisado de los esferoplastos fue resuelto en gradiente discontinuo de sacarosa. **c)** La proteína total (línea continua) y porcentaje de sacarosa (línea puntuada) de las fracciones recolectadas fueron cuantificadas. **d)** Se analizaron fracciones representativas del gradiente mediante Western blot usando anticuerpos específicos contra DnaK (proteína citoplásmica), ArcB (proteína de MI) y OpmC-HA (proteína de ME). Los extractos de una cepa de tipo salvaje (*wt*) y un mutante *dnaK* o *arcB* (Δ), fueron usados usados como controles positivos y negativos, respectivamente. F1 a F33 representan las fracciones recolectadas de arriba a abajo del gradiente.

7.2 Integridad de los microdominios de membrana al generar esferoplastos

En las células eucariontes, se ha demostrado que las proteínas que contienen el dominio SPFH están asociadas con los DRM y, por lo tanto, se utilizan como marcadores positivos (Browman *et al.*, 2007). Al etiquetar estas proteínas con marcadores fluorescentes, se ha observado por ensayos de microscopía de fluorescencia que aparecen focalizadas, por lo que se ha demostrado que las proteínas con dominio SPFH se pueden compartimentalizar en sitios puntuales en la membrana (Hinderhofer *et al.*, 2009). Por lo tanto, para determinar si la integridad

de los microdominios de la membrana no se ve afectada por la transformación a esferoplastos de las células de *E. coli*, se seleccionó una proteína que contiene el dominio SPFH en *E. coli* (HfIC) y se fusionó con mCherry. La localización de la proteína híbrida se detectó mediante microscopía de epifluorescencia en células sin tratamiento, células filamentosas y esferoplastos. Se observó que HfIC-mCherry estaba localizada en focos discretos en los polos de las células normales (Fig. 6A). Sin embargo, además de la localización polar de HfIC-mCherry, aparecieron otros focos en las células filamentosas (Fig. 6B). Finalmente, estos focos también estaban presentes en los esferoplastos (Fig. 6C). Por lo tanto, los resultados sugieren que la integridad de los microdominios de membrana parece permanecer intacta durante el tratamiento con ampicilina/lisozima y la generación de esferoplastos.

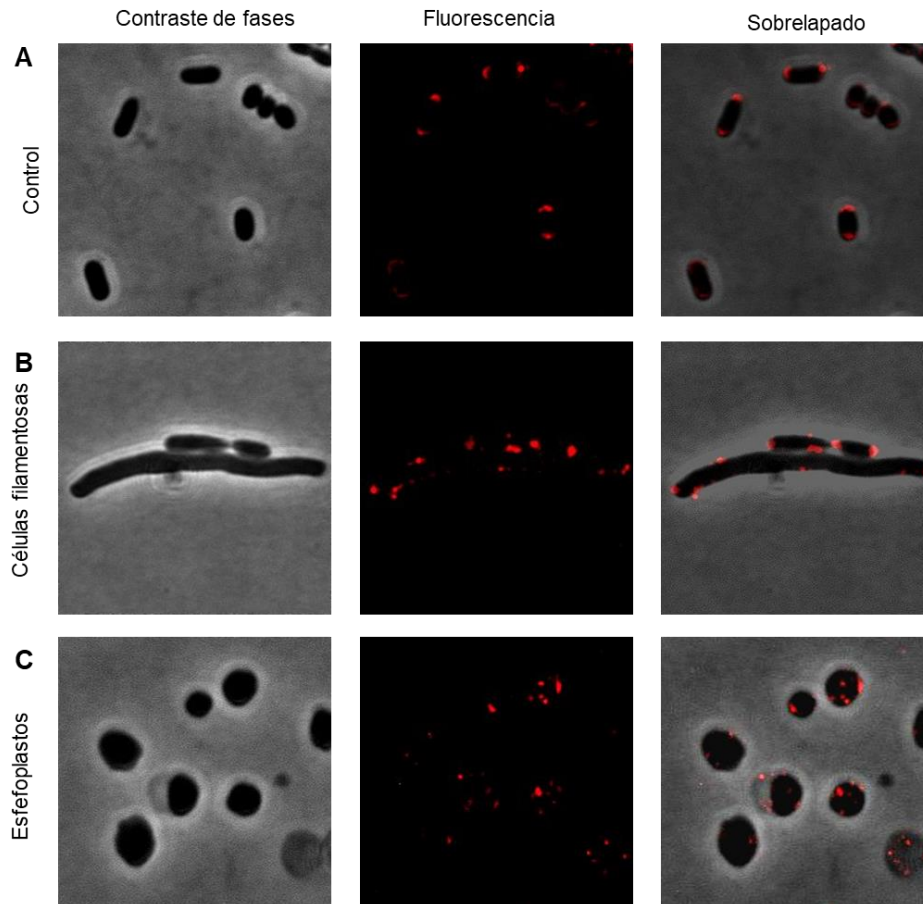


Figura 6. Localización subcelular de HfIC-mCherry. Microscopía de contraste de fase, microscopía de fluorescencia y sobrelapado de ambas señales de: **A)** células previas a la incubación con ampicilina, **B)** células filamentosas y **C)** esferoplastos. Se observa que en todas las etapas para generar esferoplastos HfIC-mCherry se

mantiene focalizada, sugiriendo que la estabilidad de los microdominios permanece a pesar de los tratamientos al que fueron sometidos las células.

7.3 Aislamiento de DRM a partir de la MI de *E. coli*

El hecho de que los componentes de los microdominios de membrana puedan extraerse por detergentes no iónicos como el Tritón X-100 en forma de DRM, ha ocasionado que esta sea una herramienta frecuente para el estudio de la composición de los microdominios de membrana (Brown, 2006; Simons & Vaz, 2004). Sin embargo, es importante mencionar que un paso crítico para el aislamiento de los DRM es la selección adecuada de la proporción detergente/proteína membranal, que debe adaptarse según la naturaleza de la membrana biológica (Schuck *et al.*, 2003). Por ejemplo, existen reportes en donde se usa una relación detergente/proteína 15:1 para la preparación de DRM de hojas de *N. tabacum* (Mongrand *et al.*, 2004). Por otro lado, se utilizó una proporción de 8:1 para preparaciones similares en hojas de *A. thaliana* (Borner *et al.*, 2005). Además, se informó una relación de 12.5:1 como la condición óptima para las preparaciones de DRM a partir de membranas plasmáticas de *P. vulgaris*, hojas de *N. tabacum* y germinación de embriones de *Z mays* (Carmona-Salazar *et al.*, 2011). Finalmente, los DRM de neutrófilos bovinos se han recuperado en proporciones entre 5:1 y 10:1 (Nebl *et al.*, 2002), mientras que una relación 3:1 fue suficiente para el aislamiento DRM de las células epiteliales (células MDCK) (Delaunay *et al.*, 2008).

Debido a lo anterior, consideramos necesario determinar la relación óptima de detergente/proteína para el aislamiento de DRM en *E. coli*. Por lo tanto, la fracción de MI obtenida previamente se incubó en diversas proporciones de Tritón X-100/proteína membranal. Los DRM entonces fueron recuperados por flotación en un gradiente continuo de Optiprep. En la parte superior del gradiente, se observó una banda opaca, cuya intensidad disminuye a medida que aumenta la proporción de detergente/proteína (Fig. 7a). Posteriormente, se fraccionó el gradiente y se cuantificó la proteína de cada una de fracciones. Se observó que el contenido total de proteína de las fracciones superiores (F1 y F2) disminuye, mientras que las fracciones inferiores aumenta a medida que aumenta la relación

detergente/proteína (Fig. 7b). Posteriormente, las fracciones fueron analizadas por Western blot usando como marcador a HflC, una proteína que contiene el dominio SPFH (usado frecuentemente como marcador de balsas lipídicas en preparaciones de células eucariontes).

El análisis por Western blot reveló que la mayor parte de la proteína HflC pudo ser recuperada en la fracción superior (F2) usando una proporción de detergente/proteína de hasta 8:1 (Fig. 7c). Como era de esperar, la fracción F2 correspondía exactamente con la banda opaca antes mencionada (Fig. 7a) y del pico de proteína total (Fig. 7b). Por otro lado, el tratamiento con una relación detergente/proteína de 9: 1 resultó en la pérdida de casi la mitad de HflC que estaba en la fracción F2, el resto se distribuyó en las fracciones inferiores (Fig. 7c). Finalmente, cuando se usaron las relaciones de detergente/proteína 10:1 y 11:1, la mayoría de HflC se encontraba en el fondo del gradiente (Fig. 7c). Por lo tanto, proponemos la relación 8:1 de triton X-100/proteína membranal como la condición óptima para el aislamiento de DRM en *E. coli*.

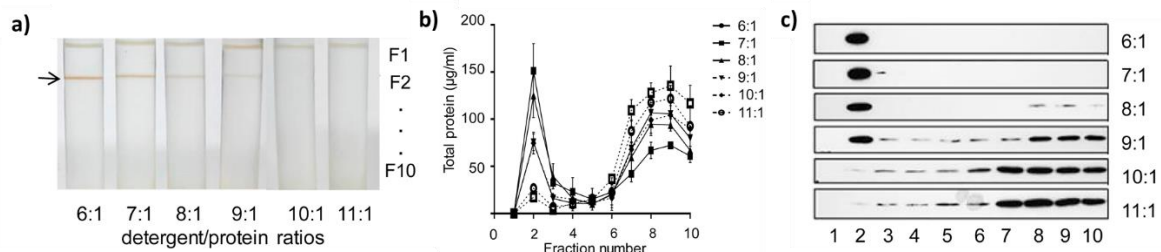


Figura 7. Aislamiento de membranas resistentes a detergentes. La MI aislada de *E. coli* se trataron con diferentes relaciones de Tritón X-100/proteína. **a)** Los DRM se aislaron por flotación usando un gradiente continuo de Optiprep. Los DRM en el gradiente son visibles como una banda opaca e indicados por una flecha. **b)** Se presenta la proteína total de las fracciones recuperadas, los valores representan el promedio de cuatro experimentos independientes. **c)** Las fracciones recolectadas fueron analizadas por Western usando anticuerpos específicos contra HflC-HA. F1-F11 representan el número de la fracción recogida de arriba a abajo del gradiente.

7.4 Análisis de la ultraestructura de MI y DRM

Los DRM obtenidos se inspeccionaron por microscopía electrónica de transmisión (Fig. 8). Las imágenes ultraestructurales revelaron la presencia de vesículas de membrana de diámetro variable en preparaciones de MI y DRM obtenidas en la relación detergente/proteína 6:1. Por otro lado, se observó una organización de los lípidos similar a una estructura pentalaminar con diferentes longitudes, que aparecen en los DRM de *E. coli* con las proporciones detergente/proteína de 7:1 a 9:1; de manera similar a lo reportado en DRM eucariontes (Carmona-Salazar *et al.*, 2011; Mongrand *et al.*, 2004; Moscatelli *et al.*, 2015; Peskan *et al.*, 2000). Si bien la ultraestructura similar no es un parámetro absoluto para confirmar la presencia de microdominios, estos resultados sugieren fuertemente la presencia de estas estructuras en bacterias como *E. coli*. Por otro lado, la cantidad de estas estructuras de fibra disminuye en proporciones superiores a 9:1 y desaparecen completamente en una relación de 11: 1 (Fig. 8), donde no se observaron estructuras lipídicas evidentes, lo que sugiere que la MI ha sido completamente solubilizada, reafirmando que la relación óptima de detergente/proteína para la obtención de DRM es por debajo de la relación 9:1.

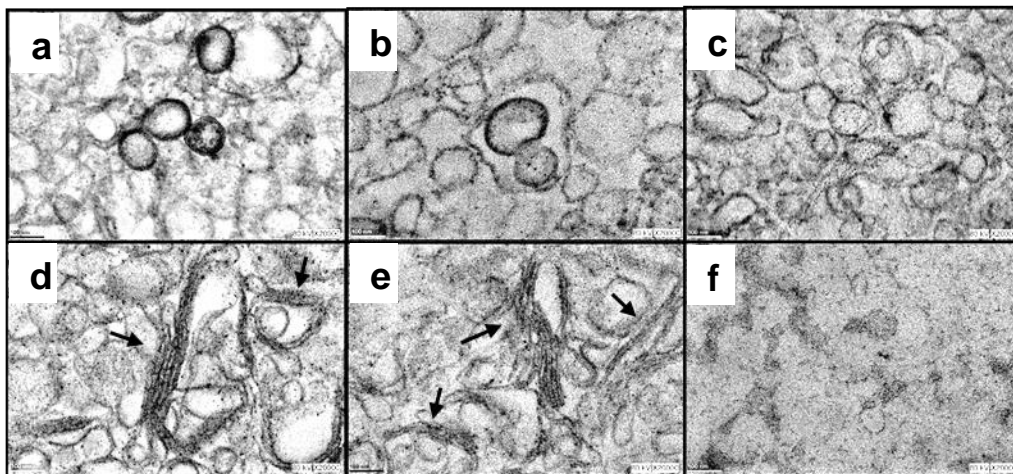


Figura 8. Microscopía electrónica de transmisión (TEM) de **a)** MI y en preparaciones de DRM obtenidas bajo diferentes relaciones detergente/proteína membranar **b)** 6:1, **c)** 7:1, **d)** 8:1, **e)** 9:1 y **f)** 11:1. Flechas muestran organización de los lípidos similar a una estructura pentalaminar.

7.5 Identificación y ubicación subcelular de proteínas asociadas a DRM de *E. coli*

Se realizó un análisis proteómico a través de cromatografía líquida acoplada a espectrómetros de masa en tándem (LC-MS/MS) de muestras de membrana (MI) y DRM obtenidas previamente. Realizamos un análisis libre de gel por escopetazo (“*shotgun*”) para identificar las proteínas contenidas en las preparaciones. Se obtuvieron un total de 42,502 espectros por análisis de MS/MS de las muestras de membrana (16,170 espectros) y dos réplicas biológicas independientes de fracciones enriquecidas en DRM (14,002 y 12,330 espectros, respectivamente). Las proteínas se identificaron positivamente cuando la probabilidad de ProteinProphet era ≥ 0.99 y se asignaron al menos tres péptidos únicos, lo que dio como resultado la identificación de un total de 712 proteínas.

Las proteínas identificadas se clasificaron según la localización subcelular utilizando la base de datos Uniprot. Cabe destacar, que según la localización subcelular de las proteínas identificadas éstas no corresponden exclusivamente a MI. De las 712 proteínas, 405 fueron proteínas de MI (56.88%), 81 proteínas citosólicas (11.38%), 39 fueron proteínas de ME (5.48%), 36 proteínas periplásmicas (5.06%) y 151 proteínas sin datos de localización (21.21%) (Fig. 9a). La abundancia relativa por conteo espectral revela que la proporción según la ubicación subcelular de las proteínas identificadas difieren entre las muestras de membrana y DRM (Fig. 9b-d). La muestra de membrana tiene un enriquecimiento relativo de 61.1% de proteínas correspondientes a MI, mientras que la muestra de DRM tiene un 66.11%. Por otro lado, las proteínas de ME tienen un enriquecimiento relativo de 5.21% y 23.93% en muestras de membrana y DRM respectivamente. Es notable mencionar que en las preparaciones de DRM las proteínas de ME aumentaron 5 veces, posiblemente debido a la resistencia intrínseca a detergentes de componentes de OM, por lo que es probable que aún existan restos de ME en nuestras preparaciones a pesar de no poder detectarlas previamente en los ensayos de Western blot contra OmpC. Además, las proteínas citosólicas tienen un enriquecimiento de 9.5% y 1.44% en muestras de membrana y DRM respectivamente. Es decir, disminuyó la abundancia

relativa aproximadamente 6 veces en preparaciones DRM en comparación con la muestra de membrana, posiblemente debido a que algunas proteínas citosólicas asociadas con la membrana interna tienen una interacción débil y se pierden cuando la membrana se solubiliza. Por otro lado, 20% de las proteínas identificadas en el análisis proteómico no poseen datos de ubicación subcelular, por lo que el porcentaje real de abundancia relativa según la ubicación celular podría variar. Los siguientes análisis que se mencionan en el texto, sólo se realizaron en proteínas asignadas a MI. Debido a que como mencionamos anteriormente, las proteínas con dominios SPFH en *E. coli* están ubicadas en la MI lo que sugiere que los microdominios asociados también deberían de estar contenidos en esta ubicación subcelular.

Para determinar el perfil de resistencia a la solubilización por Tritón X-100 de los complejos de lípido-proteína asociadas a la membrana, calculamos la diferencia de los recuentos espectrales de cada proteína obtenidas de las muestras de membrana y DRM. La diferencia se hizo restando los recuentos espectrales obtenidos de las muestras DRM menos los recuentos obtenidos de la muestra de membrana. Si la diferencia es positiva, los lípidos que contienen a la proteína tienen un perfil de resistencia a la solubilización alto. Por lo tanto, mientras mayor es la diferencia, la posibilidad de que la proteína que está asociada a esos lípidos resida dentro de los microdominios es alta. Por otro lado, si la diferencia es negativa, sugiere que los lípidos asociados a la proteína son sensibles al tratamiento por detergentes y, por lo tanto, es menos posible que la proteína forme parte del microdominio. Un corte de al menos 10 espectros de diferencia positiva se utilizó para identificar complejos lípido-proteína como candidatos potenciales para determinar que la proteína está contenida dentro de los microdominios; esto nos permitió identificar 79 proteínas con los criterios anteriores.

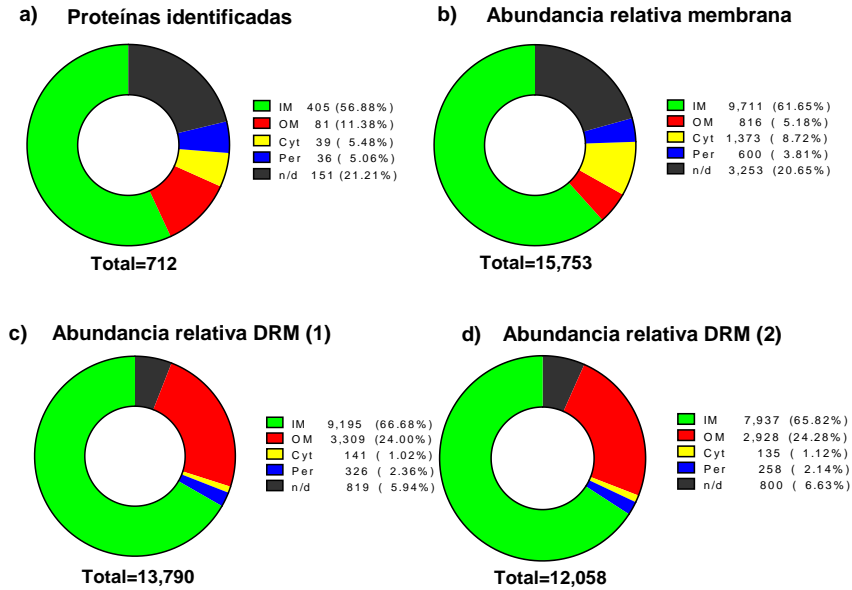


Figura 9. Distribución de proteínas identificadas según su ubicación subcelular de: **a)** proteínas identificadas en muestras de membrana y DRM. **b)** Abundancia relativa de los recuentos espectrales de la muestra de MI. **c y d)** Abundancia relativa de recuentos espectrales DRM aislada a una relación de solubilidad de detergente/proteína (p/p) 8: 1 de dos réplicas biológicas. **IM:** membrana interna, **OM:** membrana externa, **C:** citoplasma, **Per:** periplasma, **n/d:** sin datos.

Es importante mencionar que existe una diferencia sustancial entre los perfiles de resistencia a detergentes de las proteínas evaluadas. Por ejemplo, mientras que AtpD un componente del complejo ATP sintasa tiene un perfil de resistencia bajo (-380), CyoA que es parte del citocromo b_o mantiene un perfil alto (+112) aumentando 4 veces en la fracción de DRM en comparación con la muestra MI. Lo que sugiere que los componentes que forman parte de un mismo proceso fisiológico pueden estar contenidos en las balsas lipídicas (Oxidasa terminal), mientras que otros pueden estar fuera de ellas (ATPasas). Sin embargo, el recuento espectral de algunas proteínas es bajo <10 en ambas muestras (MI y DRM), lo que dificulta la interpretación de su perfil de resistencia. Por lo tanto, algunas proteínas que han sido descartadas usando los criterios anteriores, podrían estar dentro de los microdominios de membrana. El aislamiento por DRM tiene otra desventaja, es que la interacción de algunas proteínas asociadas al microdominio puede ser tan débil

(Simons & Toomre, 2000), que se solubilizan fácilmente y no sean detectables con el uso de esta técnica.

7.6 Análisis por función de proteína

Las 79 proteínas candidatas para formar parte de los microdominios de membrana se pueden clasificar en 7 grupos de acuerdo con el proceso fisiológico asociado. Se encontraron 24 proteínas relacionadas con procesos de transporte de membrana (Tabla 3). Por ejemplo, AcrB (+123) y AcrA (+88) que forman parte de un sistema de bombeo de diversas drogas el cual es inducido por estrés, tienen un perfil alto de resistencia a detergentes. Ensayos por microscopía de fluorescencia han reportado que el complejo AcrAB/TolC se localiza en puntos delimitados en la membrana en presencia de TolC, sin embargo, si se elimina TolC, AcrB pierde su localización y presenta difusión lateral a lo largo de la membrana (Ma *et al.*, 1995). Cabe destacar que en nuestros resultados se encontró que TolC (proteína de ME) también se encuentra enriquecida en preparaciones de DRM. Por otro lado, la focalización de AcrB disminuye con niveles altos de AcrD sugiriendo que este sistema puede regularse dinámicamente en respuesta a estímulos externos (Yamamoto *et al.*, 2016). Por otro lado, se ha descrito que en células eucariontes el movimiento dinámico del transportador multidroga P-glicoproteína (Pgp) a microdominios de membrana ricos en colesterol podría regular las funciones de la proteína (Sharom, 2014). Lo que sugiere que el complejo AcrA/B también podría estar dentro de microdominios en *E. coli*. Además, la proteína MsbA que pertenece a una familia de transportadores dependientes de ATP (ABC) implicados en la translocación de lipopolisacáridos a través de la MI (Zhou *et al.*, 1998) también se detectó en nuestra preparación DRM, y tiene un perfil alto de resistencia a la solubilización (+29). MsbA de *E. coli* tiene una gran similitud con la familia de proteínas resistentes a múltiples drogas (MDR) de mamíferos (Karow & Georgopoulos, 1993) y se ha reportado en eucariontes que las proteínas MDR están asociadas a balsas lipídicas y que su modulación espacio-temporal en la membrana puede regular la resistencia a múltiples fármacos (Yun *et al.*, 2013), por lo que es

posible esperar un comportamiento similar en MsbA y otros transportadores de tipo ABC en *E. coli*.

Tabla 3. Transportadores (24 proteínas)

Proteína	Acceso Uniprot	MI	DRM (1)	DRM (2)	Dif. \bar{X}	Rel. \bar{X}	TM	SP	LM	IPM
AcrB	ACRB_ECOLI	68	221	161	123	2.81	12	No	No	Si
AcrA	ACRA_ECOLI	132	243	196	88	1.66	0	Si	Si (P)	No
MtlA	PTM3C_ECOLI	70	196	126	91	2.30	7	No	No	Si
KgtP	KGTP_ECOLI	9	38	42	31	4.44	12	No	Si (P)	Si
PqiB	PQIB_ECOLI	21	56	47	31	2.45	1	No	No	Si
MsbA	MSBA_ECOLI	38	73	61	29	1.76	6	No	No	No
YecC	YECC_ECOLI	4	33	32	29	8.13	0	No	No	No
PtsG	PTGCB_ECOLI	46	93	56	29	1.62	10	No	Si (P)	Si
CorA	CORA_ECOLI	37	73	49	24	1.65	2	No	No	Si
NarK	NARK_ECOLI	11	37	32	24	3.14	12	No	No	No
MdtE	MDTE_ECOLI	41	56	72	23	1.56	0	Si	Si (P)	No
SrlE	PTHB_ECOLI	4	29	16	19	5.63	5	No	Si (M, P)	Si
NagE	PTW3C_ECOLI	58	88	64	18	1.31	12	No	No	Si
GadC	GADC_ECOLI	11	25	28	16	2.41	12	No	No	Si
MetQ	METQ_ECOLI	125	144	136	15	1.12	0	Si	No	No
GlpT	GLPT_ECOLI	35	47	50	14	1.39	12	No	Si (P)	No
NlpA	NLPA_ECOLI	12	24	26	13	2.08	0	Si	No	No
AcrD	ACRD_ECOLI	4	15	17	12	4.00	12	No	No	No
MacA	MACA_ECOLI	10	24	19	12	2.15	1	No	No	Si
YbaL	YBAL_ECOLI	7	18	19	12	2.64	13	No	No	Si
SdaC	SDAC_ECOLI	14	30	20	11	1.79	11	No	No	No
ProP	PROP_ECOLI	24	35	35	11	1.46	12	No	No	Si
CstA	CSTA_ECOLI	3	16	12	11	4.67	16	No	No	No
PitA	PITA_ECOLI	13	24	23	11	1.81	10	No	Si	Si

MI, muestra membrana interna; **DRM**, muestras DRM obtenidas con una relación 8:1 detergente/proteína (El número del replicado biológico está mostrado entre paréntesis), tanto en MI como DRM se muestra el conteo espectral de los péptidos identificados para cada proteína. **Dif. \bar{X}** , diferencia promedio obtenida de las cuentas espectrales de DRM menos MI (DRM-MI) para cada proteína; **Rel. \bar{X}** , cociente promedio obtenido de las cuentas espectrales de DRM entre MI (DRM/MI); **TM**, Dominios Transmembrana y; **SP**, péptido señal (signal peptide) usando la predicción del servidor TOPCONS; **LM**, Modificación lipídicas de proteínas: **(P)** Palmitoilación, **(M)** Miristoilación, **(F)** Farnesilación y **(G)** Geranilgeranilación predichas empleando el programa GPS-Lipid; **IPM**, predicción de anclajes de membranas anfipáticas (amphipathic in-plane membrane anchors) realizados con la herramienta Amphipaseek del servidor NPS@.

Para la generación de energía, se detectaron 15 proteínas con alta resistencia a la solubilización (Tabla 4). Contrariamente a lo informado en células eucariontes, en las cuales se ha observado que las cadenas respiratorias de óxido/reducción y los complejos de ATP sintasa están localizados dentro de balsas lipídicas (Kim *et al.*, 2006), algunos complejos de *E. coli* implicados en metabolismo y biosíntesis de energía se encuentran enriquecidos sólo en la fracción de DRM. Por ejemplo, mientras que el complejo nitrato reductasa A (*narGHI*), una reductasa terminal involucrada en las rutas de transporte de electrones durante el crecimiento anaeróbico en presencia de nitrato (Unden & Bongaerts, 1997) y otras oxidasas terminales como citocromo *b_o* (*cyoABCD*) y *bd* (*cydABCD*) se encuentran enriquecidos en muestras DRM: NarH (+58), NarG (+52), CyoA (+112), CyoB (+22), CyoC (+11), CydA (+35), CydB (+12), CydC (+9) y CydD (+8). Por otro lado, el enriquecimiento de otros complejos como NADH quinona oxidorreductasa no es fácilmente apreciable, NuoJ (+4), NuoA (+3), NuoM (+3), NuoH (+3), NuoN (-1), NuoL (-1), NuoB (-14), NuoI (-26) en DRM. Mientras que el complejo ATPasa, presenta una disminución considerable de sus componentes, AtpA (-144), AtpB (-21), AtpC (-1), AtpD (-371), AtpF (-89), AtpG (-50), AtpH (-108). Es importante mencionar que los componentes de la ATPasa se identificaron en los DRM, sin embargo, existe una diferencia notable si se comparan con los conteos espectrales de la muestra de membrana. Esto sugiere que, aunque algunas proteínas sean abundantes en la muestra de DRM, no necesariamente están dentro de las balsas lipídicas debido a que su asociación es débil y susceptible de ser solubilizada.

Tabla 4. Generación de energía (15 proteínas)

Proteína	Acceso Uniprot	MI	DRM (1)	DRM (2)	Dif. \bar{X}	Rel. \bar{X}	TM	SP	LM	IPM
CyoA	CYOA_ECOLI	36	200	96	112	4.11	2	Si	No	No
PntB	PNTB_ECOLI	25	115	88	77	4.06	9	No	Si (P)	Si
PntA	PNTA_ECOLI	145	244	172	63	1.43	5	No	Si (P)	No
NarH	NARH_ECOLI	120	163	193	58	1.48	0	No	Si (P)	Si
NarG	NARG_ECOLI	313	386	344	52	1.17	0	No	No	Si
CydA	CYDA_ECOLI	108	141	145	35	1.32	9	No	Si (P)	Si
HybC	MBHM_ECOLI	107	140	141	34	1.31	0	No	Si (P)	Si
CyoB	CYOB_ECOLI	23	58	31	22	1.93	15	No	Si (P)	Si
HybO	MBHT_ECOLI	44	74	56	21	1.48	1	Si	Si (P)	No
NarY	NARY_ECOLI	6	24	24	18	4.00	0	No	Si (P)	No
DsbD	DSBD_ECOLI	8	26	23	17	3.06	8	Si	Si (P)	Si
RsxG	RSXG_ECOLI	4	23	10	13	4.13	0	Si	Si (P, F)	No
CcmA	CCMA_ECOLI	3	19	10	12	4.83	0	No	Si (M)	No
CydB	CYDB_ECOLI	9	21	20	12	2.28	9	No	Si (P)	Si
CyoC	CYOC_ECOLI	2	10	15	11	6.25	5	No	No	Si

MI, muestra membrana interna; **DRM**, muestras DRM obtenidas con una relación 8:1 detergente/proteína (El número del replicado biológico está mostrado entre paréntesis), tanto en MI como DRM se muestra el conteo espectral de los péptidos identificados para cada proteína. **Dif. \bar{X}** , diferencia promedio obtenida de las cuentas espectrales de DRM menos MI (DRM-MI) para cada proteína; **Rel. \bar{X}** , cociente promedio obtenido de las cuentas espectrales de DRM entre MI (DRM/MI); **TM**, Dominios Transmembrana y; **SP**, péptido señal (signal peptide) usando la predicción del servidor TOPCONS; **LM**, Modificación lipídicas de proteínas: **(P)** Palmitoilación, **(M)** Miristoilación y **(F)** Farnesilación predichas empleando el programa GPS-Lipid; **IPM**, predicción de anclajes de membranas anfipáticas (amphipathic in-plane membrane anchors) realizados con la herramienta Amphipaseek del servidor NPS@.

Algunas proteínas enriquecidas en las preparaciones de DRM están involucradas en la organización de los componentes membranales y metabolismo lipídico. Tal es el caso de los transportadores tipo ABC que participan en el transporte y distribución de lípidos en la membrana. De manera interesante existen reportes de que éstas proteínas pueden ser moduladas dependiendo del entorno lipídico en el que residen

(Aye *et al.*, 2009). En nuestras preparaciones detectamos 3 proteínas enriquecidas relacionadas con el mantenimiento de lípidos y lipopolisacáridos (LPS) (Tabla 5), incluido MlaD (+49), un transportador ABC que parece estar involucrado en mantener la asimetría de lípidos entre la hoja interna y externa de la MI en *E. coli* (Malinverni & Silhavy, 2009). Es notable observar que varios transportadores ABC se encuentran en balsas lipídicas eucariontes, regulando su ubicación y actividad bajo diferentes estímulos (Klappe *et al.*, 2009).

Tabla 5. Metabolismo y modificación de lípidos (3 proteínas)

Proteína	Acceso Uniprot	MI	DRM (1)	DRM (2)	Dif. \bar{X}	Rel. \bar{X}	TM	SP	LM	IPM
MlaD	MLAD_ECOLI	70	133	104	49	1.69	1	No	No	No
EptC	EPTC_ECOLI	25	57	59	33	2.32	5	No	No	Si
YfhM	YFHM_ECOLI	35	60	75	33	1.93	0	Si	Si (P)	No

MI, muestra membrana interna; **DRM**, muestras DRM obtenidas con una relación 8:1 detergente/proteína (El número del replicado biológico está mostrado entre paréntesis), tanto en MI como DRM se muestra el conteo espectral de los péptidos identificados para cada proteína. **Dif. \bar{X}** , diferencia promedio obtenida de las cuentas espectrales de DRM menos MI (DRM-MI) para cada proteína; **Rel. \bar{X}** , cociente promedio obtenido de las cuentas espectrales de DRM entre MI (DRM/MI); **TM**, Dominios Transmembrana y; **SP**, péptido señal (signal peptide) usando la predicción del servidor TOPCONS; **LM**, Modificación lipídicas de proteínas: **(P)** Palmitoilación, predichas empleando el programa GPS-Lipid; **IPM**, predicción de anclajes de membranas anfipáticas (amphipathic in-plane membrane anchors) realizados con la herramienta Amphipaseek del servidor NPS@.

Seis proteínas relacionadas con la respuesta a estímulos (Tabla 6) aumentaron en nuestro análisis, incluidas tres de las cuatro proteínas con dominios SPFH en *E. coli*: HflK (+56), HflC (+42) y QmcA (+14), debido a que generalmente se utilizan como marcadores de balsas lipídicas en sus contrapartes eucariontes, es de esperarse el enriquecimiento de estas proteínas y refleja que el análisis empleando el perfil de resistencia a los detergentes podría proporcionar datos valiosos para predecir las proteínas asociadas a microdominios de membrana. Además, otras proteínas como el activador transcripcional CadC (+16) y el sensor quinasa CusS (+10) están enriquecidas en fracciones DRM, de manera similar, las balsas lipídicas

en células eucariontes parecen estar implicadas en la orquestación de diversos procesos relacionados con la transducción de señales (Allen *et al.*, 2007; Brown, 2006). **Tabla 6. Respuesta a estímulos (6 proteínas)**

Proteína	Acceso Uniprot	MI	DRM (1)	DRM (2)	Dif. \bar{X}	Rel. \bar{X}	TM	SP	LM	IPM
HflK	HFLK_ECOLI	40	108	83	56	2.39	1	No	Si (M)	Si
HflC	HFLC_ECOLI	80	132	112	42	1.53	1	No	No	Si
BorD	BORD_ECOLI	4	41	23	28	8.00	0	Si	Si (P, F, G)	No
CadC	CADC_ECOLI	2	23	13	16	9.00	1	No	No	Si
QmcA	QMCA_ECOLI	8	23	21	14	2.75	1	No	No	Si
CusS	CUSS_ECOLI	5	15	14	10	2.90	2	No	No	Si

MI, muestra membrana interna; **DRM**, muestras DRM obtenidas con una relación 8:1 detergente/proteína (El número del replicado biológico está mostrado entre paréntesis), tanto en MI como DRM se muestra el conteo espectral de los péptidos identificados para cada proteína. **Dif. \bar{X}** , diferencia promedio obtenida de las cuentas espectrales de DRM menos MI (DRM-MI) para cada proteína; **Rel. \bar{X}** , cociente promedio obtenido de las cuentas espectrales de DRM entre MI (DRM/MI); **TM**, Dominios Transmembrana y; **SP**, péptido señal (signal peptide) usando la predicción del servidor TOPCONS; **LM**, Modificación lipídicas de proteínas: **(P)** Palmitoilación, **(M)** Miristoilación, **(F)** Farnesilación y **(G)** Geranilgeranilación predichas empleando el programa GPS-Lipid; **IPM**, predicción de anclajes de membranas anfipáticas (amphipathic in-plane membrane anchors) realizados con la herramienta Amphipaseek del servidor NPS@.

Se identificaron 16 proteínas involucradas en el mantenimiento de las células y la división celular (Tabla 7). En *E. coli*, la división celular involucra al menos 20 proteínas que se localizan en la mitad de la célula formando una estructura llamada anillo septal (Ryan-Arends *et al.*, 2010). En nuestro análisis encontramos algunas proteínas de división celular no esenciales como: DamX (+73), TolQ (+11) y TolR (+11); así como proteínas esenciales FtsI (+42), MrdA (+26), FtsN (+21) y FtsQ (+15). Es notable la identificación de RodZ (+10) una proteína requerida para el ensamblaje del citoesqueleto de actina MreB que controla la síntesis de la pared celular y la forma de la célula (Karow & Georgopoulos, 1993). MreB es una proteína homóloga a la actina de eucariontes que organiza estructuras filamentosas que se

enrollan alrededor de la célula en forma de bastón, de manera similar al citoesqueleto de actina de las equivalentes eucarióticas (Shih *et al.*, 2005). Curiosamente, RodZ posee dos dominios: el dominio HTH que media la interacción con MreB y el dominio yuxta-membrana (JM) que está en contacto cercano con los fosfolípidos de membrana que se encuentran cargados negativamente (Karow & Georgopoulos, 1993). Por lo tanto, el enriquecimiento de RodZ en los DRM sugiere la posible interacción con los componentes lipídicos de los microdominios de la membrana y que estos puedan funcionar como una plataforma de andamiaje.

Tabla 7. Mantenimiento celular (16 proteínas)

Proteína	Acceso Uniprot	MI	DRM (1)	DRM (2)	Dif. \bar{X}	Rel. \bar{X}	TM	SP	LM	IPM
DamX	DAMX_ECOLI	65	142	133	73	2.12	1	No	No	No
MscK	MSCK_ECOLI	50	116	99	58	2.15	11	Si	Si (P)	Si
FtsI	FTSI_ECOLI	33	91	59	42	2.27	1	No	Si (P)	No
MrcB	PBPB_ECOLI	32	75	60	36	2.11	1	No	No	Si
MrdA	MRDA_ECOLI	17	46	40	26	2.53	1	No	No	No
DegS	DEGS_ECOLI	23	47	44	23	1.98	0	Si	No	No
FtsN	FTSN_ECOLI	29	47	52	21	1.71	1	No	Si (P, F, G)	Si
WzzE	WZZE_ECOLI	17	39	36	21	2.21	2	No	Si (F, G)	Si
KdtA	KDTA_ECOLI	17	31	34	16	1.91	3	No	No	Si
LptG	LPTG_ECOLI	5	25	16	16	4.10	6	No	No	Si
FtsQ	FTSQ_ECOLI	17	35	28	15	1.85	1	No	No	No
LptC	LPTC_ECOLI	10	21	25	13	2.30	0	Si	No	No
DjlA	DJLA_ECOLI	12	28	18	11	1.92	2	No	Si (M)	Si
TolQ	TOLQ_ECOLI	29	38	42	11	1.38	3	No	No	Si
TolR	TOLR_ECOLI	8	22	15	11	2.31	1	No	Si (M)	No
RodZ	RODZ_ECOLI	22	34	29	10	1.43	1	No	Si (P)	Si

MI, muestra membrana interna; **DRM**, muestras DRM obtenidas con una relación 8:1 detergente/proteína (El número del replicado biológico está mostrado entre paréntesis), tanto en MI como DRM se muestra el conteo espectral de los péptidos identificados para cada proteína. **Dif. \bar{X}** ,

diferencia promedio obtenida de las cuentas espectrales de DRM menos MI (DRM-MI) para cada proteína; **Rel. \bar{X}** , cociente promedio obtenido de las cuentas espectrales de DRM entre MI (DRM/MI); **TM**, Dominios Transmembrana y; **SP**, péptido señal (signal peptide) usando la predicción del servidor TOPCONS; **LM**, Modificación lipídicas de proteínas: **(P)** Palmitoilación, **(M)** Miristoilación, **(F)** Farnesilación y **(G)** Geranilgeranilación predichas empleando el programa GPS-Lipid; **IPM**, predicción de anclajes de membranas anfipáticas (amphipathic in-plane membrane anchors) realizados con la herramienta Amphipaseek del servidor NPS@.

Para las proteínas relacionadas con los sistemas de secreción, encontramos 5 coincidencias (Tabla 8), es notable mencionar la identificación de varias proteínas relacionadas con el sistema de secreción Sec, que incluyen YajC (+79), YidC (+59), SegG (+14) y SecY (+12). De manera similar, hay informes de que las proteínas con el dominio SPFH en *B. subtilis* interactúan con las proteínas de la maquinaria de secreción de proteínas (vía Sec) y que la ausencia de proteínas del dominio SPFH la secreción de proteínas es afectada (Bach & Bramkamp, 2013). También se detectaron otras proteínas con función desconocida (10 proteínas, Tabla 9).

Tabla 8. Proteínas relacionadas con el sistema de secreción (15 proteínas)

Proteína	Acceso Uniprot	MI	DRM (1)	DRM (2)	Dif. \bar{X}	Rel. \bar{X}	TM	SP	LM	IPM
YajC	YAJC_ECOLI	207	300	271	79	1.38	1	No	No	No
YidC	YIDC_ECOLI	56	137	92	59	2.04	5	Si	No	Si
Lnt	LNT_ECOLI	9	45	37	32	4.56	8	No	No	Si
SecG	SECG_ECOLI	17	31	31	14	1.82	2	No	No	No
SecY	SECY_ECOLI	19	30	31	12	1.61	10	No	Si (P)	No

MI, muestra membrana interna; **DRM**, muestras DRM obtenidas con una relación 8:1 detergente/proteína (El número del replicado biológico está mostrado entre paréntesis), tanto en MI como DRM se muestra el conteo espectral de los péptidos identificados para cada proteína. **Dif. \bar{X}** , diferencia promedio obtenida de las cuentas espectrales de DRM menos MI (DRM-MI) para cada proteína; **Rel. \bar{X}** , cociente promedio obtenido de las cuentas espectrales de DRM entre MI (DRM/MI); **TM**, Dominios Transmembrana y; **SP**, péptido señal (signal peptide) usando la predicción del servidor TOPCONS; **LM**, Modificación lipídicas de proteínas: **(P)** Palmitoilación, predichas empleando el programa GPS-Lipid; **IPM**, predicción de anclajes de membranas anfipáticas (amphipathic in-plane membrane anchors) realizados con la herramienta Amphipaseek del servidor NPS@.

Tabla 9. Función desconocida (16 proteínas)

Proteína	Acceso Uniprot	MI	DRM (1)	DRM (2)	Dif. \bar{X}	Rel. \bar{X}	TM	SP	LM	IPM
YebT	YEBT_ECOLI	20	125	76	81	5.03	1	No	No	No
YejM	YEJM_ECOLI	24	63	52	34	2.40	5	No	No	Si
YrfF	IGAA_ECOLI	9	40	44	33	4.67	5	No	Si (P)	No
YhcB	YHCB_ECOLI	35	57	59	23	1.66	1	No	No	No
YbjP	YBJP_ECOLI	4	17	22	16	4.88	0	Si	Si (P)	No
YajG	YAJG_ECOLI	4	23	14	15	4.63	0	Si	Si (P)	Si
WzzB	WZZB_ECOLI	55	69	62	11	1.19	2	No	No	No
YtjB	SMP_ECOLI	6	18	14	10	2.67	1	Si	Si (P)	No
YnaI	YNAI_ECOLI	11	20	22	10	1.91	5	No	Si (P)	Si
YbjL	YBJL_ECOLI	4	19	9	10	3.50	11	No	No	Si

MI, muestra membrana interna; **DRM**, muestras DRM obtenidas con una relación 8:1 detergente/proteína (El número del replicado biológico está mostrado entre paréntesis), tanto en MI como DRM se muestra el conteo espectral de los péptidos identificados para cada proteína. **Dif. \bar{X}** , diferencia promedio obtenida de las cuentas espectrales de DRM menos MI (DRM-MI) para cada proteína; **Rel. \bar{X}** , cociente promedio obtenido de las cuentas espectrales de DRM entre MI (DRM/MI); **TM**, Dominios Transmembrana y; **SP**, péptido señal (signal peptide) usando la predicción del servidor TOPCONS; **LM**, Modificación lipídicas de proteínas: **(P)** Palmitoilación, **(M)** Miristoilación, **(F)** Farnesilación y **(G)** Geranilgeranilación predichas empleando el programa GPS-Lipid; **IPM**, predicción de anclajes de membranas anfipáticas (amphipathic in-plane membrane anchors) realizados con la herramienta Amphipaseek del servidor NPS@.

Las proteínas involucradas en las funciones celulares antes mencionadas también se han descrito en DRM de eucariontes y algunos procariontes (Allen *et al.*, 2007; Bramkamp & Lopez, 2015; Chamberlain *et al.*, 2001; López & Kolter, 2010; Simons & Toomre, 2000), lo que sugiere que los microdominios de *E. coli* también están enriquecidos en ciertas proteínas relacionadas en la transducción de señales, secreción de proteínas, señalización y procesos diversos de metabolismo.

Es notable que algunas proteínas enriquecidas en la fracción DRM no tienen segmentos transmembrana (TM). Sin embargo, estas proteínas podrían ser parte de un complejo anclado a la membrana o interactuar con los lípidos de la membrana. Es bien sabido que ciertos lípidos pueden interactuar con proteínas de membrana,

modulando su plegamiento, funciones y ubicación (Contreras *et al.*, 2011). Los estudios sugieren que algunas modificaciones lipídicas como la palmitoilación o la miristoilación, podrían estar involucradas en la inserción de proteínas en los microdominios de membrana, debido a la formación de sistemas de anclaje. Lo anterior, permite que la localización de la proteína sea energéticamente favorable en esa porción de la membrana (Aicart-Ramos *et al.*, 2011; Resh, 2013). Debido a ello, procedimos a realizar predicciones de sitios de acilación de las proteínas identificadas, encontrando 36 proteínas que poseen sitios altamente potenciales de ser acilados (Tablas 1-7). Sin embargo, no hay un patrón que indique si estas modificaciones postransduccionales son esenciales para su ubicación en microdominios. Por otro lado, se ha descrito que las proteínas asociadas a balsas lipídicas en eucariontes pueden estar anclada por una hélice anfipática insertada de forma paralela a la interfaz de la membrana, estos dominios son llamados anclajes de membrana en plano (IPM) (Madsen *et al.*, 2010; Min *et al.*, 2008; Sapay *et al.*, 2006). En nuestros datos, encontramos 38 proteínas con una puntuación alta para los sitios de anclajes de tipo IPM (Tablas 1-7).

7.7 Sistemas de dos componentes en DRM de *E. coli*

Si bien, el análisis proteómico reveló un perfil de resistencia a detergentes alto en la cinasa sensora CusS (+10), no fue posible detectar otra cinasa que tuviera un perfil alto, en las preparaciones fue posible identificar otras proteínas sensoras como DcuS (+7), PhoR (+3), YpdA (+2), EvgS (+2), EnvZ (+2), YedV (-1), NarQ (-3), CpxA (-5), BaeS (-5), BtsS (-5), GlrK (-6), PhoQ (-8), RscC (-13), BarA (-16), RstB (-20), NarX (-20), KdpD (-25) y ArcB (-64). Sin embargo, estas presentan un perfil de resistencia bajo y/o ambiguo (menores a 10), por lo que no es posible determinar con exactitud si podrían residir en los microdominios de *E. coli*. Adicionalmente, se realizaron ensayos de Western blot para localizar la condición ideal de solubilización para extraer algunas cinasas que son objeto de estudio en nuestro grupo de investigación. Los resultados muestran que BarA se encuentra en DRM en la condición 5:1 (detergente/proteína), mientras que en la condición 6:1 y 7:1 la mitad

del total de la proteína se encuentra tanto en las fracciones de DRM como soluble. Por otro lado, en la condición 8:1, parte de la proteína se encuentra en DRM pero gran parte del total se encuentra solubilizada, esto coincide con el perfil de resistencia previamente obtenido en el cual tenía un valor de -16. En el caso de ArcB, esta se encuentra en DRM en la condición 4:1, mientras que en la condición 5:1 se comienza a solubilizar y en la 6:1 se encuentra completamente solubilizada (Fig. 10), es notable remarcar que ArcB se solubiliza en relaciones detergente/proteína menores, lo cual coincide con su bajo perfil de resistencia a detergentes -60.

También, es importante mencionar que, si bien BarA no está enriquecida en preparaciones de DRM, aún es posible detectarla en menor cantidad en la condición 8:1. Lo anterior puede sugerir que no necesariamente la totalidad de BarA pudiera estar residiendo en microdominios al mismo tiempo, debido a la naturaleza dinámica de los microdominios, por lo que es posible que la proteína no sea requerida en las condiciones de crecimiento ensayadas. Debido a lo anterior, aún no podemos descartar que otros sistemas de transducción de señales se encuentren dentro de los microdominios de membrana usando otras condiciones de crecimiento.

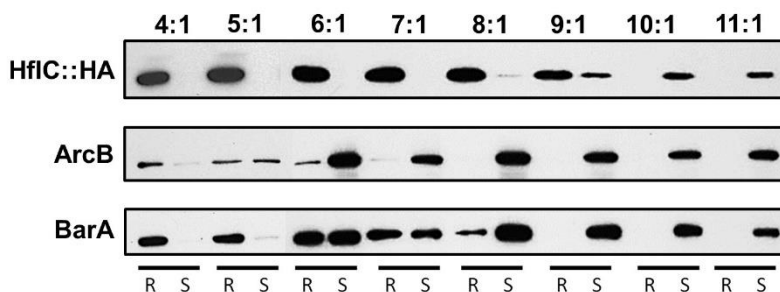


Figura 10. Detección de algunas cinasas sensoras en preparaciones de DRM. **R:** Fracción resistente a detergente, **S:** Fracción soluble.

7.8 Validación del análisis proteómico

Para validar los datos obtenidos del análisis proteómico anteriormente descritos, seleccionamos algunas proteínas que se enriquecieron en DRM: AcrA (+123), YidC (+59), HflC (+42), QmcA (+14); algunas proteínas que se perdieron en DRM: (-43), Aas (-33), así como una proteína ambigua GlnP (-2). Estas proteínas se fusionaron en C-terminal con una proteína fluorescente mCherry. Para HflC, QmcA y YidC, la fusión fue realizada en cromosoma, mientras que, para AcrA, Aas, GlnP y RbbA, el gen se clonó en el plásmido pACT3 bajo el control de un promotor inducible por L-arabinosa.

Se realizó microscopía de fluorescencia para determinar si las proteínas se encuentran focalizadas en puntos discretos en la membrana o se distribuyen homogéneamente a lo largo de la misma, indicando o no su posible asociación a microdominios de membrana. Los resultados mostraron que las proteínas con un alto perfil de resistencia al tratamiento de detergente: AcrA, YidC, HflC, QmcA (Fig. 11a-d, panel superior) se encuentran en focos discretos en la membrana. Mientras que los análisis por Western blot indicaron que la mayor parte de las proteínas pueden recuperarse en la forma de DRM (Fig. 11a-d panel inferior). Ambos resultados sugieren que las proteínas ensayadas podrían estar confinadas en microdominios de membrana. Por otro lado, las proteínas con un perfil bajo como Aas parecen encontrarse distribuidas en puntos focalizados en la membrana, sin embargo, en el Western blot la mayor parte de la proteína está solubilizada (Fig. 11f). Por otro lado, RbbA que se encuentra distribuida a lo largo de la membrana, además que es posible recuperarla sólo en las fracciones solubles (Fig. 11g). Esto sugiere que Aas y RbbA no forman parte de los microdominios de la membrana, coincidiendo con la predicción obtenida según el perfil de resistencia a detergentes. En el caso de GlnP (-2), esta se distribuyó homogéneamente en la membrana, sin embargo, en el Western blot fue posible apreciar cantidades similares de la proteína en las fracciones en DRM y solubles (Fig. 10e), aumentando la incertidumbre si esta proteína es parte de los microdominios de membrana. Por lo que, al encontrarse

cantidades similares en todas las fracciones obtenidas, no es posible determinar si GlnP forma parte de los microdominios usando la técnica de DRM.

Por lo tanto, la localización puntual de proteínas en la membrana celular no necesariamente implica un reclutamiento activo dentro de los microdominios de membrana debido a que estos son fácilmente solubilizados por detergente, sugiriendo que es posible que su interacción sea débil y transitoria, además pueden participar otros elementos de la bacteria como el citoesqueleto. Sin embargo, el análisis conjunto de microscopía de fluorescencia y el análisis de Western Blot de las fracciones DRM pueden proporcionar una mejor evidencia respecto a las proteínas que residen dentro de los microdominios de membrana. Debido a lo anterior, el perfil de resistencia a la solubilización que proponemos en este estudio puede permitir un mejor panorama general del contenido proteínico de los microdominios de membrana en *E. coli*.

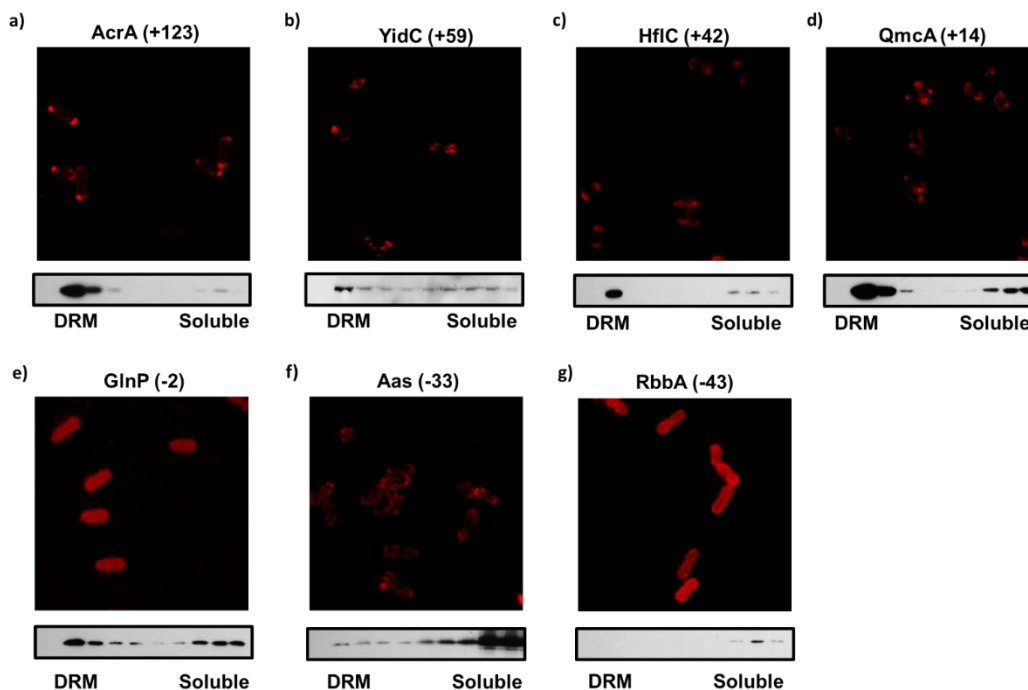


Figura 11. Validación del análisis proteómico de DRM de *E. coli*. La validación de las proteínas candidatas que pudieran residir dentro de los microdominios se llevó a cabo mediante microscopía de fluorescencia de las proteínas etiquetadas en C-terminal con mCherry (panel superior) y mediante el análisis por Western blot de las fracciones obtenidas al aislar DRM (panel inferior). Se ensayaron proteínas que presentaban un perfil alto de resistencia a detergentes: **a)** AcrA (+123), **b)** YidC (+59), **c)** HflC (+42) y **d)** QmcA (+14). Un perfil ambiguo: **e)** GlnP (-2). Y con perfil bajo: **f)** Aas (-33) y **g)** RbbA (-43).

8. CONCLUSIONES

- Los datos obtenidos demuestran que *E. coli* también posee microdominios de membrana de manera similar a los reportados en eucariontes y algunos procariontes.
- El perfil de solubilización es una herramienta útil para identificar posibles proteínas que residen dentro de los microdominios, aunque los resultados deben validarse por otra técnica.
- Se identificaron en preparaciones de DRM de *E. coli* algunas proteínas involucradas en procesos celulares (secreción de proteínas, transporte, generación de energía) con contenido similar a lo reportado en otros organismos.

9. PERSPECTIVAS

- Generar y analizar DRM de mutantes de genes que codifican proteínas con dominios SPFH.
- Determinar si las proteínas SPFH son indispensables para la formación y mantenimiento del microdominio.
- Analizar DRM aislados de bacterias expuestas a diferentes estímulos específicos, con el fin de determinar si las cinasas sensoras pueden reclutarse dentro de los microdominios de membrana según la molécula señal.
- Análisis de lípidos enriquecidos en las fracciones de DRM (en proceso).

10. ANEXOS

Tabla A1. Oligonucleótidos empleados en este trabajo

Oligonucleótidos	Secuencia
ompC-HA-Fw	5'-CACTGATAACATCGTAGCTCTGGGTCTGGTTTACCAG TTCTATCCGTATGATGTTTCCT-3'
ompC-HA-Rv	5'-AAAAAGGGCCCGCAGGCCCTTTGTTTCGATATCAATCG AGAGAATATCCTCCTTAGTTC-3'
ybbK-3xFLAG-Fw	5'-CGAGCTGGTGAAAGACAGCGCCAACAAACGGACTC AGCCAGACTACAAAGACCATGAC -3'
pKD-ybbK-Rv	5'-GCCAGAAAATATGTGGATGAACGACCATTA ACTCCAT CATATGAATATCCTCCTTAG-3'
pFluor-ybbK-Fw	5'-CGAGCTGGTGAAAGACAGCGCCAACAAACGGACTCA GCCAATGGTGAGCAAGGGCGAG-3'
yidC-Flou-Fw	5'-GGAAAAACGTGGCCTGCATAGCCGCGAGAAGAAAA ATCCATGGTGAGCAAGGGCGAG-3'
pKD-yidC-Rv	5'-GGTCAACTGACCGCCCTTATTTTAGCGAAA ACTCACC GAATATGAATATCCTCCTTAG- 3'
glnP-EcoR1-Fw	5'-CGGAATTCAGGAGGAACAACATATGCAGTTTGAC-3'
glnP-Sacl-Rv	5'-CGGAGCTCCAGGATTTTCATCCTTCTTTCC -3'
aas-NdeI-Fw	5'-GCCATATGCTTTTTAGCTTTTTTTCG-3'
aas-Sacl-Rv	5'-CGGAGCTCCTCATCGTGTTGTTCCGC-3'
acraA-NdeI-Fw	5'-GCCATATGAACAAAAACAGAGGG-3'
acrA-Sacl-Rw	5'-CGGAGCTCAGACTTGGACTGTTTCAGG-3
rbbA-NdeI-Fw	5'-GCCATATGACGCATCTGGAAC-3'
rbbA-Sacl-Rv	5'-CGGAGCTCTCCCTCCTGTTTTTTCAGCAG-3'
3xFLAG-Sacl-Fw	5'-GAGCTCGGACTACAAAGACCATG-3'
3xFLAG-HindIII-Rv	5'-GAAGCTTGGTCATTTTCGAACC-3'

11. REFERENCIAS

- Aicart-Ramos, C., Valero, R. A., & Rodriguez-Crespo, I. (2011, December). Protein palmitoylation and subcellular trafficking. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.07.009>
- Alfalah, M., Wetzel, G., Fischer, I., Busche, R., Sterchi, E. E., Zimmer, K.-P., ... Naim, H. Y. (2005). A Novel Type of Detergent-resistant Membranes May Contribute to an Early Protein Sorting Event in Epithelial Cells. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(52), 42636–42643. <https://doi.org/10.1074/JBC.M505924200>
- Allen, J. A., Halverson-Tamboli, R. A., & Rasenick, M. M. (2007). Lipid raft microdomains and neurotransmitter signalling. *Nature Reviews Neuroscience*. <https://doi.org/10.1038/nrn2059>
- An, D., Na, C., Bielawski, J., Hannun, Y. A., & Kasper, D. L. (2011). Membrane sphingolipids as essential molecular signals for *Bacteroides* survival in the intestine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108* Suppl 1(Supplement 1), 4666–4671. <https://doi.org/10.1073/pnas.1001501107>
- Aye, I. L. M. H., Singh, A. T., & Keelan, J. A. (2009). Transport of lipids by ABC proteins: Interactions and implications for cellular toxicity, viability and function. *Chemico-Biological Interactions*, *180*(3), 327–339. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2009.04.012>
- Babiychuk, E. B., & Draeger, A. (2006). Biochemical characterization of detergent-resistant membranes: a systematic approach. *The Biochemical Journal*, *397*(3), 407–416. <https://doi.org/10.1042/BJ20060056>
- Bach, J. N., & Bramkamp, M. (2013). Flotillins functionally organize the bacterial membrane. *Molecular Microbiology*, *88*(6), 1205–1217. <https://doi.org/10.1111/mmi.12252>
- Bernal, P., Muñoz-Rojas, J., Hurtado, A., Ramos, J. L., & Segura, A. (2007). A *Pseudomonas putida* cardiolipin synthesis mutant exhibits increased sensitivity to drugs related to transport functionality. *Environmental Microbiology*, *9*(5), 1135–1145. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01236.x>
- Borner, G. H. H., Sherrier, D. J., Weimar, T., Michaelson, L. V, Hawkins, N. D., Macaskill, A., ... Dupree, P. (2005). Analysis of detergent-resistant membranes in *Arabidopsis*. Evidence for plasma membrane lipid rafts. *Plant Physiology*, *137*(1), 104–116. <https://doi.org/10.1104/pp.104.053041>
- Bramkamp, M., & Lopez, D. (2015). Exploring the Existence of Lipid Rafts in Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *79*(1), 81–100.

<https://doi.org/10.1128/MMBR.00036-14>

- Browman, D. T., Hoegg, M. B., & Robbins, S. M. (2007, August). The SPFH domain-containing proteins: more than lipid raft markers. *Trends in Cell Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2007.06.005>
- Brown, D. A. (2006). Lipid Rafts, Detergent-Resistant Membranes, and Raft Targeting Signals. *Physiology*, 21(6), 430–439. <https://doi.org/10.1152/physiol.00032.2006>
- Brown, D. A., & London, E. (1998). Structure and origin of ordered lipid domains in biological membranes. *Journal of Membrane Biology*. <https://doi.org/10.1007/s002329900397>
- Brown, D. A., & Rose, J. K. (1992). Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell*, 68(3), 533–544. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90189-J](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90189-J)
- Carmona-Salazar, L., El Hafidi, M., Enríquez-Arredondo, C., Vázquez-Vázquez, C., González De La Vara, L. E., & Gavilanes-Ruiz, M. (2011). Isolation of detergent-resistant membranes from plant photosynthetic and non-photosynthetic tissues. *Analytical Biochemistry*, 417(2), 220–227. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2011.05.044>
- Chamberlain, L. H., Burgoyne, R. D., & Gould, G. W. (2001). SNARE proteins are highly enriched in lipid rafts in PC12 cells: Implications for the spatial control of exocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(10), 5619–5624. <https://doi.org/10.1073/pnas.091502398>
- Clejan, S., Krulwich, T. A., Mondrus, K. R., & Seto-Young, D. (1986). Membrane lipid composition of obligately and facultatively alkaliphilic strains of *Bacillus* spp. *Journal of Bacteriology*, 168(1), 334–340. <https://doi.org/10.1128/jb.168.1.334-340.1986>
- Contreras, F. X., Ernst, A. M., Wieland, F., & Brügger, B. (2011). Specificity of intramembrane protein-lipid interactions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(6), 1–18. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004705>
- Cronan, J. E. (2003). Bacterial Membrane Lipids: Where Do We Stand? *Annual Review of Microbiology*, 57(1), 203–224. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.57.030502.090851>
- Daley, D. O., Rapp, M., Granseth, E., Melén, K., Drew, D., & von Heijne, G. (2005). Global topology analysis of the *Escherichia coli* inner membrane proteome. *Science (New York, N.Y.)*, 308(5726), 1321–1323. <https://doi.org/10.1126/science.1109730>
- Datsenko, K. A., & Wanner, B. L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(12), 6640–

6645. <https://doi.org/10.1073/pnas.120163297>

Delaunay, J. L., Breton, M., Trugnan, G., & Maurice, M. (2008). Differential solubilization of inner plasma membrane leaflet components by Lubrol WX and Triton X-100. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1778(1), 105–112. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.09.017>

Deol, S. S., Bond, P. J., Domene, C., & Sansom, M. S. P. (2004). Lipid-protein interactions of integral membrane proteins: A comparative simulation study. *Biophysical Journal*, 87(6), 3737–3749. <https://doi.org/10.1529/biophysj.104.048397>

Fishov, I., & Woldringh, C. L. (1999). Visualization of membrane domains in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 32(6), 1166–1172. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01425.x>

Frye, L. D., & Edidin, M. (1970). The Rapid Intermixing of Cell Surface Antigens After Formation of Mouse-Human Heterokaryons. *Journal of Cell Science*, 7(2), 319–335. Retrieved from <http://jcs.biologists.org/content/7/2/319%5Cnhttp://jcs.biologists.org/content/7/2/319.full.pdf%5Cnhttp://jcs.biologists.org/content/7/2/319.short%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4098863>

Geiger, O., López-Lara, I. M., & Sohlenkamp, C. (2013, March 1). Phosphatidylcholine biosynthesis and function in bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2012.08.009>

Gilleland, H. E., & Lyle, R. D. (1979). Chemical alterations in cell envelopes of polymyxin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Journal of Bacteriology*, 138(3), 839–845. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6271731>

Hinderhofer, M., Walker, C. A., Friemel, A., Stuermer, C. A., Möller, H. M., & Reuter, A. (2009). Evolution of prokaryotic SPFH proteins. *BMC Evolutionary Biology*, 9(1), 10. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-9-10>

Kamio, Y., & Nikaido, H. (1976). Outer membrane of *Salmonella typhimurium*: accessibility of phospholipid head groups to phospholipase C and cyanogen bromide activated dextran in the external medium. *Biochemistry*, 15(12), 2561–2570. <https://doi.org/10.1021/bi00657a012>

Karow, M., & Georgopoulos, C. (1993). The essential *Escherichia coli* msbA gene, a multicopy suppressor of null mutations in the htrB gene, is related to the universally conserved family of ATP-dependent translocators. *Molecular Microbiology*, 7(1), 69–79. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb01098.x>

Kawai, F., Shoda, M., Harashima, R., Sadaie, Y., Hara, H., & Matsumoto, K. (2004). Cardiolipin Domains in *Bacillus subtilis* Marburg Membranes. *Journal*

- of Bacteriology*, 186(5), 1475–1483. <https://doi.org/10.1128/JB.186.5.1475-1483.2004>
- Kim, K.-B., Lee, J.-W., Lee, C. S., Kim, B.-W., Choo, H.-J., Jung, S.-Y., ... Ko, Y.-G. (2006). Oxidation-reduction respiratory chains and ATP synthase complex are localized in detergent-resistant lipid rafts. *Proteomics*, 6(8), 2444–2453. <https://doi.org/10.1002/pmic.200500574>
- Klappe, K., Hummel, I., Hoekstra, D., & Kok, J. W. (2009, October 1). Lipid dependence of ABC transporter localization and function. *Chemistry and Physics of Lipids*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2009.07.004>
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G., & Sonnhammer, E. L. . (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden markov model: application to complete genomes. *Journal of Molecular Biology*, 305(3), 567–580. <https://doi.org/10.1006/JMBI.2000.4315>
- LaRocca, T. J., Pathak, P., Chiantia, S., Toledo, A., Silviu, J. R., Benach, J. L., & London, E. (2013). Proving Lipid Rafts Exist: Membrane Domains in the Prokaryote *Borrelia burgdorferi* Have the Same Properties as Eukaryotic Lipid Rafts. *PLoS Pathogens*, 9(5), e1003353. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003353>
- Lee, A. G. (2003, May 2). Lipid-protein interactions in biological membranes: A structural perspective. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(03\)00056-7](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(03)00056-7)
- Lisanti, M. P., & Rodriguez-Boulan, E. (1990). Glycophospholipid membrane anchoring provides clues to the mechanism of protein sorting in polarized epithelial cells. *Trends in Biochemical Sciences*, 15(3), 113–118. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(90\)90195-H](https://doi.org/10.1016/0968-0004(90)90195-H)
- Lopez, D., & Koch, G. (2017). Exploring functional membrane microdomains in bacteria: an overview. *Current Opinion in Microbiology*, 36, 76. <https://doi.org/10.1016/J.MIB.2017.02.001>
- López, D., & Kolter, R. (2010). Functional microdomains in bacterial membranes. *Genes and Development*, 24(17), 1893–1902. <https://doi.org/10.1101/gad.1945010>
- Luirink, J., Yu, Z., Wagner, S., & de Gier, J.-W. (2012). Biogenesis of inner membrane proteins in *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1817(6), 965–976. <https://doi.org/10.1016/J.BBABIO.2011.12.006>
- Ma, D., Cook, D. N., Alberti, M., Pon, N. G., Nikaido, H., & Hearst, J. E. (1995). Genes *acrA* and *acrB* encode a stress-induced efflux system of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 16(1), 45–55. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7651136>

- Macdonald, J. L., & Pike, L. J. (2005). A simplified method for the preparation of detergent-free lipid rafts. *Journal of Lipid Research*, 46(5), 1061–1067. <https://doi.org/10.1194/jlr.D400041-JLR200>
- Madsen, K. L., Bhatia, V. K., Gether, U., & Stamou, D. (2010, May 3). BAR domains, amphipathic helices and membrane-anchored proteins use the same mechanism to sense membrane curvature. *FEBS Letters*. No longer published by Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.01.053>
- Magee, A. I., & Parmryd, I. (2003). Detergent-resistant membranes and the protein composition of lipid rafts. *Genome Biology*, 4(11), 234. <https://doi.org/10.1186/gb-2003-4-11-234>
- Malinverni, J. C., & Silhavy, T. J. (2009). An ABC transport system that maintains lipid asymmetry in the Gram-negative outer membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(19), 8009–8014. <https://doi.org/10.1073/pnas.0903229106>
- Maloney, E., Lun, S., Stankowska, D., Guo, H., Rajagoapalan, M., Bishai, W. R., & Madiraju, M. V. (2011). Alterations in phospholipid catabolism in Mycobacterium tuberculosis lysX mutant. *Frontiers in Microbiology*, 2(FEB), 19. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00019>
- Mazzone, A., Tietz, P., Jefferson, J., Pagano, R., & LaRusso, N. F. (2006). Isolation and characterization of lipid microdomains from apical and basolateral plasma membranes of rat hepatocytes. *Hepatology*, 43(2), 287–296. <https://doi.org/10.1002/hep.21039>
- Mielich-Süss, B., Wagner, R. M., Mietrach, N., Hertlein, T., Marincola, G., Ohlsen, K., ... Lopez, D. (2017). Flotillin scaffold activity contributes to type VII secretion system assembly in Staphylococcus aureus. *PLoS Pathogens*, 13(11), e1006728. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006728>
- Mileykovskaya, E., & Dowhan, W. (2000). Visualization of phospholipid domains in Escherichia coli by using the cardiolipin-specific fluorescent dye 10-N-nonyl acridine orange. *Journal of Bacteriology*, 182(4), 1172–1175. <https://doi.org/10.1128/JB.182.4.1172-1175.2000>
- Min, C.-K., Bang, S.-Y., Cho, B.-A., Choi, Y.-H., Yang, J.-S., Lee, S.-H., ... Cho, N.-H. (2008). Role of Amphipathic Helix of a Herpesviral Protein in Membrane Deformation and T Cell Receptor Downregulation. *PLoS Pathogens*, 4(11), e1000209. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000209>
- Mongrand, S., Morel, J., Laroche, J., Claverol, S., Carde, J. P., Hartmann, M. A., ... Bessoule, J. J. (2004). Lipid rafts in higher plant cells: Purification and characterization of triton X-100-insoluble microdomains from tobacco plasma membrane. *Journal of Biological Chemistry*, 279(35), 36277–36286. <https://doi.org/10.1074/jbc.M403440200>

- Moscatelli, A., Gagliardi, A., Maneta-Peyret, L., Bini, L., Stroppa, N., Onelli, E., ... Moreau, P. (2015). Characterisation of detergent-insoluble membranes in pollen tubes of *Nicotiana tabacum* (L.). *Biology Open*, 4(3), 378–399. <https://doi.org/10.1242/bio.201410249>
- Nebl, T., Pestonjamas, K. N., Leszyk, J. D., Crowley, J. L., Oh, S. W., & Luna, E. J. (2002). Proteomic analysis of a detergent-resistant membrane skeleton from neutrophil plasma membranes. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(45), 43399–43409. <https://doi.org/10.1074/jbc.M205386200>
- Neumann-Giesen, C., Falkenbach, B., Beicht, P., Claasen, S., Lüers, G., Stuermer, C. A. O., ... Tikkanen, R. (2004). Membrane and raft association of reggie-1/flotillin-2: role of myristoylation, palmitoylation and oligomerization and induction of filopodia by overexpression. *The Biochemical Journal*, 378(Pt 2), 509–518. <https://doi.org/10.1042/BJ20031100>
- Otto, G. P., & Nichols, B. J. (2011). The roles of flotillin microdomains - endocytosis and beyond. *Journal of Cell Science*, 124(23), 3933–3940. <https://doi.org/10.1242/jcs.092015>
- Papanastasiou, M., Orfanoudaki, G., Koukaki, M., Kountourakis, N., Sardis, M. F., Aivaliotis, M., ... Economou, A. (2013). The *Escherichia coli* peripheral inner membrane proteome. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP*, 12(3), 599–610. <https://doi.org/10.1074/mcp.M112.024711>
- Peskan, T., Westermann, M., & Oelmüller, R. (2000). Identification of low-density Triton X-100-insoluble plasma membrane microdomains in higher plants. *European Journal of Biochemistry*, 267(24), 6989–6995. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11106408>
- Pike, L. J. (2006). Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *Journal of Lipid Research*, 47(7), 1597–1598. <https://doi.org/10.1194/jlr.E600002-JLR200>
- Renner, L. D., & Weibel, D. B. (2011). Cardiolipin microdomains localize to negatively curved regions of *Escherichia coli* membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(15), 6264–6269. <https://doi.org/10.1073/pnas.1015757108>
- Resh, M. D. (2013). Covalent lipid modifications of proteins. *Current Biology*, 23(10), R431-5. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.04.024>
- Rothman, J. E., & Kennedy, E. P. (1977). Symmetrical distribution of phospholipids in the membrane of *Bacillus megaterium*. *Journal of Molecular Biology*, 110(3), 603–618. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(77\)80114-9](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(77)80114-9)
- Ryan Arends, S. J., Williams, K., Scott, R. J., Rolong, S., Popham, D. L., & Weiss, D. S. (2010). Discovery and characterization of three new *Escherichia coli* septal ring proteins that contain a SPOR domain: DamX, DedD, and RlpA.

- Journal of Bacteriology*, 192(1), 242–255. <https://doi.org/10.1128/JB.01244-09>
- Sapay, N., Guermeur, Y., & Deléage, G. (2006). Prediction of amphipathic in-plane membrane anchors in monotopic proteins using a SVM classifier. *BMC Bioinformatics*, 7, 255. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-255>
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012, July 1). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Schneider, J., Mielich-Süss, B., Böhme, R., & Lopez, D. (2015). In vivo characterization of the scaffold activity of flotillin on the membrane kinase KinC of *Bacillus subtilis*. *Microbiology*, 161(9), 1871–1887. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000137>
- Schuck, S., Honsho, M., Ekroos, K., Shevchenko, A., & Simons, K. (2003). Resistance of cell membranes to different detergents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(10), 5795–5800. <https://doi.org/10.1073/pnas.0631579100>
- Sharom, F. J. (2014). Complex Interplay between the P-Glycoprotein Multidrug Efflux Pump and the Membrane: Its Role in Modulating Protein Function. *Frontiers in Oncology*, 4, 41. <https://doi.org/10.3389/fonc.2014.00041>
- Shih, Y. L., Kawagishi, I., & Rothfield, L. (2005). The MreB and Min cytoskeletal-like systems play independent roles in prokaryotic polar differentiation. *Molecular Microbiology*, 58(4), 917–928. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04841.x>
- Silhavy, T. J., Kahne, D., & Walker, S. (2010). The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(5), a000414. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000414>
- Simons, K., & Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 387(6633), 569–572. <https://doi.org/10.1038/42408>
- Simons, K., & Toomre, D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 1(1), 31–39. <https://doi.org/10.1038/35036052>
- Simons, K., & Van Meer, G. (1988). Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry*, 27(17), 6197–6202. <https://doi.org/10.1021/bi00417a001>
- Simons, K., & Vaz, W. L. C. (2004). Model Systems, Lipid Rafts, and Cell Membranes. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 33(1), 269–295. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.32.110601.141803>
- Singer, S. J. J., & Nicolson, G. L. L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 175(4023), 720–731. <https://doi.org/10.1126/science.175.4023.720>

- Siontorou, C., Nikoleli, G.-P., Nikolelis, D., & Karapetis, S. (2017). Artificial Lipid Membranes: Past, Present, and Future. *Membranes*, 7(3), 38. <https://doi.org/10.3390/membranes7030038>
- Sohlenkamp, C., & Geiger, O. (2016, January 1). Bacterial membrane lipids: Diversity in structures and pathways. (F. Narberhaus, Ed.), *FEMS Microbiology Reviews*. Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv008>
- Solis, G. P., Hoegg, M., Munderloh, C., Schrock, Y., Malaga-Trillo, E., Rivera-Milla, E., & Stuermer, C. A. O. (2007). Reggie/flotillin proteins are organized into stable tetramers in membrane microdomains. *The Biochemical Journal*, 403(2), 313–322. <https://doi.org/10.1042/BJ20061686>
- Somani, V. K., Aggarwal, S., Singh, D., Prasad, T., & Bhatnagar, R. (2016). Identification of Novel Raft Marker Protein, FlotP in *Bacillus anthracis*. *Frontiers in Microbiology*, 7, 169. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00169>
- Stoops, E. H., & Caplan, M. J. (2014). Trafficking to the Apical and Basolateral Membranes in Polarized Epithelial Cells. *Journal of the American Society of Nephrology*, 25(7), 1375–1386. <https://doi.org/10.1681/ASN.2013080883>
- Tavernarakis, N., Driscoll, M., & Kyripides, N. C. (1999). The SPFH domain: implicated in regulating targeted protein turnover in stomatins and other membrane-associated proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, 24(11), 425–427. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(99\)01467-X](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(99)01467-X)
- Thein, M., Sauer, G., Paramasivam, N., Grin, I., & Linke, D. (2010). Efficient subfractionation of gram-negative bacteria for proteomics studies. *Journal of Proteome Research*, 9(12), 6135–6147. <https://doi.org/10.1021/pr1002438>
- Toledo, A., Pérez, A., Coleman, J. L., & Benach, J. L. (2015). The lipid raft proteome of *Borrelia burgdorferi*. *Proteomics*, 15(21), 3662–3675. <https://doi.org/10.1002/pmic.201500093>
- Uden, G., & Bongaerts, J. (1997). Alternative respiratory pathways of *Escherichia coli*: energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1320(3), 217–234. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9230919>
- Uzzau, S., Figueroa-Bossi, N., Rubino, S., & Bossi, L. (2001). Epitope tagging of chromosomal genes in *Salmonella*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(26), 15264–15269. <https://doi.org/10.1073/pnas.261348198>
- van Meer, G., Voelker, D. R., & Feigenson, G. W. (2008). Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(2), 112–124. <https://doi.org/10.1038/nrm2330>
- Williamson, R., Thompson, A. J., Abu, M., Hye, A., Usardi, A., Lynham, S., ...

- Hanger, D. P. (2010). Isolation of detergent resistant microdomains from cultured neurons: detergent dependent alterations in protein composition. *BMC Neuroscience*, 11, 120. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-11-120>
- Yamamoto, K., Tamai, R., Yamazaki, M., Inaba, T., Sowa, Y., & Kawagishi, I. (2016). Substrate-dependent dynamics of the multidrug efflux transporter AcrB of *Escherichia coli*. *Scientific Reports*, 6, 21909. <https://doi.org/10.1038/srep21909>
- Yun, U. J., Lee, J. H., Koo, K. H., Ye, S. K., Kim, S. Y., Lee, C. H., & Kim, Y. N. (2013). Lipid raft modulation by Rp1 reverses multidrug resistance via inactivating MDR-1 and Src inhibition. *Biochemical Pharmacology*, 85(10), 1441–1453. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.02.025>
- Zhou, Z., White, K. A., Polissi, A., Georgopoulos, C., & Raetz, C. R. H. (1998). Function of *Escherichia coli* MsbA, an essential ABC family transporter, in lipid A and phospholipid biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 273(20), 12466–12475. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.20.12466>