

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



TESIS DOCTORAL

**Nanodiscos como herramienta para estudiar interacciones entre
proteínas de división bacteriana.
Nanodiscs as a tool to study interactions between bacterial division
proteins**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Concepción García Montañés

Directores

Germán Rivas Caballero
Víctor M. Hernández Rocamora

Madrid, 2014

Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Ciencias Químicas

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



**Nanodiscos como herramienta para estudiar interacciones
entre proteínas de división bacteriana**

Nanodiscs as a tool to study interactions between bacterial division
proteins

Tesis Doctoral

Concepción García Montañés

Directores

Germán Rivas Caballero, Víctor M. Hernández Rocamora

**Centro de Investigaciones Biológicas- Consejo Superior de
Investigaciones Científicas**

Madrid 2014

A mi familia

Agradecimientos

Agradecimientos

Ahora que este camino llega a su fin son muchas las personas a las que quiero agradecer su esfuerzo y su dedicación en mi formación.

En primer lugar me gustaría dar las gracias a mis directores de tesis, Germán y Víctor, porque han creído en mí desde el primer momento y me han transmitido una fuerza sin la que nada de esto hubiera sido posible. Una mención aparte se merece Víctor, por su paciencia y saber hacer a la hora de transmitirme sus conocimientos y por su apoyo incondicional en todo momento.

A Silvia y Carlos por sus aportaciones fundamentales a esta tesis. A Elisa, Belén, Luque, Bego y Merce su ayuda en cualquier momento, sus explicaciones y por esos ratitos de distracción que vienen tan bien. A Cristina, por sus consejos y ánimos durante la escritura de la tesis.

A todo el personal tanto del laboratorio de Miguel Vicente como de los servicios técnicos del CIB que en algún momento me han ayudado en mis experimentos, sin su ayuda parte de mi trabajo no habría sido posible.

A las personas con las que he tenido el placer de colaborar profesionalmente y de las que he aprendido más y más sobre la ciencia.

A todos mis compañeros del laboratorio (Noelia, Marta, Ana, y Rubén), mi segunda familia, por su disponibilidad y por esos momentos que siempre recordaré con una sonrisa en los labios.

A nuestros vecinos cafeteros del CIB (Gonzalo, Albert, Mariano, Ruth y Jorge), por esos momentos de relax que han llenado de alegría cada mañana.

Finalmente, a mis padres, porque son los responsables de que haya llegado hasta aquí, por la educación que me han transmitido, por su tenacidad... gracias por todo. A mi hermano, mi amigo, el que siempre está ahí animándome y dándome fuerza para seguir adelante.

Y muy especialmente a mi marido, César, por su apoyo incondicional desde el primer segundo, por estar a mi lado en los buenos y en los malos momentos, por animarme y creer en mí.

¡Gracias!

Abreviaturas

Abreviaturas

BSA	Albúmina de suero bovino (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
C-terminal	Carboxilo terminal
D.O.	Densidad óptica
DLS	Dispersión de luz dinámica (<i>Dynamic light scattering</i>)
ECL	Extracto polar de lípidos de <i>E. coli</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EPC	L- α -fosfatidilcolina de huevo de gallina
FCCS	Espectroscopía de correlación cruzada de fluorescencia (<i>Fluorescence cross-correlation spectroscopy</i>)
FCS	Espectroscopía de correlación de fluorescencia (<i>Fluorescence correlation spectroscopy</i>)
FITC	Fluoresceína-5-isotiocianato (<i>Fluorescein-5-Isothiocyanate</i>)
FtsN	Mutante N sensible a la temperatura que forma filamentos (<i>Filamenting temperature-sensitive mutant N</i>)
FtsZ	Mutante Z sensible a la temperatura que forma filamentos (<i>Filamenting temperature-sensitive mutant Z</i>)
GDP, GTP	Guanosin 5' di-, tri-fosfato
GMPCPP	Guanosin-5'-[(α , β)-metileno]trifosfato
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
LB	Medio Luria-Bertani
MSP	Proteína de andamiaje (<i>Membrane Scaffold Protein</i>)
MSP1(-)	Proteína de andamiaje sin cola de histidinas
Nd	Nanodisco
Nd*	Nanodisco marcado con sonda fluorescente
N-terminal	Amino terminal
PBS	Tampón fosfato salino (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
POPC	1-palmitoil-2-oleil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfatidilcolina
rpm	Revoluciones por minuto
S ₁ ZipA	Fragmento soluble recombinante de His ₆ -ZipA que carece de la región de transmembrana N-terminal (ZipA Δ (1-25))
S ₂ ZipA	Fragmento soluble recombinante de His ₆ -ZipA que carece desde la región de transmembrana N-terminal hasta el dominio P/Q (ZipA Δ (1-188))
SDS	Dodecil sulfato sódico (<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SE	Equilibrio de sedimentación (<i>sedimentation equilibrium</i>)
SV	Velocidad de sedimentación (<i>sedimentation velocity</i>)
TEV	Proteasa del virus del mosaico del tabaco (<i>Tobacco Etch Virus</i>)
Tris-HCl	Tris(hidroximetil)aminometano
ZBD	Dominio de ZipA de interacción con FtsZ
ZipA	Proteína A que interacciona con FtsZ (<i>FtsZ interacting protein A</i>)

Índice

Agradecimientos.....	i
Abreviaturas	iii
Índice	v
English summary	x
Introducción.....	2
1. La división en <i>Escherichia coli</i>	2
2. El divisoma de <i>E. coli</i>	4
3. FtsZ.....	6
4. ZipA	9
5. FtsN	12
6. Reconstitución de proteínas de división en sistemas biomiméticos de membrana ..	16
7. Nanodiscos	18
7.1 Formación de nanodiscos	20
7.2 Proteínas de membrana: Ventajas e inconvenientes del uso de nanodiscos...	21
7.3 Ejemplos de proteínas reconstituidas en nanodiscos: metodología y técnicas	23
Objetivos.....	27
Materiales y Métodos.....	30
1. Listado de tampones.....	30
2. Purificación de proteínas	31
2.1 Purificación de MSP1D1.....	31
2.2 Purificación de FtsZ.....	31
2.3 Purificación de ZipA.....	31
2.4 Purificación de s1ZipA (ZipA Δ (1-25)) y s2ZipA (ZipA Δ (1-188))	31
2.5 Purificación de FtsN.....	31
2.6 Purificación de la proteasa TEV	32
3. Síntesis y preparación de los péptidos inhibidores de la interacción ZipA/FtsZ derivados del extremo C-terminal de FtsZ	33
4. Técnicas inmunológicas	34
4.1 Técnica de <i>western-blot</i>	34
4.2 Técnica de <i>dot-blot</i>	34
4.3 Purificación del suero anti-ZipA	35
4.4 Purificación de los complejos Nd-ZipA con los anticuerpos	35
5. Técnicas de proteínas	36

Índice

5.1 Cuantificación de proteínas	36
5.2 Determinación de cisteínas libres	37
5.3 Electroforesis en condiciones nativas (CN-PAGE)	37
5.4 Marcaje fluorescente de proteínas	38
5.5 Digestión de MSP1D1 con TEV	38
6. Formación de nanodiscos	39
6.1 Lípidos.....	39
6.2 Cuantificación de fosfolípidos.....	39
6.3 Nanodiscos vacíos	41
6.4 Reconstitución de ZipA en nanodiscos	42
6.5 Reconstitución de FtsN en nanodiscos	43
6.6 Marcaje fluorescente de nanodiscos.....	43
7. Técnicas biofísicas.....	43
7.1 Ultracentrifugación analítica.....	43
7.1.1 Velocidad de sedimentación.....	44
7.1.2 Equilibrio de sedimentación	46
7.2 Dispersión de luz dinámica (DLS)	47
7.3 Espectroscopía de correlación de la fluorescencia (FCS).....	49
7.4 Espectroscopía de correlación cruzada de la fluorescencia (FCCS).....	51
8. Modelos teóricos de unión de ZipA y FtsZ	52
9 Microscopía electrónica de transmisión	54
9.1 Reconstrucción de la estructura tridimensional de nanodiscos	55
Resultados	58
1. Caracterización biofísica de nanodiscos vacíos	58
1.1 Formación y purificación de nanodiscos vacíos.....	58
1.2 Cuantificación de fosfolípidos por nanodisco	61
1.3 Caracterización biofísica de nanodiscos vacíos	62
2. Nanodiscos con ZipA.....	67
2.1 Reconstitución y caracterización de ZipA en nanodiscos	67
2.1.1 Incorporación de una única copia de la proteína ZipA en nanodiscos formados por lípidos de E. coli	67
2.1.2 Visualización de los nanodiscos con ZipA mediante microscopía electrónica.....	71
2.1.3 Reconstrucción de la estructura tridimensional de Nd-ZipA.....	73

Índice

2.1.4 Detección de ZipA en Nd-ZipA mediante anticuerpos en imágenes de microscopía electrónica	75
2.2 Interacción de ZipA reconstituida en nanodiscos con FtsZ.....	76
2.2.1 Interacción de Nd-ZipA con FtsZ en presencia de GDP	76
2.2.2 Interacción de ZipA insertada en nanodiscos con polímeros de FtsZ en presencia de GTP o GMPCPP.....	79
2.2.3 Inhibición de la unión de Nd-ZipA a los polímeros de FtsZ mediante péptidos derivados del C-terminal de FtsZ.....	85
2.2.4 Visualización de los complejos Nd-ZipA/FtsZ mediante microscopía electrónica.....	87
3. Reconstitución de FtsN en nanodiscos	90
3.1 Purificación y caracterización de FtsN	90
3.2 Incorporación de FtsN a nanodiscos.....	94
Discusión.....	103
1. Caracterización biofísica de nanodiscos vacíos.....	103
2. Nanodiscos con ZipA.....	108
2.1 Reconstitución y caracterización de ZipA en nanodiscos	108
2.2 Interacción de ZipA reconstituida en nanodiscos con FtsZ.....	110
3. Reconstitución de FtsN en nanodiscos	113
Conclusiones.....	121
Publicaciones durante la tesis.....	125
Bibliografía.....	128

English summary

Introduction

English summary

Introduction

In *Escherichia coli*, cell division involves the assembly of a macromolecular complex, the divisome, formed by several proteins, 10 of them essential (Vicente et al. 2006). The nature of a large part of the divisome components is known, as it is their assembly pathway and some of the biochemical activities and protein-protein interactions involved (Harry et al. 2006, Vicente and Rico 2006). The elements of the divisome follow an assembly pathway in which both sequential and concerted stages are involved. Initially, three proteins, FtsZ, FtsA, and ZipA, assemble together, forming a proto-ring into which the other components are added (Vicente and Rico 2006). The Z-ring is highly dynamic, and its position is regulated by two negative control systems that inhibit ring formation at wrong places (Yu et al. 1999). Initial complex subsequently recruits the rest of division proteins (FtsK, FtsQ, FtsB, FtsL, FtsW, FtsI, FtsN), all of them membrane proteins (Adams et al. 2009).

FtsZ is a 40 kDa soluble GTPase homolog of eukaryotic tubulin, whose GTP-linked assembly-disassembly cycle is important for cell division (Erickson et al. 2010, Mingorance et al. 2010). FtsZ is anchored to the inner cell membrane by two proteins, ZipA and FtsA, thus forming the proto-ring complex, which initiates cell division. FtsA is more widely conserved than ZipA, though both protein are essential for cell division in *E. coli* and other gram negative bacteria (Geissler et al. 2003).

As most of the available knowledge on the interaction of cell division proteins has been derived from the behavior of mutants, in which one or more components of the divisome have been genetically modified or impaired, it becomes essential to corroborate the commonly accepted hypothesis using a bottom-up synthetic approach. Thus, in this thesis we have used an in vitro membrane model, nanodiscs, to study two membrane-attached division proteins, ZipA and FtsN. ZipA is a 36.4 kDa protein with a single, N-terminal transmembrane helix followed by a large, flexible domain and small C-terminal globular domain that binds to FtsZ in the cytoplasm (Ohashi et al. 2002). On the other hand, has a reversed topology, with small N-terminal unstructured and charged domain in the cytoplasm, followed by a single transmembrane domain, a large flexible domain and a small SPOR domain in the periplasmic that interacts with peptidoglycan (Dai et al. 1996). It has been reported that FtsN is able to interact with FtsA through its small charged cytoplasmic region, as well as with other late division proteins such as FtsQ and FtsI (Di Lallo et al. 2003, Karimova et al. 2005, Bertsche et al. 2006, D'Ulisse et al. 2007, Busiek et al. 2012).

Introduction

As stated above, both proteins were incorporated into nanodiscs, a membrane model consisting of a discoidal patch of lipid bilayer surrounded by two copies of a Membrane Scaffold Protein (MSP), an apoA-I analogue, which stabilize the membrane (Segrest et al. 1999). The whole structure is water-soluble, monodisperse, and has a diameter of 10 nm. Nanodiscs provide a topologically restricted environment to membrane proteins while remaining in solution, allowing the use of a broad arsenal of biochemical and biophysical tools to quantitatively characterize the embedded protein and its interactions (Nath et al. 2007).

The first part of this thesis describes the hydrodynamic characterization of nanodiscs by analytical ultracentrifugation (AUC) and dynamic light scattering (DLS), with the aim of serving as a reference for more complex experiments including a membrane protein in nanodiscs.

The second part, describes the incorporation of full-length ZipA into nanodiscs, the biophysical characterization of the structures by the AUC, DLS and fluorescence correlation spectroscopy (FCS), and the structural characterization by transmission electron microscopy (TEM). Finally, the interaction of ZipA nanodiscs with FtsZ, both in its oligomeric GDP-bound form and in its polymeric GTP-form, was quantitatively studied using AUC and FCS and FtsZ/nanodiscs complexes were visualized using TEM.

Finally, the third part describes the purification, characterization and incorporation of FtsN in nanodiscs, using the same techniques as described for ZipA.

Objectives

Objectives

The main objective of this thesis was to use and characterize the nanodisc system as support for the study of interactions between proteins of *E. coli* divisome. This included (1) the biophysical characterization of nanodiscs with biophysical techniques available in the laboratory for the analysis of interactions (AUC, DLS, TEM); (2), the reconstitution of ZipA in nanodiscs and the quantitative study of its interaction with FtsZ; and (3), the purification, reconstitution and characterization of FtsN in nanodiscs.

Results and discussion

Results and discussion

1. Biophysical characterization of empty nanodiscs

Empty nanodiscs were prepared using the MSP1D1 protein, which forms 10 nm diameter nanodiscs, and three different lipids: synthetic palmitoylcholine (POPC), egg phosphatidylcholine (EPC) and *E. coli* polar lipid extract (ECL). MSP1D1:lipid optimal ratio for the preparation of nanodiscs were optimized as 1:65 for both POPC and EPC and 1:60 for ECL, all of them resulting in the formation of 10 nm nanodiscs according to gel filtration chromatography.

The number of phospholipids per nanodisc, measured using either the Stewart method or the Fiske method, to estimate molecular weights. Interestingly, EPC nanodiscs had a lower amount of lipids per disc than POPC ones.

Values for diffusion coefficient and hydrodynamic radius, as measured using DLS, were similar for the three types of nanodiscs, but S-value, and measured by sedimentation velocity, and buoyant masses, as obtained by sedimentation equilibrium were different, indicating differences in hydrodynamic properties of the different lipids used. On the one hand, POPC and EPC nanodiscs had similar buoyant masses and S-values, both smaller than ECL nanodiscs buoyant mass and S-value, which resulted in ECL nanodiscs having a lower specific partial volume. This was attributed to the presence of negatively-charged lipids in ECL, with different surface hydration and counter-ion binding properties, which are important factors affecting specific partial volume. On the other hand, the specific partial volume of EPC and POPC nanodiscs was similar to the values reported for blood high-density lipoprotein (HDL) particles, as it was expected.

2. ZipA nanodiscs

2.1 Reconstitution and characterization of ZipA protein into nanodiscs

The complete ZipA protein, which contains a single transmembrane helix, was incorporated into 10 nm nanodiscs formed by ECL and MSP1D1. Sedimentation velocity demonstrated the purity and homogeneity of the preparations and sedimentation equilibrium indicated that purified Nd-ZipA contained a single molecule of ZipA per nanodisc. Characterization by DLS, gel filtration chromatography and FCS, indicated that ZipA nanodiscs (Nd-ZipA) had a 13 nm hydrodynamic diameter in contrast to the 10 nm diameter calculated for empty nanodiscs.

When Nd-ZipA were observed using TEM, they showed two different diameter populations of discs, one of 10-11 nm and other of 12-13 nm. The images of the particles of 10-11 nm were very similar to those obtained in the case of empty nanodiscs, while the presence of heterogeneous complex of 12-13 nm was attributed to the variety in size of the nanodiscs when ZipA was present.

Results and discussion

The globular domain was not present in the 3D reconstruction obtained from either 10-11 or 12-13 nm Nd-ZipA, nor could be detected in TEM images. This was attributed to the size of this domain, which is too small to be visualized as an isolated density on the background of the images because it is connected to nanodisc in a flexible way and it is not close to it. Although in the electron microscope it is not possible to detect the ZBD of ZipA, when ZipA is inserted into nanodiscs is accessible to antibodies prepared against this protein.

2.2 Interaction of reconstituted ZipA into nanodiscs with FtsZ

Interaction of Nd-ZipA with oligomeric GDP-bound FtsZ was measured using sedimentation equilibrium. The results were analyzed using a binding model previously used for the interaction of a soluble mutant of ZipA (sZipA) with FtsZ-GDP, providing a $\log K_{AZ}$ of 6, which is similar to the results obtained for sZipA, suggesting that the transmembrane region of ZipA is not a critical factor in the formation of the complex ZipA/FtsZ.

For the first time, the interaction of Nd-ZipA and FtsZ-GTP and GMPCPP polymers was studied quantitatively using FCS and sedimentation velocity (SV). The apparent binding constant value was of similar magnitude as the one obtained for the non-polymeric GDP-form, indicating that the polymerization with GTP or GMPCPP does not increment the affinity of ZipA for FtsZ.

Next, the FCS assay used for measuring interaction with FtsZ polymers was successfully utilized to quantitatively test the inhibition of the ZipA/FtsZ interaction by C-terminal FtsZ peptides (CTZ-MUT and CTZ-WT). This is promising for future testing of new inhibitors of this interaction.

Finally, FtsZ polymers were visualized when attached to a surface previously covered with Nd-ZipA. Polymers were not able to attach to the surface when covered with empty nanodiscs. In these images, no bundling or change in polymer morphology was detected.

These results indicate that ZipA constitutes a flexible tether to the inner membrane for FtsZ, making sure that FtsZ subunits are near the membrane ready to polymerize at the start of cell division. The moderate affinity is consistent with the highly dynamic and regulated FtsZ assembly, which a tight interaction might interfere with.

Results and discussion

3. Biophysical characterization of FtsN nanodiscs

FtsN, with a 6 histidine N-terminal tag, was overexpressed and purified from *E. coli* C41 with a yield of ~ 5 mg/L. Using sedimentation velocity experiments it was determined that FtsN is a monomer when solubilized with detergents. FtsN has two cysteine residues, both present in the globular domain, that were found to form a disulfide bridge using the Ellman method.

FtsN was reconstituted into nanodiscs of 10 nm using either ECL or EPC as lipids. Purification of FtsN nanodiscs was complicated by the fact that binding to metals of the His-tag in FtsN was affected by the presence of ECL, while with EPC the nanodisc preparations were more heterogeneous.

Characterization by denaturing electrophoresis and *western blot* suggests that C-terminal (periplasmic) FtsN domain degrades over time. Reconstitution of FtsN in nanodiscs reduced or stopped this degradation.

These results represent a starting point for the *in vitro* characterization of full-length FtsN and provide valuable information for future reconstitution studies of this protein.

Conclusions

- Empty nanodiscs of three different lipid compositions have been formed: palmitoylcholine (POPC), egg L- α -phosphatidylcholine (EPC) and *E. coli* polar lipid extract (ECL).
- It has been concluded by means of SV and SE experiments that empty nanodiscs formed by ECL have a sedimentation coefficient and a buoyant mass higher than EPC or POPC nanodiscs.
- The partial specific volume of ECL nanodiscs is smaller than for EPC or POPC nanodiscs calculated through experiments of DLS. The values obtained for both EPC and POPC nanodiscs fit within the value reported for particles of high density lipoprotein type 3 (HDL-3).
- The type of lipid used in the nanodiscs formation does not affect their size but greatly affects their hydrodynamic properties.
- We have incorporated complete, functional ZipA into *E. coli* lipids nanodiscs.
- ZipA nanodiscs have a buoyant mass of 34000 Da \pm 3000 and a sedimentation coefficient of 4.9 S \pm 0.1.
- ZipA nanodiscs have a hydrodynamic diameter in solution of about 13 nm, as measured by DLS, FCS and gel filtration chromatography.
- ZipA nanodiscs show two different diameter populations of discs, one of 10-11 nm and other of 12-13 nm, visualized through TEM.
- Although in the electron microscope it is not possible to detect the ZBD of ZipA, when ZipA is inserted into nanodiscs it is accessible to antibodies prepared against this protein.
- The presence or absence of the transmembrane region of ZipA does not affect the affinity of this protein for FtsZ, supporting the idea that it only provides an anchor point to the membrane, where the *E. coli* proto-ring is assembled.
- FtsZ polymerization with GTP or GMCPP does not increment the affinity of ZipA for FtsZ, with a $\log K_{AZ}$ of 6, when the binding of ZipA per FtsZ polymer is considered.
- Under the tested conditions, reconstituted ZipA does not affect filament arrangement in solution or on EM surfaces.
- The results set about ZipA and FtsZ interaction support a model in which ZipA loosely captures FtsZ to the inner cell membrane.
- FtsN has been overexpressed and purified from *E. coli* C41 with a yield of \sim 5 mg/L.
- Most abundant species of FtsN with detergents is a monomer.
- FtsN has two cysteine residues, both present in the globular domain, which form a disulfide bridge.
- FtsN has been reconstituted into nanodiscs of 10 nm with *E. coli* lipids and with L- α -phosphatidylcholine hen's egg extract.

Conclusions

- Characterization by denaturing electrophoresis and *western blot* suggests that C-terminal (periplasmic) FtsN domain degrades over time but when FtsN is inserted on nanodiscs.

Introducción

Introducción

1. La división en *Escherichia coli*

Escherichia coli es un bacteria Gram-negativa, con forma de barra o baciliforme, clasificada en el grupo de las γ -proteobacterias dentro de la familia *Enterobacteriaceae* (M. Schaechter 2006). El hábitat principal de esta bacteria es el intestino de los animales de sangre caliente, incluyendo a humanos. Dado que está presente en la materia fecal del colon, *E. coli* también está presente en el entorno, su hábitat secundario, al ser expulsadas con las heces. Aunque se pensaba que *E. coli* sobrevivía muy poco tiempo al ser expulsada del intestino, cada vez está mejor estudiada la capacidad de esta bacteria de adaptarse y colonizar distintos entornos (Ishii et al. 2008).

Esta adaptabilidad implica una capacidad de controlar de manera muy precisa la división celular y adaptar la frecuencia con la que se divide al medio en el que vive, con el fin de asegurar su supervivencia. Durante el proceso de división, la bacteria crece hasta alcanzar una longitud determinada. Llegado a este punto, se produce la replicación del único cromosoma de *E. coli*. A continuación, durante el proceso de división, aparece una invaginación en el punto medio de la bacteria generado por la maquinaria de división, la cual ejerce una fuerza constrictora sobre la membrana. Este proceso, finaliza con la división de la bacteria, dando lugar a dos células hijas iguales e independientes (Figura I1).

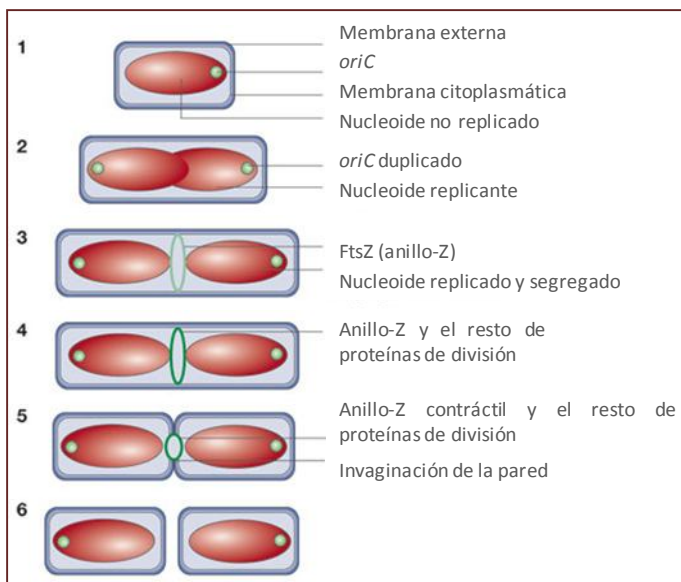


Figura I1: Ciclo de división en *Escherichia coli*.

En condiciones óptimas de cultivo, *E. coli* se divide cada 20 min. 1) *E. coli* cuando no está en proceso de división. Antes de que ocurra la replicación, el origen de replicación (*oriC*), se desplaza hacia un polo de la bacteria. 2) Una vez ha terminado la replicación de *oriC*, la secuencia migra hacia el polo opuesto de la célula, continuando el proceso de replicación del resto del cromosoma. El crecimiento celular permite la segregación del

nucleoide. 3) La proteína FtsZ se ensambla en la cara interna de la membrana citoplasmática formando el anillo-Z hacia el ecuador de la célula. 4) El anillo-Z recluta las proteínas que conformarán el divisoma. 5) Estas proteínas forman el septo de división. A partir de entonces se produce la contracción del anillo-Z y la constricción de la membrana externa. 6) Como resultado se obtienen dos células hijas iguales e independientes. Figura adaptada de (Margolin 2005).

Introducción

La división bacteriana es un evento controlado de forma precisa, sujeto a regulación temporal y espacial. La regulación temporal consiste en la coordinación del inicio de la división con la correcta replicación del cromosoma bacteriano a partir del *oriC* (Figura I1). Aunque experimentalmente se ha comprobado que la formación del anillo-Z se inicia en coordinación con la replicación del cromosoma, el mecanismo molecular exacto de esta sincronización en *E. coli* se desconoce (Tormo et al. 1985). Lo que sí se ha estudiado en detalle es la capacidad de la bacteria de impedir el inicio de la división ante la detección de fallos en el DNA. Como parte de la respuesta SOS ante daños al DNA, *E. coli* expresa la proteína Sula, que inhibe el ensamblaje de FtsZ impidiendo la formación del anillo-Z (Mukherjee et al. 1998).

En cuanto a la regulación espacial, ésta consiste en la correcta localización del anillo de división en la mitad de la célula, de forma que se produzcan dos células hijas de igual tamaño. Los mecanismos moleculares estudiados en *E. coli* consisten por un lado en el sistema Min, compuesto por las proteínas MinC, MinD y MinE, y el mecanismo de oclusión del nucleoide (Margolin 2000).

El sistema Min impide el ensamblaje del anillo-Z mediante un comportamiento oscilante de las proteínas del sistema, que se desplazan de polo a polo sobre la membrana de la célula (Raskin et al. 1999), evitando la citocinesis aberrante cercana a los polos de la célula y asegurando una correcta localización de la maquinaria de división para producir dos células idénticas (Lutkenhaus 2007). MinC inhibe la polimerización de FtsZ (Loose et al. 2011). MinD, una ATPasa que se une a la membrana, activa la función inhibitoria y dirige MinC a la membrana. MinE se localiza en forma de anillo cerca del ecuador de la célula, dispara la actividad ATPasa de MinD y la separa de la membrana dirigiendo el movimiento de oscilación (Loose et al. 2011).

Paralelamente, el nucleoide, que ocupa una gran parte del volumen interno de la célula, actúa inhibiendo la formación del anillo-Z en sus proximidades hasta un momento determinado del proceso de segregación en el que los nucleoides están prácticamente separados (Woldringh et al. 1991). De esta manera, se impide que el cromosoma se rompa o sea atravesado por el septo de división. Este mecanismo ayuda a determinar la ubicación de la septación (Wu et al. 2012).

2. El divisoma de *E. coli*

La división celular requiere un complejo multiproteico, denominado divisoma, que ensambla en el sitio de división y produce la constricción de la membrana citoplasmática junto con las distintas capas que forman la pared celular. Este complejo está formado en *E. coli* por al menos 15 proteínas, la mayoría de ellas asociadas a la membrana (Figura I2, A).

Los componentes del divisoma son reclutados de acuerdo a un orden lineal y estricto, lo que determina un proceso de ensamblaje paso a paso en el siguiente orden: FtsZ > ZipA, FtsA > ZapA > FtsE, FtsX > FtsK > FtsQ > FtsB, FtsL > FtsW > FtsI > FtsN > AmiC > EnvC. Estas proteínas ensamblan fundamentalmente en dos etapas (Dai et al. 1991, Aarsman et al. 2005), siguiendo una serie de mecanismos concertados y secuenciales que conducen, finalmente, a la formación del anillo de división en el ecuador de la célula (Figura I2, B).

En la etapa inicial de la división, denominada ensamblaje temprano, tres proteínas (FtsZ, ZipA y FtsA) se asocian de manera conjunta dando lugar al primer complejo proteico, el protoanillo, siendo éste un paso fundamental para la división celular (Hale et al. 1999). Tras la formación del protoanillo, en la etapa final del ensamblaje, se reclutan una serie de proteínas tardías que finalmente dan lugar al anillo maduro de división o divisoma (Vicente et al. 2006). La primera de ellas es FtsK, seguida por el complejo FtsQ-FtsB-FtsL. Posteriormente el complejo FtsW-FtsI, dos proteínas involucradas en la síntesis del peptidoglicano en el septo de división y el anillo se completa finalmente con FtsN, inmediatamente antes del inicio de la constricción. Cuando las bacterias carecen de alguna de las proteínas de división esenciales no pueden llevar a cabo la constricción y presentan un clásico fenotipo de división letal. Estas bacterias inviables no son capaces de dividirse eficazmente, de manera que, tras crecer formando filamentos elongados con sus nucleoides correspondientes, mueren.

Las proteínas que constituyen el divisoma desarrollan distintas funciones como modular el estado de ensamblaje de FtsZ (FtsA, ZipA, ZapA), conectar el anillo-Z a la membrana citoplasmática (FtsA, ZipA), coordinar la septación con la segregación cromosómica (FtsK), sintetizar peptidoglicano de la pared celular (FtsI, FtsW) e hidrolizar peptidoglicano para separar las dos células hijas (AmiC, EnvC). Un requerimiento esencial para la formación del anillo-Z es el anclaje de FtsZ a la membrana. También existen otras proteínas que son esenciales en el proceso de división pero cuya función no se conoce tan profundamente (FtsEX, FtsQ, FtsL, FtsB y FtsN) (Weiss 2004).

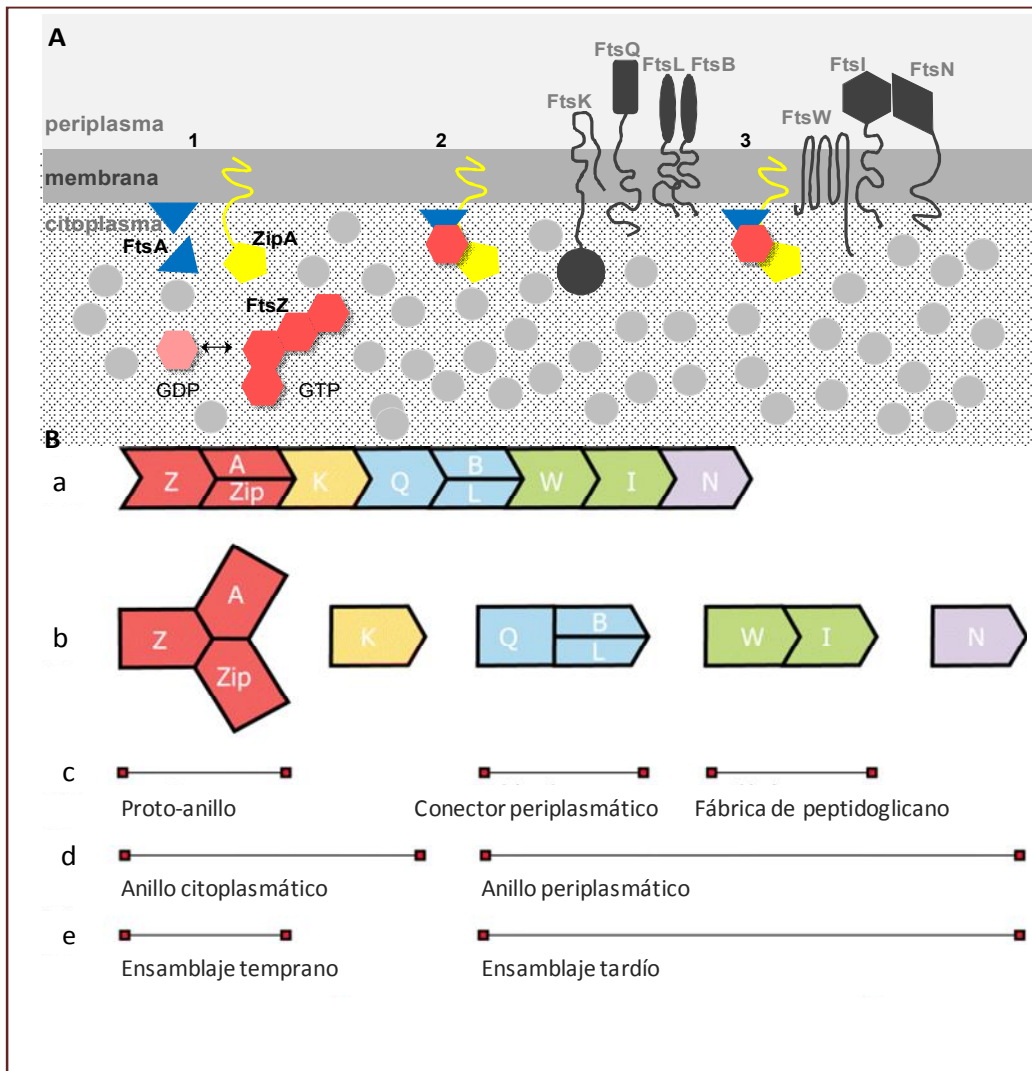


Figura 12: Maquinaria de división celular en *E. coli*. *Panel A:* 1) La maquinaria se ensambla en el sitio de división y dirige el proceso de constricción de la membrana y la pared celular. 2) En una etapa temprana, el protoanillo (FtsZ, ZipA y FtsA) se ensambla en el ecuador celular. 3) En una etapa más tardía, se reclutan al sitio de división una serie de proteínas esenciales que ensamblan formando el divisoma. *Panel B:* Ensamblaje de los componentes esenciales del anillo de división celular. Se ilustran las 10 proteínas esenciales que se reúnen en el centro celular para formar el anillo de división, el cual lleva a cabo la septación. En (a) se muestra una secuencia lineal y concertada de ensamblaje que podrían seguir las proteínas, o, el ensamblaje de forma concertada que involucra complejos, como se ve en (b). El protoanillo (c), formado por la interacción entre las tres proteínas FtsZ, FtsA y ZipA, ensambla en la membrana citoplasmática en una etapa temprana (e), seguido por la adición de FtsK para formar el anillo citoplasmático (d). En las etapas tardías del ensamblaje (e) se van añadiendo elementos adicionales que forman el conector periplasmático (FtsQ, FtsB y FtsL) y las proteínas del anillo que están involucradas en la síntesis de peptidoglicano septal (FtsW y FtsI), seguidas todas ellas, por FtsN que conecta con la capa de peptidoglicano ya que presenta un dominio periplasmático (d). Figura adaptada de (Vicente and Rico 2006).

3. FtsZ

El componente fundamental de la maquinaria de división bacteriana, FtsZ (383 aa), es una proteína citoplasmática soluble de 40.3 kDa (Romberg et al. 2003) que se encuentra ampliamente conservada en procariotas y en algunos orgánulos celulares como cloroplastos o mitocondrias. FtsZ es homóloga estructural de la tubulina eucariota (Erickson 1995, Lowe et al. 1998, Nogales et al. 1998). Además de ser una proteína esencial, es la primera proteína que se localiza en el sitio de división donde ensambla formando el anillo-Z que sirve de andamio para la incorporación del resto de las proteínas del divisoma.

FtsZ pertenece a la familia de las GTPasas (Mukherjee et al. 1993) y, como tal, une e hidroliza GTP (Romberg and Levin 2003). Esta actividad GTPasa depende de la concentración de proteína (Lu et al. 1998). Está formada por dos dominios alrededor de una hélice central: el dominio N-terminal, que interacciona con otra subunidad de FtsZ para formar un dominio de actividad GTPasa (Scheffers et al. 2002, Oliva et al. 2004), y el dominio C-terminal, que interacciona con ZipA y FtsA, las otras dos proteínas del protoanillo, para formarlo (Figura I3).



Figura I3: Modelo tridimensional de la estructura de la proteína FtsZ de *E. coli*. La molécula de GTP unida a la proteína se representa como esferas en rojo. El residuo N-terminal está destacado en azul. Los últimos residuos del C-terminal de FtsZ, que en este modelo forma una α -hélice, y que constituyen el sitio de interacción con ZipA y FtsA, están resaltados en verde. Este modelo fue cedido por el grupo de modelado molecular del CBMSO-CSIC (Prof. Paulino Gómez Puertas).

Introducción

FtsZ es capaz de formar polímeros lineales de 4 nm de ancho y longitud y curvatura variables (Adams and Errington 2009, Erickson et al. 2010, Mingorance et al. 2010). El polímero es una estructura dinámica que está en continua actividad mediante procesos de polimerización y despolimerización. Esta característica permite a FtsZ formar una red filamentosa en el citoplasma bacteriano actuando de soporte estructural o citoesqueleto (Nogales 2010). Además de esto, actúa como estructura de andamiaje sobre la cual se van anclando el resto de componentes de la maquinaria de división (Niu et al. 2008, Mingorance et al. 2010). La concentración de moléculas de FtsZ en *E. coli* se encuentra entre 5-10 μM (Rueda et al. 2003, Mohammadi et al. 2009), con una concentración crítica de polimerización de 1-2 μM (Mukherjee et al. 1998). Por tanto, diversos mecanismos inhiben la polimerización de FtsZ hasta que la célula se encuentra preparada para la división.

En ausencia de GTP, FtsZ de *E. coli* experimenta una oligomerización reversible y no cooperativa modulada por factores como el pH, la fuerza iónica, la concentración de cationes monovalentes y divalentes y la aglomeración molecular (de Pereda et al. 1996, Rivas et al. 2000, Martos et al. 2010, Pacheco-Gomez et al. 2011, Krol et al. 2013). En presencia de Mg^{2+} y moderada fuerza iónica, la proteína asocia para dar lugar a la formación de oligómeros lineales de FtsZ de longitud variable (Ahijado-Guzman et al. 2013).

Por otra parte, el ensamblaje de FtsZ *in vitro*, es muy sensible a las condiciones de la reacción (Mukherjee et al. 1999, Romberg et al. 2001) y requiere además GTP (Romberg and Levin 2003), de forma que su unión promueve la autoasociación de la proteína siguiendo un modelo de interacción cabeza-cola, formando polímeros de tamaño y disposición variados (Erickson et al. 2010, Mingorance et al. 2010). Estos polímeros son muy dinámicos y rápidamente desensamblan cuando el ratio GTP/GDP disminuye debido a la hidrólisis. Aunque la afinidad por el GTP es algo mayor que por GDP, los nucleótidos pueden competir entre sí, siendo éste uno de los mecanismos propuestos como reguladores de las características de dichos polímeros (Fu et al. 2010). En función de las condiciones experimentales, los polímeros de FtsZ pueden adoptar gran variedad de estructuras, como las que se muestran en la Figura I4, A.

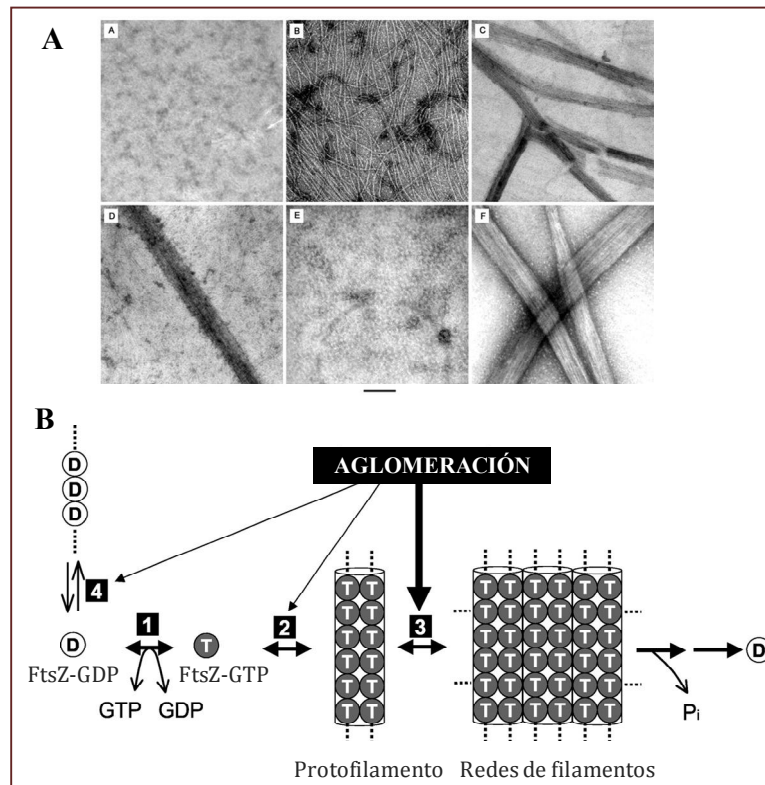


Figura 14: Panel A: Plasticidad estructural de FtsZ visualizada al microscopio electrónico de transmisión. En función de las condiciones de la reacción, FtsZ puede presentar diversos estados de asociación como: A) no polimerización en ausencia de K^+ ; B) polímeros sencillos; C) interacciones laterales entre polímeros; D) polímeros dobles; E) despolimerización tras largos periodos de incubación; F) haces de polímeros o cintas (de Pereda et al. 1996, Erickson et al. 1996, Yu et al. 1997, Gonzalez et al. 2003, Gonzalez et al. 2005, Popp et al. 2009). Barra de escala 100 nm. **Panel B: Modelo esquemático de los procesos de oligomerización y ensamblaje de FtsZ de *E. coli*.** Cada una de las reacciones puede estar modulada por efectos de agentes de aglomeración molecular que simulan el aglomerado interior bacteriano, concentración de diferentes cofactores y efectos del pH. 1) intercambio de nucleótido de FtsZ soluble; 2) formación cooperativa de los protofilamentos de FtsZ; 3) ensamblaje de los protofilamentos en cintas bidimensionales; 4) oligomerización de FtsZ. La aglomeración favorece la formación de oligómeros de FtsZ-GDP en un proceso inducido por magnesio. Cuando el GTP se agota FtsZ despolimeriza por completo.

El polímero básico de FtsZ, o protofilamento, es un filamento sencillo, y se considera que es la unidad estructural del anillo-Z. Estos protofilamentos son demasiado cortos para abarcar toda la circunferencia bacteriana en el centro de la célula, por lo que los protofilamentos deben ensamblarse formando una estructura de mayor tamaño para formar el anillo-Z observado *in vivo* (Li et al. 2007, Fu et al. 2010). El mecanismo mediante el cual se consigue esto no se conoce todavía, siendo objeto de debate actualmente, aunque se ha observado el ensamblaje de protofilamentos *in vitro* en estructuras de mayor orden tras la adición de agentes aglomerantes (Gonzalez et al. 2003, Popp et al. 2009), calcio (Yu et al. 1998) o ciertas condiciones del medio (Chen et al. 2009).

4. ZipA

ZipA de *E. coli* (328 aa) es una proteína de membrana bitópica, que atraviesa la membrana interna de *E. coli* con el N-terminal en el periplasma y el C-terminal en el citoplasma. Esta proteína es esencial para la división en *E. coli*, aunque no se encuentra particularmente conservada fuera de las γ -proteobacterias (Hale et al. 2002, Margolin 2005). La función principal que se le atribuye es la de anclar el anillo-Z a la membrana y, junto con FtsZ y FtsA, reclutar las proteínas tardías para formar el anillo maduro.

Bajo condiciones normales se requiere ZipA para la correcta formación del anillo-Z (Hale and de Boer 1999). Ambas proteínas, FtsA y ZipA, son capaces de anclar FtsZ a la membrana en ausencia de la otra, sin embargo la presencia de las dos es necesaria en *E. coli* para reclutar el resto de proteínas de división. Por otro lado, se ha encontrado un mutante de FtsA, R286W, al que se le ha denominado FtsA* y que puede sortear la necesidad de ZipA en el reclutamiento de las proteínas posteriores necesarias para formar el anillo de división (Geissler et al. 2003) (Pichoff et al. 2005, Pichoff et al. 2012). La adición de FtsA* a FtsZ debería ser suficiente, en principio, para formar un protoanillo activo anclado a la membrana sin ZipA.

In vivo, ZipA es unas 3 veces menos abundante que FtsZ (Rueda et al. 2003), y sólo el 30 % de la ZipA total se localiza en el sitio de división (Stricker et al. 2002). Sorprendentemente, ZipA presenta un comportamiento dinámico, con una constante de recambio de proteína entre en anillo-Z y el *pool* externo, localizado en la membrana de acuerdo con estudios de recuperación de la fluorescencia tras fotoblanqueo (Stricker et al. 2002).

Esta proteína de 36.4 kDa, consta de una hélice N-terminal altamente hidrofóbica de aproximadamente 25 aminoácidos asociada a la membrana interna, un dominio cargado constituido por una región básica de unos 23 aminoácidos con una carga neta de +8 y una región ácida de unos 17 aminoácidos, un dominio P/Q desestructurado y flexible rico en prolina (31 %) y glutamina (23 %) (Erickson 2001) (160 aa), que sirve de conexión entre el fragmento transmembrana y un dominio globular C-terminal de interacción con FtsZ (ZBD, residuos 189 al 328) localizado en el citoplasma (Hale et al. 1997, Ohashi et al. 2002) (Figura 15). La proteína completa solubilizada con detergentes es monomérica (López Navajas 2007) y el mutante sin la hélice transmembrana también se comporta como un monómero en solución (Martos et al. 2010). Recientemente se ha reportado la presencia de posibles dímeros de la proteína en extractos celulares, mediante electroforesis nativa bidimensional (Skoog et al. 2012).

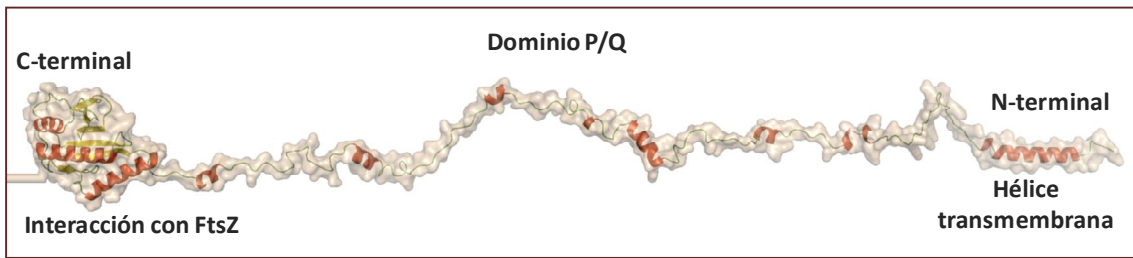


Figura 15: Modelo tridimensional de la proteína ZipA de *E. coli*. En la imagen se muestran las regiones principales de la proteína: el dominio N-terminal (fragmento transmembrana), el dominio P/Q desestructurado y el dominio C-terminal de interacción con FtsZ. Cedido por el grupo de modelado molecular del CBMSO-CSIC (Prof. Paulino Gómez Puertas).

La estructura del dominio C-terminal de ZipA fue determinada por resonancia magnética nuclear (RMN) (Moy et al. 2000), y ese mismo año se publicó la estructura resuelta por cristalografía de rayos-X del complejo formado entre el dominio C-terminal de ZipA y un péptido de 17 aminoácidos derivado de la región C-terminal de FtsZ (Mosyak et al. 2000) (Figura 16). Los datos estructurales muestran que el dominio globular C-terminal de ZipA interacciona directamente con FtsZ (Mosyak et al. 2000). En cuanto a la estructura del complejo de ZipA con FtsZ, en la estructura cristalina obtenida (Mosyak et al. 2000), el péptido conteniendo los últimos 17 aminoácidos del extremo C-terminal de FtsZ se encuentra embebido en un bolsillo hidrofóbico dentro del dominio globular de ZipA, plegado como una α -hélice extendida, exponiendo sus residuos hidrofóbicos a un lado de la hélice hacia la interfase de unión (Figura 16). Aunque no se conoce la estructura, lo más probable es que el dominio P/Q se encuentre como un brazo extendido desestructurado que sirva de enlace para la molécula de FtsZ a la membrana citoplasmática (Ohashi et al. 2002, Pazos et al. 2013).

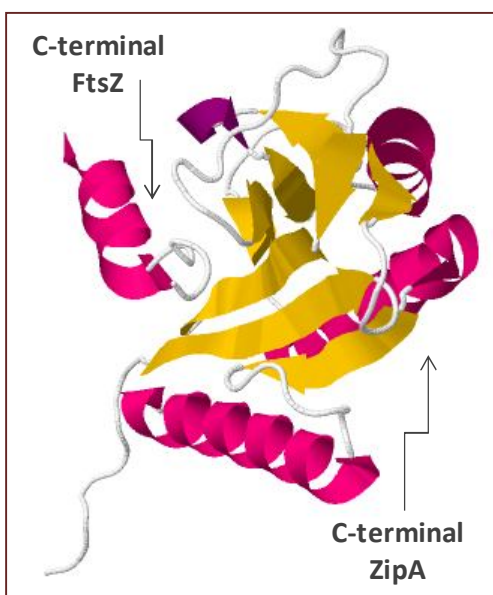


Figura 16: Estructura del complejo formado por el dominio C-terminal de ZipA y el péptido del C-terminal de FtsZ resuelta mediante cristalografía de rayos-X (Mosyak et al. 2000). Los aminoácidos del dominio C-terminal de ZipA se pliegan en una conformación de lámina- β /hélice- α /lámina- β , dejando un canal hidrofóbico de interacción por donde se produce la interacción con el péptido de FtsZ.

Introducción

En algunos trabajos, se ha reportado que ZipA promueve la formación de estructuras más grandes de polímeros de FtsZ debido a interacciones laterales (*bundles*), en donde parece estar implicado el dominio C-terminal, lo cual podría estar conectado con la estabilización del anillo-Z por ZipA observada *in vivo* (RayChaudhuri 1999, Hale et al. 2000, Kuchibhatla et al. 2011). El conocimiento que se posee sobre la asociación de FtsZ y ZipA se ha obtenido hasta ahora principalmente mediante estudios genéticos (Harry et al. 2006) con un número limitado de ensayos estructurales y biofísicos (Mosyak et al. 2000, Moy et al. 2000, Kenny et al. 2003, Martos et al. 2010). Aunque en esos trabajos se publicaron varios valores de afinidad entre distintos mutantes de delección de ZipA y FtsZ, nunca se ha estudiado cuantitativamente la interacción entre ambas proteínas usando las proteínas completas. Los principales mutantes usados son ZipA $\Delta(1-25)$ (s_1 ZipA) el cual carece del fragmento transmembrana N-terminal desde el aminoácido 1 al 25, y por otra parte, se ha usado el mutante soluble ZipA $\Delta(1-188)$ (s_2 ZipA). Con el mutante s_2 ZipA y el péptido correspondiente a los 17 últimos aminoácidos del C-terminales de FtsZ se han encontrado constantes de afinidad aparentes en el orden de $\sim 10 \mu\text{M}$, usando técnicas de resonancia del plasmón superficial y anisotropía de fluorescencia (Mosyak et al. 2000, Kenny et al. 2003). Más recientemente, se publicó un estudio cuantitativo mediante técnicas de ultracentrifugación analítica y dispersión de luz estática en gradiente de la interacción entre el mutante s_1 ZipA y FtsZ completa, en ausencia de GTP. En este trabajo se propuso un modelo de interacción en el que sólo una molécula de ZipA interacciona por cada especie oligomérica de FtsZ, con una afinidad también en el orden de micromolar (Martos et al. 2010).

El estudio de la interacción entre FtsZ y ZipA no sólo es importante para conocer el funcionamiento de la maquinaria de división bacteriana, sino también porque proporciona información útil para el posible desarrollo de inhibidores de la interacción, con el objetivo de desarrollar nuevos agentes antimicrobianos (Sass et al. 2013).

5. FtsN

FtsN (319 aa) es la última proteína esencial conocida del divisoma en ser reclutada al septo (Addinall et al. 1997, Chen et al. 2001), por lo que depende de la presencia del resto de proteínas que forman el divisoma para ensamblarse en el anillo-Z (Vicente and Rico 2006). La estabilidad y el funcionamiento del divisoma para producir anillos activos en la septación no están garantizados hasta que se recluta FtsN. Esta proteína sólo se ha encontrado en γ -proteobacterias (Margolin 2000), aunque hay claros homólogos presentes en bacterias entéricas y *Haemophilus* spp (Dai et al. 1996).

El gen *ftsN* se aisló como un supresor multicopia de una mutación termosensible de *ftsA* (Dai et al. 1993). La sobreexpresión de FtsN también suprime, en mayor o menor medida, mutaciones termosensibles en *ftsK*, *ftsQ* y *ftsI* (Dai et al. 1993), propiedad única entre las proteínas esenciales de división.

FtsN (35.8 kDa) es una proteína de membrana, la cual comparte topología con las proteínas FtsQ, FtsL, FtsB y FtsI, involucradas también en la etapas tardías de la división celular. Todas ellas son proteínas de membrana con un único dominio transmembrana que conecta una corta porción N-terminal citoplásmica y un dominio C-terminal periplásmico de longitud variable (Bowler et al. 1989) (Dai et al. 1996) (Guzman et al. 1992, Guzman et al. 1997).

FtsN consta de un pequeño fragmento citoplasmático N-terminal (residuos 1-33), seguido de un fragmento transmembrana (residuos 34-53) y finalmente, un dominio C-terminal (residuos 54-319) orientado hacia el lado periplásmico de la membrana, que le permite interactuar con las cadenas de peptidoglicano, y es donde se cree que está contenida la función específica de la proteína en la división (Dai et al. 1996) (Figura 17). La delección de los dominios citoplasmático y de membrana causa inestabilidad y pérdida de la función (Goehring et al. 2007). Sin embargo, se comprobó que el fragmento transmembrana podía ser reemplazado por secuencias heterólogas, incluso por un péptido con señal de corte, lo que sugiere que, tanto la función específica de la proteína como su localización en el sitio de división, vendrían determinadas por su dominio C-terminal (Dai et al. 1996, Addinall et al. 1997).

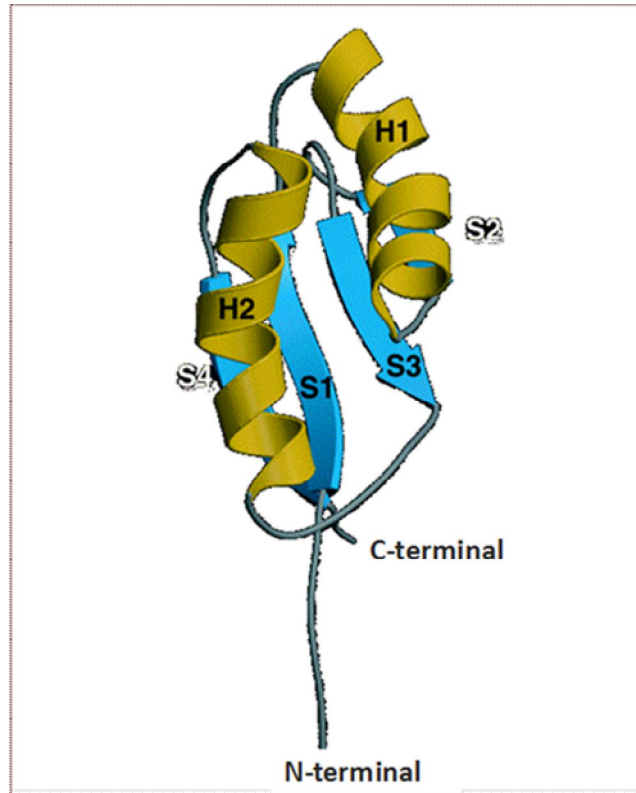


Figura 17: Modelo de cintas del dominio C-terminal de FtsN tras la superposición de 45 estructuras obtenidas por RMN. Los 77 aminoácidos del C-terminal de FtsN (dominio SPOR) adoptan una topología $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$, característica de los dominios RNP (dominio de unión a RNA). Figura adaptada de (Yang et al. 2004).

Los estudios de mutagénesis de delección secuencial combinados con RMN permitieron definir tres regiones distintas en el dominio periplásmico de FtsN (Yang et al. 2004) (Figura 18). La región de FtsN esencial para la división celular (residuos 53-137) (Ursinus et al. 2004) abarca tres hélices parcialmente estructuradas (residuos 62-123) que podrían constituir el sitio de interacción con otras proteínas. A continuación, una región flexible rica en glutamina (residuos 124-216) conecta las tres hélices con la región C-terminal. Por otra parte, los análisis estructurales llevados a cabo mediante RMN revelaron un plegamiento tipo RNP (dominio de unión a RNA) en el C-terminal (comprendiendo los residuos 243-319), el cual presentaba alta homología de secuencia con dominios de unión a peptidoglicano (Yang et al. 2004). Mediante ensayos *in vivo* e *in vitro* se demostró que este dominio se une a mureína durante el proceso de división celular (Ursinus et al. 2004).

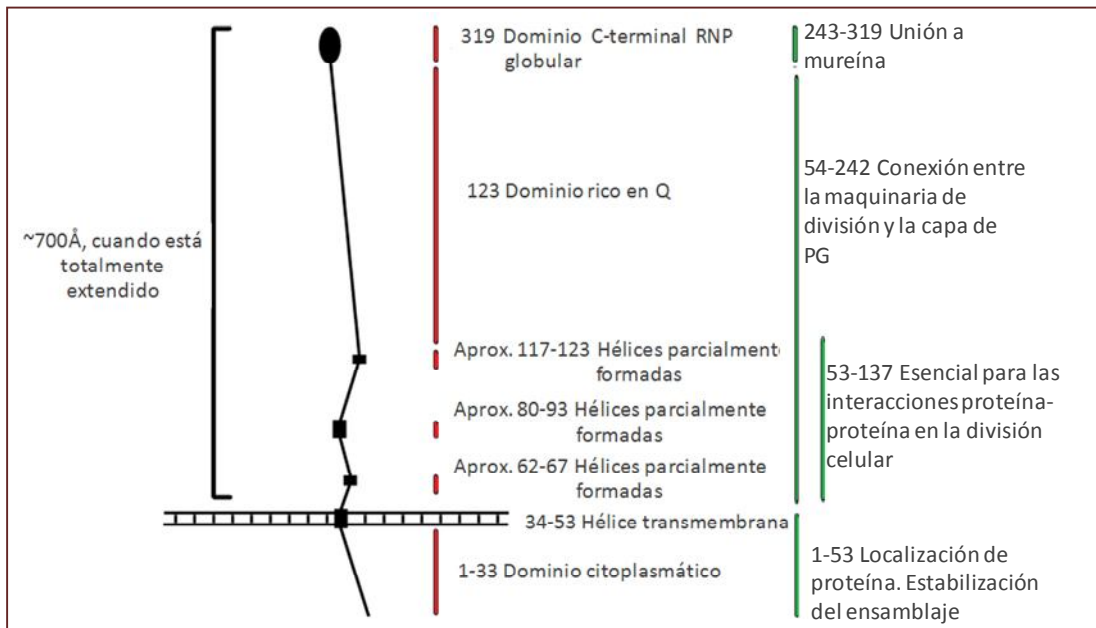


Figura 18: La arquitectura de dominio de FtsN según el análisis de mutagénesis de delección secuencial y análisis estructural por RMN. El dominio C-terminal globular, que tiene el potencial de interactuar con la capa de peptidoglicano, se conecta a través de un largo conector rico en glutamina (Q) a tres hélices cortas, parcialmente formadas, que están ancladas a la membrana interna por una hélice transmembrana (TM). La dimensión indicada refleja la longitud máxima posible que la proteína podría adoptar si la parte desplegada de la proteína adoptara una conformación totalmente extendida. En la práctica, la longitud sería probablemente más corta ya que la parte desplegada estaría en equilibrio entre un conjunto de diferentes conformaciones. Aunque se desconoce el grado de tal acortamiento, todavía parece totalmente plausible que la proteína pueda tener suficiente longitud para salvar el espacio periplásmico, cuya anchura es probablemente de 130-250 Å (Oliver 1996). Figura adaptada de (Yang et al. 2004).

Aunque la función de FtsN es aún desconocida, se sabe que su presencia es necesaria para el reclutamiento de dos proteínas no esenciales en el anillo de división: la mureína hidrolasa AmiC, que interviene en la separación de las células hijas, y el complejo de membrana externa Tol-Pal, necesario para la correcta invaginación de la membrana externa (Bernhardt et al. 2003, Gerding et al. 2007).

Por otro lado, algunos estudios indican que FtsN posiblemente desempeña una función en la etapa temprana de la división en cooperación con la proteína de la etapa temprana FtsA. Mediante ensayos de doble híbrido en bacterias y purificación por coafinidad, se demostró que FtsN interactúa con FtsA (Di Lallo et al. 2003, Karimova et al. 2005, Busiek et al. 2012). De hecho, en los experimentos de purificación por coafinidad a partir de lisados celulares, se describió que solamente era necesaria la región citoplasmática de FtsN, unida a la región transmembrana o a una cremallera de leucina, para interactuar con FtsA (Busiek et al. 2012). En este mismo trabajo se vio que una mutación en un conjunto conservado de cargas positivas (RRKK) de la región citoplasmática de FtsN (residuos 16-19) hacia cargas negativas suprimía la interacción

Introducción

con FtsA, por lo que se cree que esta región cargada es la responsable de la interacción con FtsA. Además, demostró que el subdominio 1c de FtsA (residuos 81-140), el cual consta de una α -hélice (H2) y 3 láminas β (S5, S6 y S7), es suficiente para llevar a cabo la interacción con FtsN. Y también se propuso que FtsN podría, de alguna manera, ayudar a la autoasociación de FtsA.

Por otro lado, ensayos de reclutamiento polar *in vivo* han puesto de manifiesto la existencia de una correlación entre la localización de FtsA y FtsN en el septo (Corbin et al. 2004). Además, el empleo de una nueva estrategia experimental, el denominado reclutamiento prematuro (*premature-targeting*), ha permitido conocer que FtsN es la única proteína de la etapa tardía de la división que requiere específicamente la presencia de FtsA para localizarse en el septo (Goehring et al. 2006), aunque todas las demás proteínas del divisoma estén presentes en el anillo de división.

Según algunos autores, FtsN parece presentar algún tipo de relación con ZipA (Rico et al. 2010). Aunque ZipA y FtsN ensamblen en distintas etapas de la formación del divisoma, la similitud entre sus perfiles filogenéticos (Rico et al. 2004) y la habilidad del mutante FtsA* para suplir la carencia de una de estas dos proteínas, pero no las dos simultáneamente (Bernard et al. 2007), se han interpretado como señales de que ZipA y FtsN están jugando un papel juntas en el divisoma (Rico et al. 2010). Para dar más peso a esta idea, en el trabajo de (Rico et al. 2010), se muestra que la presencia de ZipA en el protoanillo es relativamente sensible a los niveles celulares de FtsN, mientras que ni FtsA ni FtsZ se ven afectadas.

Las interacciones de FtsN no se limitan a las proteínas de la etapa temprana, sino que también se han descrito interacciones con las proteínas de la etapa tardía, como FtsQ y FtsI. Estas interacciones se han medido mediante estudios de doble híbrido en bacterias, entrecruzamiento (*cross-linking*) o co-inmunoprecipitación (Di Lallo et al. 2003, Karimova et al. 2005, Bertsche et al. 2006, D'Ulisse et al. 2007). Los estudios de doble híbrido bacteriano llevados a cabo en (Busiek et al. 2012) sirvieron para apoyar resultados anteriores en los que se había visto interacción *in vivo* entre FtsN y FtsA y apuntaron hacia la autoasociación de FtsN, concretamente hacia la dimerización. Sin embargo, ya que tanto los estudios de reclutamiento polar, como los ensayos de doble híbrido bacteriano no permitían distinguir entre interacciones proteína-proteína directas e indirectas, los autores completaron el trabajo con una técnica *in vitro* que les permitió ir más allá en la interacción FtsN-FtsA; esta técnica es la denominada *Far-Western*. En trabajos anteriores ya se había sugerido la autoasociación de FtsN, medida por transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET) (Alexeeva et al. 2010) o por ensayos de doble híbrido (Karimova et al. 2005). Ya que FtsA se une directamente a FtsZ y que FtsN interacciona con las proteínas implicadas en la síntesis del septo y la división, se propone que, estas interacciones entre proteínas del divisoma tempranas y tardías puedan ser uno de los varios controles de retroalimentación para la constricción del anillo-Z.

6. Reconstitución de proteínas de división en sistemas biomiméticos de membrana

La envuelta celular de *E. coli* está constituida por tres capas que, del exterior al interior, son la membrana externa, el periplasma y la membrana plasmática o interna. La cara externa de la membrana externa está formada por el lipopolisacárido (LPS). La membrana interna se encuentra separada de la membrana externa por el periplasma, que a su vez, contiene al peptidoglicano.

La membrana interna de *E. coli* es una típica membrana plasmática, estructurada de acuerdo con el modelo del mosaico fluido (Singer et al. 1972), con una bicapa de glicerofosfolípido en la cual están embebidas proteínas funcionales que difunden libremente (Kadner 1996). *E. coli* no contiene estructuras membranosas interiores como sucede en células eucariotas y, por lo tanto, todos los procesos asociados a membrana como los relacionados con el crecimiento y metabolismo tienen lugar en la membrana interna (Kadner 1996, de Kruijff 1997, Duong et al. 1997), además, muchas de las proteínas implicadas en división celular están localizadas en la membrana o cerca de ella. Las proteínas de la membrana interna, las cuales están bien integradas dentro de la bicapa lipídica (proteínas integrales de membrana) o asociadas en un lado (proteínas de membrana periféricas) están implicadas en muchos procesos.

El componente lipídico de la membrana interna de *E. coli* lo conforman, principalmente, tres fosfolípidos: PE (fosfatidiletanolamina, 74 %), PG (fosfatidilglicerol, 19 %) y CA (cardiolipina, 3 %) (Figura I9). En esta tesis se ha usado extracto polar de lípidos de *E. coli* (Avanti) para llevar a cabo la reconstitución de las proteínas en estudio en los nanodiscos. Este extracto, que se compone de PE (67 %), PG (23 %) y CA (10 %), resulta de gran utilidad debido a su elevada similitud en la composición lipídica respecto a la membrana interna de *E. coli*.

Dado que el proceso de división bacteriano está asociado a la membrana interna, para el estudio en condiciones biomiméticas de estas proteínas se necesita el uso de modelos de membrana que permitan mantener las proteínas solubles y a la vez medir sus propiedades biofísicas, interacciones y actividades enzimáticas. Existen diversos modelos de membrana que nos permiten reproducir estas características como los liposomas de distintos tamaños, las bicapas soportadas, las microesferas o los nanodiscos, los cuales han sido usados en nuestro laboratorio para estudiar el protoanillo (Figura I10). Todos ellos suponen una alternativa atractiva a las medidas *in vivo*, ya que permiten la reconstrucción *in vitro* de entornos biomiméticos que simulan las condiciones fisiológicas.

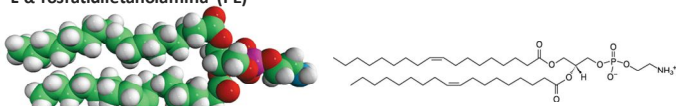
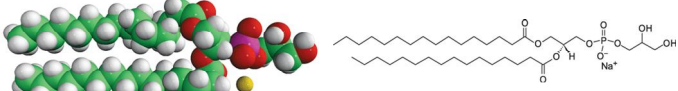
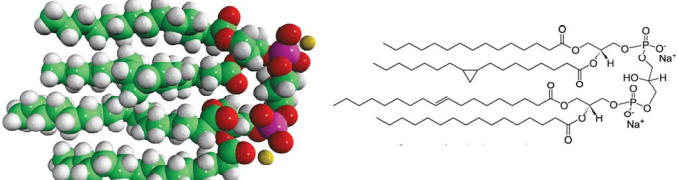
		% lipídico	Carga neta	Peso molecular
L- α -fosfatidiletanolamina (PE)		74%	0	719.30
L- α -fosfatidilglicerol (PG)		19%	-1	756.96
Cardiolipina (CA)		3%	-2	1435.86

Figura I9: Fosfolípidos principales que conforman la membrana interna de *E. coli*. Esta composición confiere a la membrana una carga neta negativa a pH 7.5. La particularidad de esta membrana bacteriana frente a otras es su elevado contenido proteico (~70 % en peso), compuesto por proteínas integrales de membrana y proteínas periféricas (Devaux et al. 1985).

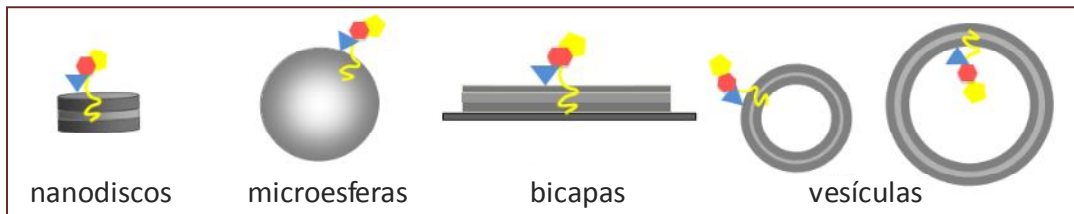


Figura I10: Reconstitución del protoanillo en distintos modelos de membrana. De izquierda a derecha: nanodiscos, los resultados de este estudio se presentan en esta tesis y en los artículos (Hernandez-Rocamora et al. 2012, Hernandez-Rocamora et al. 2012); microesferas, usadas para estudiar la interacción entre ZipA y FtsZ mediante espectroscopía RAMAN (Ahijado-Guzman et al. 2012); bicapas soportadas, usadas para estudiar el sistema MinCDE tanto de forma aislada como su interacción con el protoanillo (FtsZ y ZipA) (resultados sin publicar); y vesículas gigantes, creadas tanto con membrana interna natural como con distintas composiciones lipídicas y que se han usado para estudiar la interacción entre ZipA y FtsA con FtsZ (Jimenez et al. 2011, Cabre et al. 2013).

Introducción

En esta tesis se eligieron los nanodiscos como sistema de reconstitución de las proteínas de membrana ZipA y FtsN ya que presentan numerosas ventajas. Una de ellas es que crean un entorno biomimético restringido de membrana el cual estabiliza a las proteínas y las mantiene solubles permitiendo, de esta forma, llevar a cabo experimentos bajo condiciones experimentales definidas que permiten la obtención de parámetros, tanto bioquímicos como biofísicos, de interés y la posibilidad de estudiar las interacciones de estas proteínas de membrana con otras proteínas de su entorno. Como paso previo a la inserción de las proteínas de membrana en nanodiscos fue necesaria una caracterización extensiva de nanodiscos vacíos, sin proteína de membrana incorporada, que permitió conocer el comportamiento de este sistema, sus características biofísicas y estructurales. De esta forma, se ponen de relieve posibles dificultades a tener en cuenta a la hora de realizar un estudio más complejo, así como las precauciones necesarias en la caracterización hidrodinámica de nanodiscos de diferente composición lipídica.

7. Nanodiscos

Los nanodiscos se presentan como un sistema reconstituido de membrana, simple respecto a la complejidad del entorno celular, con capacidad para conservar los parámetros intrínsecos de las biomembranas y con la posibilidad de controlar fácilmente las condiciones experimentales. Los nanodiscos como modelo de membrana mantienen un grado de restricción espacial similar al de la membrana, pero a su vez permiten el uso de técnicas de disolución, como ultracentrifugación analítica, dispersión de luz y técnicas de molécula única.

Los nanodiscos fueron descritos por primera vez en el año 2002 por el grupo del Dr. Sligar como un sistema para reconstituir proteínas de membrana (Bayburt et al. 2002) y en los últimos años su uso ha crecido exponencialmente (Ritchie et al. 2009). El sistema se basa en la capacidad de la apolipoproteína A-1 (apoA-1) de formar estructuras discoidales en las que un fragmento de bicapa lipídica se estabiliza mediante dos anillos periféricos formados por dos moléculas de apoA-1 (Figura I11). La interacción entre la apoA-1 y los lípidos se produce gracias a las hélices α anfipáticas de esta proteína, que protegen las cadenas alifáticas de los fosfolípidos del disolvente acuoso.

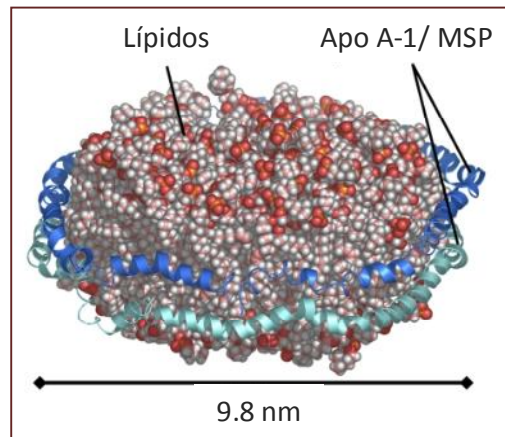


Figura I11: Modelado estructural de un nanodisco basado en el doble cinturón discoidal formado por la apolipoproteína A-1 (Segrest et al. 1999). La bicapa de fosfolípidos se encuentra rodeada por dos copias (*azul* y *cian*) de la proteína apoA-1. En el nanodisco, la proteína MSP tomaría el lugar ocupado por la apoA-1. Figura adaptada de (Christopher R. Morgan 2011).

El grupo de Sligar produjo distintas variantes de la apoA-I en las que se eliminaron residuos que no participaban en la interacción con lípidos y se optimizó la secuencia para la expresión recombinante en bacterias, estas variantes se denominaron proteínas de andamiaje de membrana (*membrane scaffold proteins*, MSPs) (Bayburt et al. 2002). A algunas de las variantes de MSPs producidas se les añadieron hélices anfipáticas extra mediante duplicación de partes de su secuencia de aminoácidos, de forma que produjeran discos de mayor tamaño (Denisov et al. 2004). Las partículas de nanodisco son, por tanto, de un tamaño definido y estable que depende de la variante de MSP utilizada para producirlos.

En esta tesis la proteína de andamiaje elegida fue la MSP1D1, cuya secuencia se muestra en la Figura I12, que forma nanodiscos de unos 10 nm de diámetro. Esta proteína presenta una cola de histidinas en posición N-terminal seguida de un sitio de reconocimiento de la proteasa del virus del tabaco (proteasa TEV), y finalmente la secuencia de la proteína (Ritchie et al. 2009).

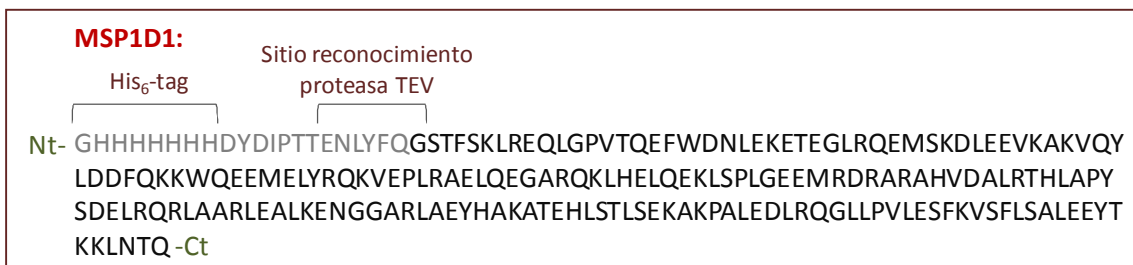


Figura I12: Secuencia de la proteína de andamiaje MSP1D1. En *gris* se muestra la cola de histidinas del extremo N-terminal seguida de una secuencia que conecta con el sitio de reconocimiento de la proteasa TEV. En *negro* se muestra la secuencia de la proteína MSP1D1 de 191 aminoácidos. La proteasa TEV corta la proteína entre los residuos Q y G de su secuencia de reconocimiento.

7.1 Formación de nanodiscos

La formación de nanodiscos comienza con la mezcla de los lípidos que se desean incorporar y la proteína MSP en un ratio lípido:proteína que se debe optimizar para cada lípido y variante de MSP. Las propiedades que presente la bicapa, como fluidez o carga superficial, dependerán del lípido elegido, por lo que su elección debe estudiarse en detalle, atendiendo a propiedades de éste como su forma molecular o su temperatura de transición de fase (T_m). Además, se debe tener en cuenta que las propiedades estructurales y funcionales de la proteína insertada en el nanodisco pueden verse condicionadas por el entorno lipídico que la rodea y que el objetivo final es mimetizar aspectos y propiedades de los lípidos en estado nativo para probar la función de la proteína de membrana *in vitro*.

Esta mezcla inicial, a su vez, contiene un detergente, por ejemplo colato (Baas et al. 2004, Bayburt et al. 2006, Whorton et al. 2007), en una proporción 1:2 respecto a la concentración de lípidos. Se necesita tener suficiente cantidad del detergente para generar un estado micelar inicial (Bayburt et al. 2002). Existen otros detergentes que se pueden usar para disolver los lípidos en la reconstitución, como por ejemplo, Triton X-100 (Gawrisch et al. 2008) o n-dodecil- β -D-maltósido (DDM) (Dalal et al. 2010). Se debe tener en cuenta que el detergente elegido para disolver los lípidos debe ser compatible con la proteína de membrana a insertar. Por tanto, es necesario hacer un estudio previo que asegure que ese detergente solubiliza correctamente los lípidos y la proteína de membrana, sin que éste provoque pérdidas permanentes en la actividad de la proteína de membrana. En este sentido puede resultar de ayuda la guía de solubilización de proteínas de membrana que se describe en (Hjelmeland et al. 1984).

Cabe resaltar que además de la proteína purificada, también existe la posibilidad de usar directamente un extracto crudo que contenga la proteína solubilizada para la mezcla de formación de nanodiscos, realizándose la purificación mediante cromatografía de afinidad una vez que la proteína ya está insertada en el nanodisco (Mitra et al. 2013). La ventaja de usar el extracto de membranas solubilizadas es que las proteínas de membrana purificadas y solubilizadas en detergente son más lábiles y pueden perder su función (Ritchie et al. 2009). Por otra parte, la proteína purificada en detergente presenta la ventaja de que el lípido nativo se ha eliminado prácticamente en su totalidad, lo que permite controlar de manera precisa la composición lipídica y además, es más fácil optimizar el ratio MSP:lípido. Un factor a tener en cuenta es que la presencia de glicerol por encima del 4 %, a menudo usado para la preservación de proteínas purificadas, puede interferir en el proceso de formación del nanodisco, por lo que es conveniente eliminarlo.

Tras la incubación de la muestra durante un breve periodo de tiempo a una temperatura cercana, siempre por encima de la T_m del lípido correspondiente, se elimina el detergente del medio lo que lleva a la MSP a ensamblar los nanodiscos. La elección de la temperatura es un punto importante en la formación de los nanodiscos, ya que es necesario que los lípidos adopten la fase de líquido cristalino que confiere

Introducción

fluidez a la bicapa. Si en la mezcla inicial se halla presente una proteína integral de membrana solubilizada en detergentes, al eliminar los detergentes, ésta se incorporará dentro de la bicapa de los nanodiscos (Figura I13) (Bayburt et al. 2002, Nath et al. 2007).

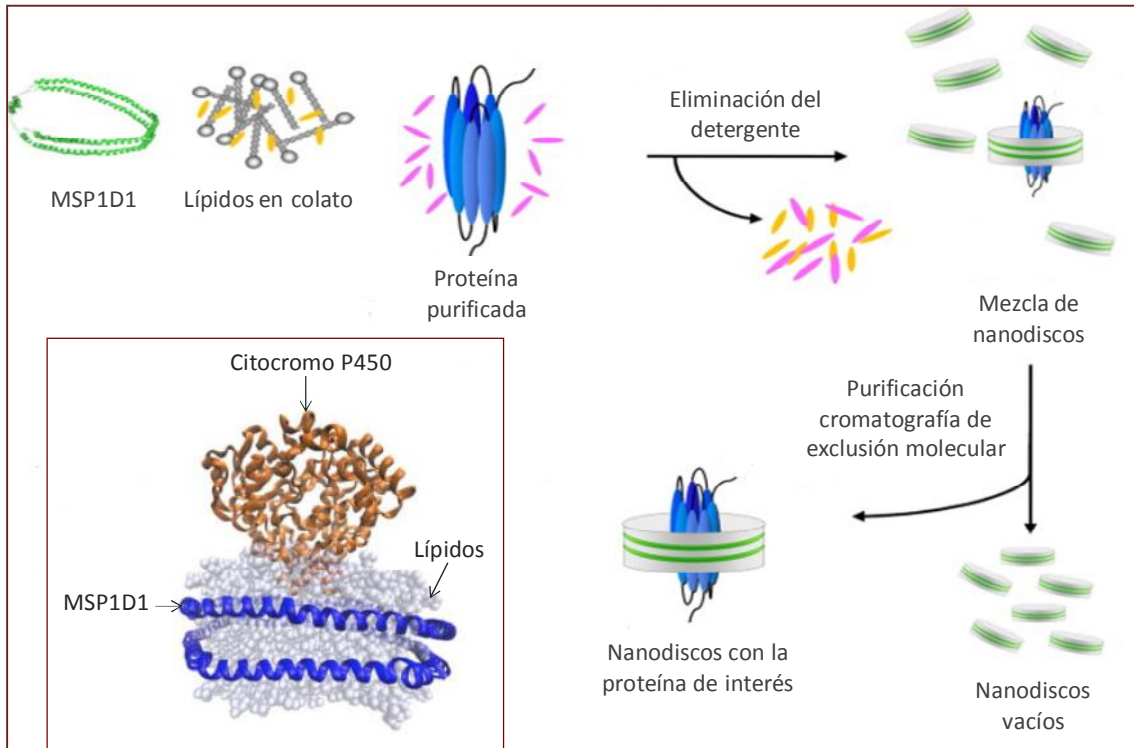


Figura I13: Esquema de la inserción de una proteína de membrana en nanodiscos. La proteína de membrana purificada se mezcla con la proteína MSP elegida y con los lípidos solubilizados en detergente. Posteriormente, el detergente se elimina mediante la adición de Bio-beads. Durante la eliminación del detergente, se inicia el autoensamblaje de los nanodiscos. Tras la completa eliminación del detergente, los nanodiscos vacíos, sin la proteína de interés insertada, se separan de los portadores de la proteína mediante cromatografía de exclusión molecular debido a la diferencia de tamaño entre nanodiscos con y sin proteína. Figura adaptada de (Inagaki et al. 2012). **Recuadro interno: Ejemplo de una proteína insertada en un nanodisco tras el proceso de formación descrito arriba.** Se trata de un modelo del citocromo P450 3A4 (CYP 3A4) insertado en un nanodisco. Las dos copias de la proteína MSP se muestran en azul, la proteína insertada en naranja y la bicapa de lípidos, POPC en este caso, en azul claro. En este modelo, la proteína de interés se inserta en la bicapa sin llegar a atravesarla completamente (monotópica). Figura adaptada de (Marty et al. 2012).

7.2 Proteínas de membrana: Ventajas e inconvenientes del uso de nanodiscos

Se ha estimado que en una célula típica hasta el 30 % de los marcos abiertos de lectura codifican proteínas de membrana (T. J. Stevens 2000). Estas proteínas juegan un papel fundamental en muchas rutas biológicas (Phillips et al. 2009) y representan un grupo importante de dianas para drogas; por ejemplo, los receptores acoplados a

Introducción

proteínas G (GPCRs) son un blanco frecuente en tratamientos terapéuticos (Hopkins et al. 2002, Insel et al. 2012, Dror et al. 2013). Es por ello que su estudio ha crecido en los últimos años ya que es un campo que resulta atractivo. Pero las proteínas de membrana presentan, a su vez, limitaciones asociadas al rendimiento en la purificación y a la solubilización de forma funcional. Además, los lípidos que rodean a la proteína de membrana y pueden modular su mecanismo de acción son, en muchas ocasiones, únicos y por ello, es deseable que los estudios *in vitro* se lleven a cabo con las proteínas insertadas en un entorno de bicapa lipídica nativa (Shen et al. 2013). Por ello, se deben tener en cuenta algunos aspectos importantes a la hora de llevar a cabo la caracterización biológica de la proteína de membrana de interés:

- i) control preciso del entorno lipídico que rodea a la proteína.
- ii) control y definición del estado de oligomerización de la proteína.
- iii) permitir la interacción con los ligandos de la proteína independientemente de la topología la inserción.

Aunque tradicionalmente se han usado detergentes, bicapas lipídicas artificiales como liposomas o bicelas para proporcionar a las proteínas de membrana un entorno lo más fisiológico posible, ninguno de ellos satisface todos los criterios descritos anteriormente. Por su parte, la tecnología de nanodiscos satisface estos criterios y resulta interesante en el estudio de proteínas de membrana *in vitro* (Ritchie et al. 2009). Además, hay varios ejemplos recientes que demuestran el potencial de los nanodiscos como medio de administración de fármacos (*drug-delivery*) (Ng et al. 2013, Numata et al. 2013).

Las ventajas de los nanodiscos frente a otros sistemas de reconstitución de proteínas de membrana provienen de la capacidad de solubilizar una proteína de membrana sin la necesidad de detergentes, en un entorno de membrana y en partículas de tamaño definido y del orden de decenas de nanómetros (Nath et al. 2007). Además permiten estudiar la proteína de interés en un estado conocido, monomérico u oligomérico, cosa que resulta más difícil en otros sistemas, como liposomas o detergentes (Serebryany et al. 2012). Asimismo, tanto la unión de ligandos a la proteína de membrana desde el lado extracelular, como la interacción de las moléculas con el receptor por la cara interna, pueden ocurrir simultáneamente y se pueden estudiar en conjunto. Estas características, además, facilitan enormemente la aplicación de técnicas biofísicas como la fluorescencia, la ultracentrifugación analítica o la dispersión de luz tanto estática como dinámica (Nath et al. 2010, Inagaki et al. 2012, Monterroso et al. 2013). Por el contrario, otras técnicas, como la espectroscopía de infrarrojo o el dicroísmo circular, pueden ser más difíciles de usar con nanodiscos dada la presencia de la proteína MSP cuya señal interferiría con la de la propia proteína reconstituida.

7.3 Ejemplos de proteínas reconstituidas en nanodiscos: metodología y técnicas

Una muestra de la versatilidad de la tecnología de nanodiscos es la gran variedad de proteínas de membrana que han sido estudiadas con este sistema. Hay que recalcar que para cada proteína en cuestión se debe optimizar la metodología de formación de nanodiscos de forma que la proteína se acomode de la mejor manera posible. Algunas de las proteínas reconstituidas en nanodiscos incluyen:

- i) integrinas (Ye et al. 2010)
- ii) citocromos P450 (Bayburt et al. 2002, Civjan et al. 2003, Baas et al. 2004, Duan et al. 2004, Denisov et al. 2006, Das et al. 2007, Denisov et al. 2007, Kijac et al. 2007, Nath et al. 2007, Grinkova et al. 2008, Das et al. 2009, Grinkova et al. 2013, Luthra et al. 2013)
- iii) receptores acoplados a proteínas G en forma monomérica y como dímeros (Leitz et al. 2006, Bayburt et al. 2007, Marin et al. 2007, Knepp et al. 2013)
- iv) otros receptores (Boldog et al. 2006, Boldog et al. 2007, Mi et al. 2008)
- v) bacteriorodopsina en forma monomérica o como trímeros (Bayburt et al. 2003, Bayburt et al. 2006, Etkorn et al. 2013)
- vi) toxinas (Borch et al. 2008, Akkaladevi et al. 2013)
- vii) factor tisular proteico de coagulación sanguínea (Shaw et al. 2007, Morrissey et al. 2008)
- viii) complejo proteico SecYEG del translocón (Alami et al. 2007, Dalal et al. 2009)
- ix) oxidasa monoamino (Cruz et al. 2007)

Los nanodiscos no sólo son útiles a la hora de insertar proteínas de membrana sino también para trabajar con proteínas anfitrópicas, que pueden encontrarse tanto en disolución como asociadas a lípidos. En el trabajo de (Springer et al. 2013) se describe cómo una proteína anfitrópica, con actividad ATPásica, regula su actividad gracias al contexto lipoproteico que le proporcionan los nanodiscos.

El potencial de los nanodiscos se refleja en el poder y versatilidad que proporcionan en diversas técnicas y metodologías, tanto bioquímicas como biofísicas, para el estudio de proteínas de membrana insertadas en estos sistemas. Se han aplicado diversas metodologías para el estudio de proteínas de membrana reconstituidas en nanodiscos, entre las que se incluyen:

- i) resonancia magnética nuclear en estado sólido (RMN) (Li et al. 2006, Kijac et al. 2007, Raschle et al. 2009, Etkorn et al. 2013, Puthenveetil et al. 2013, Tzitzilonis et al. 2013)
- ii) electroforesis de flujo libre (*free flow electrophoresis*) (Justesen et al. 2013)
- iii) métodos de fluorescencia de molécula única (Nath et al. 2008, Nath et al. 2010, Hernandez-Rocamora et al. 2012)

Introducción

- iv) estudios de unión de ligando mediante resonancia de plasmón superficial (SPR) (Gluck et al. 2011)
- v) dispersión de neutrones a bajo ángulo (SANS) (Mahabir et al. 2013)
- vi) espectroscopía de resonancia de spin electrónico (ESR) (Bordignon et al. 2013)
- vii) dispersión de neutrones (Clifton et al. 2013)
- viii) ensayos de poros de fusión (Shi et al. 2012)
- ix) ultracentrifugación analítica (Alami et al. 2007, Ye et al. 2010, Hernandez-Rocamora et al. 2012, Inagaki et al. 2012)
- x) solubilización de receptores funcionales (Leitz et al. 2006, Bayburt et al. 2007, Boldog et al. 2007, Mi et al. 2008)
- xi) dispersión de luz dinámica (Hernandez-Rocamora et al. 2012, Inagaki et al. 2012)
- xii) dispersión de rayos-X a bajo ángulo (SAXS) (Skar-Gislinge et al. 2011)

En la literatura se describen numerosos métodos para determinar las dimensiones de los nanodiscos. Éstos incluyen la cromatografía de exclusión molecular, la dispersión de rayos-X a bajo ángulo, la microscopía de sonda de barrido (*scanning probe microscopy*) y la microscopía electrónica (Bayburt et al. 2002, Bayburt and Sligar 2003, Bayburt et al. 2007). Mientras que para determinar la estequiometría lipídica se ha usado el recuento de centelleo de nanodiscos preparando fosfolípidos tritizados (Bayburt et al. 2002), RMN ^1H (Inagaki et al. 2012) y HPLC combinado con espectrometría de masas con cuadrupolos en tándem (HPLC/MS/MS) (Inagaki et al. 2012).

La formación de complejos de proteínas de membrana en nanodiscos se ha determinado mediante FRET (Bayburt et al. 2011) o técnicas de imagen de molécula única usando proteínas de membrana modificadas con Cy3 y Cy5 (Whorton et al. 2007). En el caso concreto de la rodopsina y bacteriorodopsina, también se han usado la centrifugación en gradiente de densidad monitorizando la absorbancia a 500 nm (Bayburt et al. 2007) y el dicroísmo circular en el visible debido a las bandas de absorbancia del grupo prostético retinal (Bayburt et al. 2006), respectivamente, para analizar los estados oligoméricos de las proteínas una vez se insertaron en el nanodisco. El uso de estas técnicas ha sido posible con estas dos proteínas ya que poseen el retinal como cromóforo natural, lo que les confiere propiedades diferentes de las proteínas no marcadas.

La presente tesis se estructura de la siguiente manera: se comienza con la caracterización biofísica e hidrodinámica de nanodiscos vacíos de distinta composición lipídica, continuando con el estudio biofísico y estructural de nanodiscos que incorporan a la proteína del protoanillo de *E. coli* ZipA, así como la interacción de esta proteína con FtsZ y, para finalizar, el estudio preliminar de la proteína de división tardía del divisoma de *E. coli*, FtsN, reconstituida en nanodiscos.

Objetivos

Objetivos

El objetivo general de esta tesis fue poner a punto el sistema de nanodiscos como soporte para el estudio de interacciones entre proteínas del divisoma de *E. coli*. Este trabajo es pionero en España, tanto en el uso del sistema de nanodiscos para insertar proteínas de membrana, como en la aplicación de este sistema para medir interacciones entre proteínas de forma cuantitativa.

Los objetivos específicos de la tesis fueron:

- Producción y caracterización biofísica, bioquímica y estructural de nanodiscos.
- Reconstitución de la proteína de división ZipA en nanodiscos y estudio cuantitativo y estructural de su interacción con la proteína FtsZ.
- Reconstitución de la proteína del divisoma FtsN en nanodiscos. Para llevar a cabo este objetivo fue necesaria la previa puesta a punto del protocolo de purificación de esta proteína.

Materiales y Métodos

Materiales y Métodos

Materiales y Métodos

1. Listado de tampones

Tampones	Composición
Conservación de ZipA	Tris-HCl 40 mM pH 8.0, NaCl 500 mM, Triton X-100 0.02%
Nanodiscos	Tris-HCl 20 mM pH 7.4, NaCl 0.1 M, EDTA 0.5 mM
A (FtsN)	Tris-HCl 20 mM pH 8.0, NaCl 0.5 M, imidazol 5 mM, Triton X-100 1%
B (FtsN)	Tris-HCl 20 mM pH 8.0, NaCl 0.5 M, colato 20 mM
C (FtsN)	Tris-HCl 20 mM pH 7.4, NaCl 0.1 M, EDTA 1 mM, colato 20 mM
D (TEV)	Tris-HCl 50 mM pH 7.0, NaCl 0.3 M
E (TEV)	Tris-HCl 20 mM pH 7.5, EDTA 1 mM
PBS	Fosfato sódico 10 mM pH 7.4, NaCl 140 mM, KCl 2.7 mM
Elución de anticuerpos	Glicina 200 mM pH 2.7, EGTA 1 mM
F (ZipA)	Tris-HCl pH 50 mM 7.5, NaCl 0.5 M, imidazol 5 mM
G (ZipA)	Tris-HCl pH 50 mM 7.5, NaCl 0.5 M, imidazol 500 mM
TBE 0.5 X	Tris-Borato 50 mM pH 8.0, EDTA 1 mM
Marcaje de FtsZ	Hepes-HCl 20 mM pH 8.0, KCl 50 mM, MgCl ₂ 5 mM, EDTA 1 mM
Digestión de MSP1D1	Tris-HCl 50 mM pH 8.0, NaCl 0.5 M
Z (FtsZ)	Tris-HCl 50 mM pH 7.5, KCl 0.5 M, MgCl ₂ 5 mM
H (diálisis Nd-FtsN)	Tris-HCl 50 mM pH 8.0, NaCl 0.3 M, imidazol 50 mM

Materiales y Métodos

2. Purificación de proteínas

2.1 Purificación de MSP1D1

La proteína de andamiaje MSP1D1 (24656 Da), la cual produce discos de 10 nm de diámetro y contiene una cola de histidinas en su N-terminal seguida por un sitio de reconocimiento para la proteasa TEV, se purificó como se describe en (Bayburt et al. 2002, Denisov et al. 2004). Se almacenó a -80 °C.

2.2 Purificación de FtsZ

La proteína FtsZ (40324 Da) de *E. coli* se purificó mediante el método de precipitación inducido por calcio descrito en (Rivas et al. 2000) y se almacenó a -80 °C.

2.3 Purificación de ZipA

La proteína His₆-ZipA (a partir de ahora ZipA, 38639 Da), se produjo a partir de la cepa de *E. coli* BL21(DE3)pLysS transformada con el plásmido pET-15ZIP y se purificó siguiendo el protocolo descrito en (RayChaudhuri 1999) con pequeñas modificaciones. Las fracciones obtenidas mediante cromatografía de afinidad con columna de níquel (His-Bind Resin) que contenían ZipA se dializaron frente a Tris-HCl 40 mM pH 8.0, NaCl 500 mM, Triton X-100 0.02 % v/v, se concentraron y se guardaron a -80 °C.

2.4 Purificación de s1ZipA (ZipA Δ (1-25)) y s2ZipA (ZipA Δ (1-188))

El mutante s₁ZipA carece del dominio transmembrana de ZipA, y por lo tanto se comporta como una proteína soluble. s₂ZipA, además carece del dominio desestructurado que sigue al dominio transmembrana, con lo que consiste únicamente en el dominio globular de ZipA encargado de la interacción con FtsZ. Ambas proteínas, portadoras de una cola de histidinas, se purificaron con el protocolo descrito para s₁ZipA en (López Navajas 2007, Martos et al. 2010) y se almacenaron a -80 °C.

2.5 Purificación de FtsN

La proteína His₆-FtsN (a partir de ahora FtsN, 39613 Da), se produjo a partir de la cepa C41(DE3) de *E. coli* transformada con el plásmido pARV65, cedido por el laboratorio del Dr. Miguel Vicente en el Centro Nacional de Biotecnología, Madrid.

La cepa se cultivó a 37 °C en medio LB (Maniatis T. 1982) con kanamicina (50 g/ml) hasta que alcanzó una densidad óptica a 600 nm (D.O.₆₀₀) de 0.4. A continuación se indujo la expresión con IPTG 1 mM durante 3 h a 30 °C. Las células se recogieron por centrifugación (5000 g, 15 min, 4 °C) y se congelaron a -80 °C hasta su utilización.

Materiales y Métodos

Para extraer la proteína, se resuspendieron las células en 20 ml de tampón de nanodiscos (Tris-HCl 20 mM pH 7.4, NaCl 0.1 M, EDTA 0.5 mM) suplementado con un cóctel inhibidor de proteasas libre de EDTA (Roche), usando media pastilla disuelta en 1 ml de tampón de nanodiscos por cada 20 ml. Tras la lisis del cultivo por sonicación en hielo, la fracción insoluble en la cual reside FtsN, se separó de la fracción soluble (sobrenadante) mediante centrifugación (10000 *g*, 30 min, 4 °C) y se resuspendió en 20 ml de tampón A (Tris-HCl 20 mM pH 8.0, NaCl 0.5 M, imidazol 5 mM, Triton X-100 1 %) suplementado con el cóctel inhibidor de proteasas descrito anteriormente (media pastilla disuelta en 1 ml de tampón A por cada 20 ml). Un posterior ciclo de sonicación e incubación del extracto 15 min a 4 °C aseguró una correcta solubilización de FtsN. Por último, la fracción soluble, que contiene FtsN solubilizada con Triton X-100, se separó del resto por centrifugación (10000 *g*, 30 min, 4 °C).

El extracto enriquecido en la proteína FtsN se purificó mediante cromatografía de afinidad usando una columna de 5 ml de sefarosa quelante cargada con níquel, equilibrada en tampón A. FtsN, que queda retenida en la columna por afinidad, se eluyó con un gradiente discontinuo de imidazol (50 mM, 100 mM, 500 mM) en el tampón B (Tris-HCl 20 mM pH 8.0, NaCl 0.5 M, colato 20 mM). El imidazol compite con las histidinas de FtsN por unirse al níquel inmovilizado en la columna desplazando a FtsN de su unión a la columna. La mayor parte de la proteína eluyó a 500 mM de imidazol. Se añadió EDTA 1 mM a las fracciones recogidas que contenían FtsN. Las fracciones se recogieron, se analizaron por electroforesis SDS-PAGE (Laemmli 1970) y se cuantificaron midiendo la absorbancia a 280 nm ($\epsilon_{\text{FtsN}} = 33460 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Para conservar la proteína purificada, ésta se dializó en tampón C (Tris-HCl 20 mM pH 7.4, NaCl 0.1 M, EDTA 1 mM, colato 20 mM), se concentró y se almacenó en alícuotas a -80 °C. El rendimiento de la purificación fue de ~5 mg de proteína por litro de cultivo. La pureza de FtsN fue mayor del 90 %, siendo su migración electroforética compatible con una masa molecular de ~40 kDa.

2.6 Purificación de la proteasa TEV

La proteasa TEV (27000 Da) se produjo a partir de la cepa de *E. coli* BL21(DE3) transformada con el plásmido pOP385, que codifica el mutante S219V de esta proteasa.

Esta cepa se cultivó a 37 °C en medio LB con cloramfenicol (50 g/ml) y ampicilina (50 g/ml) hasta una D.O.₆₀₀ de 0.9. Tras dejar enfriar 20 min a 4 °C, la expresión de la proteína se indujo mediante la adición de IPTG a 1 mM, y la incubación durante toda la noche a 15 °C. Las células se recogieron por centrifugación (7000 *g*, 15 min, 4 °C) y se congelaron a -80 °C hasta su utilización.

Para extraer la proteína, se resuspendieron las células en 32 ml de tampón D (Tris-HCl 50 mM pH 7.0, NaCl 0.3 M). Se sonicaron en hielo en un sonicador Branson 150 y se volvieron a centrifugar a 66000 *g*, 20 min a 4 °C. La fracción soluble obtenida tras la centrifugación se purificó mediante cromatografía de afinidad en una resina de

Materiales y Métodos

5 ml de sefarosa quelante cargada de níquel (columna HiTrap HP; GE Healthcare), previamente equilibrada en tampón D.

La proteasa TEV, que quedó retenida en la columna por afinidad, se eluyó con un gradiente continuo de imidazol de 5 mM a 1 M en tampón D en un aparato de cromatografía líquida a baja presión (FPLC) ÄKTA prime (Amersham Pharmacia Biotech). La proteína TEV eluyó a 500 mM imidazol. Las fracciones se recogieron, se cuantificaron midiendo la absorbancia a 280 nm y las fracciones más concentradas se juntaron y dializaron en tampón E (Tris-HCl 20 mM pH 7.5, EDTA 1 mM) a 4 °C durante toda la noche.

A continuación, la muestra se cargó en una columna de intercambio catiónico de 5 ml (Sefarosa SP FF; GE Healthcare), previamente equilibrada en tampón E. La proteína se eluyó mediante un gradiente continuo de tampón E a tampón E + NaCl 1 mM en el equipo de FPLC ÄKTA prime. La proteína TEV eluyó a 500 mM NaCl aproximadamente. Las fracciones se recogieron, se analizaron por electroforesis SDS-PAGE, se cuantificaron midiendo la absorbancia a 280 nm ($\epsilon_{\text{TEV}} = 31860 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y se almacenaron a -80 °C tras la adición de glicerol al 50 %. El rendimiento de la purificación fue de ~5 mg por litro de cultivo de TEV. La pureza de TEV fue mayor del 90 %, siendo su migración electroforética compatible con una masa molecular de ~25 kDa.

3. Síntesis y preparación de los péptidos inhibidores de la interacción ZipA/FtsZ derivados del extremo C-terminal de FtsZ

El péptido CTZ-WT contiene la secuencia correspondiente a los aminoácidos 367-383 de FtsZ (KEPDYLDIPAFLRKQAD) y es capaz de interactuar con la proteína ZipA. El péptido CTZ-MUT (KRNDWTNIMAFLLKQAD) contiene una serie de mutaciones sobre dicha secuencia que le confieren mayor afinidad por ZipA (Kenny et al. 2003). Ambos péptidos fueron sintetizados por el servicio de Química de Proteínas del CIB mediante tecnología de fase sólida. Los péptidos se purificaron en el laboratorio mediante cromatografía en fase reversa usando una columna Vydac 218TP (Grace) de 1x25 cm y se comprobó que los valores de masa eran los correctos mediante el servicio de espectrometría de masas. Los valores de los coeficientes de extinción molar teóricos que se usaron para el cálculo de las concentraciones fueron 1490 y 5500 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$, calculados a partir de la secuencia de los péptidos (Gill et al. 1989), para CTZ-WT y CTZ-MUT, respectivamente. Las alícuotas se liofilizaron para su almacenamiento.

Materiales y Métodos

4. Técnicas inmunológicas

4.1 Técnica de *western-blot*

Esta técnica consiste en la transferencia de proteínas desde un gel de electroforesis a una membrana y la detección específica de estas proteínas mediante el uso de anticuerpos. La detección de los anticuerpos unidos suele realizarse mediante quimioluminiscencia.

Primero, las muestras que contenían la proteína a analizar, se sometieron a una electroforesis SDS-PAGE en gels al porcentaje de acrilamida indicado. Después éstas se transfirieron a membranas de PVDF (di-fluoruro de polivinilideno) según el método descrito en (Reim et al. 1994). La membrana se saturó con leche en polvo al 2 % (p/v) en tampón PBS (Fosfato sódico 10 mM pH 7.4, NaCl 140 mM, KCl 2.7 mM) mediante incubación a 4 °C durante toda la noche. Tras tres lavados de 5 min con tampón PBS, se incubó a temperatura ambiente con agitación suave durante 2 h en presencia del anticuerpo primario. Para la detección de FtsN se usó un antisuero aislado de conejo inmunizado con proteína purificada, generosamente cedido por el laboratorio del Dr. Miguel Vicente, CNB-CSIC, Madrid, y se usó en una dilución 1:5000. Posteriormente se repitieron los lavados con tampón PBS y la membrana se incubó durante 1 h a temperatura ambiente y agitación suave con proteína A-peroxidasa (ref.P8651, Sigma-Aldrich) en dilución 1:3000. Finalmente, tras tres lavados con tampón PBS a temperatura ambiente, las bandas se revelaron con el kit *BM Chemiluminescence Blotting Substrate* (POD) de Roche.

4.2 Técnica de *dot-blot*

Esta técnica representa una simplificación respecto a la técnica *western blot*, ya que no se hace una cromatografía para detectar las proteínas, sino que se aplica directamente una gota que contiene la proteína de interés sobre una membrana. La detección se lleva a cabo con anticuerpos específicos frente a la proteína de interés, como en el *western blot*.

Para este tipo de ensayo las muestras se depositaron directamente en gotas con la cantidad de muestra indicada formando una matriz en una membrana seca de nitrocelulosa (ref. 162-0112, BioRad). La membrana se incubó con 2 % de leche en polvo en tampón PBS durante 1 h a temperatura ambiente para bloquear los sitios de unión inespecíficos y posteriormente, con una dilución 1:1000 del anticuerpo correspondiente en 1 % de leche en polvo en tampón PBS. La presencia del anticuerpo unido a la membrana se detectó incubando con proteína A-peroxidasa y el kit de Roche tal y como se hizo para la técnica de *western-blot*.

Materiales y Métodos

4.3 Purificación del suero anti-ZipA

El suero anti-ZipA fue generosamente cedido por el laboratorio del Dr. Miguel Vicente del Centro Nacional de Biotecnología, Madrid. El suero provenía de conejos inmunizados frente a la proteína purificada His₆-ZipA. Posteriormente se purificó este suero para aislar los anticuerpos dirigidos al dominio de interacción con FtsZ de la proteína ZipA (ZBD). Para ello, se usó el mutante s₂ZipA, el cual contiene el dominio ZBD unido a una cola de histidinas, y se siguió el protocolo descrito en (Talian et al. 1983). Brevemente, s₂ZipA se sometió a una electroforesis SDS-PAGE en un gel del 15 % de poliacrilamida y luego se transfirió a una membrana de nitrocelulosa (ref.162-0112, BioRad) mediante electrotransferencia. Se tiñó la membrana con rojo Ponceau (BioRad), se cortó la banda correspondiente a s₂ZipA y se lavó abundantemente con tampón PBS. La membrana recortada se incubó durante toda la noche a 4 °C con tampón PBS que contenía 2 % de leche en polvo para bloquear los sitios de unión no específicos. Tras lavar la membrana con tampón PBS se incubó con suero anti-ZipA durante 2 h a temperatura ambiente y se volvió a lavar abundantemente con tampón PBS. Finalmente, los anticuerpos unidos a la membrana se eluyeron usando tampón glicina 200 mM pH 2.7, EGTA 1 mM. La solución que contenía los anticuerpos eluidos se neutralizó con Tris-HCl 100 mM pH 7.4 hasta que el pH llegó a 7.0, se alicuotó y se almacenó a -80 °C.

La especificidad del anticuerpo se comprobó mediante un ensayo *dot-blot*, en el que se depositaron gotas con 50 pmol de ZipA, s₁ZipA, s₂ZipA, Nd-ZipA y nanodiscos vacíos sobre la membrana seca de nitrocelulosa, revelada como se indica más arriba.

4.4 Purificación de los complejos Nd-ZipA con los anticuerpos

Se incubaron 130 pmol de Nd-ZipA o nanodiscos vacíos durante toda la noche a 4 °C con 67 µl del suero anti-ZipA purificado. Las mezclas se purificaron mediante cromatografía de afinidad, gracias a la presencia de la cola de histidinas tanto en ZipA como en MSP1D1.

Primero se incubó la mezcla de nanodiscos y suero con 250 µl de sefárosa quelante cargada con níquel, previamente equilibrada en tampón F (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 0.5 M, imidazol 5 mM). Tras lavar con 3 ml de tampón F los nanodiscos inmovilizados se eluyeron con tampón G (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 0.5 M, imidazol 500 mM). Los anticuerpos que se unan a ZipA eluirán junto con los Nd-ZipA.

La presencia de anticuerpos en la elución, tanto la de nanodiscos vacíos como la de Nd-ZipA, se comprobó mediante un ensayo de *dot-blot* en el cual se depositaron 2 µl de la elución en una membrana de nitrocelulosa seca junto con tres controles: 2 µl de suero anti-ZipA purificado, 2 µl de Nd-ZipA 4.7 µM y 2 µl de nanodiscos vacíos 16.6 µM. Tras la incubación de la membrana con tampón PBS y 2 % de leche en polvo, se detectó la presencia de los anticuerpos con el conjugado de proteína A con peroxidasa (Roche) que se indica en el método de *dot-blot*.

Materiales y Métodos

5. Técnicas de proteínas

5.1 Cuantificación de proteínas

En esta tesis se han usado dos métodos diferentes para medir la concentración de proteínas en una disolución: el método de Bradford (Bradford 1976) y la espectroscopía de absorción UV-Vis usando la ecuación de Lambert-Beer y el coeficiente de extinción molar.

El ensayo de Bradford se basa en el máximo de absorbancia de una solución ácida de *Coomasie Brilliant Blue*, que pasa de 465 nm a 595 nm cuando se une a las proteínas. Tanto las interacciones hidrofóbicas como las iónicas estabilizan la forma aniónica del colorante, causando un cambio de color visible. La cantidad de proteína que se puede cuantificar de manera fiable por este método está en el rango de 0.2-20 μg .

Se preparó una curva estándar de absorbancia frente a cantidad de proteína conocida, en este caso 0-16 μg de albúmina de suero bovino (BSA; Sigma-Aldrich) y se usó para estimar la concentración de la muestra de proteína. Las reacciones se produjeron incubando 20 μl de muestra con 1 ml de reactivo (Biorad) diluido 1:5 en agua durante 5 min a temperatura ambiente. Después se midió la absorbancia a 595 nm de las muestras en un espectrofotómetro UV-Vis Ultrospec 3000 pro (Amersham Pharmacia Biotech).

Otro método para estimar la concentración de proteínas es el que utiliza el coeficiente de extinción molar de la proteína a 280 nm. En esta longitud de onda, los aminoácidos aromáticos (triptófano, tirosina y fenilalanina) absorben luz. La relación entre absorbancia y concentración de proteína se determina por la ecuación de Lambert-Beer:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

donde ε es el coeficiente de extinción molar, c es la concentración, l es el paso óptico de la cubeta utilizada para medir la absorbancia (cm) y A es la absorbancia a 280 nm.

Proteínas	ε ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)	MW (g/mol)
<i>FtsZ</i>	14000	40324
<i>ZipA</i>	15930	38639
<i>FtsN</i>	33460	39613
<i>MSP1D1</i>	21000	24656
<i>TEV</i>	31860	27000
<i>FtsA</i>	33527	47624

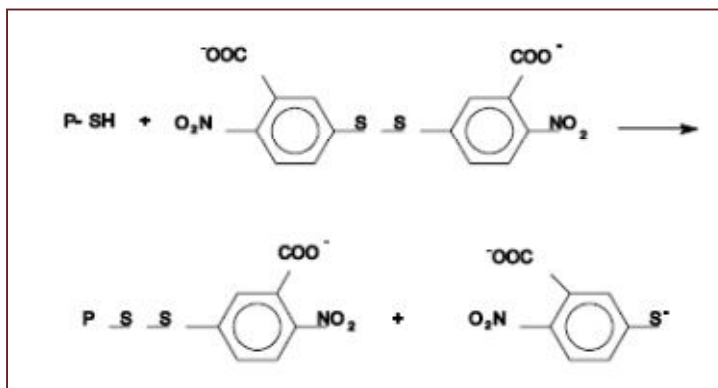
Tabla M1 : Coeficientes de extinción molar y masas moleculares de las proteínas de interés en esta tesis.

Las mediciones se llevaron a cabo en un espectrofotómetro UV-Vis Ultrospec 3000 pro (Amersham Pharmacia Biotech). Las masas moleculares de proteína que se dan en la Tabla M1 corresponden a monómeros de proteína.

Materiales y Métodos

5.2 Determinación de cisteínas libres

Para la valoración de los grupos tiol (-SH) de las cisteínas de una proteína se utilizó el reactivo de Ellman (Evans et al. 1959), ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzónico (DTNB), que es específico de sulfhidrilos. Esta reacción transcurre de forma estequiométrica como se indica a continuación (Reacción M1) donde se produce un mol de anión 2-nitro-5-tiobenzoato por mol de grupo sulfhidrilo de la proteína, lo que hace posible la determinación de las cisteínas libres en una proteína.



Reacción M1: Reacción de Ellman.

Este producto, TNB (2-nitro-5-tiobenzoato), tiene color amarillo con máximo de absorción a 412 nm y un coeficiente de extinción molar de $14150 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, lo que hace que la reacción sea fácil de estudiar espectrofotométricamente.

A partir del espectro se calcula la concentración de proteína por medio de su absorbancia a 280 nm. La cantidad de tioles libres por molécula se calcula como:

$$n = \frac{(Abs_{412nm}^{DTNB} - Abs_{412nm}^{blanco})}{\epsilon_{412nm}^{DTNB}} \frac{1}{C_{proteína}}$$

Ecuación M1 : Ecuación para calcular el número de tioles libres por molécula.

donde n son moles de tiol por mol de proteína, $\epsilon_{412nm}^{DTNB} = 14150 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ es el coeficiente de extinción molar del DTNB y $C_{proteína}$ es la concentración molar de la proteína.

5.3 Electroforesis en condiciones nativas (CN-PAGE)

Al contrario que la electroforesis SDS-PAGE, en este caso se realiza la electroforesis en condiciones no desnaturizantes. De esta forma se pueden estudiar complejos formados por distintas proteínas que en la técnica de SDS-PAGE estarían disociados. En la CN-PAGE la migración de las proteínas no sólo depende del tamaño molecular sino también de la forma y la carga de la proteína por lo que no se puede

Materiales y Métodos

determinar de forma precisa la masa molecular. En este trabajo se usó la electroforesis en condiciones nativas para comprobar que los nanodiscos de ZipA efectivamente migraban como una única especie.

Se usaron geles al 8 % de acrilamida preparados en tampón TBE 0.5 X (Tris-Borato 50 mM pH 8.0, EDTA 1 mM). La electroforesis se corrió a 10 V/cm en tampón TBE 0.5 X a 4 °C durante 3.5 h (Schagger et al. 1994).

5.4 Marcaje fluorescente de proteínas

Las proteínas se marcaron usando sonda fluorescente reactiva a grupos amino. La sonda usada fue *Alexa-488 carboxylic acid succinimidyl ester* (ref.A20000) que se adquirió en Invitrogen (Oregon, USA).

FtsZ se marcó fluorescentemente con la sonda Alexa-488 como se describe en (Jimenez et al. 2011, Reija et al. 2011). Brevemente, FtsZ se dializó en tampón Hepes-HCl 20 mM pH 8.0, KCl 50 mM, MgCl₂ 5 mM, EDTA 1 mM y después se incubó a 30 °C en presencia de CaCl₂ 20 mM, GTP 2 mM y la sonda fluorescente en una relación molar 2:1 sonda:proteína, que reaccionará con los grupos amino expuestos. La reacción de marcaje se paró mediante la adición de Tris-HCl a una concentración final de 50 mM. Dado que durante el marcaje FtsZ está en condiciones de polimerización, con este protocolo se minimiza la posibilidad de que la sonda reaccione con residuos implicados en la polimerización. La relación de marcaje resultante fue de ~0.4 mol Alexa-488 por mol de FtsZ.

5.5 Digestión de MSP1D1 con TEV

MSP1D1 contiene una secuencia de corte reconocida por la proteasa TEV (ENLYFQG) entre la cola de 6 histidinas del N-terminal y el resto de la proteína. Esto permite eliminar la cola de histidinas mediante una digestión con la proteasa TEV, que corta entre los residuos Gln y Gly dentro de la secuencia de corte. La proteína obtenida sin cola de histidinas se designa MSP1D1(-) y permite reconstituir nanodiscos que no se retienen en una columna de níquel excepto si son portadores de alguna proteína reconstituida en ellos que sí presente cola de histidinas.

La incubación y posterior purificación se llevaron a cabo como se describe en (Denisov et al. 2004). Brevemente, la proteína se incubó con TEV usando un ratio molar TEV:MSP1D1 1:200, en tampón de nanodiscos con la adición de 1 mM DTT, durante toda la noche y a temperatura ambiente. Tras dializar frente a tampón Tris-HCl 50 mM pH 8.0, NaCl 0.5 M, la muestra se pasó por una columna de séfaroza quelante cargada con níquel. La proteína digerida es incapaz de unirse a la columna y por tanto se recoge en el *flow-through*.

Materiales y Métodos

6. Formación de nanodiscos

6.1 Lípidos

El extracto polar de lípidos de *E. coli* (formado por 57.5 % PE, 15.1 % PG, 9.8 % CA, 17.6 % desconocido; Mw= 798.9 g/mol) (ref.100600P), la L- α -fosfatidilcolina de huevo de gallina (formado por dipalmitoilfosfatidilcolina (16:0-DPPC, 32.7 %), la dioleoilfosfatidilcolina (18:1-DOPC, 32.0 %)) (ref. 840051) y el lípido etiquetado con la sonda fluorescente lisamina rodamina B (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(lissamine rhodamine B sulfonyl) (ammonium salt)) (ref. 810150) se adquirieron en Avanti Polar Lipids. La fosfatidilcolina sintética (2-Oleoyl-1-palmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, POPC o PC (16:0/18:1); Mw= 760.08 g/mol) (ref. 42773) se adquirió en Sigma-Aldrich. Se compraron como polvo seco y se resuspendieron en una mezcla 2:1 de cloroformo y metanol y se almacenaron en alícuotas a -20 °C. Los disolventes fueron siempre de calidad espectroscópica.

Para resuspender los lípidos antes de la preparación de nanodiscos, la cantidad requerida de lípidos se transfirió a tubo de vidrio con una jeringa Hamilton y se secó bajo una corriente de N₂ hasta que se formó una película fina en el fondo del tubo. Los lípidos se resuspendieron en tampón de nanodiscos con 100 mM de colato sódico hasta obtener una concentración de lípidos 50 mM. La resuspensión se consiguió en 3-4 ciclos de 30 segundos de incubación a 37 °C en un baño de agua seguido de agitación vigorosa en vórtex.

Los lípidos se transfirieron a un tubo eppendorf y se sonicaron brevemente en un sonicador Branson 150 hasta que se obtuvo una disolución transparente.

6.2 Cuantificación de fosfolípidos

La determinación del número de fosfolípidos por nanodisco se realizó mediante el protocolo descrito por (Stewart 1980). Para ello, se llevó la muestra de nanodiscos a un volumen total de 100 μ l con tampón de nanodiscos quedando una concentración final de 5-10 μ M. Se mezcló en tubos de vidrio con 1.9 ml de cloroformo y 1 ml de reactivo de tiocianato (FeCl₃ 0,1 M y NH₄SCN 0.4 M), se agitaron vigorosamente los tubos cerrados mediante vórtex durante 1 min y se dejaron en reposo a temperatura ambiente durante 30 min para que se separaran las dos fases: clorofórmica (inferior del tubo) y acuosa (superior del tubo). Los fosfolípidos formaron un complejo con el tiocianato y pasaron a la fase clorofórmica, de forma que se recogió la fase clorofórmica y se midió la absorbancia a 488 nm. La cantidad de fosfolípido se determinó a partir de una curva realizada con estándares de concentración conocida de fosfatidilcolina de huevo, para todos los casos, siendo el rango de medida entre 0.1 y 1 mg/ml de fosfolípidos (Figura M1).

Materiales y Métodos

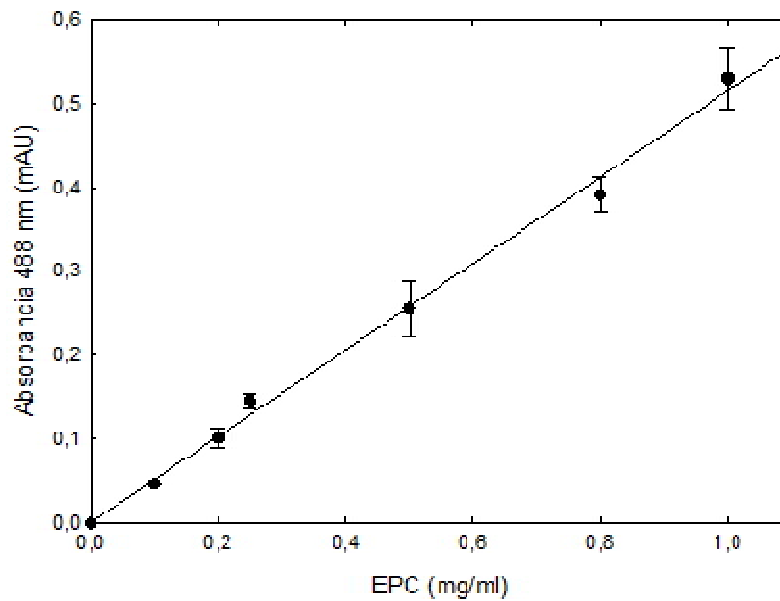


Figura M1: Recta patrón para la cuantificación de fosfolípidos por nanodisco mediante el método de Stewart. El experimento se llevó a cabo por triplicado. Las barras de error representan la desviación estándar de 3 medidas independientes.

Con el fin de disponer de otro valor con el que poder comparar el resultado obtenido mediante el protocolo descrito anteriormente, y ya que se disponía de los datos necesarios para ello, se llevó a cabo el cálculo de la estequiometría lipídica según el procedimiento descrito en (Inagaki et al. 2012) haciendo uso de valores obtenidos mediante velocidad de sedimentación (descripción de la técnica en el Apartado 7.1.1).

Este método consiste en comparar la señal correspondiente al pico principal de nanodiscos medidos por absorbancia con la señal de interferencia. Por absorbancia se puede conocer la concentración de proteína (MSP1D1), mientras que la interferencia detecta tanto lípidos como proteínas. La concentración de proteína se mide por absorbancia y de aquí se puede cuantificar su contribución a la señal de interferencia. La diferencia con la señal total de interferencia será la contribución de los lípidos a la señal de interferencia. A partir de este dato y calculando cuánto contribuye cada molécula de lípido a la señal de interferencia, se obtiene el número de lípidos por MSP1D1.

La señal del pico de nanodiscos en absorbancia e interferencia (S_{abs} y S_{if} , respectivamente) se obtiene integrando este pico en la distribución de coeficientes de sedimentación utilizando el programa SEDFIT (Schuck 2000). La concentración de proteína se obtiene a partir de S_{abs} , con la relación de Lambert-Beer, usando un coeficiente de extinción molar de $21000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para MSP1D1 (paso óptico del sistema de detección de 1.2 cm). La concentración de nanodiscos sería la mitad de la concentración de MSP1D1, al haber 2 moléculas de MSP1D1 en cada nanodisco. La

Materiales y Métodos

contribución teórica de una especie a la señal de interferencia, ε_j , viene dada por la Ecuación M2:

$$\varepsilon_j = \frac{M}{100} \cdot \frac{dn/dc}{\lambda}$$

Ecuación M2: Cálculo de la contribución de una especie a la señal de interferencia

donde M es la masa molar de la especie, dn/dc representa el cambio en el índice de refracción en función de la concentración de la especie y λ a la longitud de onda del láser del sistema de detección por interferencia. Para los lípidos se usó un valor de dn/dc de 0.164 cm³/g (Stora et al. 2000), mientras que para MSP1D1 este valor fue de 0.185 cm³/g (Padrick et al. 2010). El láser de la ultracentrífuga analítica tiene una λ de 655 nm. El número de lípidos por nanodiscos, $n_{\text{lípidos}}$, se calcula a partir de s_{if} , usando la Ecuación M3:

$$n_{\text{lípidos}} = \frac{s_{if} - 2c_{nd}\varepsilon_{MSP}}{c_{nd}\varepsilon_{\text{lípidos}}}$$

Ecuación M3: Cálculo del número de lípidos por nanodiscos a partir de datos de SV

donde c_{nd} corresponde a la concentración molar de nanodiscos y ε_{MSP} y $\varepsilon_{\text{lípidos}}$ corresponden a la contribución de cada molécula de MSP1D1 o de lípidos, respectivamente, a la señal de interferencia, calculada como se describe más arriba.

6.3 Nanodiscos vacíos

Para preparar los nanodiscos (Bayburt et al. (2002)) se mezclaron los lípidos, resuspendidos tal y como se explica anteriormente, en una proporción molar MSP1D1:lípido optimizada para cada tipo de lípido. Estas proporciones fueron de 1:65 para POPC y L- α -fosfatidilcolina de huevo de gallina, y de 1:60 para el extracto polar de lípidos de *E. coli*. La concentración final de lípidos en la mezcla se mantuvo en 8 mM. La concentración de colato resultante fue, de al menos 18 mM. La mezcla se incubó 1 h a 4 °C excepto en el caso del extracto polar de lípidos de *E. coli*, en el que la incubación se hizo a temperatura ambiente.

Para eliminar el detergente y promover la formación de los nanodiscos se incubó la mezcla durante 4 h a 4 °C en agitación con 500 mg/ml de microesferas adsorbentes BioBeads SM-2 (BioRad). Las BioBeads se separaron de la mezcla mediante el uso de puntas de micropipeta finas y alargadas en las que no penetran las *beads*. Posteriormente, la muestra se clarificó mediante centrifugación a 100000 g durante 30 min y 4 °C.

La purificación de los nanodiscos se llevó a cabo mediante cromatografía de exclusión molecular en un sistema de FPLC ÄKTA (Amersham Pharmacia Biotech)

Materiales y Métodos

usando una columna Superdex 200 HR 10/300 GL (GE Healthcare) previamente calibrada (Tabla M2).

Para esta calibración se usó tampón de nanodiscos y 100 μ l de cada uno de los siguientes marcadores de masa molecular conocida (Bayburt et al. 2002): Azul dextrano (1-2 mg/ml), Tiroglobulina (5 mg/ml), Ferritina (1.2 mg/ml), Catalasa (5 mg/ml) y BSA (8 mg/ml).

	Volumen pico (Vi)	Vi-Vo	Diámetro Stokes (nm)	Masa molecular (Da)
Dextrano	8.57			
BSA	14.64	6.07	7.1	67000
Catalasa	13.03	4.46	10.4	232000
Ferritina	11.31	2.74	12.2	440000
Tiroglobulina	9.70	1.13	17.0	669000

Tabla M2: Calibración de la columna Superdex 200 HR 10/300 GL (GE Healthcare) con los marcadores de masa molecular conocida.

Para separar los nanodiscos, los posibles agregados no específicos y la MSP1D1 libre se inyectó la mezcla en la columna calibrada y equilibrada en tampón de nanodiscos y se llevó a cabo una cromatografía de exclusión molecular fijando un flujo de 0.5 ml/min. Las fracciones correspondientes a los nanodiscos se juntaron, se concentraron mediante filtros Vivaspín (Sartorius) con una masa molecular de corte de 10000 Da y se conservaron en alícuotas a 4 °C (para uso inmediato) o a -20 °C. La concentración de los nanodiscos se estimó mediante absorción empleando un coeficiente de extinción molar a 280 nm de 42000 $M^{-1}cm^{-1}$ (este dato resulta al tener en cuenta las dos copias de MSP1D1 que intervienen en la formación del nanodisco).

6.4 Reconstitución de ZipA en nanodiscos

La proteína ZipA se incorporó en nanodiscos de extracto polar de lípidos de *E. coli* siguiendo el protocolo descrito en (Hernandez-Rocamora et al. (2012)). Brevemente, los lípidos secos se resuspendieron hasta 50 mM en tampón de nanodiscos con 100 mM colato, como se indica en el Apartado 6.1. Posteriormente, MSP1D1 se mezcló con los lípidos y con ZipA 1:4:30 (MSP1D1:lípido:ZipA). Las reacciones se incubaron 1 h en tampón de nanodiscos a temperatura ambiente, conteniendo una concentración final de lípidos 9 mM y al menos 18 mM de colato sódico. El colato se eliminó posteriormente mediante una incubación durante toda la noche a 4 °C con 0.8 g/ml de BioBeads SM-2 (Bio-Rad) en un agitador oscilante. Las BioBeads se separaron por centrifugación y las mezclas se purificaron mediante cromatografía de exclusión molecular usando una columna Superdex 200 HR10/300 GL equilibrada en tampón de nanodiscos tras una centrifugación (100000 *g*, 30 min, 4 °C). Las fracciones correspondientes a los nanodiscos con la proteína incorporada se concentraron y se volvieron a cargar en la columna para una nueva purificación.

Materiales y Métodos

Finalmente, las fracciones correspondientes a los nanodiscos con ZipA se concentraron y se guardaron a 4 °C (uso inmediato), o se almacenaron en alícuotas a -80 °C.

Cuando los nanodiscos se hicieron con POPC o L- α -fosfatidilcolina de huevo de gallina, se usó un ratio molar MSP1D1:ZipA:lípido de 1:4:60, y la incubación de la mezcla antes de añadir las Biobeads, fue de 1 h a 4 °C. La concentración de los nanodiscos de ZipA se estimó mediante absorción empleando un coeficiente de extinción molar a 280 nm de 57930 M⁻¹cm⁻¹ (este dato resulta de las dos moléculas de MSP1D1 y una molécula de ZipA involucradas en la formación del nanodisco).

6.5 Reconstitución de FtsN en nanodiscos

Para reconstituir FtsN en nanodiscos se siguió el mismo protocolo que para ZipA, sólo que alterando los ratios molares MSP1D1:proteína:lípido. Estos ratios fueron, 1:1:70 para L- α -fosfatidilcolina de huevo de gallina y 1:2:60 para el extracto de lípidos de *E. coli*. Además, durante la mezcla de lípidos, FtsN y MSP1D1, se mantuvo la concentración de colato por encima de 20 mM, para evitar la agregación de FtsN.

6.6 Marcaje fluorescente de nanodiscos

Para conseguir nanodiscos marcados fluorescentemente, se usó el lípido conjugado a una sonda fluorescente DOPE-rodamina (*1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(lissamine rhodamine B sulfonyl) (ammonium salt)*). Este lípido se añadió en un ratio molar 1:20 lípido marcado:lípido total. La mezcla se preparó antes de secar los lípidos para eliminar los disolventes orgánicos.

El protocolo para formar nanodiscos, tanto vacíos como con alguna proteína, es completamente idéntico cuando se usa esta mezcla con lípidos marcados y cuando se usan sólo lípidos sin marcar. Para cuantificar los nanodiscos marcados con este lípido, se usó el método de Bradford explicado anteriormente (Apartado 5.1), ya que la rodamina absorbe a 280 nm e interfiere con la cuantificación espectrofotométrica. Además, se cuantificó la concentración de rodamina, midiendo la absorbancia a 570 nm y usando un coeficiente de extinción molar de 61000 M⁻¹cm⁻¹.

7. Técnicas biofísicas

7.1 Ultracentrifugación analítica

La ultracentrifugación analítica es un método para la determinación del tamaño y la forma aproximada de proteínas, así como para la caracterización tanto cualitativa como cuantitativa de asociaciones de las mismas (Olsen et al. 1992); (Kralicek et al. 1993). El fundamento técnico consiste en monitorizar cómo las macromoléculas se distribuyen en las celdas durante la centrifugación. En la velocidad de sedimentación se estudia la variación de esa distribución con el tiempo, mientras que en el equilibrio

Materiales y Métodos

de sedimentación se estudia la distribución que alcanzan las macromoléculas cuando se ha alcanzado un equilibrio entre la fuerza centrífuga y la difusión de las moléculas.

7.1.1 Velocidad de sedimentación

Mediante el uso de esta técnica, las especies presentes en la disolución se fraccionan en función de su masa, forma y densidad. Por tanto podemos obtener un perfil de las especies presentes y su concentración relativa.

Durante un experimento de velocidad de sedimentación las moléculas están sometidas a un elevado campo centrífugo. Esto provoca que la fuerza centrífuga supere a la de difusión, produciéndose un transporte neto de materia en el sistema. El flujo de sedimentación en disolución de una especie molecular i que se encuentra girando con una velocidad angular ω viene descrito por la ecuación de Lamm:

$$J_i = s_i w_i \omega^2 - D_i \frac{dw_i}{dr}$$

Ecuación M4: Ecuación de Lamm.

donde J_i es el flujo de la especie i en unidades de masa/(área · tiempo), w_i es su concentración (peso/volumen), ω es la velocidad angular del rotor (radianes/segundo), r es la posición radial s_i y D_i y son los coeficientes de sedimentación y difusión traslacional de la especie molecular respectivamente, siendo ambos coeficientes propiedades de cada especie molecular en un determinado disolvente.

El coeficiente de sedimentación viene dado por:

$$s_i = \frac{M_i (1 - v_i \rho_o)}{N_A f_{sed,i}} = \frac{M_i^*}{N_A f_{sed,i}}$$

Ecuación M5: Ecuación para el cálculo del coeficiente de sedimentación.

donde, M_i , v_i y $f_{sed,i}$ y son respectivamente, la masa molecular, el volumen específico parcial y el coeficiente de fricción para la sedimentación de la especie i , ρ_o es la densidad del disolvente y N_A es el número de Avogadro. El producto $M_i (1 - v_i \rho_o)$ se denomina masa molecular de flotación, M_i^* .

A su vez, el coeficiente de difusión viene dado por:

$$D_i = \frac{RT}{N_A f_{dif,i}}$$

Ecuación M6: Ecuación para el cálculo del coeficiente de difusión.

donde R es la constante de los gases ideales, T es la temperatura absoluta y $f_{dif,i}$ el coeficiente de fricción para la difusión.

Los coeficientes de fricción definidos son función del tamaño y de la forma de la macromolécula, así como de su interacción con el disolvente y con otras moléculas de soluto. En el límite de idealidad, estos dos coeficientes, $f_{sed,i}$ y $f_{dif,i}$ son iguales (van

Materiales y Métodos

Holde 1998). Por tanto, combinando las Ecuaciones M5 y M6 se llega a la siguiente expresión, la Ecuación de Svedberg:

$$\frac{S_i}{D_i} = \frac{M_i^*}{RT}$$

Ecuación M7: Ecuación de Svedberg.

Los experimentos se realizaron en una ultracentrífuga analítica Beckman Optima XL-I equipada con un sistema óptico de medida UV-visible y de detección por interferencia. En las células de medida se emplearon piezas centrales de doble sector y paso óptico de 12 mm.

El análisis de los perfiles de sedimentación obtenidos a intervalos de tiempo regulares se realizó mediante el ajuste directo de soluciones a la Ecuación de Lamm (Ecuación M4) a los perfiles de sedimentación con el programa SEDFIT (Schuck 2000). El mejor ajuste obtenido de los perfiles de sedimentación experimentales a las soluciones de la Ecuación de Lamm proporciona una distribución $c(s)$ que representa la concentración de especies que sedimentan con un coeficiente de sedimentación S .

El valor de coeficiente de sedimentación de cada especie se corrigió a las condiciones estándar de agua y 20 °C con el programa SEDNTERP, obteniéndose el correspondiente $S_{20,w}$ (van Holde et al. 1985). Mediante este programa también se puede hacer una estimación del volumen específico parcial (\bar{v}) de las proteínas a partir de la correspondiente secuencia de aminoácidos.

A partir del coeficiente de sedimentación, el volumen específico parcial (\bar{v}) y el ratio friccional (f/f_0) es posible calcular la masa molecular de una especie con la Ecuación M5 (Schuck 2000). SEDFIT, el programa de análisis utilizado, ajusta como parámetro para calcular el perfil de sedimentación un valor de f/f_0 promedio para todas las especies presentes (Schuck 2000).

Para llevar a cabo los experimentos de nanodiscos vacíos las muestras se equilibraron a 4 °C en tampón de nanodiscos. Los experimentos se realizaron a 20 °C una velocidad de 48000 rpm midiendo la absorbancia a 280 nm o a 237 nm en muestras más diluidas. En el caso de los experimentos de unión de nanodiscos con ZipA a FtsZ, las muestras que contenían nanodiscos con ZipA se equilibraron a 4 °C en tampón-Z (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, KCl 0.5 M, MgCl₂ 5 mM), a menos que se indique lo contrario. Los nucleótidos de guanina fueron de Jena Bioscience. En todos los experimentos de ensamblaje inducido por GTP, se usó un sistema de regeneración del GTP (2 unidades/ μ l acetato quinasa, acetil fosfato 15 mM) como se describe en (Gonzalez et al. 2003). De esta forma, se mantiene una relación GTP:GDP constante durante el tiempo que dura el experimento. Los experimentos se realizaron a 30000 y 40000 rpm, a 20 °C, y se registraron con el sistema de detección por interferencia. En el caso de los Nd*-ZipA o los Nd*-FtsN los perfiles de sedimentación se registraron también a 570 nm usando el detector UV-VIS del instrumento. Para llevar a cabo los

Materiales y Métodos

experimentos con nanodiscos de FtsN, las muestras se equilibraron a 4 °C en tampón de nanodiscos, y las muestras de la proteína FtsN sin nanodiscos en tampón B. Los experimentos se llevaron a cabo a 48000 rpm y a 10 °C, midiéndose la muestra por interferencia y por absorbancia a 230 nm.

7.1.2 Equilibrio de sedimentación

Mediante esta técnica podemos obtener información termodinámica acerca de la masa molecular promedio, estequiometría y afinidad de unión de las proteínas estudiadas.

Dada una disolución uniforme de macromoléculas sometidas a una fuerza centrífuga moderada, se establece un equilibrio entre el proceso de sedimentación de las macromoléculas hacia el fondo de la celda y el proceso de difusión que se opone al anterior.

El equilibrio se alcanza cuando, transcurrido un tiempo, los dos procesos se igualan y como resultado el transporte neto se anula ($J_i=0$); llegado este punto, las macromoléculas estarán distribuidas formando un gradiente de concentración creciente hacia el fondo de la celda que no variará con el tiempo.

Para una situación de equilibrio $J_i=0$, combinando las Ecuaciones M4 y M7 se obtiene la Ecuación M8:

$$\frac{d \ln w_i}{dr^2} = \frac{M_i^* w^2}{2RT}$$

Ecuación M8

donde w es la concentración y r es el radio de la celda de medida. Si esta expresión es integrada respecto a r^2 , obtendremos la ecuación de equilibrio para la sedimentación de un soluto ideal.

$$w_i(r) = w_i(r_0) \exp\left(\frac{M_i^* w^2}{2RT} (r^2 - r_0^2)\right)$$

Ecuación M9: Ecuación de equilibrio para la sedimentación de un soluto ideal.

donde r_0 indica la posición de referencia donde empieza el gradiente.

El gradiente en el equilibrio, se caracteriza fundamentalmente porque no varía con el tiempo, es independiente de las propiedades hidrodinámicas del soluto, y depende únicamente de la masa molecular de flotación (M_i^*).

En los experimentos de equilibrio de sedimentación, el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio depende de la velocidad utilizada, del tamaño de la macromolécula y de la longitud de la columna que es la distancia desde el menisco hasta el fondo de la celda. Con el ajuste de la Ecuación M9 al gradiente obtenido en el equilibrio, mediante el software HeteroAnalysis, obtenemos la masa molecular

Materiales y Métodos

aparente de flotación de cada muestra (Cole 2004). La masa de flotación M_i^* , está relacionada con la masa molecular promedio M_i mediante la ecuación $M_i^* = M_i(1 - \bar{v}_i\rho_0)$. Donde ρ_0 es la densidad del tampón y \bar{v}_i es el volumen específico parcial de la proteína. El volumen específico parcial de las proteínas se calcula como el promedio en peso de los valores de volumen específico parcial de los aminoácidos de la proteína mediante el programa SEDNTERP (Laue 1992).

Los experimentos de nanodiscos vacíos se realizaron a 20 °C, a una velocidad de 8000 rpm y midiendo la absorbancia a 280 nm. La muestra se dejó equilibrar en la celda al menos 8 h antes de tomar un gradiente. Después de otras 4 h de centrifugación, se volvió a medir otro gradiente para comprobar que realmente se había alcanzado el equilibrio.

Los experimentos de nanodiscos con ZipA se llevaron a cabo con una columna de 80 μ l a distintas velocidades (de 5000 a 10000 rpm) y a distintas longitudes de onda (280-290 nm para FtsZ o para muestras de Nd sin marcar; y 550-600 nm para muestras con Nd marcados, Nd*). En todos los casos, se llevó a cabo una centrifugación a 43000 rpm tras los experimentos de equilibrio para calcular la línea base correspondiente.

En los experimentos llevados a cabo con mezclas FtsZ/Nd-ZipA, los nanodiscos se marcaron fluorescentemente y los gradientes se monitorizaron en la región espectral visible, siendo los Nd*-ZipA el único componente que contribuyó a la señal del gradiente. Pudiéndose cuantificar la cantidad de FtsZ unida a los nanodiscos.

Se calculó el número de moléculas de FtsZ unidas por molécula de Nd-ZipA ($\langle n \rangle$), de la misma forma que se hizo previamente para mezclas de p6-DNA (Alcorlo et al. 2009), según:

$$\langle n \rangle = (M_w^* - M_{Nd-ZipA}^*) / M_{FtsZ}^*$$

Ecuación M10: Cálculo del número de moléculas de FtsZ unidas por molécula de Nd-ZipA.

donde $M_{Nd-ZipA}^*$ representa la masa de flotación de los Nd-ZipA en ausencia de FtsZ y M_{FtsZ}^* representa la masa molecular de los monómeros de FtsZ. Los experimentos de nanodiscos con FtsN se midieron a 230 nm.

7.2 Dispersión de luz dinámica (DLS)

La dispersión de luz dinámica es una técnica que permite estudiar la difusión de moléculas en solución. Para ello, se enfoca un láser sobre una pequeña región de la muestra. La mayoría de la luz atraviesa la muestra, pero una pequeña proporción de la luz incidente es dispersada y detectada a un ángulo de 90 ° respecto de la dirección del haz incidente. El movimiento browniano de las moléculas en la disolución produce fluctuaciones (en la escala de los microsegundos a los milisegundos) en la intensidad de la luz dispersada como consecuencia de la entrada y salida de estas partículas de la región por la que pasa el haz. La frecuencia de estas fluctuaciones en la intensidad de la luz dispersada está relacionada con la difusión de las moléculas (Murphy 1997).

Materiales y Métodos

El análisis de las fluctuaciones en la intensidad de luz dispersada, se realiza mediante la obtención de la función de autocorrelación. Esta función, describe la correlación entre las intensidades de luz dispersada a tiempo t y las intensidades a un tiempo posterior $t + \tau$, donde τ es el tiempo de correlación (van Holde 1998). La intensidad de luz dispersada, depende de la posición de las partículas en el volumen analizado. A tiempos cortos, la correlación es alta, porque la posición de las partículas es más parecida con la posición que tenían anteriormente. A tiempos largos, la correlación es menor, y por ello la función de autocorrelación decae con el tiempo.

La relación entre ambas propiedades se establece en la siguiente ecuación:

$$g(t) = 1 + e^{-Dq^2t}$$

Ecuación M11: Función de autocorrelación.

donde $g(t)$ es la función de autocorrelación, D es el coeficiente de difusión de la molécula, t el tiempo, q es el vector de dispersión de luz,

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin \frac{\theta}{2}$$

Ecuación M12: Vector de dispersión de luz.

donde n es el índice de refracción del disolvente, λ la longitud de onda de la luz incidente, y θ el ángulo de dispersión de la luz (van Holde 1998). A partir del coeficiente de difusión, se puede estimar el radio hidrodinámico mediante la ecuación de Stokes-Einstein:

$$D = (k \cdot T) / (6\pi \cdot \eta \cdot r)$$

Ecuación M13: Ecuación de Stokes-Einstein.

donde D es el coeficiente de difusión, k la constante de Boltzman, T la temperatura, η la viscosidad y r el radio de la partícula.

Las muestras de nanodiscos se midieron a una concentración entre 1-10 μM , a 20 °C. Previamente, las muestras se filtraron con un filtro de jeringa Anotop de 0.1 μm (Whatman) y se centrifugaron a 100000 g durante 30 min a 4 °C antes de la medida. Los experimentos se llevaron a cabo en un aparato Protein Solution DynaPro MS/X equipado con un láser de longitud de onda de 824.7 nm. Se calcularon los coeficientes de difusión aparentes a partir del análisis mediante regularización de las curvas de autocorrelación con el programa Dynamics V6 Software (Wyatt Technology Corp.) o bien con el programa SEDFIT (Schuck 2000). De cada muestra se realizaron al menos 10 medidas que se promediaron para calcular el coeficiente de difusión.

Materiales y Métodos

7.3 Espectroscopía de correlación de la fluorescencia (FCS)

Mediante la técnica de espectroscopía de correlación de fluorescencia, se miden las fluctuaciones temporales aleatorias de moléculas fluorescentes cuando atraviesan un pequeño volumen de observación. Estas fluctuaciones se correlacionan para obtener la función de autocorrelación $G(\tau)$ cuyo análisis permite determinar el coeficiente de difusión traslacional y la concentración de las moléculas fluorescentes de la disolución. De este modo, es posible estudiar reacciones de asociación en las que se formen complejos que difundan más lentamente que las moléculas fluorescentes no asociadas. Los métodos de FCS permiten además estudiar otros fenómenos que puedan producir modificaciones en la intensidad de fluorescencia emitida por las moléculas excitadas tales como cambios conformacionales o cinéticas de asociación y disociación. El método de FCS pertenece al conjunto de las técnicas de fluorescencia que presentan sensibilidad de molécula única.

FCS es una técnica muy útil para el análisis de interacciones de forma rápida y con un bajo consumo de muestra (concentración y volumen) sin necesidad de separar el ligando unido del ligando libre, por lo que resulta especialmente apropiada para la búsqueda sistemática de nuevos fármacos. Otra ventaja importante es que se puede aplicar directamente en células vivas.

Se utiliza un láser que se enfoca en la muestra al límite de difracción a través del objetivo de un microscopio. Tras la excitación los fotones emitidos por el fluoróforo son capturados por la misma óptica que enfoca al láser y transmitidos al detector a través de una apertura confocal (*pinhole*) y de filtros ópticos. Si la excitación se lleva a cabo utilizando un láser multifotónico, la apertura confocal que elimina la luz fuera de foco no es necesaria. Finalmente, los fotones emitidos son detectados por detectores rápidos muy sensibles, típicamente fotodiodos de avalancha.

La función de autocorrelación ($G(\tau)$) relaciona la intensidad de fluorescencia I emitida por las moléculas fluorescentes excitadas en el elemento de volumen en un instante t con la intensidad de fluorescencia emitida τ segundos más tarde:

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \delta F(t+\tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} = \frac{\langle F(t) F(t+\tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} - 1$$

Ecuación M14: Función de autocorrelación.

donde $\delta F(t) = F(t) - \langle F(t) \rangle$.

Las medidas se llevaron a cabo en un sistema MicroTime 200 (PicoQuant, Germany) utilizando un láser de dos fotones como se describe en (Reija et al. 2011) con algunas modificaciones. La emisión de fluorescencia se detectó a través de un filtro de emisión FF01-607/36-25. Para evitar la saturación de excitación y el fotoblanqueo, se ajustó la potencia de excitación a 10-15 mW a la entrada del microscopio. Todas las medidas se realizaron a 21 °C.

Materiales y Métodos

Se adquirieron 5-10 trazas durante 1 min para cada solución y se analizaron de forma global con el software FFS Data Processor (Scientific Software Technologies Center, Belarus) (Skakun et al. 2005). Las muestras se excitaron con un haz gaussiano tridimensional y las curvas de autocorrelación de las muestras que contenían Nd* o Nd*-ZipA se ajustaron a un modelo de un solo componente:

$$G(\tau) = 1 + G(0) \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)^{-1} \left(1 + \frac{\tau}{S^2\tau_D}\right)^{-1/2}$$

Ecuación M15: Ecuación para el ajuste a un modelo de un solo componente.

donde $G(0)$, τ_D y S son la amplitud de la curva de autocorrelación, el tiempo de difusión traslacional de una partícula fluorescente y el parámetro estructural, respectivamente. Este parámetro relaciona las dimensiones axial (z_0) y radial (r_0) del volumen de detección efectivo ($S = z_0/r_0$) y tuvo valores entre 3 y 6 como se determinó mediante calibración con fluoresceína o rodamina 110.

A partir de la medida de τ_D , se obtuvo un coeficiente de difusión traslacional D usando la siguiente expresión para la excitación por dos fotones: $\tau_D = r_0^2/8D$. El valor de τ_0 se estimó tras la calibración asumiendo un valor D de $400 \mu\text{m}^2/\text{s}$ y $435 \mu\text{m}^2/\text{s}$ para fluoresceína y rodamina 110, respectivamente (Culbertson et al. 2002, Bacia et al. 2007, Gendron et al. 2008).

Para mezclas de FtsZ sin marcar con Nd*-ZipA, se usó un modelo de dos componentes para ajustar las curvas de autocorrelación:

$$G(\tau) = 1 + G(0) \left[(1 - f_B) \left(1 + \frac{\tau}{\tau_F}\right)^{-1} \left(1 + \frac{\tau}{S^2\tau_F}\right)^{-1/2} + f_B \left(1 + \frac{\tau}{\tau_B}\right)^{-1} \left(1 + \frac{\tau}{S^2\tau_B}\right)^{-1/2} \right]$$

Ecuación M16: Ecuación para el ajuste a un modelo de dos componentes.

donde τ_F y τ_B son el tiempo de difusión traslacional de los nanodiscos marcados libres y unidos, respectivamente, y f_B representa la población fraccional de nanodiscos unidos. El resto de símbolos ya se han descrito previamente.

La interacción de Nd-ZipA con los polímeros de FtsZ se midió incubando 45 nM Nd*-ZipA con concentraciones crecientes de FtsZ ensamblada. Se obtuvieron resultados similares con $1 \mu\text{M}$ de nanodiscos. Los datos presentados son la media de, al menos, 3 experimentos independientes. Los experimentos de competición se llevaron a cabo añadiendo un exceso molar de diez veces o concentraciones equimolares de los péptidos C-terminal de FtsZ (con respecto a FtsZ) a muestras que contenían una mezcla de Nd*-ZipA y polímeros de FtsZ.

Materiales y Métodos

7.4 Espectroscopía de correlación cruzada de la fluorescencia (FCCS)

El concepto de la técnica FCCS supone excitar simultáneamente dos fluoróforos distintos en un mismo volumen confocal, registrar las fluctuaciones de fluorescencia de ambos fluoróforos y finalmente hacer un análisis en serie temporal de la correlación cruzada de las fluctuaciones de una y otra señal. Aquí el parámetro de medida fundamental es la amplitud de la función de correlación cruzada, en vez de su evolución temporal (como ocurría en FCS convencional). La correlación cruzada de dos señales será alta cuando los dos fluoróforos difundan conjuntamente en la unidad de volumen elemental, y será baja cuando no. De esta forma, si partimos de una molécula con un doble marcado fluorescente, será muy fácil seguir cualquier reacción que genere una ruptura de la misma que implique la separación física de los dos fluoróforos. Análogamente, si partimos de dos moléculas independientes con distinto marcador fluorescente, en principio exhibirán muy baja correlación cruzada, pero si seguimos una reacción de ligamiento o fusión entre ambas especies, se detectará un significativo incremento en la correlación cruzada.

La mayor dificultad experimental del diseño confocal de la técnica FCCS consiste en el adecuado alineamiento y confocalización de los dos haces de luz láser. Estos problemas instrumentales quedan obviados en el diseño de FCCS con excitación por dos fotones. En esta variante, sólo hace falta un láser para excitar distintos fluoróforos que generen espectros de emisión con mínimo solapamiento (Torres 2002). Los fundamentos de esta técnica están descritos en mayor detalle en (Schwille et al. 1997, E.Margeat 2007, Zorrilla et al. 2008).

En este trabajo se usó la técnica de FCCS para confirmar la interacción física entre Nd-ZipA y FtsZ sugerida por los experimentos de FCS. Para estos experimentos se usó Nd*-ZipA y FtsZ (12,5 μ M) con una cantidad de proteína marcada con Alexa 488 como trazador (FtsZ-Alexa488) en presencia de GTP (y sistema de regeneración enzimático).

La configuración usada para los experimentos de FCCS fue la misma que para los experimentos de FCS excepto que los filtros FF01-685/40-25 y FF01-520/35-25 se colocaron delante de los canales rojo y verde, respectivamente. Para cada muestra, se adquirieron 5-10 trazas durante 1 min cada una, y se analizaron de forma global usando el software FFS Data Processor. Se ajustó la ecuación del modelo de dos componentes (Ecuación M16) a las curvas de autocorrelación obtenidas en el canal rojo, correspondientes a las especies Nd*-ZipA. Las curvas obtenidas en el canal azul, las cuales surgieron de las especies que contenían FtsZ-Alexa 488, se analizaron usando el modelo descrito previamente en (Reija et al. 2011), en donde además de FtsZ ensamblada, se tuvo en cuenta tanto la contribución de la sonda libre (~20 %) como de la proteína sin ensamblar (~15 %). La curva de correlación cruzada se ajustó al modelo de una sola especie (Ecuación M15) y el coeficiente de difusión traslacional determinado resultó compatible, dentro del error, con el obtenido para el complejo a partir del análisis de las curvas de autocorrelación. Ni las amplitudes de las curvas de

Materiales y Métodos

autocorrelación ni las intensidades de emisión de cada uno de los fluoróforos cambiaron en presencia de la otra sonda. Además, no se detectó emisión significativa de ninguna de las sondas en el canal correspondiente al de la otra, excluyendo de esta forma cualquier contribución a la correlación cruzada debida a artefactos. La fracción de Nd-ZipA unida a los polímeros de FtsZ se pudo estimar usando la siguiente expresión (Swift et al. 2006, Zorrilla et al. 2008):

$$f_B = \frac{G_x(0)}{G_{gp}(0)}$$

Ecuación M17: Estimación de la fracción de Nd-ZipA unida a los polímeros de FtsZ.

donde $G_x(0)$ es la amplitud de la curva de correlación cruzada y $G_{gp}(0)$ es la amplitud de la curva de autocorrelación detectada en el canal verde correspondiente a la proteína ensamblada.

8. Modelos teóricos de unión de ZipA y FtsZ

Modelo 1: Unión de FtsZ en forma oligomérica, FtsZ-GDP, a ZipA insertada en nanodiscos:

Se sabe que FtsZ experimenta una autoasociación isodésmica en presencia de GDP (Rivas et al. 2000, Gonzalez et al. 2003): $Z_{i-1} + Z \leftrightarrow Z_i$, con la constante de equilibrio K_{ZZ} para todo i .

K_{AZ} es la constante de asociación de equilibrio de FtsZ con una molécula de ZipA insertada en un nanodisco para todo i ($Z_i + A \leftrightarrow AZ_i$);

$$c_{Zi} = K_{ZZ}^{i-1} c_Z^i$$

Ecuación M18

$$c_{AZi} = K_{AZ} c_A K_{ZZ}^{i-1} c_Z^i$$

Ecuación M19

siendo c_Z y c_A las concentraciones de FtsZ y ZipA en sus formas monoméricas, respectivamente.

La conservación de la masa se expresa como:

$$c_{A,tot} = c_A + \sum_i c_{AZ} = c_A \left[1 + \frac{K_{AZ}}{K_{ZZ}} \sum_i (K_{ZZ} c_Z)^i \right] = c_A \left[1 + \frac{K_{AZ}}{K_{ZZ}} \frac{1}{(1 - K_{ZZ} c_Z)} \right]$$

Ecuación M20

Materiales y Métodos

$$c_{Z,tot} = \sum_i i c_{Zi} + \sum_i i c_{AZi} = \frac{1 + K_{AZ} c_A}{K_{ZZ}} \sum_i i (K_{ZZ} c_Z)^i = (1 + K_{AZ} c_A) \frac{c_Z}{(1 - K_{ZZ} c_Z)^2}$$

Ecuación M21

Dados los valores de $c_{A,tot}$, $c_{Z,tot}$, K_{ZZ} y K_{AZ} , se pueden resolver las Ecuaciones M20 y M21 numéricamente para obtener los valores de c_A y c_Z . Calculados estos valores, se pueden usar las Ecuaciones M18 y M19 para calcular los valores de c_{Zi} y c_{AZi} . Posteriormente, se puede calcular el número promedio de moléculas de FtsZ unidas por molécula de Nd-ZipA según:

$$\langle n \rangle = \frac{\sum_i i c_{AZi}}{c_A + \sum_i c_{AZi}}$$

Ecuación M22

Se escribió un modelo de MATLAB para ajustar este modelo a los datos de equilibrio de sedimentación (Ecuación M10). Usando los parámetros que mejor ajustan, se pudo calcular la distribución fraccional de los Nd-ZipA unidos a todas las especies que contienen FtsZ con abundancia significativa (Figura R18).

Modelo2: Unión de los polímeros de FtsZ a Nd-ZipA:

Para determinar la constante de asociación para la interacción de Nd-ZipA con polímeros de FtsZ, se justaron los datos de unión de FCS (Figura R16, D) al siguiente modelo mecanístico. Se asume que para una concentración de FtsZ total dada, FtsZ puede existir como una mezcla en equilibrio de monómero y especies sencillas de oligómeros con una estequiometría n_{olig} . Mediante medidas previas hidrodinámicas y de dispersión se determinó la fracción de FtsZ existente como oligómero en función de $[FtsZ]_{tot}$ (Martos et al. 2010, Monterroso et al. 2012). La concentración molar de oligómero es igual a:

$$c_{olig} = \frac{f_{olig} [FtsZ]_{tot}}{n_{olig}}$$

Ecuación M23

Asumiendo que un oligómero se puede unir a Nd-ZipA con una constante de afinidad K_{AZ} , la fracción de Nd-ZipA unidos a FtsZ será:

$$f_B = \frac{K_{AZ} c_{olig}}{1 + K_{AZ} c_{olig}}$$

Ecuación M24

Materiales y Métodos

En el límite en el cual toda FtsZ existiera como oligómero, la Ecuación M24 se reduce a:

$$f_B = \frac{K'_{AZ}[FtsZ]_{tot}}{1 + K'_{AZ}[FtsZ]_{tot}}$$

Ecuación M25

donde

$$K'_{AZ} = K_{AZ}/n_{olig}$$

Ecuación M26

Cabe destacar que las Ecuaciones M24-M26 son válidas cuando un oligómero sencillo se une a un solo Nd-ZipA. En principio, un oligómero puede unir más de un Nd-ZipA, y de hecho, se ha visto que ocurre a concentraciones altas de Nd-ZipA. Sin embargo, se ha demostrado que bajo las condiciones de los experimentos de FCS (concentración baja de Nd-ZipA), un solo Nd-ZipA está unido a cada oligómero de FtsZ. Por ello, la Ecuación M26 se puede utilizar para el modelo de los datos de FCS y se obtiene una constante de asociación de equilibrio válida.

9. Microscopía electrónica de transmisión

En el microscopio electrónico se incide una radiación electrónica sobre la muestra, y con ayuda de unas lentes electromagnéticas se forma una imagen magnificada del espécimen. Dado que las muestras biológicas no tienen componentes que generen un alto contraste al dispersar los electrones, es necesario añadir a las muestras agentes de tinción, generalmente metales pesados, que generen este contraste. En la tinción negativa, que se basa en la aplicación a la muestra de una solución salina de un metal pesado (acetato de uranilo al 2.5 % o formiato de uranilo al 1 %), de tal manera que la muestra se deshidrata pero queda inmersa en una capa de metal que la protege. La imagen que se genera procede fundamentalmente del contraste entre la capa de metal y de la ausencia de éste allí donde se encuentre la muestra biológica. En definitiva, se obtiene un “negativo” del espécimen estudiado (Valpuesta J.M. 2003) que permite realizar estudios estructurales de moléculas.

Las muestras se incubaron sobre rejillas de cobre, con una capa del polímero FormVar y sombreadas con carbono. Las visualizaciones de las distintas muestras se realizaron en un microscopio electrónico JEOL-1200 a 100 kV y se recogieron las imágenes con una cámara TemCam-F416 CMOS (TVIPS) a 50000 o 60000 aumentos.

Para visualizar los nanodiscos, se depositó una gota de 20 µl de solución de nanodiscos, bien vacíos o Nd-ZipA, a 30 nM (para llevar a cabo los estudios estructurales) o a 600 nM (para cubrir la superficie al completo con nanodiscos), sobre

Materiales y Métodos

rejillas recubiertas con el polímero FormVar sometidas a descarga luminiscente (*glow discharge*) (Namork et al. 1982). Tras 2 min, se eliminó el exceso de líquido, se lavaron 3 veces con agua, se volvió a eliminar el exceso de líquido y luego se tiñeron durante 2 min con formiato de uranilo al 1 %. El mismo procedimiento se usó para visualizar nanodiscos de FtsN, en este caso, usando concentraciones de 30 y 100 nM. Para visualizar los polímeros de FtsZ, se preparó una solución madre de FtsZ a 6.75 μM equilibrada en tampón-Z. Se añadió GTP 1 mM a la solución madre para que FtsZ formara polímeros en cantidad suficiente y, tras 1 min, se diluyó la solución 5 veces en tampón que contenía GTP 1 mM hasta que la concentración de GTP fue 1.35 μM para facilitar la visualización de polímeros individuales. Inmediatamente después, se depositó una gota de 25 μl de la muestra diluida sobre la rejilla sometida a descarga luminiscente (*glow discharge*) y se incubó de 30 s a 1 min. Luego, se eliminó el exceso de líquido de la muestra y se tiñó durante 1 min con formiato de uranilo al 1 %. En algunos controles, la muestra se lavó tres veces con agua antes de la tinción pero no se observaron diferencias. Para visualizar los Nd-FtsN, se depositó una gota de 20 μl de Nd_{Ecoli}-FtsN a 30 nM en tampón de nanodiscos sobre rejillas recubiertas con el polímero FormVar sometidas a descarga luminiscente (*glow discharge*). Tras 2 min, se eliminó el exceso de líquido, se lavaron 3 veces con agua, se volvió a eliminar el exceso de líquido y luego se tiñeron durante 2 min con formiato de uranilo al 1 %.

9.1 Reconstrucción de la estructura tridimensional de nanodiscos

Para esta reconstrucción se tomaron alrededor de 250 micrografías de nanodiscos de ZipA o vacíos, en condiciones de mínima dosis, usando un programa de toma de imágenes automático incorporado en el software de adquisición de imágenes de la cámara TemCam-F416. De estas micrografías, se extrajeron 13789 partículas para Nd-ZipA y 15000 para nanodiscos vacíos usando el programa e2boxer.py del paquete de software EMAN2 (Tang et al. 2007). Se llevó a cabo una clasificación libre de patrón en 70 clases con el comando e2refine2d.py de EMAN2.

Se diseñaron dos modelos iniciales los cuales se simetrizaron rotacionalmente, se filtraron y se usaron para el refinamiento con EMAN (Ludtke et al. 1999). El conjunto de los datos se procesó posteriormente siguiendo la estrategia de multi-referencia usando estos dos modelos iniciales, con el comando *multirefine* en EMAN (Ludtke et al. 1999).

Inicialmente, se impuso una simetría rotacional grande ($c > 300$) durante el refinamiento. La resolución de las estructuras finales se estimó usando el comando *eotest* en EMAN (Ludtke et al. 1999) de 21 y 20 Å para las reconstrucciones de 11 y de 13 nm, respectivamente. Se llevó a cabo otro refinamiento usando los mismos parámetros que antes pero sin imponer ninguna restricción para la simetría. La resolución de las estructuras finales (estimadas como se ha descrito antes) fue de 31 Å para ambas reconstrucciones cuando no se impuso simetría.

Resultados

Resultados

1. Caracterización biofísica de nanodiscos vacíos

1.1 Formación y purificación de nanodiscos vacíos

Se prepararon nanodiscos usando tres lípidos distintos. En primer lugar, palmitoiloleilfosfatidilcolina (POPC) sintética. Este compuesto se ha usado en la literatura como modelo de nanodisco con fosfolípido insaturado y es el más estudiado biofísicamente (Bayburt et al. 2002, Ritchie et al. 2009). En segundo lugar se usó un extracto de L- α -fosfatidilcolina de huevo de gallina (EPC), cuyos componentes mayoritarios son dipalmitoilfosfatidilcolina (16:0-DPPC, 32.7 %) y dioleoilfosfatidilcolina (18:1-DOPC, 32.0 %). Por último, se estudiaron nanodiscos preparados con el extracto polar de lípidos de *E. coli* (ECL), que es el tipo de lípidos en los que se reconstituyó ZipA y FtsN, al ser mucho más parecido a la composición lipídica que ambas proteínas encuentran en la membrana interna de *E. coli*.

Para los nanodiscos de POPC y EPC se usó el protocolo de preparación con el ratio molar MSP1D1:lipido optimizado en 1:65 (Bayburt et al. 2002) (Figura R1). En ambos casos, se obtuvieron nanodiscos con un pico principal cuyo volumen de elución coincide con el de proteínas de 10 nm de diámetro hidrodinámico en una columna de exclusión molecular calibrada (Figura R1), tal y como se describe en la literatura para nanodiscos de POPC preparados con MSP1D1 (Bayburt et al. 2002). En todas las preparaciones de nanodiscos se forman, además de nanodiscos, agregados MSP1D1/lipido de mayor tamaño e incluso a micelas lipídicas. Estos agregados salen en volúmenes de elución menores al pico principal de nanodiscos e incluso en el volumen de exclusión dependiendo de su tamaño. También puede quedar MSP1D1 libre, especialmente si el ratio MSP1D1:lipido es muy alto, y agregados MSP1D1/lipido de menor tamaño que los nanodiscos (Bayburt et al. 2002). En el caso de los lípidos de EPC las preparaciones contenían más MSP1D1 libre (el pico que eluye a 15.6 ml en la Figura R1) que los de POPC sintético. En ambos casos, siempre se pasaron las preparaciones de nanodiscos por la columna de gel filtración y se juntaron únicamente las fracciones correspondientes al pico principal de nanodiscos.

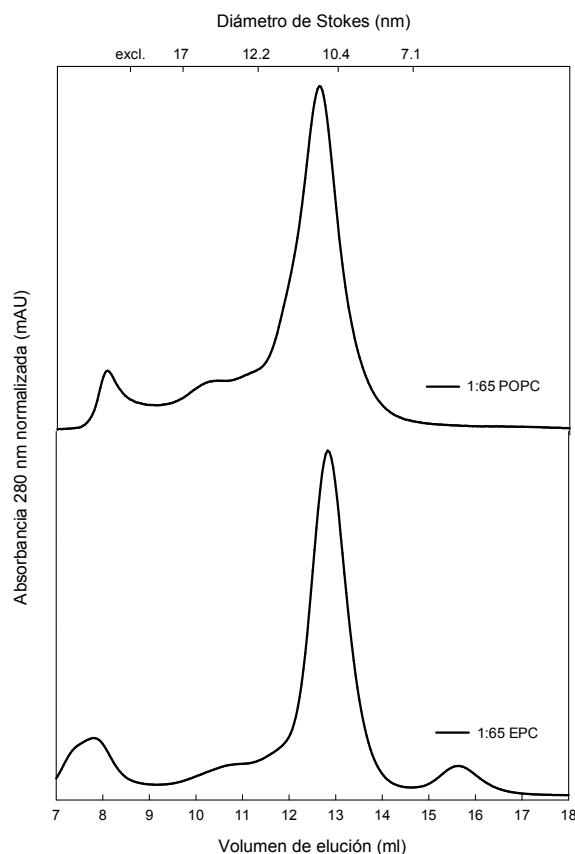


Figura R1: Perfiles cromatográficos representativos correspondientes a la purificación de nanodiscos formados por POPC y por EPC mediante cromatografía de exclusión molecular. El ratio MSP1D1:lípido fue de 1:65 en ambos casos. En la parte superior se muestra el resultado de la calibración de la columna con proteínas con diámetro de Stokes conocido, como se describe en Materiales y Métodos (Apartado 6.3). Se usó una columna Superdex 200 HR 10/300 GL equilibrada en tampón de nanodiscos y flujo constante de 0.5 ml/min.

En el caso de los nanodiscos de ECL, se probaron distintos ratios para encontrar el que resultase en una mayor proporción de nanodiscos frente a otros agregados inespecíficos lípido/MSP1D1. Como se muestra en la Figura R2 se hicieron preparaciones con ratios molares MSP1D1:lípido en un rango entre 1:150 y 1:40 que se analizaron mediante gel filtración. En ninguno de los ratios probados se obtiene el pico de nanodiscos (el pico cercano a ~12.5 ml en la columna cromatográfica usada) bien separado del resto de agregados grandes o pequeños. La proporción de éste frente al resto de especies es mayor en los ratios 1:50 y 1:40, pero en esos ratios el pico de nanodiscos se solapa con los correspondientes a otros agregados lípido/MSP1D1 tanto de mayor como de menor tamaño que los nanodiscos. Por lo tanto se eligió el ratio 1:60 para realizar las preparaciones a mayor escala. Para aislar nanodiscos del resto de agregados, se juntaron las fracciones correspondientes al pico cercano a 12 ml, se concentraron y se volvieron a someter a gel filtración (Figura R3). Las fracciones correspondientes al centro del pico resultante de la segunda cromatografía son las que se usaron posteriormente para la caracterización biofísica.

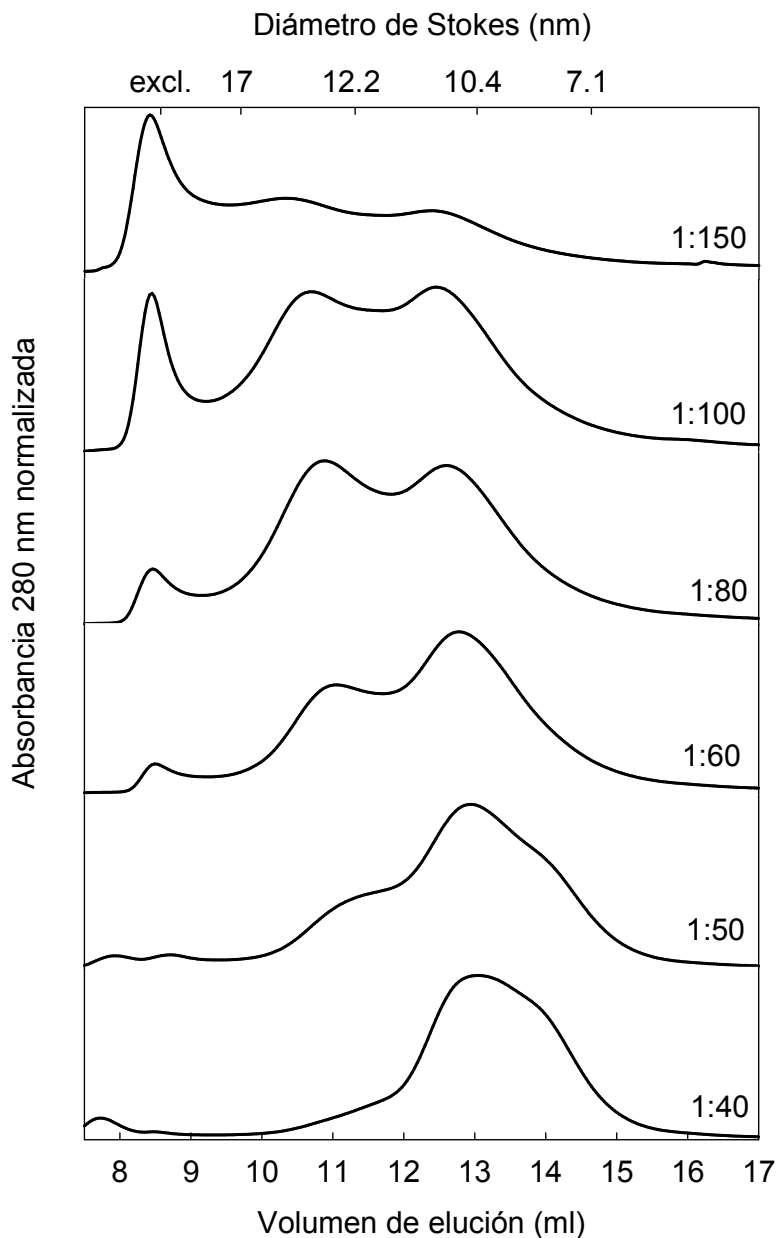


Figura R2: Optimización del ratio molar MSP1D1:lipido para la preparación de nanodiscos de ECL. Se muestran los cromatogramas de exclusión molecular de preparaciones de nanodiscos con ECL a distintos ratios molares MSP1D1:lipido, indicados junto a cada cromatograma. En la parte superior se muestra el resultado de la calibración de la columna con proteínas con diámetro de Stokes conocido, como se explica en Materiales y Métodos (Apartado 6.3). Se usó una columna Superdex 200 HR 10/300 GL equilibrada en tampón de nanodiscos fijando flujo constante de 0.5 ml/min.

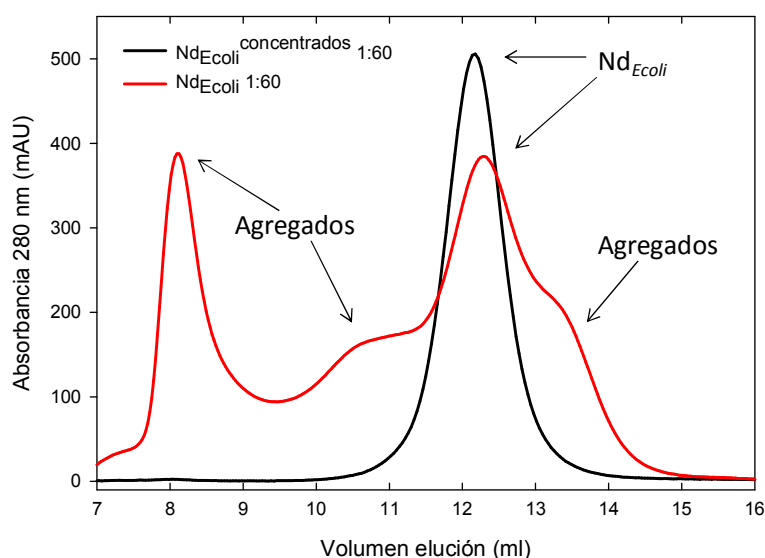


Figura R3: Perfiles cromatográficos representativos de la purificación de Nd_{Ecoli} de ratio molar MSP1D1:lípido 1:60. La línea roja muestra el perfil cromatográfico de la muestra que contiene Nd_{Ecoli} tras su formación. La línea negra muestra el perfil cromatográfico del pico aislado de ~ 12.5 ml de los Nd_{Ecoli} tras su concentración. Ambas cromatografías se llevaron a cabo en una columna Superdex 200 HR 10/300 GL equilibrada en tampón de nanodiscos fijando flujo constante de 0.5 ml/min.

1.2 Cuantificación de fosfolípidos por nanodisco

Para estimar la masa molecular de los nanodiscos, es necesario conocer la cantidad de lípidos que éstos poseen. Por lo tanto se usaron métodos bioquímicos para cuantificar fosfolípidos en muestras de nanodiscos. Para EPC y POPC se usó el método descrito por Stewart (Stewart 1980). Este método, que utiliza la partición preferencial de compuestos coloreados de ferrotiocianato con fosfolípidos en una fase orgánica, es más rápido y sencillo de llevar a cabo que el método de Fiske (Naito 1975), aunque tiene la desventaja de que los fosfolípidos cargados negativamente no interaccionan con el ferrotiocianato y por tanto no se pueden valorar. Dado que el ECL contiene una considerable proporción de lípidos aniónicos (fosfatidilglicerol y cardiolipina), para nanodiscos de ECL se usó el método de Fiske, que consiste en mineralizar el fósforo de los fosfolípidos que luego es valorado colorimétricamente. El número de lípidos por nanodiscos se determinó posteriormente dividiendo la concentración de lípidos obtenida por la concentración molar de nanodiscos obtenida a partir de la absorción ultravioleta de MSP1D1, como se explica en Materiales y Métodos (Apartado 6.2). Los resultados de estas determinaciones están en la Tabla R1.

Resultados

Por último, a partir de los datos de lípidos por nanodisco obtenidos mediante métodos bioquímicos y asumiendo que cada nanodisco contiene 2 moléculas de MSP1D1 por disco (Bayburt et al. 2002), se pudo estimar una masa molar promedio para estos nanodiscos. Para ello se usó la masa molar teórica de MSP1D1 (246557 g/mol) y masas molares promedio para cada lípido de 760.08 g/mol (POPC), 770.12 g/mol (EPC) y 798.3 g/mol (ECL). Los valores de masa molar promedio para POPC y EPC proceden de las especificaciones del proveedor de los lípidos (Avanti Polar Lipids). El valor de masa molar promedio de ECL, se calculó teniendo en cuenta la distribución de lípidos que componen este extracto natural que indica el proveedor (Avanti Polar Lipids): 67 % de fosfatidiletanolamina, 23.2 % de fosfatidilglicerol y 9.8 % de cardiolipina. A su vez, las masas molares promedio de estos componentes se tomaron de las que indica Avanti Polar Lipids para los extractos naturales provenientes de *E. coli* de fosfatidiletanolamina (719.3 g/mol, ref. 840027), fosfatidilglicerol (757.0 g/mol, ref. 841188) y cardiolipina (1435.9 g/mol, ref. 841199). El resultado de estas estimaciones se muestra en la Tabla R1.

Lípido	Lípidos por nanodisco		Masa molar promedio ^c
	Métodos bioquímicos ^a	Velocidad de sedimentación ^b	
EPC	98 ± 6	68	124800
POPC	120 ± 30	118	143600
ECL	94 ± 2	89	124400

Tabla R1: Contenido lipídico de nanodiscos preparados con distintos lípidos. ^aResultados de determinación de lípidos mediante los métodos de Stewart (EPC y POPC) o de Fiske (ECL). Los valores mostrados son el promedio de al menos dos determinaciones independientes. ^bResultados de la determinación de lípidos mediante un único ensayo de velocidad de sedimentación como se explica en Materiales y Métodos (Apartado 6.2). ^cValores de masa molar (en g/mol) estimados según se indica en el texto.

1.3 Caracterización biofísica de nanodiscos vacíos

Con el fin de obtener información sobre las propiedades hidrodinámicas de los nanodiscos, así como comprobar la homogeneidad de la muestra se utilizaron las técnicas de velocidad de sedimentación y dispersión de luz dinámica. La primera de ellas, nos permite obtener una distribución de especies de la muestra en función de su coeficiente de sedimentación, lo que da información sobre la heterogeneidad de la muestra así como de las propiedades hidrodinámicas de ésta. La dispersión de luz dinámica, por otro lado, es una técnica complementaria a la velocidad de sedimentación en la que se puede obtener el coeficiente de difusión traslacional de muestras homogéneas así como detectar la presencia de agregados de alta masa molar.

Resultados

Los perfiles de velocidad de sedimentación obtenidos para los tres tipos de nanodiscos estudiados mostraron siempre una especie mayoritaria que representa al menos el 90 % de la señal (Figura R4). Las especies minoritarias fueron siempre de mayor coeficiente de sedimentación que el pico principal. Además estas especies minoritarias, representaron una proporción mayor de la señal en nanodiscos de ECL que en los otros tipos de nanodiscos. Por último, el pico principal de los nanodiscos de ECL tuvo un mayor coeficiente de sedimentación que el de los nanodiscos de EPC o POPC, lo que indica que sedimentan más rápidamente. Los valores del coeficiente de sedimentación de la especie principal de cada tipo de nanodisco están indicados en la Tabla R2.

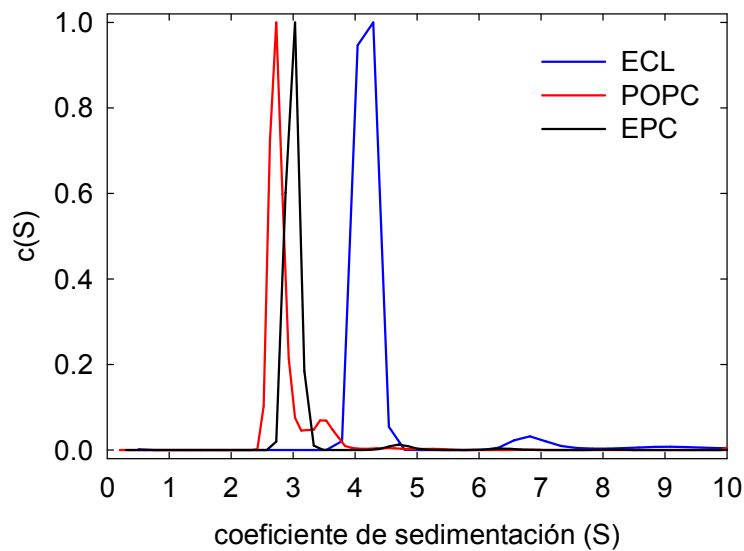


Figura R4: Comparación entre perfiles de sedimentación normalizados representativos de nanodiscos preparados a partir de distintos lípidos. Las muestras se equilibraron en tampón de nanodiscos y los experimentos se hicieron a 20 °C, a 48000 rpm, utilizando el sensor de interferencia. La concentración de las muestras fue de 2.2 μM , 5.1 μM y 10.1 μM para ECL, POPC y EPC respectivamente.

Dado que se habían hecho experimentos de velocidad de sedimentación midiendo absorbancia e interferencia simultáneamente de muestras de nanodiscos, se utilizó un método desarrollado por Inagaki y colaboradores (Inagaki et al. 2012) para estimar el número de lípidos por nanodisco a partir de dichos datos (Tabla R1). Los resultados son muy parecidos a los obtenidos utilizando métodos colorimétricos para nanodiscos de ECL y POPC. Sin embargo para EPC el valor obtenido de lípidos por nanodisco por este método es mucho más bajo. En todo caso, por ambos métodos el valor de lípidos por nanodisco es menor para EPC que para POPC.

Resultados

En cuanto a la dispersión de luz dinámica, se midieron distintas muestras de cada uno de los tipos de nanodiscos. Las curvas de autocorrelación mostraron en muchos casos, e independientemente del tipo de lípido usado, la presencia clara de más de una especie. Como ejemplo se muestra una curva de autocorrelación claramente bifásica en la Figura R5. Además, el ajuste de un modelo de exponencial sencilla (el esperado para una muestra monodispersa) fue siempre de muy baja calidad para cualquiera de las muestras analizadas. Por lo tanto, las curvas se analizaron mediante un método de regularización, en el que se obtiene una distribución de especies con distinto coeficiente de difusión aparente (D_{ap}) a partir de la deconvolución de la curva de autocorrelación (Chu 1991). El método usado es el de regularización por máxima entropía implementado en el software SEDFIT (Schuck 2000). Usando este método se obtuvieron habitualmente distribuciones como la de la Figura R5, que corresponde a una muestra de nanodiscos de EPC. En estas distribuciones siempre aparecía una componente con un D_{ap} de $\sim 4 \cdot 10^{-7}$ cm²/s, compatible con nanodiscos, y otra componente con valor de D_{ap} en el orden de 10^{-8} cm²/s y cuya contribución a la señal era variable según la muestra, aunque siempre significativa (10-30 %). La naturaleza de esta especie de mayor tamaño se comenta en la Discusión.

Lípido	$S_{20,w}$ ^a	D_{ap} ^b	R_h ^c	M_b teórica ^d
EPC	3.1 ± 0.1	$4.0 \pm 0.2 \cdot 10^{-7}$	5.3 ± 0.3	18000 ± 1000
POPC	2.8 ± 0.1	$3.7 \pm 0.7 \cdot 10^{-7}$	6.0 ± 1.0	18000 ± 3000
ECL	4.3 ± 0.1	$3.6 \pm 0.4 \cdot 10^{-7}$	5.9 ± 0.6	28000 ± 3000

Tabla R2: Parámetros hidrodinámicos de distintos tipos de nanodiscos. ^a Coeficiente de sedimentación normalizado a 20 °C y en agua. Unidades de Svedberg. Valores promedio de al menos 2 experimentos independientes. ^b Coeficiente de difusión traslacional aparente obtenido a partir de la técnica de DLS. Unidades de cm²/s. Valores promedio de al menos 2 experimentos independientes. ^c Radio hidrodinámico en nm, calculado mediante la ecuación de Stokes-Einstein (Ecuación M13) a partir del coeficiente de difusión. ^d Masa de flotación calculada mediante la ecuación de Svedberg (Ecuación M7) a partir de los valores de coeficiente de sedimentación y difusión experimentales.

A partir del análisis expuesto más arriba, se obtuvieron valores de D_{ap} para varias muestras independientes de cada uno de los tres tipos de nanodiscos estudiados. Los resultados se muestran en la Tabla R2. A partir del valor de D_{ap} , se calculó también el radio hidrodinámico (R_h) de los nanodiscos (Tabla R2), usando la ecuación de Stokes-Einstein (Ecuación M13). Los valores de D_{ap} y R_h son muy similares en los tres tipos de nanodiscos. Los valores de R_h son iguales dentro del error que el valor esperado de 5 nm descrito en la literatura (Bayburt et al. 2002, Denisov et al. 2004).

Resultados

Por último, dado que se conoce el valor de los coeficientes de difusión y sedimentación, es posible calcular la masa de flotación (M_b) de las especies mediante la ecuación de Svedberg (Ecuación M7). Los resultados de estos cálculos, presentados en la Tabla R2, indican que nanodiscos de POPC y EPC tendrían una masa de flotación similar, mientras que la de los nanodiscos de ECL sería mayor.

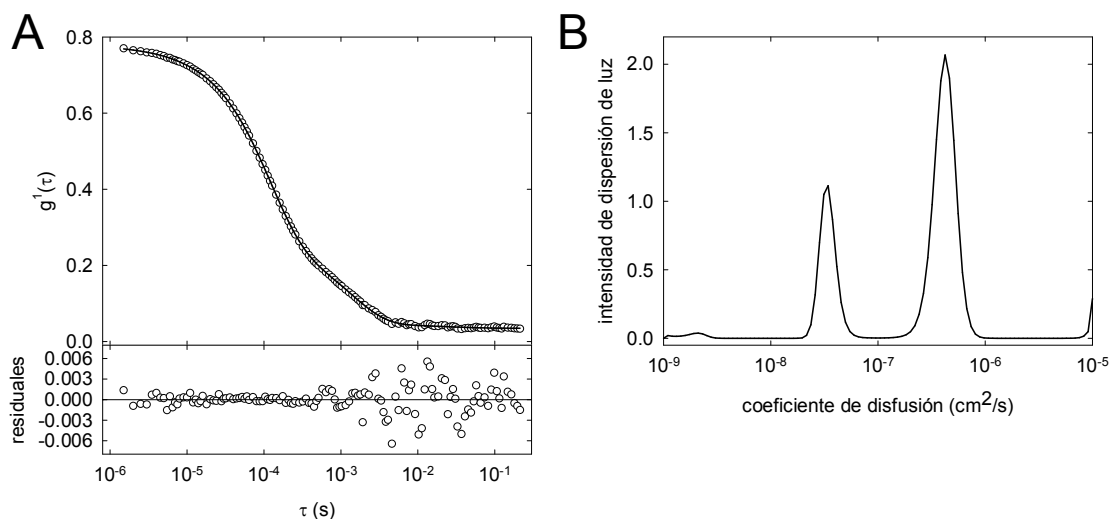


Figura R5: Ejemplo representativo del análisis por DLS de una muestra de nanodiscos. A) Curva de autocorrelación de primer orden de DLS (*símbolos*) y el ajuste realizado por SEDFIT para obtener una distribución I(D) (*línea*). Debajo se muestran los residuales del ajuste. Estos datos proceden de una muestra de nanodiscos de EPC a 1.8 μM , medidos a 20 $^{\circ}\text{C}$. **B)** Distribución de intensidad de dispersión en función del coeficiente de difusión traslacional obtenido a partir de los datos del *panel A*. En la distribución aparecen dos picos con máximos (de derecha a izquierda) a $4.2 \cdot 10^{-7}$ y $3.4 \cdot 10^{-8}$ cm^2/s , lo que equivaldría según la ecuación de Stokes-Einstein (Ecuación M13) a especies con diámetro de 10.2 y 126 nm, respectivamente. El pico con un coeficiente de difusión de 10 nm, que correspondería a nanodiscos, representa un 70 % de la señal de dispersión.

Para confirmar los resultados anteriores que indicarían que los nanodiscos de ECL tienen una masa de flotación mayor que la del resto de lípidos, se realizaron experimentos de equilibrio de sedimentación. Mediante esta técnica, se obtiene la masa de flotación promedio de las especies presentes en la muestra. En la Figura R6, se muestran experimentos representativos para los tres tipos de nanodiscos probados.

Los valores de masa de flotación obtenidos para los distintos nanodiscos se muestran en la Tabla R3. Estos valores de masa de flotación experimentales son similares, dentro del error, a los calculados mediante la ecuación de Svedberg (Ecuación M7) a partir de los coeficientes experimentales de difusión y sedimentación (Tabla R2), confirmando el hecho de que la masa de flotación de los nanodiscos de ECL es mayor que la de los otros nanodiscos probados.

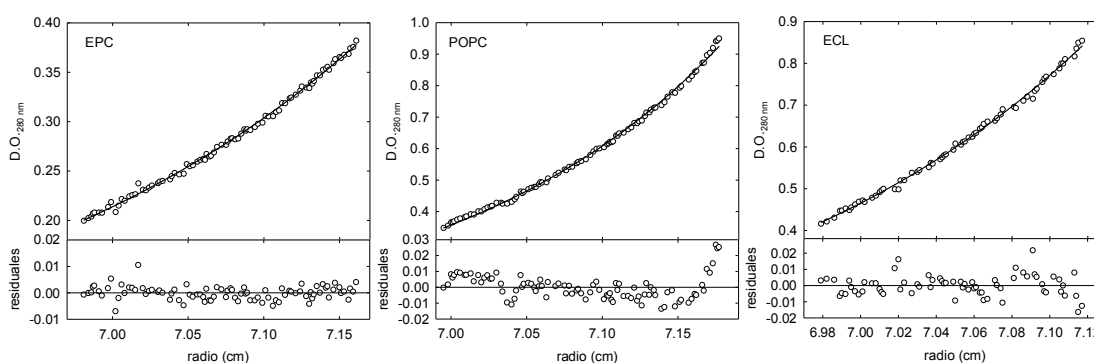


Figura R6: Experimentos de equilibrio de sedimentación representativos de nanodiscos con distintos lípidos. Todos los experimentos se realizaron en tampón de nanodiscos, a 20 °C y midiendo la absorbancia a 280 nm. La velocidad fue de 8000 rpm para EPC y ECL y de 11000 rpm para POPC. La concentración de las muestras fue de 5 μM (EPC), 13.6 μM (POPC) y 6.4 μM (ECL). Para cada experimento se muestran 2 paneles: el superior con el gradiente obtenido en el experimento (*círculos*) y el ajuste a los datos del modelo teórico para obtener la masa de flotación (*línea*); y el inferior con los residuales de dicho ajuste.

Por último, dado que se tenían valores de masa de flotación de los nanodiscos y estimaciones de masa molar promedio de éstos, se realizó una estimación del volumen específico parcial (\bar{v}) de los nanodiscos. Este valor es indicativo del volumen ocupado por una unidad de masa de la molécula, y por tanto, de cómo de compacta es dicha molécula. El \bar{v} típico para una proteína está en torno a 0.73 cm^3/g (Kratky et al. 1973), mientras que para muestras con lípidos este valor suele ser mayor. El \bar{v} calculado para nanodiscos de ECL es mucho menor que el obtenido para EPC y POPC, cuyos valores de \bar{v} son más similares entre ellos.

Lípido	M_b^a	\bar{v}^b
EPC	17900 \pm 500	0.854
POPC	17600 \pm 300	0.875
ECL	25000 \pm 2000	0.795

Tabla R3: Valores de masa de flotación y volumen específico parcial para distintos tipos de nanodiscos. ^aValores promedio de al menos dos experimentos de equilibrio de sedimentación independientes. ^bValor estimado a partir de la masa de flotación experimental y la masa molecular teórica estimada en la Tabla R2, usando la equivalencia $M_b = M \cdot (1 - \bar{v} \cdot \rho)$, donde M es la masa molecular, M_b la masa de flotación, \bar{v} el volumen específico parcial y ρ la densidad del solvente, que en el caso del tampón de nanodiscos es 1.003 g/cm^3 .

2. Nanodiscos con ZipA

2.1 Reconstitución y caracterización de ZipA en nanodiscos

2.1.1 Incorporación de una única copia de la proteína ZipA en nanodiscos formados por lípidos de *E. coli*

La mayoría de estudios publicados hasta la fecha en los que se realizan experimentos con la proteína ZipA *in vitro*, utilizan o bien mutantes de ZipA sin su única hélice transmembrana o bien se usa ZipA completa en presencia de detergentes (Erickson et al. 2010). Con el objetivo de estudiar mediante técnicas biofísicas la interacción de ZipA con FtsZ y además en un entorno lo más parecido posible al del interior de la bacteria, se reconstituyó ZipA en nanodiscos de bicapas lipídicas. El tipo de nanodiscos utilizado fue el formado por la proteína de andamiaje MSP1D1 con extracto polar de lípidos de *E. coli* (ECL). Esta combinación produce nanodiscos de unos 10 nm de diámetro (Denisov et al. 2004), como se muestra en el apartado anterior.

Para reconstituir ZipA en nanodiscos se siguió el protocolo descrito en Materiales y Métodos (Apartado 6.4). La mezcla resultante se fraccionó mediante cromatografía de exclusión molecular, de esta forma se separaron los nanodiscos que contenían ZipA de los vacíos y de la proteína MSP1D1 libre (Figura R7, A). El análisis electroforético mostró que las fracciones correspondientes al pico principal, que eluía alrededor de 11 ml, contenía tanto ZipA como MSP1D1, mientras que los dos picos siguientes no contenían ZipA (Figura R7, B). El pico con ZipA y MSP1D1 correspondería a nanodiscos con ZipA (Nd-ZipA), mientras que los dos siguientes corresponderían a nanodiscos vacíos y MSP1D1. El pico de nanodiscos de ZipA presentaba además un hombro a menor volumen de elución, que también contenía ZipA y MSP1D1 según el análisis electroforético. Mediante densitometría de estos geles, se comprobó que el ratio ZipA:MSP1D1 era más próximo a 1:2 en el centro del pico, mientras que la proporción de ZipA crecía en las fracciones correspondientes al hombro de este pico. Esto indicaría, que se estaban formando nanodiscos con más de una copia de ZipA.

Para obtener nanodiscos con una única copia de ZipA (Nd-ZipA), se juntaron las fracciones que contenían ZipA:MSP1D1 en un ratio próximo a 1:2 (según densitometría) y se volvieron a fraccionar en un segundo paso de cromatografía de exclusión molecular (Figura R7, C). Para comprobar que realmente estas fracciones correspondían a un único complejo de nanodiscos conteniendo ZipA, se realizó una electroforesis en condiciones nativas (Figura R8).

Resultados

En este experimento, las fracciones con ZipA y MSP1D1 aisladas de la cromatografía como se describe más arriba, migran en el gel nativo como una única banda con una velocidad de migración más lenta que los nanodiscos vacíos o que MSP1D1. Las muestras de ZipA no incorporada en nanodiscos no pudieron entrar en el gel ya que, probablemente, se encontraban formando agregados grandes. Estos resultados indicaban por tanto que se habían formado efectivamente nanodiscos con ZipA incorporada.

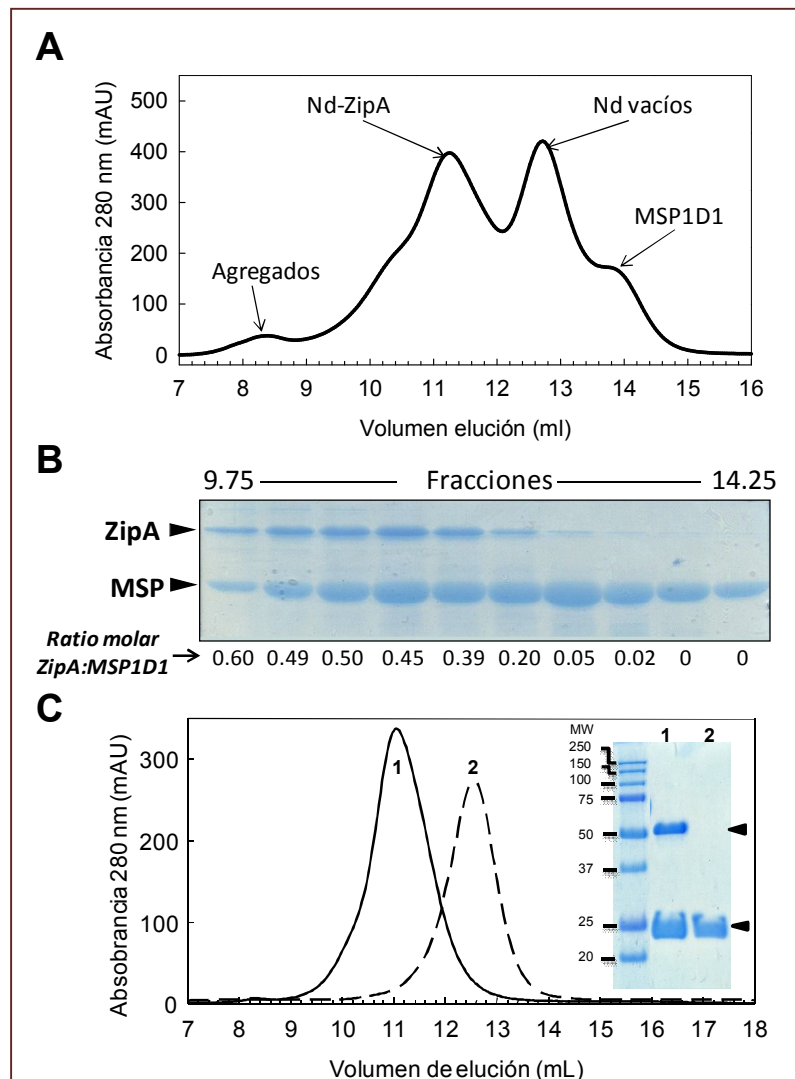


Figura R7: Análisis cromatográfico y purificación de los nanodiscos conteniendo ZipA (Nd-ZipA). A) Cromatografía de exclusión molecular de la muestra obtenida tras la eliminación del detergente de la mezcla inicial de los nanodiscos de ZipA. B) Análisis mediante SDS-PAGE de las fracciones obtenidas en A correspondientes a un volumen de elución entre 9.75-14.25 ml. Debajo de cada calle se indica el ratio molar ZipA:MSP1D1 calculado mediante densitometría. C) Análisis mediante cromatografía de exclusión molecular de Nd-ZipA purificados (*línea continua*) o de nanodiscos vacíos (*línea discontinua*). La Figura insertada muestra el análisis mediante SDS-PAGE de las fracciones tomadas del centro de los picos de Nd-ZipA (*carril 1*) o de nanodiscos vacíos (*carril 2*).

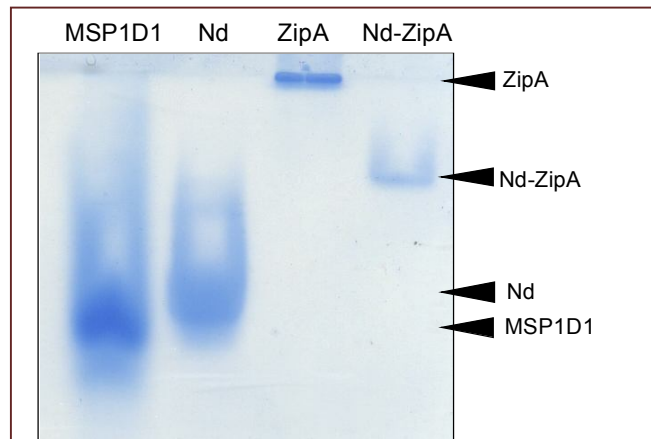


Figura R8: Electroforesis nativa de nanodiscos de ZipA. Análisis mediante electroforesis nativa en gel de poliacrilamida de la preparación final de Nd-ZipA purificados (0.9 μ g). Para comparar, se cargaron en un mismo gel ZipA solubilizada con detergente (14 μ g), nanodiscos vacíos de ECL (15 μ g) y MSP1D1 (15 μ g).

Para verificar que la preparación de Nd-ZipA presentaba una única molécula de la ZipA por nanodisco se empleó la ultracentrifugación analítica (Figura R9). Los análisis de los experimentos de velocidad de sedimentación, tanto de los nanodiscos vacíos de lípidos de *E. coli* (Nd) como de los Nd-ZipA, mostraron perfiles de sedimentación para ambas especies con una especie mayoritaria que representaba más del 90 % de la señal y con valores de coeficientes de sedimentación de 4.3 S y 4.9 S, respectivamente (Figura R9, A).

Paralelamente se llevaron a cabo experimentos de equilibrio de sedimentación para determinar el tamaño de los nanodiscos y la estequiometría de los complejos Nd-ZipA (Figura R9, B). Del análisis de los gradientes obtenidos, se obtuvieron valores de masas moleculares de flotación de 25000 ± 2000 para Nd y de 34000 ± 3000 para Nd-ZipA. La diferencia entre las masas de flotación de las dos especies, 9000, fue del orden del valor teórico esperado para una única molécula de ZipA, 10200. Dado que las masas de flotación son aditivas, esto indicaría que los complejos Nd-ZipA obtenidos contenían una única molécula de ZipA en cada nanodisco. Variaciones en la concentración de proteína en el rango entre 1-15 μ M no tuvieron impacto significativo en los coeficientes de sedimentación o masas de flotación obtenidos en los experimentos de velocidad o equilibrio de sedimentación con nanodiscos vacíos o Nd-ZipA.

La homogeneidad de los nanodiscos (Nd o Nd-ZipA) se confirmó nuevamente mediante espectroscopía de correlación de fluorescencia. Se midieron los valores de los coeficientes de difusión de dos preparaciones, nanodiscos vacíos marcados fluorescentemente y con ZipA (Nd* y Nd*-ZipA) (Figura R9, C). El marcaje se realizó añadiendo un lípido fluorescente como trazador durante la preparación de los nanodiscos, como se explica en el capítulo de Materiales y Métodos, Apartado 6.6.

Resultados

Los coeficientes de difusión traslacional no cambiaron al modificar las concentraciones de nanodiscos en el rango de 45 nM a 1 μ M.

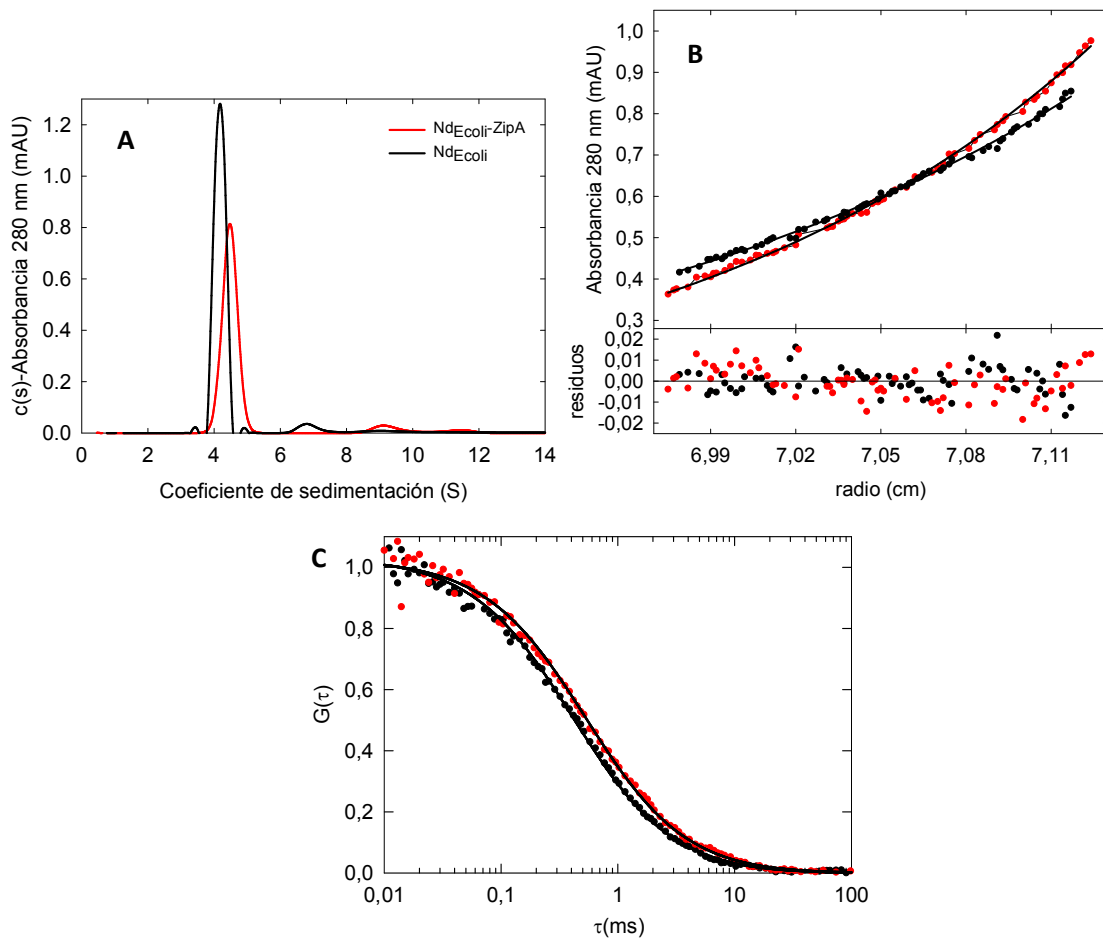


Figura R9: Caracterización biofísica de los Nd-ZipA. A) Análisis mediante velocidad de sedimentación de los nanodiscos vacíos (*línea negra*) y de los Nd-ZipA (*línea roja*). B) Perfiles de absorbancia de equilibrio de sedimentación de los nanodiscos vacíos 6.4 μ M (*línea negra*) y de Nd-ZipA 8.7 μ M (*línea roja*), obtenidos a 8000 rpm y 20 °C. Las *líneas* indican el mejor ajuste de un modelo de especie única a los datos, obteniéndose masas moleculares de flotación para los nanodiscos vacíos y para Nd-ZipA de 25000 ± 2000 Da y 34000 ± 3000 Da, respectivamente. C) Perfiles de autocorrelación de fluorescencia normalizados para Nd* (*línea negra*) y para Nd*-ZipA (*línea roja*). La concentración de los Nd* y de los Nd*-ZipA fue de 45 nM. Las *líneas* corresponden al mejor ajuste de la Ecuación M15 a los datos con los parámetros de mejor ajuste dados en la Tabla R4.

Por último, se obtuvieron valores de los coeficientes de difusión traslacional aparentes mediante DLS, tanto para nanodiscos vacíos como para Nd-ZipA, compatibles con los obtenidos por FCS (Tabla R4). Con los valores de coeficientes de difusión traslacional obtenidos por FCS, se calcularon los diámetros de nanodiscos vacíos y Nd-ZipA, usando la ecuación de Stokes-Einstein en la que se asume una geometría esférica (Ecuación M13). Para nanodiscos vacíos este valor fue de ~ 10 nm, lo cual es consistente con el valor obtenido mediante cromatografía de exclusión

Resultados

molecular (Tabla R4) y está en acuerdo con el diámetro esperado para la proteína MSP1D1. Para los Nd-ZipA se obtuvo un diámetro hidrodinámico de ~13 nm, que también concuerda con el obtenido mediante cromatografía de exclusión molecular.

	$S_{20,w}^a$	M_b^b	Diámetro de Stokes		Coeficiente de difusión	
			Filtración en gel ^c	FCS ^c	FCS ^{d,e}	DLS ^e
Nd-ZipA	4.9 ± 0.1	34000 ± 3000	13.4 ± 0.3	13.0	3.2 ± 0.4 · 10 ⁻⁷	3.5 ± 0.2 · 10 ⁻⁷
Nd	4.3 ± 0.1	25000 ± 2000	10.3 ± 0.4	10.0	4.5 ± 0.2 · 10 ⁻⁷	3.6 ± 0.6 · 10 ⁻⁷

Tabla R4: Propiedades moleculares de ZipA incorporada en nanodiscos.

a) Coeficiente de sedimentación en condiciones estándar (agua, 20 °C y dilución infinita) obtenidos del experimento de la Figura R9, A. b) Masas moleculares de flotación promedio obtenidas del experimento de la Figura R9, B. c) Los datos representan el diámetro de Stokes obtenido a partir de los coeficientes de difusión medidos por FCS. Unidades en nm. d) Calculado a partir de las curvas de autocorrelación de FCS representadas en la Figura R9, C. e) Los valores representan el promedio de al menos tres experimentos independientes. Valores con unidades de cm²/s.

Este incremento aparente de tamaño obtenido para los Nd-ZipA se atribuyó a la presencia del largo dominio desestructurado de ZipA (Ohashi et al. 2002), el cual sobresaldría de la superficie del disco, aumentando el volumen hidrodinámico de la estructura.

2.1.2 Visualización de los nanodiscos con ZipA mediante microscopía electrónica

El esquema de la Figura R10 muestra cómo estaría dispuesta ZipA en los nanodiscos de ZipA según los resultados obtenidos de la caracterización biofísica de los nanodiscos. Para caracterizar estructuralmente estos complejos, se utilizó la técnica de microscopía electrónica de transmisión utilizando tinción negativa. Para ello, las fracciones correspondientes al centro del pico de Nd-ZipA se diluyeron y se tiñeron con formiato de uranilo en rejillas recubiertas por carbono y sometidas a descarga luminiscente (*glow discharge*), para su observación mediante microscopía electrónica (Figura R11, A y B), como se describe en Materiales y Métodos (Apartado 9).

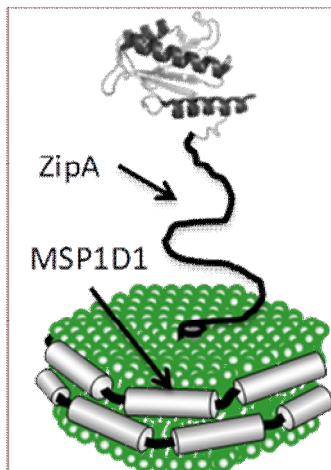


Figura R10: Reconstitución de ZipA en nanodiscos. Representación gráfica de ZipA integrada en nanodiscos.

Resultados

En las micrografías de los nanodiscos vacíos aparecían objetos circulares, la mayoría de los cuales con un diámetro de 10-11 nm (Figura R11, A). Estas imágenes resultaban consistentes con vistas a lo largo del eje longitudinal (“vistas superiores”) de discos del tamaño observado mediante FCS y DLS (Tabla R4). Sin embargo, en las micrografías de Nd-ZipA las partículas eran más heterogéneas (Figura R11, B). Por una parte, los objetos circulares que podrían ser vistas superiores de los Nd-ZipA, se encontraron en dos poblaciones diferentes con diámetros de 10-11 nm y 12-13 nm, respectivamente (Figura R11, B, *flechas negras*). Las imágenes de las partículas de 10-11 nm eran muy parecidas a las obtenidas en el caso de los nanodiscos vacíos, mientras que la presencia de complejos heterogéneos de 12-13 nm se atribuyó a la variedad en tamaño de los nanodiscos cuando ZipA está presente. Además, se encontraron vistas rectangulares con dimensiones similares al diámetro de los nanodiscos, las cuales se interpretaron como vistas laterales (vistas perpendiculares al eje longitudinal) (Figura R11, B, *flecha blanca*). Curiosamente, las vistas laterales sólo se detectaron en el caso de los Nd-ZipA, nunca en el caso de nanodiscos vacíos, lo cual se interpretó como un cambio en la preferencia por determinadas vistas al interaccionar con la película de carbono de las rejillas del microscopio electrónico cuando los nanodiscos contenía ZipA. Se han descrito cambios en la preferencia por algunas vistas durante el análisis de complejos macromoleculares mediante microscopía electrónica, y se han interpretado como un reflejo de los cambios en la macromolécula (Verschoor et al. 1985).

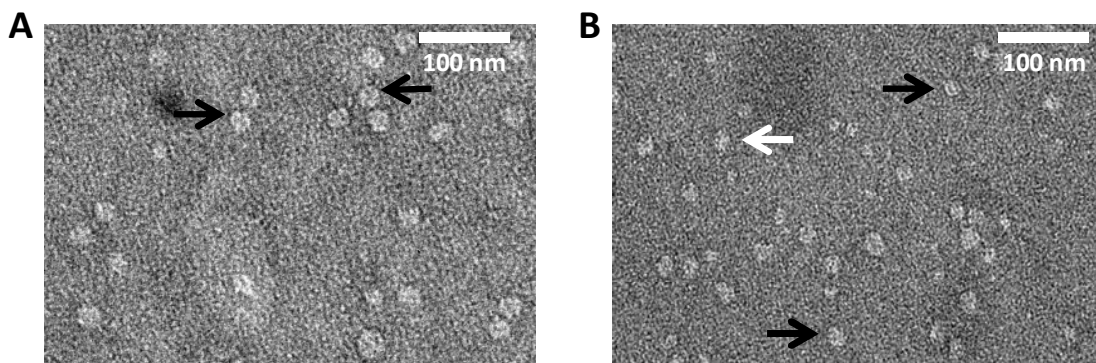


Figura R11: A) Micrografía de los nanodiscos vacíos a 30 nM donde se señalan mediante flechas algunas moléculas representativas. También se muestran dos imágenes de moléculas de nanodiscos vacíos (barra de escala, 100 nm). B) Micrografía de nanodiscos conteniendo ZipA a 30 nM donde se indican algunas moléculas circulares representativas con flechas negras y con flechas blancas las partículas representativas rectangulares. También se muestran dos imágenes de moléculas de Nd-ZipA (barra de escala, 100 nm).

Resultados

2.1.3 Reconstrucción de la estructura tridimensional de Nd-ZipA

Se extrajeron 15000 imágenes de micrografías de nanodiscos vacíos obtenidas en condiciones de mínima dosis y se clasificaron usando métodos libres de patrón para mejorar el ratio de señal/ruido (Figura R12, A). Los promedios de cada clase confirmaron que la mayoría de las imágenes de las moléculas se podían clasificar como vistas superiores de nanodiscos de unos 10-11 nm de diámetro. Igualmente, se clasificaron y promediaron 13800 imágenes de Nd-ZipA confirmando la interpretación hecha a partir de las micrografías originales, es decir, se hallaron 4 tipos predominantes de partículas (Figura R12, B), que corresponderían por un lado a vistas superiores circulares de dos diámetros diferentes (10-11 nm y 12-13 nm) y por otro lado vistas rectangulares con también presentaban dos longitudes diferentes (10-11 y 12-13 nm). Estos resultados sugieren la presencia de dos tipos mayoritarios de nanodiscos, de 10-11 nm y 12-13 nm de diámetro, con vistas rectangulares que son consistentes con las vistas laterales de los complejos. Se encontró que tanto las vistas superiores como las laterales de las especies pequeñas suponían el 70 % de las imágenes en comparación con el 30 % correspondiente a las especies grandes (una vez eliminadas las vistas inclinadas que no se podían adjudicar a ninguna de las dos especies).

Con los promedios de las vistas laterales y superiores se obtuvieron reconstrucciones 3D de los Nd-ZipA usando modelos para el refinamiento de ángulos (Materiales y Métodos, Apartado 9.1). Estos modelos se simetrizaron rotacionalmente y también se hicieron simétricos ambos lados del disco para descartar cualquier posible parcialidad (*bias*) durante el refinamiento. En una primera aproximación, se impuso una simetría rotacional alta ($c > 300$) a lo largo del refinamiento teniendo en cuenta la alta simetría del objeto a baja resolución para los estudios de tinción negativa. En el proceso de refinamiento se usó una aproximación multi-referencia (comando *multirefine*) con EMAN (Ludtke et al. 1999) en la que cada imagen de partícula del conjunto de datos se comparó con proyecciones de estructuras de referencia de 10-11 nm y 12-13 nm y se asignó a aquella con la mejor correlación. Tras la convergencia, el conjunto de datos se separó en dos grupos, pequeños y grandes. Los complejos pequeños de Nd-ZipA mostraron un diámetro de 11 nm (Figura R12, C) mientras que los complejos grandes presentaron un diámetro de 13 nm (Figura R12, D), aunque ambos tuvieron una anchura similar cercana a 6 nm y características generales muy parecidas. No se encontró ningún indicio del dominio citoplasmático sobresaliente de ZipA en los discos, ni siquiera cuando se llevaron a cabo las reconstrucciones sin imponer ninguna simetría rotacional (Figura R12, C y D). Tampoco se detectó densidad aparente que pudiera asignarse al fragmento sobresaliente de ZipA cuando se hicieron inspecciones visuales del total de imágenes y medias 2D. Esto sugiere que tanto el conector como el dominio C-terminal de ZipA puede ser que sobresalgan de los nanodiscos, es decir que no estén depositados junto a la membrana. El dominio globular de ZipA es demasiado pequeño para visualizarse como

Resultados

una densidad aislada sobre el fondo de las imágenes ya que está conectado al nanodisco de forma flexible y no se encuentra próximo. Tal densidad también sería difícil de detectar en las medias 2D y en las reconstrucciones 3D ya que la densidad se perdería después del promediado, al no estar esta siempre en la misma posición. No obstante, no se puede descartar que el dominio C-terminal de ZipA podría ser también indetectable en las proximidades del nanodisco debido a su pequeño tamaño y al efecto de la tinción.

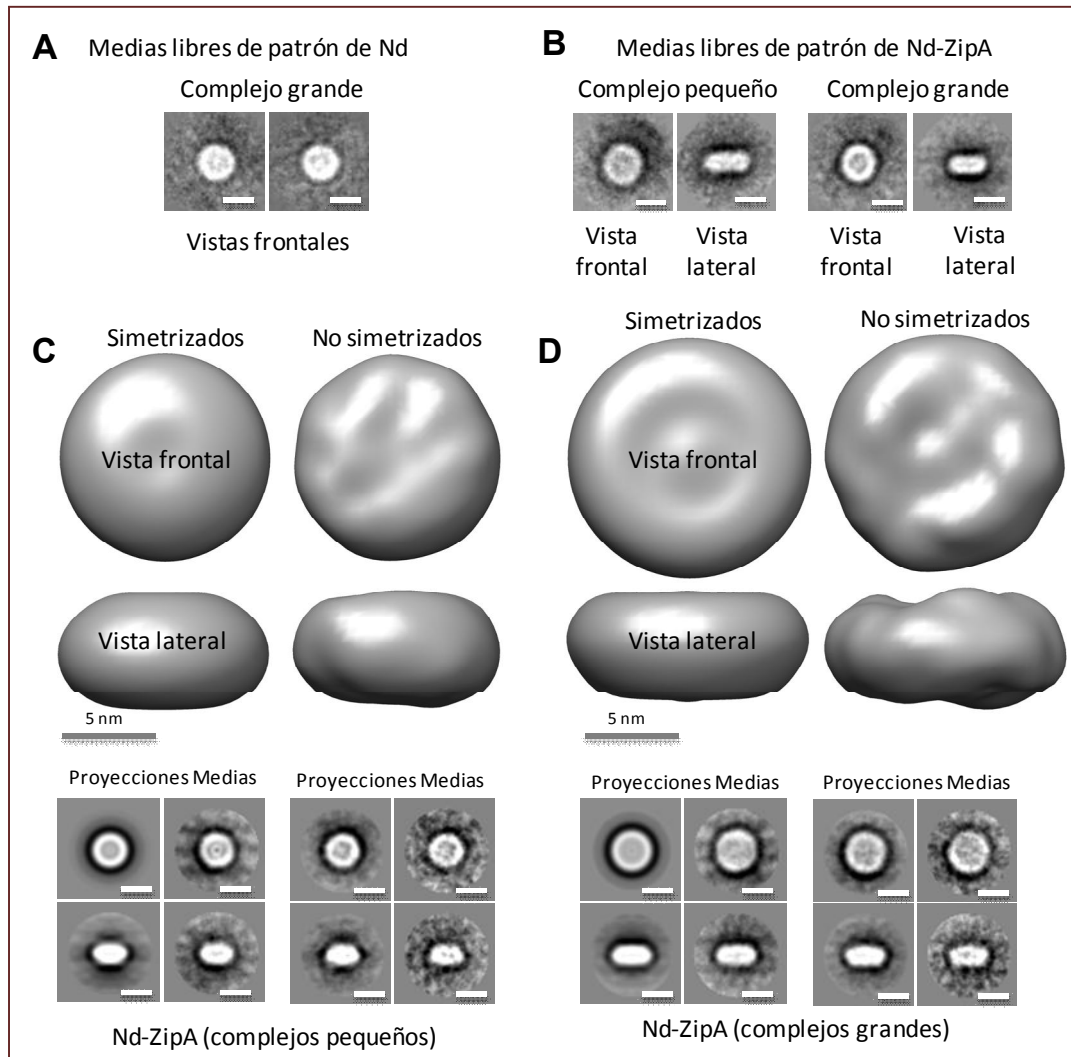


Figura R12: Microscopía electrónica de los nanodiscos de ZipA. A, Medias libres de patrón de los nanodiscos vacíos. Barra de escala, 10 nm. B, Medias libres de patrón de los complejos de Nd-ZipA. Barra de escala, 10 nm. C, Vistas frontales y laterales de las reconstrucciones 3D de las especies de Nd-ZipA de 11 nm refinadas sin asumir simetría (*paneles de la derecha*) o asumiendo simetría rotacional (*paneles de la izquierda*). En la parte de abajo se muestran proyecciones y promedios 2D obtenidos tras el refinamiento para cada una de las estructuras. D, Vistas frontales y laterales de las reconstrucciones 3D de las especies de Nd-ZipA de 13 nm refinadas sin asumir simetría (*paneles de la derecha*) o asumiendo simetría rotacional (*paneles de la izquierda*). En la parte de abajo se muestran las proyecciones y los promedios 2D obtenidos tras el refinamiento para cada una de las estructuras.

Resultados

2.1.4 Detección de ZipA en Nd-ZipA mediante anticuerpos en imágenes de microscopía electrónica

Ya que ZipA no pudo detectarse ni en la clasificación libre de patrón ni en el refinamiento de estructuras 3D, se usaron anticuerpos anti-ZipA purificados a partir de un suero policlonal anti-ZipA para detectar la presencia de ZipA accesible en el contexto de los Nd-ZipA. En primer lugar, se purificaron los anticuerpos que detectaban específicamente el dominio de unión a FtsZ (ZBD), como se describe en Materiales y Métodos, Apartado 4.3. Este suero purificado se podría unir a la proteína ZipA completa, a s_2 ZipA y a s_1 ZipA los cuales carecen del dominio transmembrana N-terminal. Además, el suero purificado se une a los Nd-ZipA pero no a los nanodiscos vacíos (Figura R13, A). Posteriormente, se aislaron inmunocomplejos que contenían anticuerpos unidos a Nd-ZipA mediante cromatografía de afinidad con columna quelante de níquel a partir de una mezcla que contenía Nd-ZipA y anticuerpos purificados (Materiales y Métodos, Apartado 4.4). Los nanodiscos unidos a la resina tenían MSP1D1 y ZipA, ambas con cola de histidinas en el N-terminal, y la elución contenía nanodiscos y anticuerpos, como se comprobó mediante un experimento de *dot blot* (Figura R13, B). Se hizo un experimento control de manera similar pero en ausencia de ZipA y se vio una menor elución de anticuerpos, confirmando así, que éstos se unían de forma específica a la ZipA insertada en los Nd-ZipA. (Figura R13, B). La co-purificación residual de anticuerpos con nanodiscos vacíos podría indicar que una pequeña fracción de anticuerpos se unirían a la resina o a los nanodiscos vacíos, pero la observación de esta muestra al microscopio electrónico reveló que los anticuerpos presentes estaban a una distancia significativa de los nanodiscos (no se muestra), lo que significa que una pequeña cantidad de anticuerpos podrían haberse retenido de forma inespecífica y haber eluido de la resina.

Los Nd-ZipA decorados con anticuerpos se observaron posteriormente en el microscopio electrónico. Las imágenes de partículas obtenidas fueron consistentes con las esperadas para esos inmunocomplejos (Figura R13, C). Se observaron moléculas con forma de “Y”, parecidas a las imágenes que aparecen en preparaciones de anticuerpos solos, que se encontraban cerca de las vistas circulares y rectangulares de los Nd-ZipA. Se encontraron anticuerpos unidos tanto a nanodiscos de 10-11 nm como de 12-13 nm con un ratio similar al observado en el caso de Nd-ZipA no decorados. En conjunto, los resultados obtenidos por *dot blot* y las imágenes de microscopía electrónica apoyan firmemente la idea de que la región citoplásmica de ZipA se proyecta desde el nanodisco, lo que la hace accesible a la interacción con otras moléculas.

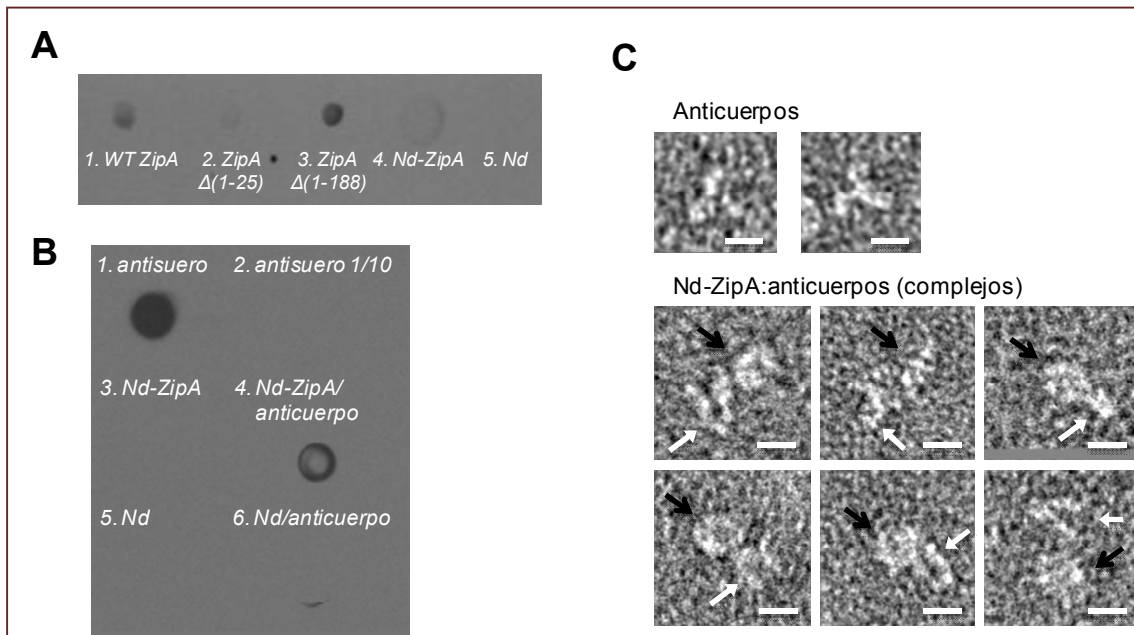


Figura R13: El dominio de unión a FtsZ de ZipA puede ser reconocido por anticuerpos de forma específica cuando ZipA se encuentra incorporada en Nd-ZipA. A) Experimento *dot blot* para comprobar la especificidad del suero purificado anti-ZipA. Las muestras indicadas se inmovilizaron en la membrana, la cual se incubó con el suero purificado anti-ZipA. B) *Dot blot* para comprobar la presencia de anticuerpos en mezclas purificadas de Nd-ZipA/anticuerpo o Nd/anticuerpo. La presencia de anticuerpos se detectó como se indica en Materiales y Métodos, Apartado 4.4. C) Complejos representativos de Nd-ZipA/anticuerpo. Las *flechas negras* indican Nd-ZipA y las *blancas* el anticuerpo. Se encontraron complejos de Nd-ZipA de 10-11 nm y de 12-13 nm decorados con anticuerpos. Las imágenes del panel representan nanodiscos de 10-11 nm, con la excepción de la imagen de la *parte inferior esquina derecha*, que son nanodiscos de 12-13 nm. En los *paneles de arriba* se muestran partículas representativas de anticuerpos. Barra de escala, 10 nm.

2.2 Interacción de ZipA reconstituida en nanodiscos con FtsZ

2.2.1 Interacción de Nd-ZipA con FtsZ en presencia de GDP

Bajo las condiciones de trabajo usadas (pH 7.5 y 0.1-0.5 M de KCl, 5 mM MgCl₂) y en presencia de GDP, los monómeros de la proteína FtsZ autoasocian de manera no cooperativa formando oligómeros cortos, siendo unidades de seis monómeros la especie más grande detectada a 500 mM KCl (Martos et al. 2010). La interacción entre estos oligómeros y ZipA, fue estudiada previamente usando para ello un mutante soluble de ZipA, sZipA, que carece de la hélice transmembrana (Martos et al. 2010). En esta tesis, se estudió interacción entre ZipA completa reconstituida en nanodiscos y FtsZ en presencia de GDP, con el objetivo de determinar la importancia de la inserción de ZipA en la membrana en su interacción con FtsZ.

Resultados

Este estudio se llevó a cabo mediante experimentos de equilibrio de sedimentación utilizando nanodiscos marcados fluorescentemente (Nd*-ZipA). Para obtener gradientes en los que sólo contribuyera la especie marcada, se midió la absorbancia de la celda a 585 nm, la longitud de onda a la que absorbe la lisamina rodamina. Como se esperaba, los Nd*-ZipA (15 μ M) sedimentaron en el equilibrio con una masa molecular de flotación de 36000 ± 1000 (Figura R14, A), parecida a los Nd-ZipA (Figura R9, B). Tras la adición de FtsZ (30 μ M) en presencia de GDP, la masa molecular de flotación de los Nd*-ZipA aumentaba hasta 55000 ± 2000 (Figura R14, A). El incremento en masa se puede atribuir a la masa aportada por FtsZ unida ya que los Nd*-ZipA son el único componente que contribuye a la señal a 585 nm. Además, se realizaron experimentos de control en los que la masa de flotación de nanodiscos vacíos marcados fluorescentemente (Nd*), no varió al añadir FtsZ-GDP.

Dado que las masas de flotación son aditivas, se puede calcular el número de subunidades de FtsZ unidas a cada nanodisco conociendo la masa de flotación de los monómeros de FtsZ y la de los nanodiscos, asumiendo que cada complejo sólo contiene un nanodisco (Ecuación M10). De esta manera, se obtuvieron curvas mostrando la dependencia de la formación de complejos Nd-ZipA/FtsZ con la concentración de FtsZ (Figura R14, B). Estas curvas se analizaron mediante un modelo de asociación (Materiales y Métodos, Apartado 8) similar al descrito para la unión de FtsZ-GDP al mutante soluble de ZipA, sZipA (Martos et al. 2010).

En todo este análisis de los datos, se asume que una única molécula de Nd-ZipA puede unirse a cada oligómero de FtsZ. Además, como primera aproximación, también se asumió que la afinidad entre una molécula de Nd-ZipA y cualquier forma oligomérica de FtsZ es idéntica, tal y como expresan las Ecuaciones M18 y M19.

Aunque estas asunciones no tendrían por qué ser necesariamente ciertas, este análisis que asume el comportamiento más simple esperable, explica cuantitativamente los datos experimentales.

Del mejor ajuste del *Modelo 1* a los datos se obtuvieron valores de $\log K_{ZZ}$ (afinidad de dos moléculas de FtsZ entre sí) y $\log K_{AZ}$ (afinidad entre una molécula de Nd-ZipA y un oligómero de FtsZ) de 5.2 ± 0.4 y 6.1 ± 0.5 , respectivamente. Estos valores son similares a los valores publicados para la unión de FtsZ y s₁ZipA en solución ($\log K_{ZZ} = 4.8$, $\log K_{AZ} = 5.7$, (Martos et al. 2010)). Estos resultados sugieren que la región transmembrana no es un factor crítico en la formación del complejo ZipA/FtsZ. Además, los valores obtenidos para las constantes de equilibrio derivados de estos análisis, en los cuales se asume un modo de asociación mixta, indican que, en presencia de GDP, las mezclas de Nd-ZipA y FtsZ se distribuyen en poblaciones en las que oligómeros de FtsZ de mayor orden (detectables hasta hexámeros) se unen a cada Nd-ZipA a medida que aumenta la concentración de FtsZ (Figura R14, C).

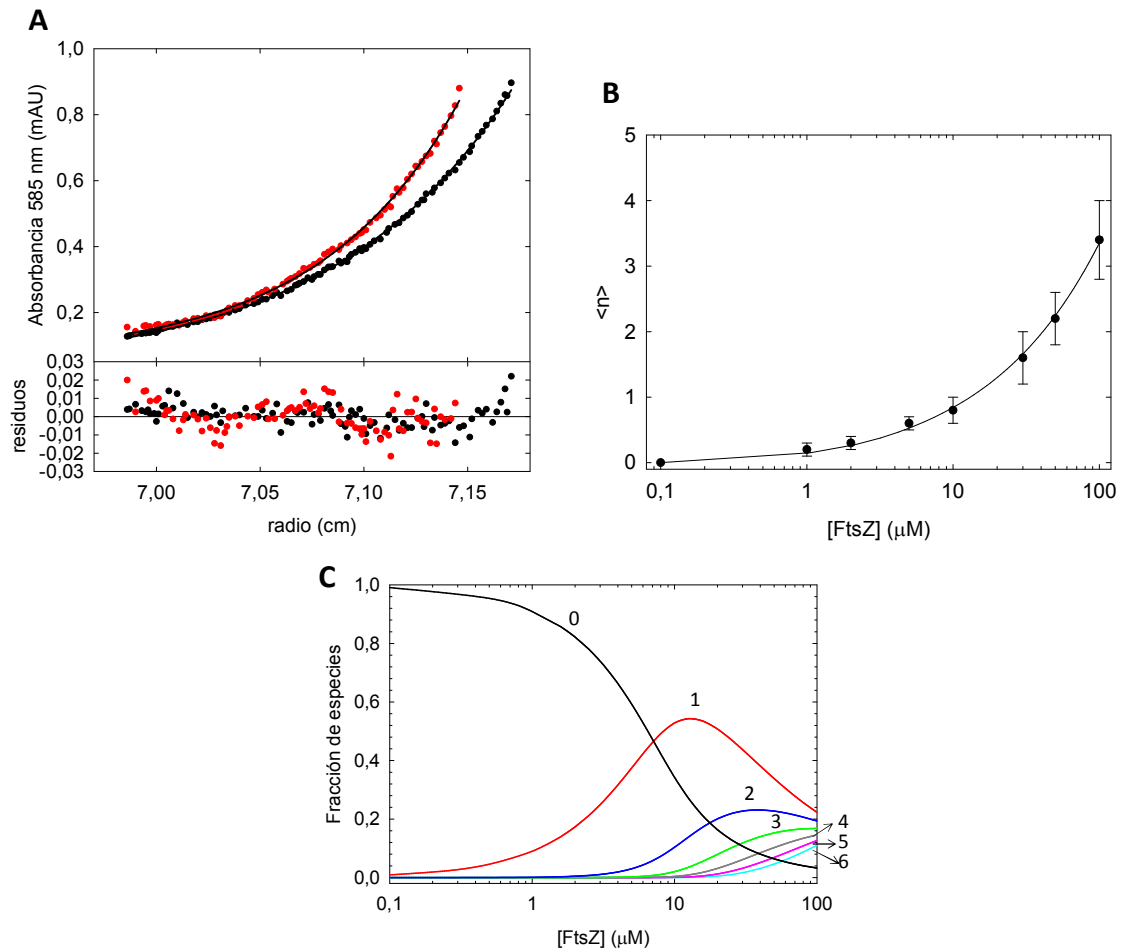


Figura R14: Interacción de Nd*-ZipA con FtsZ-GDP. A) Gradientes de equilibrio de sedimentación de Nd*-ZipA (10 μM) en ausencia (*línea negra*) o en presencia (*línea roja*) de FtsZ (50 μM), obtenidos a 8000 rpm y 20 °C. Las *líneas continuas* indican los gradientes que mejor ajustan para una única especie. B) Número de moléculas de FtsZ unidas por Nd*-ZipA $\langle n \rangle$ en función de la concentración de FtsZ calculada mediante la Ecuación M10 a partir de los datos de equilibrio de sedimentación. La *línea* representa el mejor ajuste de la Ecuación M22 a los datos experimentales con los siguientes parámetros: $\log K_{ZZ} = 5.2$ y $\log K_{AZ} = 6.1$. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de al menos 2 medidas independientes. C) Distribución fraccional del total de Nd*-ZipA (10 μM) entre especies libres y asociadas a los diferentes oligómeros de FtsZ en función de la concentración total de FtsZ, calculada usando los parámetros indicados en B. Las etiquetas indican el número de moléculas de FtsZ unido a cada molécula de Nd*-ZipA.

Resultados

2.2.2 Interacción de ZipA insertada en nanodiscos con polímeros de FtsZ en presencia de GTP o GMPCPP

Previamente a este trabajo, no se habían publicado datos cuantitativos sobre la interacción entre ZipA y polímeros de FtsZ. Por lo tanto, el objetivo fue obtener estos datos usando ZipA reconstituida en nanodiscos y FtsZ polimerizada utilizando bien GTP o bien el análogo de GTP, lentamente hidrolizado por FtsZ, GMPCPP.

Las condiciones de polimerización fueron las mismas en las que estos polímeros se caracterizaron exhaustivamente en el laboratorio mediante ultracentrifugación analítica, DLS, dispersión de luz estática y FCS (Monterroso et al. 2012). Para este estudio se utilizaron nanodiscos marcados fluorescentemente con DOPE-rodamina (Nd*-ZipA y Nd*) en experimentos de velocidad de sedimentación y FCS. En experimentos con polímeros de FtsZ-GTP, se añadió siempre un sistema enzimático de regeneración de GTP, que consiste en la adición de acetil fosfato y el enzima acetato quinasa, que consigue mantener la concentración de GTP constante durante, al menos, 1 hora (Monterroso et al. 2012, Monterroso et al. 2013).

Los perfiles de velocidad de sedimentación de Nd*-ZipA en presencia de FtsZ polimerizada mediante GTP o GMPCPP y obtenidos mediante absorbancia a 570 nm, longitud de onda en la que sólo absorbe la rodamina presente en los nanodiscos, muestran la presencia de 2 picos principales (Figura R15, B y C), uno que correspondería a nanodiscos vacíos y otro al complejo de polímeros de FtsZ y Nd*-ZipA. Los controles en los que se usó nanodiscos fluorescentes sin ZipA, no mostraron la aparición del pico correspondiente al complejo (Figura R15, A).

En el caso de los polímeros con GMPCPP, el perfil de velocidad de sedimentación de la mezcla de Nd*-ZipA (5 μ M) y FtsZ (50 μ M), muestra un pico de sedimentación más lento, con un valor de 4.3 S, que corresponde a la especie Nd*-ZipA libre. Este valor concuerda con el valor obtenido para Nd*-ZipA (sin trazador fluorescente). El pico más rápido corresponde al complejo formado por Nd*-ZipA y FtsZ, con un valor de 22.0 S, significativamente más grande que el valor obtenido para los polímeros de FtsZ-GMPCPP solos (19.0 S) (Monterroso et al. 2012).

Los datos (Figura R15, B) indican que, aproximadamente la mitad de la cantidad total de Nd*-ZipA (5 μ M) está unida al polímero (50 μ M FtsZ corresponderían a \sim 0.3 μ M de oligómero en el caso del polímero de GMPCPP (Monterroso et al. 2012)), lo que indica una media de unos cinco Nd*-ZipA unidos por oligómero. Estos resultados sugieren que los polímeros de FtsZ en presencia de GMPCPP se unen a Nd*-ZipA con afinidad moderada en el rango micromolar. El tamaño del complejo, como se refleja en los valores de S, fue independiente de la concentración de FtsZ (5-50 μ M).

Resultados

En cuanto a la unión de Nd*-ZipA a polímeros de FtsZ formados en presencia de GTP y sistema de regeneración de GTP, los experimentos de la velocidad de sedimentación mostraron resultados similares (Figura R15, C). En el experimento de la Figura R15, C aparecía también un pico más lento correspondiente a Nd-ZipA libre, con un coeficiente de sedimentación (4.3 S) similar al de los Nd-ZipA sin marcar, y otro pico a 15.5 S que correspondería al complejo de Nd*-ZipA con los polímeros de FtsZ-GTP. La señal de nanodiscos también se distribuía en un 50 % entre ambos picos. El pico del complejo también tenía un coeficiente de sedimentación mayor al del polímero en ausencia de Nd-ZipA, indicando que este complejo tiene una geometría diferente que los polímeros libres. Como los polímeros de FtsZ formados en presencia de GTP (13.0-14.0 S) son significativamente más pequeños que los formados con GMPCPP (19.0 S) (Monterroso et al. 2012), su asociación a los Nd-ZipA resulta en complejos con coeficientes de sedimentación más pequeños (16.0 S) que aquellos obtenidos con GMPCPP (22.0 S). Igual que para el caso de GMPCPP, el tamaño de los complejos formados no cambió tras el aumento en la concentración de FtsZ.

Resultados

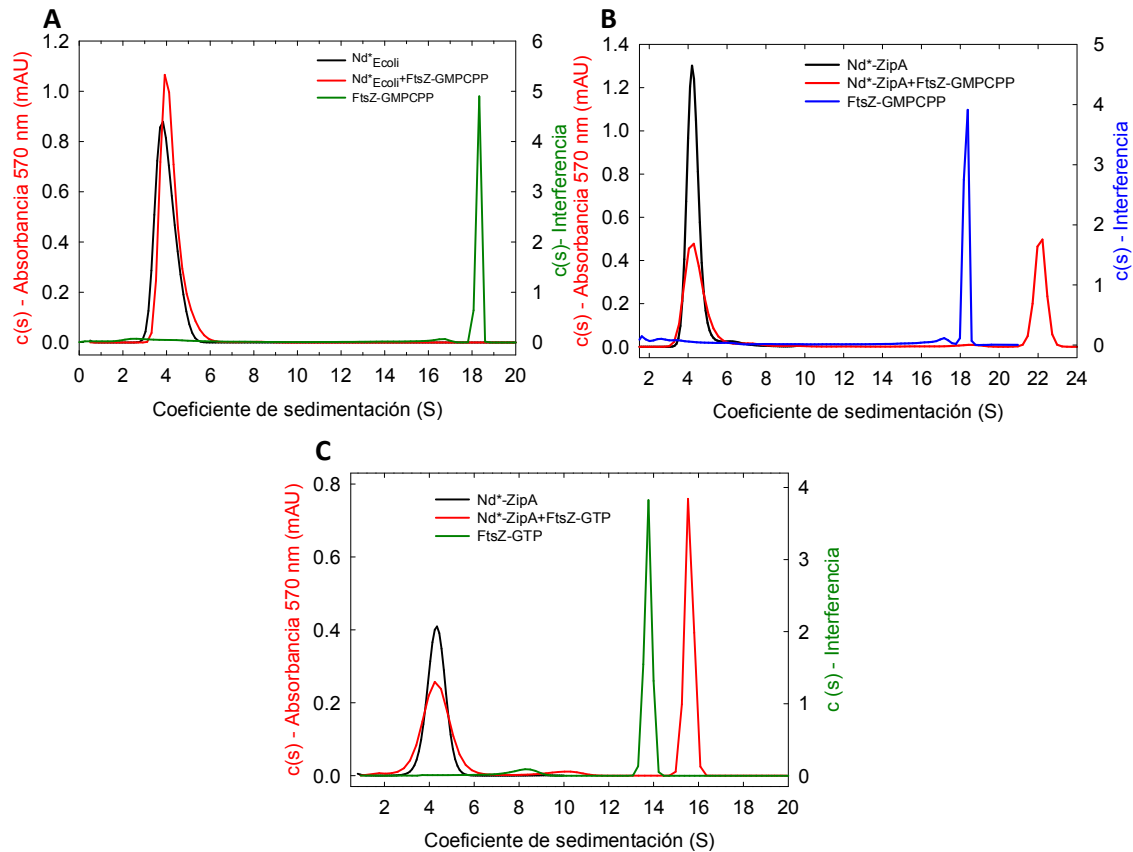


Figura R15: Análisis de la unión de Nd-ZipA a los polímeros de FtsZ mediante velocidad de sedimentación. A) Distribución de los coeficientes de sedimentación de Nd^* -vacíos (5 μ M) en ausencia (*línea negra*) o en presencia (*línea roja*) de polímeros de FtsZ-GMPCPP (12.5 μ M), obtenida a partir de los datos de absorbancia (570 nm). La *línea verde* muestra la distribución de los coeficientes de sedimentación para los polímeros de FtsZ solos, a partir de los datos por interferencia. B) Análisis de velocidad de sedimentación de la unión de Nd-ZipA a los polímeros de FtsZ en presencia de GMPCPP. Distribución de los coeficientes de sedimentación de Nd^* -ZipA (5 μ M) en ausencia (*línea negra*) y en presencia (*línea roja*) de FtsZ (50 μ M) obtenida a partir de los datos de absorción (570 nm). La *línea azul* representa la distribución de los coeficientes de sedimentación de FtsZ-GMPCPP sola a partir de los datos de interferencia en el mismo experimento. C) Unión de Nd-ZipA a polímeros de FtsZ en presencia de GTP y sistema de regeneración de GTP. Análisis por velocidad de sedimentación de Nd^* -ZipA (5 μ M) en ausencia (*línea negra*) y en presencia (*línea roja*) de polímeros de FtsZ-GTP (25 μ M) obtenido a partir de los datos de absorción (570 nm). La *línea verde* representa la distribución de los coeficientes de sedimentación de FtsZ-GTP sola a partir de los datos de interferencia.

Para determinar la afinidad de la interacción de los polímeros de FtsZ con los Nd^* -ZipA, se usó la técnica de FCS. La curva de autocorrelación de Nd^* -ZipA medida mediante FCS en presencia de polímeros de FtsZ-GTP o de polímeros de FtsZ-GMPCPP, muestra un desplazamiento a mayores tiempos de difusión, lo que indicaría la presencia de especies de mayor tamaño correspondientes a complejos Nd^* -ZipA/FtsZ polimérica (Figura R16, A).

Resultados

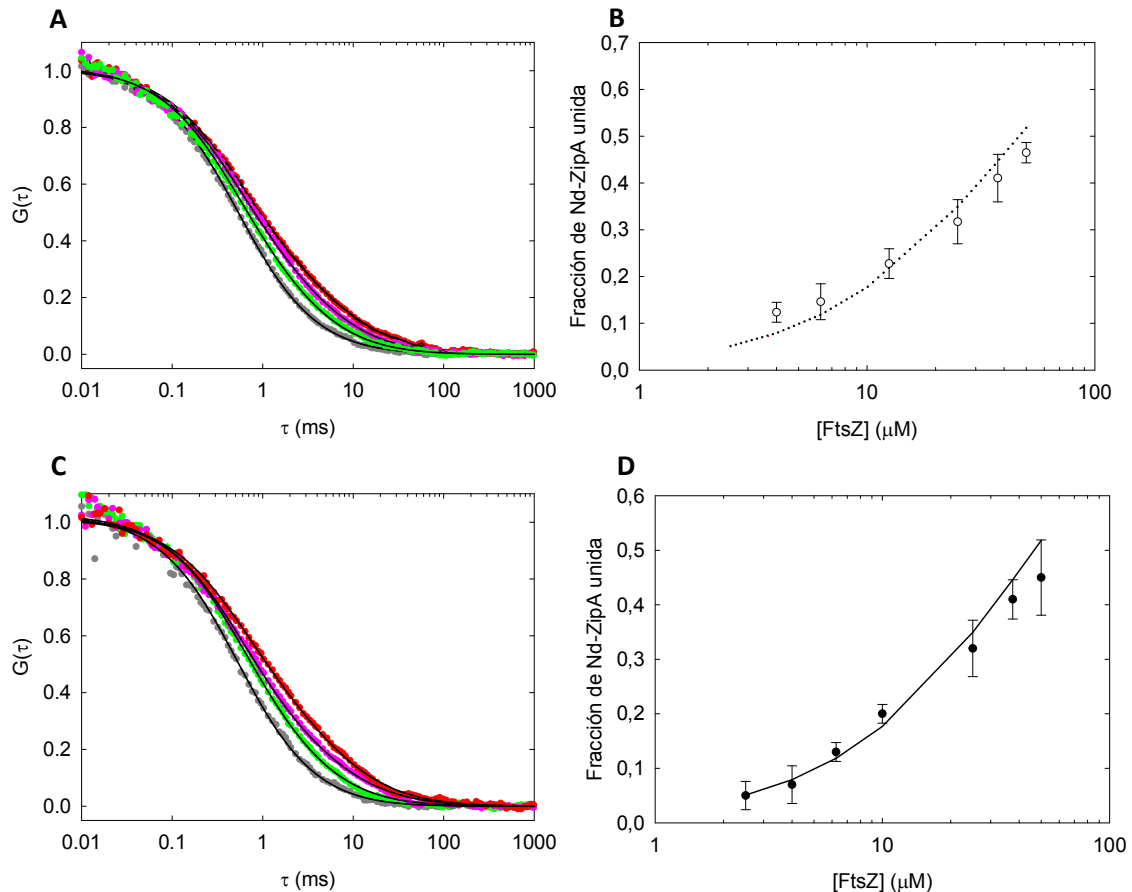


Figura R16: Unión de Nd-ZipA a polímeros de FtsZ en presencia de GTP/sistema de regeneración de GTP o GMPCPP. A) Perfiles de autocorrelación de FCS normalizados de Nd*-ZipA (45 nM de trazador, 1 μ M total de Nd-ZipA) en ausencia de FtsZ (*círculos grises*), con 10 μ M de FtsZ (*círculos verdes*), con 25 μ M de FtsZ (*círculos morados*) y con 50 μ M de FtsZ (*círculos rojos*) en presencia de GTP/sistema de regeneración de GTP. Las líneas corresponden a los mejores ajustes de las Ecuaciones M15 y M16 a los datos. B) Fracción de Nd-ZipA unida a polímeros de FtsZ-GTP en función de la concentración de FtsZ medida por FCS. La línea de puntos representa el mejor ajuste de la Ecuación M25 para FtsZ-GMPCPP (Figura R16, D) con el parámetro $\log K_{AZ} = 6.2$. Las barras de error corresponden a la desviación estándar calculada para al menos 4 experimentos independientes. C) Perfiles de autocorrelación de FCS normalizados de Nd*-ZipA (45 nM de trazador, 1 μ M total de Nd-ZipA) en ausencia de FtsZ (*círculos grises*), con 10 μ M de FtsZ (*círculos verdes*), con 25 μ M de FtsZ (*círculos morados*) y con 50 μ M de FtsZ (*círculos rojos*) en presencia de GMPCPP. Las líneas corresponden al mejor ajuste de las Ecuaciones M15 y M16 a los datos. D) Fracción de Nd-ZipA unida a polímeros de FtsZ-GMPCPP en función de la concentración de FtsZ medida por FCS. La línea representa el mejor ajuste de las Ecuaciones M25 y M26 con el parámetro $\log K_{AZ} = 6.3$. Las barras de error corresponden a la desviación estándar calculada para al menos 4 experimentos independientes. En ambos casos, se obtuvieron los mismos resultados sin la adición de Nd*-ZipA.

Resultados

Para confirmar la presencia de complejos FtsZ/Nd-ZipA, se usó la espectroscopía de correlación cruzada de fluorescencia (FCCS). En esta técnica se obtienen trazas de intensidad de dos especies marcadas con dos fluoróforos distintos, en este caso Nd*-ZipA y FtsZ marcada con Alexa488. En estos experimentos, se generaron tres curvas separadas tras la excitación simultánea de los dos fluoróforos, las funciones de autocorrelación correspondientes a cada una de las dos sondas y el perfil de correlación cruzada, que surge del análisis de la correlación entre las trazas de intensidad recogidas en los dos canales. La aparición de una curva de correlación cruzada con amplitud diferente de 0 constituye un indicador claro de la presencia de una fracción significativa de complejos heterólogos de Nd-ZipA con FtsZ ensamblada (Figura R17).

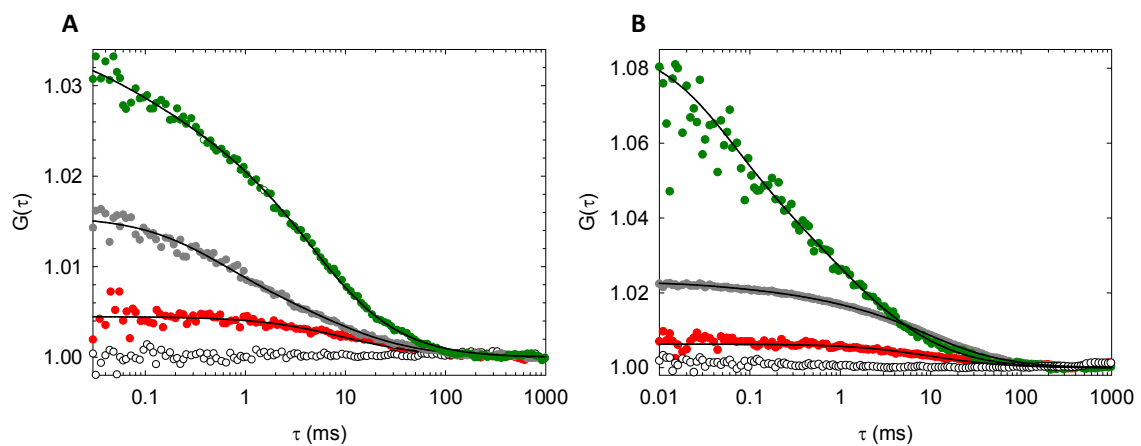


Figura R17: Unión de Nd-ZipA a polímeros de FtsZ mediante FCCS. A) Perfiles de autocorrelación y correlación cruzada obtenidos a partir de medidas de FCCS de la interacción de Nd*-ZipA (300 nM) y polímeros de FtsZ (12.5 μ M) marcada con FtsZ-Alexa 488 (150 nM) como trazador. FtsZ fue polimerizada con la adición de 1 mM GTP y el sistema de regeneración de GTP. Los *círculos grises y verdes* representan las curvas de autocorrelación de las especies que contenían Nd*-ZipA y FtsZ-Alexa 488, respectivamente. Las líneas corresponden al ajuste de los modelos indicados en Materiales y Métodos, Apartado 8. La curva de correlación cruzada del complejo se muestra como *círculos rojos*. En comparación, la curva casi plana obtenida para las muestras en las que se reemplazaron los Nd*-ZipA por Nd* se muestra como *círculos blancos*. B) Perfiles de autocorrelación y correlación cruzada de un experimento de FCCS equivalente al de A, pero en este caso usando GMPCPP a 0.4 mM para inducir la polimerización. Las concentraciones de moléculas, así como las correspondencias de los símbolos son iguales que en A.

Una vez confirmada la presencia de complejos mediante FCCS, se procedió al análisis de las curvas de FCS de Nd*-ZipA en presencia de FtsZ polimérica, representadas en la Figura R16, para obtener el porcentaje de éstos unidos al polímero.

Resultados

Es importante recalcar que ni la intensidad de fluorescencia ni la amplitud de las curvas de autocorrelación de Nd*-ZipA variaban al añadir FtsZ ensamblada, lo cual indica que la contribución de Nd*-ZipA unidos o libres al perfil de autocorrelación sólo dependía de la abundancia relativa de ambas especies.

Por lo tanto, se analizaron estas curvas de autocorrelación usando un modelo empírico según el cual la especie fluorescente (Nd*-ZipA) sólo existe en uno de los dos estados, libre o unido a la especie polimérica. Cabe recalcar que la fracción de Nd-ZipA unida a filamentos de FtsZ estimada a partir de este análisis (0.23 ± 0.03) es compatible dentro del error con la que se estima a partir de la amplitud de la curva de autocorrelación de fluorescencia (0.17 ± 0.05) (Figura R17), a la misma concentración de FtsZ ($12.5 \mu\text{M}$).

Para obtener la constante de equilibrio para la unión de una molécula de Nd-ZipA a cada protofilamento, se llevaron a cabo experimentos en los que una concentración fija de Nd*-ZipA fluorescentes (45 nM), en ausencia o presencia de Nd-ZipA sin marcar hasta $1 \mu\text{M}$, se titulaba con concentraciones variables de FtsZ (formas GTP o GMPCPP). Se analizaron las curvas de autocorrelación resultantes para obtener la fracción de especie unida, como se explica más arriba, y así construir curvas de unión en función de la concentración de FtsZ en presencia de GTP o GMPCPP (Figura R16, B y D). En el análisis de las curvas de unión (Figura R16, B y D), no se hizo ninguna suposición respecto al número de Nd-ZipA unidos por filamento. A la concentración más alta de FtsZ ($50 \mu\text{M}$) y de Nd-ZipA ($1 \mu\text{M}$) examinadas, sólo la mitad de ZipA ($0.5 \mu\text{M}$) se encuentra unida a los polímeros, que a dicha concentración de subunidades de FtsZ, representarían una concentración de $\sim 0.5 \mu\text{M}$ de protofilamentos de GTP de unas 100 subunidades cada uno (Monterroso et al. 2012), y por lo tanto, el número medio de Nd-ZipA unidos por molécula de polímero sería de sólo 1. Esto está de acuerdo con las suposiciones subyacentes en las Ecuaciones M23-M26. Del mejor ajuste de las Ecuaciones M25 y M26 a los datos, se obtuvo un valor de constante de afinidad para los Nd-ZipA a los polímeros de FtsZ ($\log K_{AZ}$) de 6.3 ± 0.3 .

Por último, se representó la fracción de Nd-ZipA unida a oligómeros, tanto en forma FtsZ-GDP como en el caso de polímeros de FtsZ-GTP, en función de la concentración de oligómero (Figura R18). Este análisis muestra que, aunque los dos tipos de oligómero son muy diferentes en tamaño medio (~ 2 frente a ~ 100), la afinidad de unión al oligómero es casi la misma. El resultado de este análisis fue similar para la unión de Nd-ZipA a polímeros de GMPCPP (Figura R18).

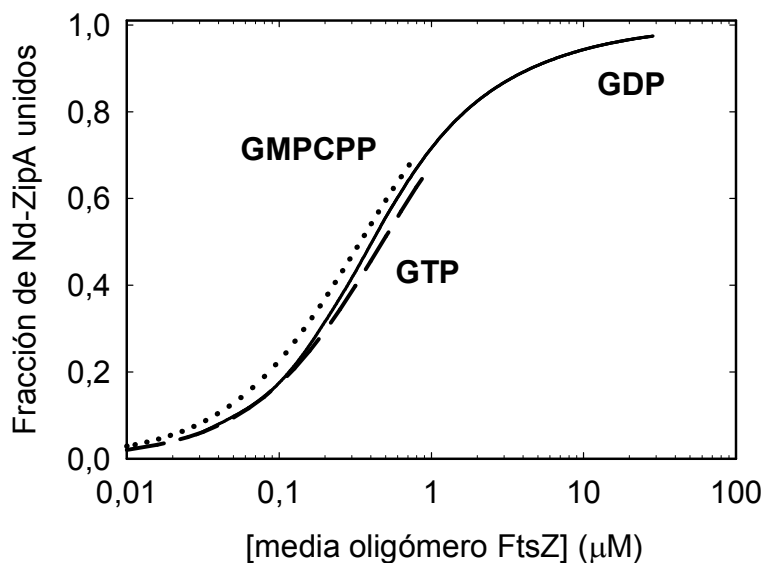


Figura R18: Fracción molar de Nd-ZipA unida en función de la concentración del oligómero promedio de FtsZ en presencia de GDP (línea continua), GTP (línea discontinua) y GMPCPP (línea de puntos) a 1 μM de Nd-ZipA, asumiendo 2, 100 y 140 moléculas de FtsZ por oligómero de FtsZ-GDP, -GTP o -GMPCPP, respectivamente. Las distribuciones se calcularon usando los valores de los parámetros de mejor ajuste indicados en la leyenda de la Figura R14, B (GDP) y en el panel D de la Figura R16 (GMPCPP y GTP). Para facilitar el análisis comparativo, la fracción de Nd*-ZipA unida a FtsZ-GDP representa la suma de todas las especies de Nd-ZipA que contienen FtsZ en cantidad significativa.

2.2.3 Inhibición de la unión de Nd-ZipA a los polímeros de FtsZ mediante péptidos derivados del C-terminal de FtsZ

Se ha descrito que la interacción entre FtsZ y ZipA se produce a través del dominio globular de la región C-terminal de ZipA y los últimos aminoácidos del extremo C-terminal de FtsZ (Mosyak et al. 2000). En un trabajo previo, se sintetizó un péptido de 17 aminoácidos conteniendo los residuos del C-terminal de FtsZ (367-383) y se estudió su unión a ZipA usando un mutante conteniendo únicamente el dominio globular C-terminal de ZipA, ZipA $\Delta(185-328)$, cristalizándose el complejo y hallándose su estructura. Posteriormente, con el objetivo de diseñar inhibidores de la interacción FtsZ-ZipA, se realizaron ensayos de competición usando polarización de fluorescencia para los que se diseñaron dos péptidos diferentes (CTZ-WT y CTZ-MUT, descritos en Materiales y Métodos, Apartado 3). Estos péptidos mimetizan el segmento de la región C-terminal de FtsZ y se ha descrito que puede unir el dominio de unión de FtsZ de ZipA (ZBD) (Kenny et al. 2003). La afinidad de la unión de CTZ-MUT a la región C-terminal de ZipA es un orden de magnitud mayor que la de CTZ-WT (Kenny et al. 2003). Con el objetivo de comprobar si los ensayos de unión descritos en este trabajo pueden usarse para la búsqueda de inhibidores de la interacción entre ZipA y FtsZ, se probó la capacidad de estos dos péptidos de competir con FtsZ por la unión a ZipA.

Resultados

Para ello se usó la técnica de espectroscopía de correlación de fluorescencia, con la que se midió la capacidad de estos péptidos para inhibir la unión de los Nd-ZipA a los polímeros de FtsZ. Las curvas de autocorrelación (Figura R19, A) muestran una difusión traslacional más rápida tras la adición del péptido CTZ-MUT, compatible con una disociación completa de los Nd*-ZipA de los polímeros de FtsZ-GMPCPP. Este efecto tan marcado no se observa al añadir el péptido CTZ-WT en concentración equimolar. Al añadir un exceso molar 10 veces mayor de ambos péptidos respecto a FtsZ a las mezclas de Nd*-ZipA unidos a los polímeros de FtsZ, se obtuvieron curvas de autocorrelación que se solapan con las curvas de los Nd*-ZipA en ausencia de FtsZ. Esto es compatible con una disociación completa de los Nd*-ZipA de los polímeros de FtsZ-GMPCPP en el caso de ambos péptidos (no se muestra).

Los perfiles de sedimentación de Nd*-ZipA en presencia de polímeros de FtsZ-GMPCPP y CTZ-MUT (Figura R19, B) sólo presentan un pico correspondiente al de Nd*-ZipA libres, sin ningún rastro de complejos de Nd*-ZipA con polímeros. Para un exceso de 10 veces, el péptido CTZ-MUT causó una disociación completa incluso a una concentración de péptido menor (equivalente al ratio molar 1:1 péptido:FtsZ). Sin embargo, en el caso del péptido CTZ-WT, sólo se encontró un descenso del 60 % en la fracción de Nd-ZipA unidos. Estas observaciones concuerdan con las diferentes afinidades descritas para los dos péptidos (Kenny et al. 2003). Como cabía esperar, la disociación del complejo Nd*-ZipA-FtsZ producida por el péptido fue similar cuando el polímero se formó en presencia de GTP y sistema de regeneración de GTP.

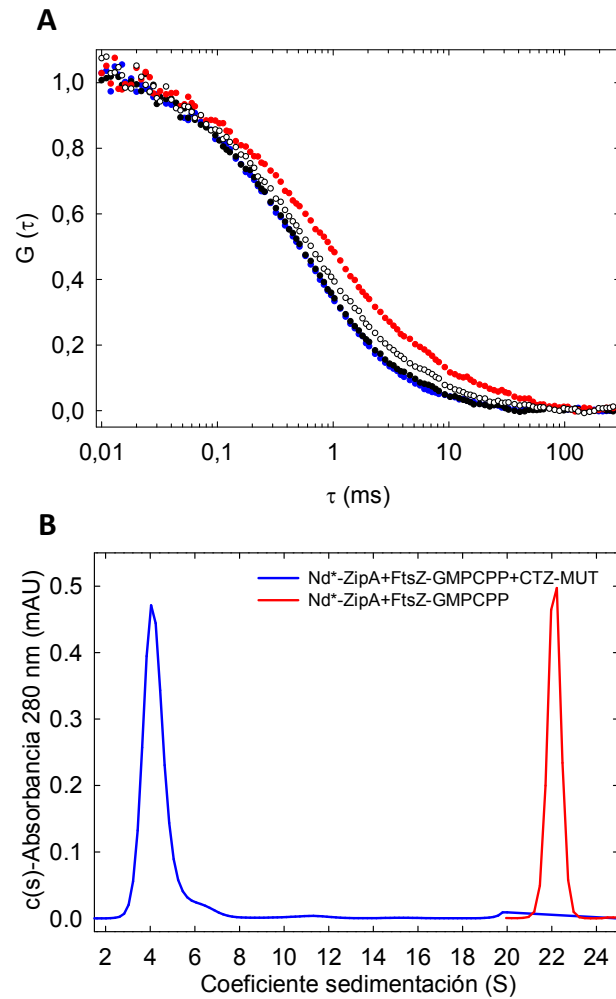


Figura R19: Inhibición de la unión de Nd*-ZipA a los polímeros de FtsZ por la acción de péptidos del C-terminal de FtsZ. A) Funciones de autocorrelación normalizadas de Nd*-ZipA en ausencia (*círculos negros*) y en presencia (*círculos rojos*) de 25 μ M de FtsZ. Se muestran los perfiles de FCS de las mezclas Nd*-ZipA:FtsZ tras la adición de 25 μ M de CTZ-MUT (*círculos azules*) o CTZ-WT (*círculos blancos*). Las líneas corresponden al ajuste de las Ecuaciones M15 y M16 a los datos. La polimerización de FtsZ se indujo mediante la adición de 1 mM GMPCPP. B) Perfiles de sedimentación de Nd*-ZipA (3 μ M) en presencia de 12.5 μ M de FtsZ-GMPCPP y de 12.5 μ M del péptido CTZ-MUT (*línea azul*). También se muestra el perfil teórico correspondiente a Nd*-ZipA unidos totalmente a FtsZ-GMPCPP (*línea roja*).

2.2.4 Visualización de los complejos Nd-ZipA/FtsZ mediante microscopía electrónica

Una vez comprobado que ZipA reconstituida en nanodiscos es capaz de unir FtsZ en su forma polimérica se planteó la posibilidad de usar estos nanodiscos para analizar estructuralmente esas interacciones macromoleculares mediante microscopía electrónica. FtsZ polimeriza en presencia de GTP formando estructuras diferentes dependiendo de la concentración de proteína y de las condiciones del tampón.

Resultados

A concentraciones de proteína bajas (1-10 μM), los polímeros de FtsZ teñidos negativamente aparecen como filamentos lineales de 4-5 nm de ancho con distinta longitud y curvatura (Figura R20). Estas estructuras se consideran la forma polimérica más simple de FtsZ y la unidad de construcción del anillo de FtsZ en el divisoma (Erickson et al. 2010). Mediante el uso de diversos aditivos, como el agente aglomerante Ficoll (Gonzalez et al. 2003), o el modulador de la polimerización ZapA (Mohammadi et al. 2009), estos filamentos se pueden agregar para dar estructuras de mayor orden. Bajo las condiciones empleadas se encontró una cantidad mínima de agregados de filamentos (Figura R20, A).

Usando los valores de la constante de afinidad aparente entre los Nd-ZipA y los polímeros de FtsZ-GTP obtenida mediante FCS ($\log K_{AZ} = 6.3 \pm 0.3$), se puede deducir que, a las concentraciones en las que es posible distinguir filamentos individuales en micrografías electrónicas (1-5 μM), sólo el 2-10 % de los Nd-ZipA estarán unidos a los filamentos en solución. Para saturar los filamentos con nanodiscos haría falta añadir una concentración muy alta de éstos, lo que haría muy difícil distinguir aquellos que están unidos de los que simplemente se han depositado próximos a un filamento. Por lo tanto, se decidió el llevar a cabo un experimento de captura en el que la superficie de carbón de las rejillas de microscopía electrónica se cubrió completamente con nanodiscos para evitar la absorción no específica de los filamentos de FtsZ a la superficie de la rejilla. Tras un paso de lavado, se incubó la rejilla con FtsZ en presencia de GTP y se observó la preparación al microscopio. Cuando se hizo el experimento con nanodiscos vacíos, los polímeros de FtsZ no se retuvieron, como se concluyó tras un exhaustivo análisis de numerosas rejillas (Figura R20, B). Estos resultados sugirieron que los filamentos de FtsZ no fueron capaces de unirse a una superficie cubierta por nanodiscos. Por el contrario, las superficies cubiertas por Nd-ZipA mostraron filamentos depositados sobre la superficie de los nanodiscos, efecto específico que parece deberse a la molécula ZipA insertada en los nanodiscos (Figura R20, C). Curiosamente, no se detectó la presencia de agrupaciones de filamentos en presencia de Nd-ZipA.

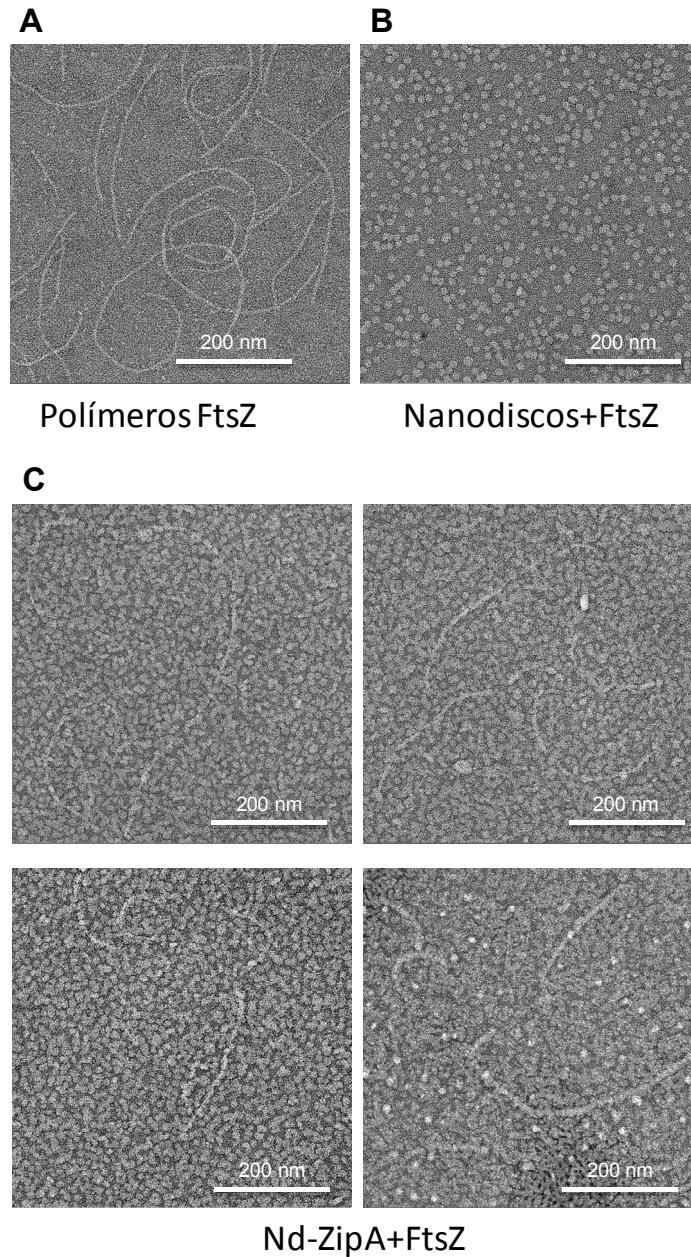


Figura R20: Nd-ZipA capturados específicamente por polímeros de FtsZ. A) Típica micrografía de filamentos de FtsZ-GTP preparados como se describe en Materiales y Métodos, Apartado 9. B) Experimento control en el cual se cubrió la superficie con nanodiscos vacíos y se incubó con polímeros de FtsZ. C) Captura de filamentos de FtsZ en superficie cubierta con Nd-ZipA. Se muestra una selección de polímeros de FtsZ sobre una superficie de Nd-ZipA. En B y C, Las rejillas de microscopía electrónica recubiertas de carbono sometidas a descarga luminiscente (*glow discharge*) se incubaron 30 s con una solución 600 nM, tanto de nanodiscos vacíos como de Nd-ZipA, respectivamente. Tras un paso de lavado, se incubaron las rejillas con FtsZ 1.35 μ M en condiciones de polimerización.

3. Reconstitución de FtsN en nanodiscos

3.1 Purificación y caracterización de FtsN

Como paso previo a la reconstitución de FtsN en nanodiscos se puso a punto la purificación de esta proteína. La variante empleada, llamada His₆-FtsN, permitió su purificación mediante cromatografía de afinidad a metales, como se describe exhaustivamente en Materiales y Métodos, Apartado 2.5. La Figura R21 muestra un análisis electroforético de una purificación representativa.

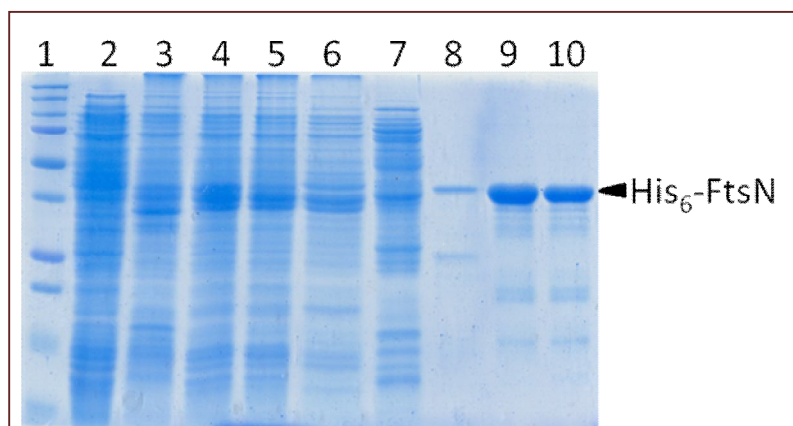


Figura R21: Análisis electroforético de una purificación representativa de His₆-FtsN. Se cargó un gel al 12 % de acrilamida en condiciones desnaturalizantes con las siguientes muestras: 1, Marcador de peso molecular; 2, fracción soluble sin detergentes; 3, fracción insoluble a 1 % Triton X100; 4, fracción soluble a 1 % Triton X100; 5, proteína no retenida; 6, lavado 1; 7, lavado 2; 8, lavado 3; 9 y 10, fracciones del pico de elución de FtsN a 1.8 y 1.3 mg/ml, respectivamente. Se cargaron 3 μ L de cada muestra, excepto para los lavados en los que se cargó 10 μ L. Las bandas del marcador de peso molecular corresponden (de mayor a menor) a 250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20, 15 y 10 kDa.

Del proceso de purificación, se obtuvieron muestras que en el análisis electroforético presentaban una banda mayoritaria, que migraba de acuerdo a la masa molecular predicha para His₆-FtsN, es decir, aproximadamente 40 kDa. La pureza de esta banda, medida mediante densitometría, variaba entre un 75 y un 90 % según la purificación y la fracción analizada. Además, estas muestras siempre presentaban bandas minoritarias de menor peso molecular que la banda principal en la electroforesis. Esto nos hizo sospechar que, o bien parte de la proteína se degradaba proteolíticamente durante la purificación, o bien esta degradación ya ocurría en las células durante la expresión. A pesar del uso rutinario de inhibidores de proteasas durante los dos pasos de extracción de la proteína (PMSF a 1 mM y un cóctel de inhibidores de proteasas comercial), estas bandas no desaparecieron.

Para comprobar si las bandas de menor peso molecular correspondían a FtsN degradada proteolíticamente, y determinar si esta degradación proseguía tras los distintos pasos de purificación, se realizó un experimento en el que se incubó a temperatura ambiente una muestra de His₆-FtsN purificada y dializada en tampón C, a

Resultados

una concentración 0.35 g/l. Se tomaron alícuotas a distintos tiempos que fueron analizadas mediante electroforesis desnaturalizante y *western-blot* (Figura R22, A y B). En el *western blot*, el anticuerpo policlonal anti-FtsN fue capaz de reconocer, no sólo la banda principal, si no también bandas que se ven muy tenues mediante tinción con *Coomasie*, situadas justo por debajo de la banda del marcador de peso molecular de 37 kDa. Esto indicaría que sólo algunas de las bandas de menor peso molecular detectadas con His₆-FtsN purificada corresponderían a His₆-FtsN proteolizada en diverso grado. Mediante densitometría se comprobó que la importancia de la banda de His₆-FtsN disminuye ligeramente con el tiempo en el gel teñido con *Coomasie*, mientras que la señal correspondiente a las bandas proteolíticas aumenta ligeramente con el tiempo en el *western-blot* (Figura R22, C).

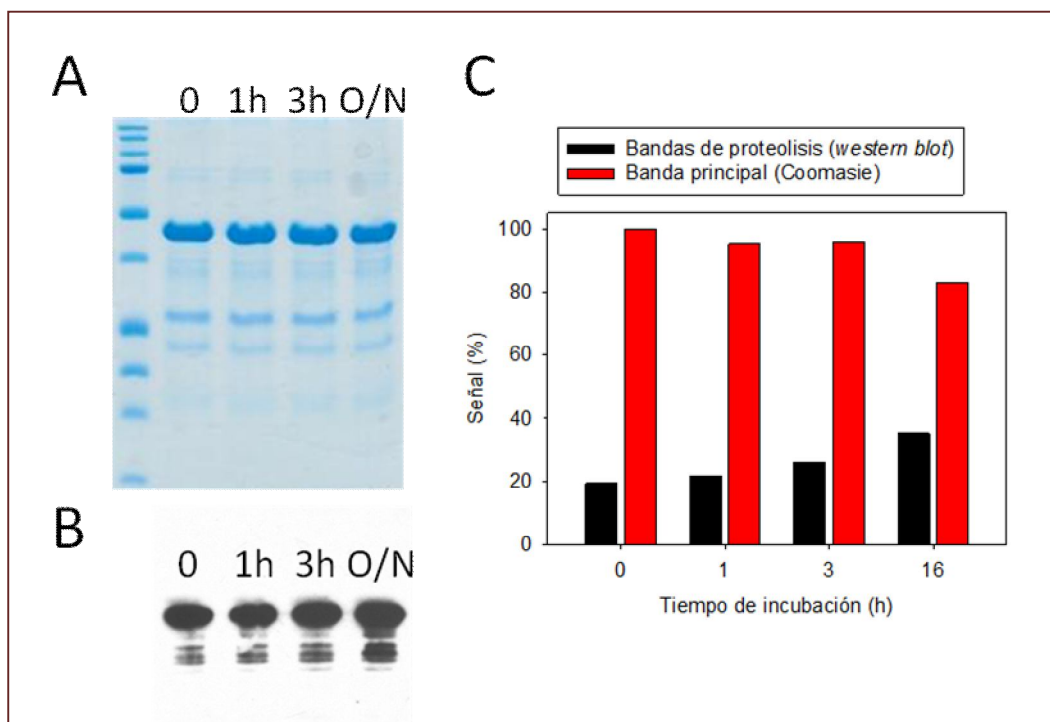


Figura R22: Degradación proteolítica de His₆-FtsN. A) Análisis de una muestra de FtsN a 0.35 g/l incubada a temperatura ambiente durante distintos tiempos en tampón C. Se tomaron muestras de 60 µl a los tiempos indicados (0, 1 h, 3 h y toda la noche), a los que se añadió 20 µl de tampón de carga de electroforesis concentrado 5X. De la mezcla se cargaron 20 µl en un gel al 12 % de acrilamida, que fue posteriormente teñido mediante *Coomasie*. Las bandas del marcador de peso molecular corresponden (de mayor a menor) a 250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20, 15 y 10 kDa. B) De las mezclas preparadas para el análisis del *panel A*, se cargaron 2 µl en un gel al 12 % de acrilamida. Tras correr la electroforesis, las muestras se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. La membrana se trató con el anticuerpo anti-FtsN y proteína A-peroxidasa como se explica en Materiales y Métodos, Apartado 4.1. La placa fotográfica mostrada se expuso durante 1'. C) Análisis mediante densitometría de (1) la variación de la señal de la banda principal del gel mostrado en A, normalizando esta señal a 100 para la muestra a 0 h; y (2) la señal correspondiente a las bandas de degradación de FtsN mostradas en B, normalizadas frente a la señal total de todas las bandas de la calle.

Resultados

A continuación, usando siempre aquellas fracciones en las que la banda principal representase al menos un 90 % en de la señal en el análisis por densitometría (como en la Figura R21), se caracterizó His₆-FtsN mediante velocidad de sedimentación (Figura R23). La muestra presentaba una especie mayoritaria, representando el 89 % de la señal, con un coeficiente de sedimentación de 2.0 S. Como en el caso de His₆-FtsN la especie principal representa un 90 % de la señal, el valor de f/f_0 proporcionado por este análisis, 2.09, es una buena estimación de la relación friccional para His₆-FtsN. Además, el \bar{v} de His₆-FtsN se puede estimar a partir de su secuencia de aminoácidos, dando una valor de 0.719 cm³/g. Dado que His₆-FtsN está solubilizada mediante colato y que por lo tanto ésta tendrá unidas algunas moléculas de este detergente, hay que tener en cuenta la contribución del detergente unido al \bar{v} del complejo. El colato tiene un \bar{v} de 0.771 cm³/g y un número de agregación de 4 (Moller 1986), lo que significa que hay 4 moléculas en una micela de colato. Se puede asumir que la forma de solubilizar His₆-FtsN sería mediante la inclusión de su hélice transmembrana en una o varias micelas de detergente (le Maire et al. 2000). Se calculó un \bar{v} teórico para complejos de FtsN monomérica con 1, 2 ó 3 micelas de detergente unidas, mediante el promediado ponderado según la aportación a la masa molecular del complejo, del \bar{v} de detergente y el de la proteína. Con estos valores de \bar{v} se calculó la masa molecular con la Ecuación M5 tal y como está implementada en el programa SEDFIT. Los resultados de estos cálculos se muestran en la Tabla R5 e indican que His₆-FtsN estaría en forma monomérica en las condiciones estudiadas.

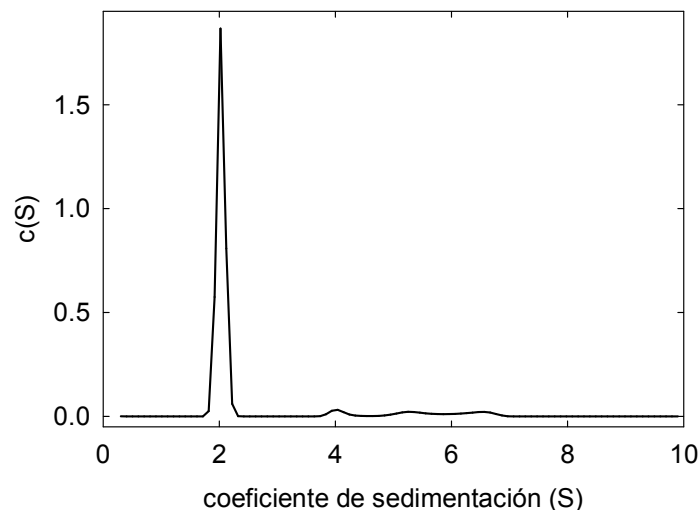


Figura R23: Velocidad de sedimentación de His₆-FtsN. Perfil de sedimentación de una muestra de His₆-FtsN a 0.44 g/l obtenido midiendo absorbancia a 280 nm, a una velocidad de rotor de 48000 rpm. La muestra estaba equilibrada en tampón C.

Núm. micelas	Masa teórica ^a	\bar{v} ^b	Masa experimental ^c
1	41249	0.721	39913
2	42885	0.723	40333
3	44521	0.725	40785

Tabla R5: Cálculo de la masa molecular de His₆-FtsN en presencia de colato 20 mM según los datos de velocidad de sedimentación. ^a Masa molecular teórica (en g/mol) de un complejo de His₆-FtsN con el número indicado de micelas de colato unidas. ^b Volumen específico parcial (en cm³/g) del complejo teórico de His₆-FtsN con el número indicado de micelas de colato unidas. ^c Masa molecular calculada a partir del \bar{v} teórico del complejo His₆-FtsN/colato y los valores de coeficiente de sedimentación y f/f_0 obtenidos del experimento mostrado en la Figura R23 según se explica en el texto principal.

La proteína FtsN contiene 2 residuos de cisteína en su secuencia, pero se desconoce si ambos están formado un puente disulfuro intramolecular o están libres. Los grupos sulfhidrilo de cisteínas libres de dos moléculas de proteína pueden reaccionar entre sí de manera inespecífica para formar oligómeros. Por ello se suele añadir agentes reductores a los tampones en los que se guardan las proteínas, que evitan la formación de este tipo de oligómeros inespecíficos. Con el objetivo de determinar si las dos cisteínas presentes en FtsN formaban un puente disulfuro intramolecular y por lo tanto, si era conveniente añadir o no agentes reductores a las preparaciones de FtsN, se usó el método de Ellman para valorar la presencia de grupos sulfhidrilo libres en His₆-FtsN, en distintas condiciones (ver Materiales y Métodos). Brevemente, en este método se usa el reactivo incoloro, DTNB, que es capaz de reaccionar de forma estequiométrica con grupos tiol generando un mol de producto amarillo, el ácido 2-tionitrobenzoico o TNB, por cada mol de tiol.

En primer lugar, se comprobó que el DTNB no reaccionaba con muestras de FtsN, tanto en estado nativo como desnaturalizadas mediante la adición SDS al 1 %, incluso después de incubar durante 24 h a temperatura ambiente. Esto sugería que las dos cisteínas presentes en FtsN podrían estar formando un puente disulfuro. Para comprobar esto, se incubó la proteína durante 10 minutos a 90 °C en presencia de SDS al 1 % y en presencia o ausencia del agente reductor DTT a 80 mM. Tras esta incubación, se eliminó el agente reductor de la muestra mediante cromatografía de exclusión molecular. Tras determinar mediante absorción en el ultravioleta la concentración de proteína en ambas muestras, control y tratada con DTT, se valoró la presencia de cisteínas libres con el reactivo de Ellman. El DTNB reaccionó únicamente con las muestras tratadas previamente con DTT, dando una relación de TNB por mol de proteína de 1.9 ± 0.3 . Estos resultados indican que las dos cisteínas presentes en FtsN están formando un puente disulfuro.

3.2 Incorporación de FtsN a nanodiscos

Con el fin de mantener FtsN en solución y a la vez, en un ambiente que simulase el entorno nativo de esta proteína, es decir la membrana interna de *E. coli*, la proteína se incorporó a nanodiscos. Una de las ventajas de usar nanodiscos es que pueden estabilizar la proteína insertada en ellos (Bayburt et al. 2010), lo que podría solucionar el problema de proteólisis que se observó en las preparaciones de FtsN con detergentes. Se hicieron nanodiscos formados con la proteína de andamiaje MSP1D1, que forma discos de 10 nm, y se probaron dos tipos de lípidos: fosfatidilcolina de huevo de gallina (EPC) y extracto polar de lípidos de *E. coli* (ECL). La formación de los nanodiscos de FtsN se hizo siguiendo el protocolo descrito en Materiales y Métodos.

En principio se probó a usar ECL y MSP1D1 para preparar nanodiscos de FtsN usando las mismas condiciones que se habían utilizado para ZipA, dado que ambas proteínas contienen un único segmento transmembrana, además de un dominio desestructurado que podría facilitar la purificación de la proteína incorporada al nanodisco simplemente por diferencia de tamaño respecto a los nanodiscos vacíos. El cromatograma obtenido al purificar estas preparaciones es muy similar al de los Nd-ZipA, con tres picos principales: uno conteniendo FtsN y MSP1D1, a ~11.2 ml y otros dos que sólo contienen MSP1D1, a 12.4 y ~15.2 ml (Figura R24, A). El primero de ellos contendría por tanto, los nanodiscos con FtsN incorporada. Las fracciones correspondientes a ese pico se juntaron y concentraron y se volvieron a pasar por la columna cromatográfica (Figura R24, A). Sin embargo, esta segunda cromatografía no fue suficiente para aislar completamente el pico de nanodiscos con FtsN. A pesar de esto, se juntaron las fracciones del centro del pico a ~11.2 ml, se concentraron y fueron usadas para un análisis posterior.

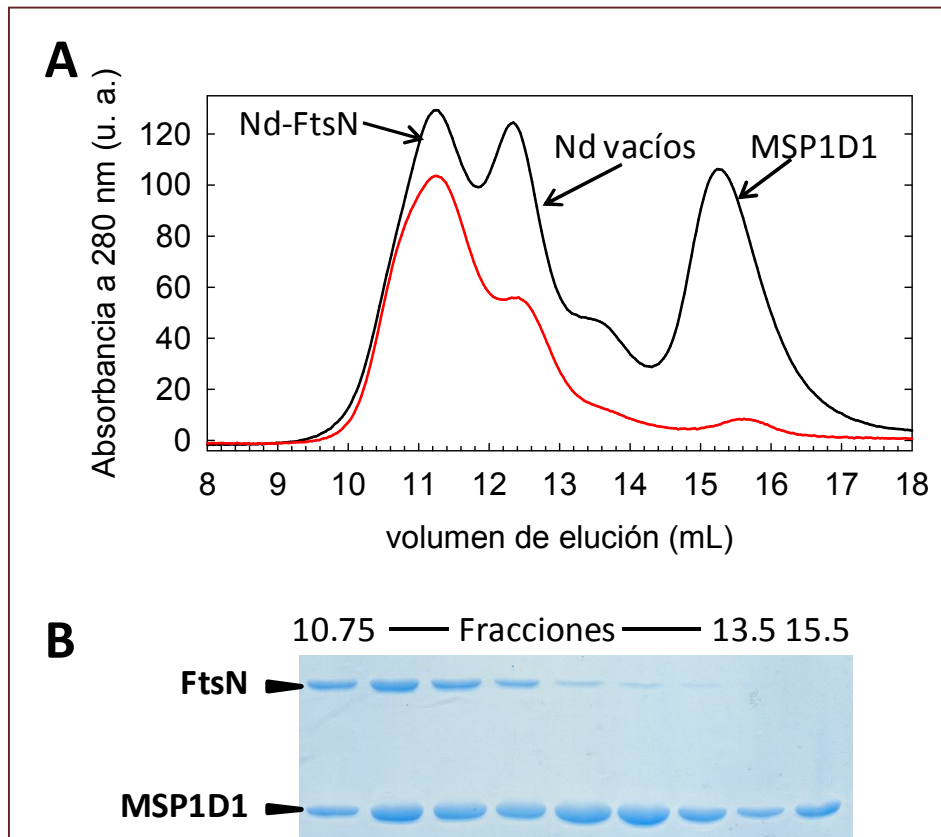


Figura R24: Análisis cromatográfico y purificación de nanodiscos con lípidos de *E. coli* conteniendo His₆-FtsN. A) Cromatogramas de nanodiscos con FtsN y ECL, cromatografía inicial tras la reacción (*línea negra*), fracciones correspondientes a los ml 11 a 11.75 de la primera cromatografía, concentradas y recromatografiadas (*línea roja*). Los nanodiscos fueron preparados usando una relación MSP1D1:FtsN:lípido de 1:2:60. Se cargó 250 μ l de muestra en una columna Superdex 200 HR 10/300 GL equilibrada en tampón de nanodiscos fijando flujo constante de 0.5 ml/min. B) Análisis electroforético de las fracciones obtenidas de la cromatografía mostrada en A, correspondiente a la reacción inicial (*línea negra*). Las fracciones corresponden a los volúmenes de elución de 10.75 ml a 13.5 ml, excepto la última muestra que corresponde a 15.5 ml.

Con el objetivo de intentar mejorar la separación entre nanodiscos vacíos y nanodiscos con FtsN, se prepararon nanodiscos con MSP1D1(-), la proteína MSP1D1 sin cola de histidinas, y ECL. Dado que en este caso la proteína de andamiaje no tiene cola de histidinas, sólo los nanodiscos en los que se incorporase His₆-FtsN deberían ser capaces de unirse a una resina de afinidad a metales, como la usada en la purificación de His₆-FtsN. Tras preparar la reacción de nanodiscos (mezcla de FtsN con MSP1D1(-), lípidos y colato 20 mM), eliminar el detergente y clarificar mediante centrifugación, la mezcla se dializó para eliminar el EDTA en tampón H (Tris-HCl 50 mM pH 8.0, NaCl 0.3 M, Imidazol 50 mM), y se pasó por una columna de afinidad a metales, conteniendo níquel. La proteína His₆-FtsN no quedó retenida en la columna al aparecer únicamente en el *flow-trough* y no en la elución con 500 mM de imidazol (Figura R25). Por lo tanto esta estrategia no resultó eficaz para mejorar la purificación de los nanodiscos de FtsN.

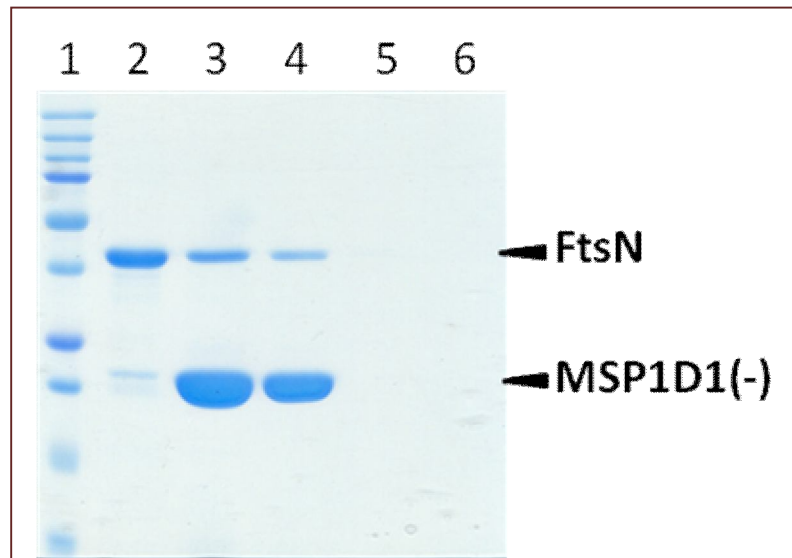


Figura R25: SDS-PAGE que muestra la purificación de Nd-FtsN con lípidos de *E. coli* mediante cromatografía de afinidad a metales. Tras preparar nanodiscos como en la Figura R24, excepto que en este caso se usó MSP1D1(-), se clarificó la mezcla de reacción mediante centrifugación, se dializó la muestra para eliminar EDTA y se incubó con resina de sefarosa quelante cargada con níquel. El tampón de diálisis y de equilibrado de la columna fue el tampón H. Se intentó la elución con 300 y 500 mM de imidazol (en el mismo pH y fuerza iónica que la unión). Las calles del gel corresponden a 1, patrón de peso molecular; 2, fracción insoluble tras la clarificación inicial; 3, fracción soluble tras la clarificación y que fue cargada en la columna; 4, la misma fracción tras pasarla por la resina; 5 y 6, elución con 300 y 500 mM de imidazol, respectivamente. El gel tiene un 12 % de acrilamida y en cada calle se cargó 3 μ l de muestra.

Para comprobar si los lípidos podrían tener alguna influencia en la capacidad de His₆-FtsN de unirse a la resina con níquel inmovilizado, se prepararon nanodiscos de FtsN usando MSP1D1(-) y EPC en vez de lípidos de *E. coli*. Estos nanodiscos se unieron a la resina quelante cargada de níquel (Figura R26, A), lo que sugiere que los lípidos pueden influir en la afinidad de His₆-FtsN por metales. Los nanodiscos así purificados presentaban un perfil cromatográfico de exclusión molecular heterogéneo, con un pico principal a 11.2 ml (similar al de los Nd-FtsN preparados con ECL) que presentaba hombros a mayor y menor volumen de elución, todos conteniendo MSP1D1(-) e His₆-FtsN (Figura R26, B). El hombro a menor volumen de elución solaparía con el pico de nanodiscos vacíos, que eluye en estas condiciones a ~12.5-13.0 ml (ver Apartado 1 de Resultados, Nanodiscos vacíos). Según densitometría del gel mostrado en la Figura R26, B, todas las fracciones analizadas tendrían una relación MSP1D1:FtsN de ~2:1, lo que indicaría la presencia de 1 His₆-FtsN por cada nanodisco. Las fracciones centrales del pico de ~11.3 ml se juntaron, concentraron y guardaron para analizarlas.

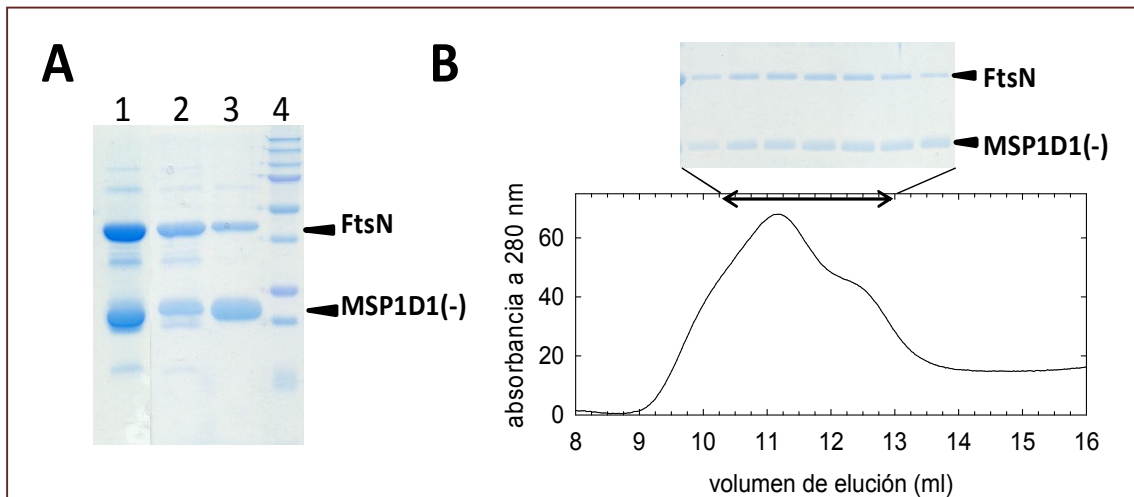


Figura R26: Purificación de Nd-FtsN formados con EPC y MSP1D1(-). A) Análisis mediante SDS-PAGE al 12 % de acrilamida de la purificación de Nd-FtsN con EPC y MSP1D1(-) mediante cromatografía de afinidad a metales. Los nanodiscos se prepararon como se indica en Materiales y Métodos, Apartado 6.5, usando un ratio His₆-FtsN:MSP1D1(-):EPC 1:1:70. Se cargó 5 μ l de las siguientes muestras: 1, preparación de nanodiscos antes de pasarla por la resina de afinidad; 2, la misma fracción tras pasarla por la resina; 3 elución con 300 mM de imidazol y 4, marcador de peso molecular. B) Cromatografía de exclusión molecular de la muestra de Nd-FtsN purificados mediante cromatografía de afinidad (calle 3 del gel en A).

Para comprobar la homogeneidad de las preparaciones de nanodiscos de FtsN, tanto de ECL como de EPC, se realizaron experimentos de velocidad de sedimentación (Figura R27, A). El perfil de sedimentación de Nd-FtsN con EPC es más heterogéneo, presentado una especie principal a 3.8 S, que representaba un 70 % de la señal, y otras especies de mayor coeficiente de sedimentación. En el caso de los Nd-FtsN con ECL, el perfil era más homogéneo, con una especie principal con coeficiente de sedimentación a 4.9 S, representando el 82 % de la señal y un pico minoritario a 2.2 S. Esto indicaría que los Nd-FtsN con ECL estaban más puros. La diferencia entre el coeficiente de sedimentación de ambos tipos de nanodiscos, teniendo ambos igual radio de Stokes (según el perfil de sedimentación) y conteniendo ambos el mismo tipo de proteína se debe a las distintas propiedades de flotación de los lípidos, tal y como se observó para nanodiscos vacíos en el Apartado 1. Dados los resultados anteriores, se continuó con los nanodiscos de FtsN preparados con ECL.

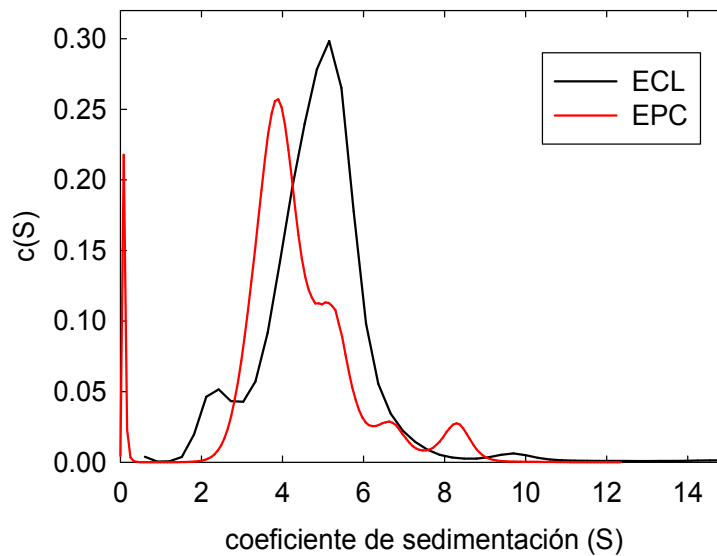


Figura R27: Velocidad de sedimentación de nanodiscos de FtsN. Velocidad de sedimentación de muestras de Nd-FtsN preparados con ECL (*línea negra*) o con EPC (*línea roja*). Las muestras proceden del pico a 11.2 ml purificado como se explica en el texto, tal cual salieron de la columna de exclusión molecular. Por tanto las muestras estaban equilibradas en tampón de nanodiscos. El experimento se realizó a 48000 rpm, 20 °C y midiendo la absorbancia a 230 nm. La absorbancia a 280 de las muestras antes de cargarlas fue de 0.08 y 0.09 para EPC y ECL, respectivamente.

Anteriormente se había visto que FtsN en detergentes podría sufrir proteólisis una vez purificada. Para comprobar si las bandas de proteólisis desaparecían una vez formados los nanodiscos y si el proceso de degradación también podía ocurrir con la proteína insertada en nanodiscos, se realizó un experimento similar al de la Figura R22, pero con Nd-FtsN formados con ECL (Figura R28). En este caso, no se detectó la presencia de las bandas de degradación observadas en FtsN solubilizada en detergente, ni mediante *Coomasie* ni mediante el anticuerpo anti-FtsN. Sin embargo, este anticuerpo si detectaba correctamente la banda correspondiente a FtsN, sin unirse a la banda correspondiente a MSP1D1 (no mostrado). Esto indica que en nanodiscos no ocurre la degradación de FtsN observada en detergentes.

Resultados

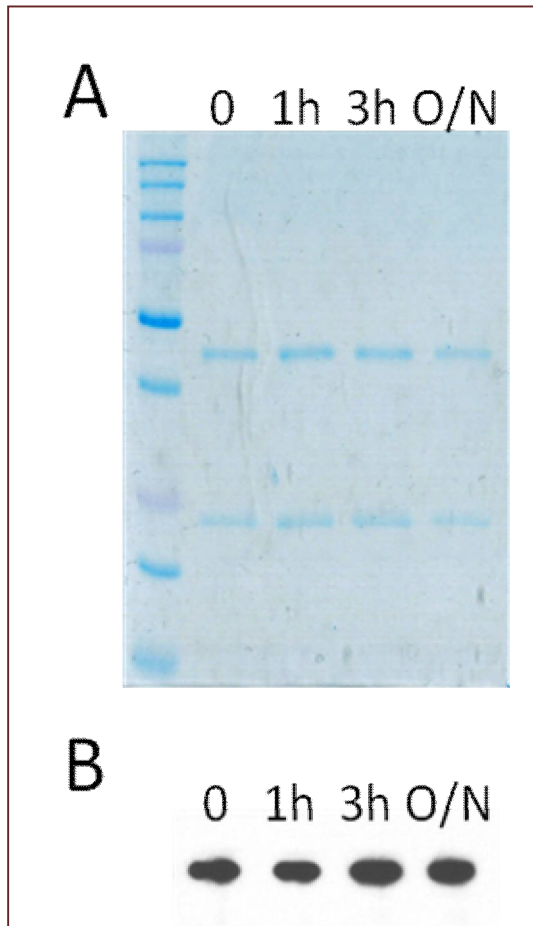


Figura R28: Estabilidad de His₆-FtsN insertada en nanodiscos. A) Análisis de una muestra de Nd-FtsN preparados con ECL, a una D.O._{280nm} de 0.06, incubados a temperatura ambiente durante distintos tiempos en tampón de nanodiscos. Se tomaron muestras de 40 μ l a los tiempos indicados (0, 1 h, 3 h y toda la noche), a los que se añadió 20 μ l de tampón de carga de electroforesis concentrado 5X. De la mezcla se cargaron 30 μ l en un gel al 12 % de acrilamida, que fue posteriormente teñido mediante *Coomasie*. Las bandas del marcador de peso molecular corresponden (de mayor a menor) a 250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20, 15 y 10 kDa. B) De las mezclas preparadas para el análisis del *panel A*, se cargaron 5 μ l en un gel al 12 % de acrilamida. Tras correr la electroforesis, las muestras se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. La membrana se trató con el anticuerpo anti-FtsN y proteína A-peroxidasa como se explica en Materiales y Métodos, Apartado 4.1. La placa fotográfica mostrada se expuso durante 1'.

Por último, se observaron muestras de Nd-FtsN con ECL mediante microscopía electrónica de transmisión, de manera análoga a como se hizo para los Nd-ZipA (Figura R29). Las micrografías muestran la presencia de partículas circulares de aspecto similar a las observadas para Nd-ZipA. En un estudio preliminar, se seleccionaron 1000 partículas de micrografías obtenidas mediante métodos de mínima dosis y se realizó una clasificación libre de patrón. Los promedios de las clases obtenidas revelan que la mayoría de partículas tienen un tamaño entre 10-12 nm y una forma circular. Esto indicaría que se trata de vistas perpendiculares a la membrana lipídica del disco. No se aprecia evidencia de la presencia del dominio globular de FtsN.

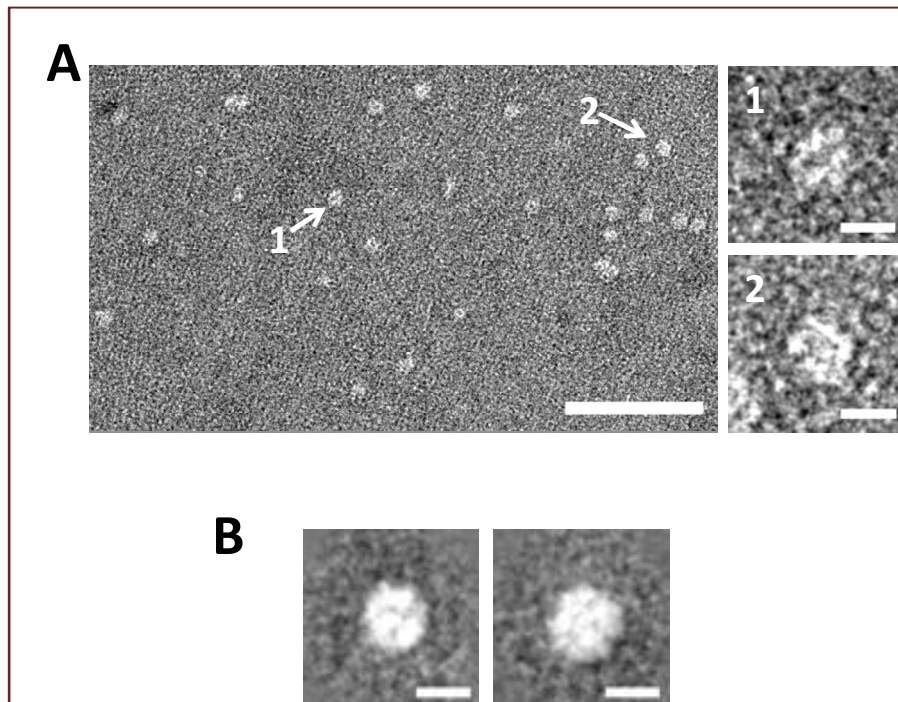


Figura R29: Visualización de Nd-FtsN mediante microscopía electrónica de transmisión. A) Micrografía representativa de una muestra de Nd-FtsN preparados con lípidos de *E. coli*. Barra de escala, 100 nm. A la derecha de la micrografía se muestran las dos partículas señaladas en la imagen principal, ampliadas. La barra de escala representa 10 nm en dichas partículas. B) Promedios de clases representativas obtenidas mediante clasificación libre de patrón. Barra de escala, 10 nm.

Discusión

Discusión

1. Caracterización biofísica de nanodiscos vacíos.

Al comienzo de esta tesis, apenas había trabajos publicados que implicaran una caracterización de nanodiscos a nivel biofísico, sobre todo mediante el uso de ultracentrifugación analítica. Esta técnica permite detectar y caracterizar en términos cuantitativos (estequiometría, afinidad y reversibilidad) las interacciones macromoleculares que conducen a la formación de complejos multiprotéicos, como los que se forman en el proceso de división bacteriana. Los estudios en los que se caracterizaba propiamente el nanodisco, sin proteína reconstituida, se habían basado hasta ese momento principalmente en cromatografía de exclusión molecular, dispersión de rayos X a bajo ángulo y microscopía de sonda de barrido (Bayburt et al. 2002, Denisov et al. 2004, Skar-Gislinge et al. 2010). El primer trabajo en el que se reporta el uso de ultracentrifugación analítica para caracterizar nanodiscos es el de Alami y colaboradores, en el se describe la incorporación del complejo trimérico del translocón SecYEG a nanodiscos, así como la caracterización de la proteína reconstituida mediante cromatografía de exclusión molecular, velocidad de sedimentación y electroforesis en condiciones nativas (Alami et al. 2007). Posteriormente, Ye y colaboradores publicaron la reconstitución de la integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ en nanodiscos con DMPG y DMPC, así como la caracterización mediante experimentos de velocidad de sedimentación y equilibrio de sedimentación de nanodiscos vacíos o con proteína incorporada (Ye et al. 2010). En ese trabajo, estas técnicas sólo se usaron para averiguar el número de moléculas insertadas en cada nanodisco, pero no se realizó una caracterización exhaustiva.

El primer trabajo publicado en el que se usa de forma exhaustiva la ultracentrifugación analítica y la dispersión de luz dinámica para caracterizar nanodiscos, tanto vacíos como con un receptor insertado usando lípidos sintéticos, es el de Inagaki y colaboradores (Inagaki et al. 2012). Unos pocos meses más tarde se publicó la caracterización mediante ultracentrifugación analítica, DLS y FCS de nanodiscos vacíos y de ZipA con fosfolípidos de *E. coli*, que se describen en los Apartados 1 y 2 de los Resultados, respectivamente (Hernandez-Rocamora et al. 2012). A finales de ese mismo año, se publicó una revisión ampliada de los resultados de Inagaki y colaboradores, donde se hace hincapié en la caracterización biofísica de nanodiscos de POPC, POPG y mezclas de ambos lípidos (Inagaki et al. 2012). Por tanto el objetivo de esta primera parte de la tesis fue realizar una caracterización de nanodiscos preparados con el extracto de lípidos de *E. coli*, y compararlos con los más comunes y estudiados de fosfatidilcolina (tanto POPC como EPC).

Para preparar nanodiscos de POPC y EPC se siguió el protocolo descrito en (Bayburt et al. 2002), obteniéndose un pico definido cuyo volumen de elución (12.5 ml) coincide con el descrito en la literatura para nanodiscos de POPC (Bayburt et al. 2002), con un diámetro de Stokes de 10 nm. En el caso de nanodiscos de ECL, se optimizó el

Discusión

ratio MSP1D1:lípido a 1:60. Estos nanodiscos eluyeron a un volumen de 12.5 ml igualmente, resultado que coincide con el obtenido en el trabajo de (Alami et al. 2007) en donde emplearon extracto total de lípidos de *E. coli* (57.5 % PE, 15.1 % PG, 9.8 % CA, 17.6 % desconocido), de composición muy similar a la usada en este trabajo y el mismo ratio MSP1D1:lípido.

Tras la optimización del ratio molar MSP1D1:lípido para cada composición lipídica y la purificación mediante cromatografía de exclusión molecular se comenzó con la caracterización biofísica en cada caso. A partir de la técnica de DLS se calcularon los coeficientes de difusión traslacionales aparentes (D_{ap}) para cada tipo de nanodisco, (Tabla R2), sirviendo estos valores para el posterior cálculo de los radios hidrodinámicos mediante la ecuación de Stokes-Einstein (Ecuación M13). Los radios obtenidos oscilan entre 5.3 ± 0.3 nm en el caso de nanodiscos de EPC, 6.0 ± 1.0 nm para los de POPC y 5.9 ± 0.6 nm para los de ECL. El valor de los nanodiscos de POPC concuerda razonablemente con el radio de 5.4 nm descrito para estas partículas (Inagaki et al. 2012) medido por DLS. En el caso de los nanodiscos de ECL, también existe concordancia con los resultados publicados, ya que otros autores también describen nanodiscos de esta composición con 10 nm de diámetro (Alami et al. 2007).

Hay que mencionar, al hablar de DLS, la aparición de un componente de mayor tamaño, en todos los tipos de nanodiscos y en todas las muestras medidas, con un valor de D_{ap} del orden de 10^{-8} cm²/s. A pesar de que este componente de mayor tamaño siempre estaba presente con una contribución significativa a la señal de dispersión, esto no implica necesariamente que su concentración en las muestras sea muy alta. Por un lado, la dispersión de Rayleigh, que es la medida en la dispersión de luz dinámica, depende de la sexta potencia del diámetro de las partículas y, por tanto, los valores de intensidad de dispersión en la técnica de DLS están sesgados hacia especies de gran tamaño (Chu 1991, Inagaki et al. 2012). Por otro lado, la especie mayoritaria detectada en los experimentos de velocidad de sedimentación corresponde a una especie pequeña que siempre representaba al menos el 90 % de la señal (Figura R4). Por lo tanto, se puede concluir que estos agregados detectados por DLS serían minoritarios con respecto a la especie de nanodiscos.

Un dato que es importante conocer acerca de los nanodiscos es el número de fosfolípidos por nanodisco, ya que es necesario para estimar la masa molecular de los nanodiscos de distinta composición lipídica. Los valores estimados en esta tesis se muestran en la Tabla R1. Por un lado, se usaron métodos bioquímicos y colorimétricos para determinar la cantidad de lípidos y por otro, se usó el análisis explicado por Inagaki y colaboradores (Inagaki et al. 2012) en el que se estima este valor a partir de datos de velocidad de sedimentación para una misma muestra observada mediante absorbancia e interferencia. La estimación a partir de velocidad de sedimentación coincide con los datos colorimétricos en el caso de ECL y POPC, pero difiere en el caso de EPC.

Discusión

Esta diferencia para el EPC puede deberse a la inexactitud de los valores usados para determinar la contribución de lípidos y proteína a la señal de interferencia, pues los valores de masa molecular así como el cambio del índice de refracción en función de la concentración (dn/dc) de este extracto lipídico, por la propia naturaleza heterogénea de este extracto, pueden no ser correctos. En todo caso, consistentemente los nanodiscos conteniendo extractos lipídicos naturales (ECL y EPC) presentaron siempre menos moléculas de lípido por nanodisco que los de POPC.

Para el caso de nanodiscos de POPC, se obtuvieron valores de 120 ± 30 moléculas de POPC por nanodisco mediante el método de Stewart o de 118 según el método de Inagaki y colaboradores. Estos valores son muy similares a los obtenidos mediante conteo por centelleo de lípidos tritizados (129 ± 9 ; (Bayburt et al. 2002)), o al obtenido por Inagaki y colaboradores (112 ± 15 ; (Inagaki et al. 2012)).

Dado que el diámetro de los nanodiscos calculado mediante DLS fue similar independientemente del lípido usado, la diferencia en la cantidad de lípidos tiene que estar causada por un mayor volumen ocupado por molécula individual de lípido en el caso de EPC y ECL. En el caso de EPC, se conoce la presencia en este extracto natural de un porcentaje significativo de lípidos poliinsaturados (un 20.7 % del total según el proveedor de estos lípidos, Avanti Polar Lipids). Las cadenas poliinsaturadas provocarían un peor empaquetamiento de los lípidos, con lo que estos ocuparían más espacio y el número de lípidos por nanodisco sería menor. En el caso de ECL, se ha descrito que *E. coli* no posee lípidos poliinsaturados, mientras que el porcentaje en peso de lípidos insaturados estaría en torno al 35 % del total (Marr et al. 1962, White et al. 2000). Además, los lípidos de *E. coli*, al igual que los de muchas bacterias, contienen cadenas de ácidos grasos cíclicas, con valores reportados de hasta un 25 % en peso (White et al. 2000). Se ha comprobado en simulaciones moleculares que una composición compleja de lípidos como la de los lípidos de *E. coli* junto con la presencia de cadenas alifáticas con ciclopropanos causa una menor compactación de los lípidos que mezclas simples POPE/POPG (Oursel et al. 2007, Pandit et al. 2012). Por lo tanto, la heterogeneidad de las cadenas alifáticas de los fosfolípidos junto con la presencia de lípidos con cadenas cíclicas podría ser la causa de que la bicapa formada por estos lípidos sea menos compacta y por tanto haya un menor número de lípidos por nanodisco que en el caso del POPC.

En todo caso, estos resultados concuerdan con el modelo estructural propuesto para nanodiscos, en el que el tamaño del nanodisco viene determinado por la variante de la proteína de andamiaje usada en la formación del nanodisco (Denisov et al. 2004), y no por el tipo de lípido, es decir, lípidos que ocupan más espacio no dan lugar a nanodiscos más grandes, sino que, simplemente, hay menos lípidos por nanodisco.

Discusión

Una de las técnicas utilizadas durante la caracterización biofísica de nanodiscos vacíos fue la velocidad de sedimentación. El coeficiente de sedimentación del pico mayoritario obtenido, para nanodiscos formados por POPC fue de 2.8 ± 0.1 , igual dentro del error al valor de 2.88 ± 0.01 reportado previamente para el mismo tipo de nanodiscos (Inagaki et al. 2012). Para EPC, el coeficiente fue ligeramente mayor que los de POPC, de 3.1 ± 0.1 , esta pequeña diferencia podría deberse al diferente número de lípidos presentes por nanodisco (Tabla R1). Sin embargo, en el caso de nanodiscos formados con ECL el coeficiente de sedimentación es mayor, 4.3 ± 0.1 S. Dado que los nanodiscos de ECL y EPC tienen una forma y tamaño similar (discos de ~ 10 nm conteniendo 2 moléculas de MSP1D1) y su masa molecular teórica es muy similar, es interesante que su velocidad de sedimentación sea tan distinta.

El coeficiente de sedimentación de una molécula obtenido en un experimento de velocidad de sedimentación viene determinado principalmente por su masa de flotación y por su coeficiente de fricción (Ecuación M5). Dado que no se encontraron variaciones sistemáticas en el coeficiente friccional durante el análisis de los experimentos de velocidad de sedimentación (datos no mostrados), se estudió más en detalle la masa de flotación de los nanodiscos. Por un lado, se tuvieron en cuenta los datos de coeficientes de difusión (D_{ap}) obtenidos mediante DLS junto con los coeficientes de sedimentación (S) y se calcularon las masas de flotación (M_b) para cada especie mediante la Ecuación de Svedberg (Tabla R2). Además se realizaron experimentos de equilibrio de sedimentación a partir de los que se obtiene directamente este parámetro (Tabla R3). Los valores obtenidos mediante el cálculo teórico coinciden razonablemente con los obtenidos mediante equilibrio de sedimentación, encontrándose que la masa de flotación de los nanodiscos de ECL fue mayor que la de los de EPC o POPC, las cuales fueron del mismo orden. Por lo tanto, estos resultados indicarían que el mayor coeficiente de sedimentación de nanodiscos de ECL se debería a una mayor masa de flotación.

Finalmente, con los valores de las masas de flotación experimentales y las estimaciones de las masas molares promedio, se hizo una estimación del volumen específico parcial (\bar{v}) para los nanodiscos de las tres composiciones lipídicas en estudio (Tabla R3). Es destacable que el volumen específico parcial calculado para nanodiscos de ECL fue menor ($0.795 \text{ cm}^3/\text{g}$) que el de los de EPC ($0.854 \text{ cm}^3/\text{g}$) o los de POPC ($0.875 \text{ cm}^3/\text{g}$). Además es interesante destacar que los valores obtenidos tanto para el caso de nanodiscos de EPC como de POPC encajan dentro del valor descrito para las partículas de lipoproteína de alta densidad de tipo 3 (HDL-3), $0.867 \text{ cm}^3/\text{g}$ (Hazelwood 1958), que son las partículas formadas por apolipoproteína humana en sangre de mayor densidad y por tanto las más parecidas a un nanodisco.

Esta mayor masa de flotación y menor volumen específico parcial para el caso de nanodiscos de ECL, podría explicarse por la presencia de fosfolípidos cargados en este extracto lipídico (un 9.8 % de cardioplipina y un 23.2 % de fosfatidilglicerol, según el proveedor).

Discusión

Inagaki y colaboradores describen un comportamiento similar cuando usan nanodiscos formados por lípidos negativos (POPG, en ese caso), es decir, cuando aumentan el porcentaje de POPG sobre POPC observan un aumento del coeficiente de sedimentación que se corresponde con una mayor masa de flotación (Inagaki et al. 2012). La explicación que ofrecen para este resultado se basa en que la diferencia en las propiedades de carga de los lípidos negativos determinarían una variación en el grado de hidratación superficial así como en la unión de contraiones, que son factores determinantes del volumen específico parcial de estas moléculas y, por tanto, de su masa de flotación (Casassa et al. 1964, Inagaki et al. 2012). El mismo razonamiento se podría aplicar en el caso de nanodiscos de ECL, que contiene un 33 % de lípidos cargados negativamente. Por otro lado, el componente mayoritario de ECL es la fosfatidiletanolamina, el cual se ha determinado que tiene un nivel de hidratación de su cabeza polar mucho menor que el de la fosfatidilcolina (Sen et al. 1988). Un menor grado de hidratación contribuiría negativamente a la flotabilidad de la molécula, al disminuir el volumen específico parcial y por tanto, aumentar la masa de flotación. Para confirmar este último punto, sería interesante estudiar las propiedades hidrodinámicas de nanodiscos con lípidos puros con esta cabeza polar, como la palmitoiloleilfosfatidiletanolamina (POPE).

En conclusión, se ha comprobado que el tipo de lípido no influye en el tamaño de los nanodiscos pero sí enormemente en sus propiedades hidrodinámicas. Así por ejemplo, los nanodiscos de ECL presentan un mayor coeficiente de sedimentación y una mayor masa de flotación, debido a las diferentes propiedades en cuanto a carga e hidratación de la superficie de la bicapa lipídica. Por otro lado, nuestros resultados apuntan a que por un lado la naturaleza de la cabeza polar de los fosfolípidos es la que más afecta a las propiedades de flotación de los nanodiscos, mientras que la diferente naturaleza de las cadenas alifáticas de los fosfolípidos sólo afectaría a la cantidad de lípidos que se pueden empaquetar en un nanodisco. Un estudio más sistemático usando fosfolípidos puros en vez de extractos naturales, en los que se variase de forma sistemática la cabeza polar y el grado de insaturación o longitud de las cadenas alifáticas de los fosfolípidos, sería de interés para resolver más claramente estas cuestiones.

2. Nanodiscos con ZipA

La división celular en *E. coli* es un proceso orquestado por la interacción de un grupo de proteínas, muchas de ellas proteínas de membrana. De hecho, las interacciones entre proteínas que inician el proceso de división, FtsZ, ZipA y FtsA, tienen lugar en el contexto de la membrana interna. Cómo reconstruir estos procesos *in vitro* para caracterizarlos dentro del contexto de la membrana continúa siendo un reto. Además, en nuestro laboratorio se hace énfasis en el estudio de interacciones entre proteínas de forma cuantitativa. Para aunar estos dos objetivos, el estudio cuantitativo de interacciones y el uso de condiciones que mimeticen las presentes en la célula, se reconstituyó ZipA en nanodiscos y se estudió su interacción con FtsZ en sus distintas formas oligoméricas o poliméricas.

2.1 Reconstitución y caracterización de ZipA en nanodiscos

Para intentar mimetizar el entorno en el que se encuentra la proteína ZipA en la membrana interna de *E. coli*, se incorporó una única copia de ésta en nanodiscos formados por extracto polar de lípidos de *E. coli* y por la proteína de andamiaje MSP1D1. Para la formación se siguió un protocolo adaptado y optimizado a partir del ya descrito para otras proteínas, y estos nanodiscos se purificaron mediante cromatografía de exclusión molecular. Finalmente, se comprobó que se había incorporado sólo una copia de ZipA por nanodisco mediante densitometría de geles de acrilamida. Este resultado se vio confirmado por los experimentos de ultracentrifugación analítica, una de las técnicas más útiles para la determinación de estequiometrías, tanto velocidad como equilibrio de sedimentación. Este tipo de caracterización es similar al que se siguió en el caso de (Alami et al. 2007) para verificar la incorporación del complejo SecYEG en nanodiscos, aunque en ese caso sólo se usó la velocidad de sedimentación.

En esta tesis se hizo además una caracterización más completa, introduciendo la espectroscopía de correlación de fluorescencia como herramienta para confirmar la homogeneidad de los nanodiscos. Gracias a este método, se obtuvo el valor del coeficiente de difusión ($3.2 \pm 0.4 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$). Pese a que este coeficiente también se calculó mediante dispersión de luz dinámica ($3.5 \pm 0.2 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$), se determinó llevar a cabo el cálculo del diámetro de los nanodiscos con el valor obtenido mediante FCS, dado que en FCS no se detectaron agregados de ningún tipo como los que se observaron mediante DLS (ver más abajo y el Apartado 1). El valor obtenido fue de ~ 13 nm, valor que concuerda con lo obtenido mediante cromatografía de exclusión molecular y que es superior al de nanodiscos vacíos. Este aumento en el diámetro hidrodinámico al reconstituir proteínas en nanodiscos ya se ha descrito en el caso de otras proteínas de membrana incorporadas en nanodiscos formados por MSP1D1 (Inagaki et al. 2012).

De la misma manera, mediante FCS, se calculó el coeficiente de difusión de nanodiscos de *E. coli* vacíos ($4.5 \pm 0.2 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$) y se comparó con el obtenido mediante DLS ($3.6 \pm 0.6 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$), como se explica en el apartado anterior. La discrepancia de los coeficientes de difusión obtenidos por DLS y FCS puede atribuirse a la presencia minoritaria de agregados o especies de mayor peso molecular que tienen una gran contribución a la señal de dispersión de luz, mientras que esa contribución es mucho menor en el caso del FCS, cuya intensidad de señal depende del cuadrado del brillo de las moléculas y no depende del tamaño de éste. Para los nanodiscos vacíos se obtuvo un valor de $\sim 10 \text{ nm}$ de diámetro hidrodinámico, como era de esperar con ese tipo de lípido usado y esa proteína de andamiaje.

Las estructuras de los Nd-ZipA se visualizaron usando microscopía electrónica de transmisión usando tinción negativa. Se encontró que los Nd-ZipA adoptaban dos conformaciones, como discos de 10-11 nm o de 12-13 nm de diámetro. Los discos de 12-13 nm no se encontraron en los nanodiscos vacíos. Mediante FCS y DLS, se observó que las especies más abundantes tenían en solución, un diámetro hidrodinámico de 13 nm (Tabla R4). Para explicar estos resultados hay que tener en cuenta que esas técnicas, concretamente DLS y FCS, no pueden resolver dos especies de tamaño similar, como las de Nd-ZipA que se han descrito. Además, el radio hidrodinámico promedio también depende de ZipA, la cual puede estar sobresaliendo del disco debido a su dominio flexible largo rico en prolina y glutamina.

La heterogeneidad de tamaño en los nanodiscos se ha descrito previamente para el caso de partículas de lipoproteínas de alta densidad (HDL) formadas por apoA-I, proteína de la cual deriva la proteína MSP1D1. Las partículas HDL reconstituidas adoptan un conjunto de estructuras discoidales con diferentes radios de Stokes (de 7.8 hasta 12.0 nm) lo cual se atribuye al repertorio limitado de conformaciones posibles de la apoA-I (Cavigliolo et al. 2008). La abundancia de cada especie y las dimensiones precisas también varían dependiendo del tipo de mezcla lipídica que se use para la reconstitución de las HDLs (Cavigliolo et al. 2008). Finalmente, se ha visto que la inserción de proteínas en nanodiscos puede producir heterogeneidad en la forma y tamaño, como se encontró cuando se incorporó la proteína VDAC-1 en nanodiscos de DMPC (dimiristoilfosfatidilcolina) (Raschle et al. 2009). Así, resulta comprensible que la presencia de la proteína ZipA altere la conformación preferente de MSP1D1 en nanodiscos, introduciendo esta heterogeneidad observada.

En esta tesis, se propone que la proteína ZipA reconstituida en nanodiscos podría estar sobresaliendo del nanodisco, al cual está conectado a través del conector flexible, ya que resulta imposible la visualización del dominio globular C-terminal de ZipA en las proximidades del nanodisco. Este dominio tiene una dimensión máxima de sólo 4 nm (Moy et al. 2000), por lo que es difícil visualizarlo sobre el fondo ruidoso de las micrografías, aunque podría ser detectado, en principio, si estuviera unido a una estructura más grande que los nanodiscos.

La presencia de vistas laterales en micrografías de Nd-ZipA pero no en experimentos llevados a cabo con nanodiscos vacíos podría deberse a que ZipA sobresale de la membrana lipídica, lo que favorece la situación de los nanodiscos en la superficie de la rejilla con su eje longitudinal perpendicular al soporte. Esta propuesta sería consistente con el conector flexible de 150 aminoácidos que sirve de conexión del dominio globular largo de unión a FtsZ (ZBD) de 140 aminoácidos a las membranas. Respaldando este punto de vista, se ha visto que el conector flexible se puede extender de 8 a 60 nm, con una extensión media de 13 nm (Ohashi et al. 2002). Sin embargo, no se puede descartar que el dominio ZBD no se detecte incluso cuando esté cerca del nanodisco debido a su pequeño tamaño y a las limitaciones introducidas por la tinción negativa.

Dos conjuntos de evidencias apoyan que la ZipA integrada dentro de los nanodiscos es apta para la interacción con otras proteínas y el análisis de esas interacciones mediante microscopía electrónica. ZipA fue el blanco de anticuerpos policlonales purificados que se unen específicamente al dominio ZBD de ZipA y a complejos Nd-ZipA. Se copurificaron mediante cromatografía de afinidad con columna de níquel y se vieron en micrografías teñidas negativamente. Estos resultados confirmaron que la proteína ZipA se encuentra intacta en los nanodiscos aunque no sea posible su visualización mediante el modelo refinado 3D o las medias libres de patrón.

En resumen, los resultados presentados indican que la proteína ZipA es funcional al reconstituirse dentro de nanodiscos de 10 nm de diámetro donde es capaz de interactuar con otras proteínas de la maquinaria de división. Los estudios biofísicos de interacción con FtsZ validan esta afirmación. Estos complejos de Nd-ZipA son adecuados para el estudio de estas interacciones mediante microscopía electrónica, abriendo nuevas vías para el estudio estructural de la maquinaria de división celular en *E. coli*.

2.2 Interacción de ZipA reconstituida en nanodiscos con FtsZ

En este apartado de la tesis se ha investigado la interacción entre la proteína de membrana ZipA reconstituida en nanodiscos y la proteína soluble FtsZ, dos proteínas que se ensamblan en el protoanillo de *E. coli*. Para el estudio cuantitativo de esta interacción se ha usado una estrategia de etiquetado fluorescente de nanodiscos usando como trazador lípidos conjugados con la sonda fluorescente lisamina rodamina b, presentes en la mezcla al preparar los nanodiscos.

Este abordaje no sólo nos ha permitido obtener datos cuantitativos de la interacción ZipA/FtsZ en distintas condiciones, sino que nos ha permitido medir la inhibición de esta interacción en solución, lo cual resulta de gran utilidad en la búsqueda sistemática de inhibidores del ensamblaje del divisoma y en el desarrollo de nuevos antimicrobianos.

Discusión

Mediante las preparaciones de nanodiscos (Nd-ZipA) con una única copia de ZipA por nanodisco, descritas más arriba, se midió, en primer lugar, la interacción con la proteína FtsZ en diferentes formas, tanto en forma oligomérica en presencia de GDP como en forma polimérica en presencia de GTP o GMPCPP. La afinidad de los Nd-ZipA por los oligómeros de FtsZ-GDP es de la misma magnitud que la afinidad por los polímeros tanto de GTP como de GMPCPP, con un $\log K_{AZ}$ del orden de 6. Estos valores son de magnitud similar a los encontrados para la interacción de la forma soluble de ZipA (carece de la región transmembrana, residuos 1-25) con cada una de las dos formas de FtsZ (Martos et al. 2010); (resultados sin publicar del laboratorio de Germán Rivas). Por lo tanto, los resultados obtenidos usando la proteína completa en esta tesis, respaldan las conclusiones del trabajo previo en el que usó la proteína ZipA truncada carente del dominio transmembrana de anclaje para medir su unión a FtsZ en ausencia de GTP (Martos et al. 2010).

De lo anterior, se puede concluir que la región transmembrana de ZipA tiene escasa influencia en la interacción con FtsZ y apoya la idea de que ésta sólo proporciona un punto de anclaje a la membrana, donde se ensambla el protoanillo de *E. coli*. Aunque esta conclusión era de esperar, los resultados obtenidos excluyen claramente cualquier efecto no deseado en el plegamiento o en la función del fragmento resultante del corte del segmento transmembrana de ZipA. Además, es difícil predecir si la separación de la proteína de su entorno nativo de unión a lípido resultaría en una proteína con las mismas propiedades, en particular aquellas relacionadas con la unión.

Por otra parte, el hecho de que la afinidad de ZipA por los diferentes tipos de oligómeros y polímeros de FtsZ sea similar implica que la afinidad de unión de los Nd-ZipA a FtsZ es insensible al estado de oligomerización o a la naturaleza del nucleótido unido a FtsZ. Este es un resultado importante, teniendo en cuenta la posible presencia de efectos alostéricos, los cuales seguramente existen en el caso de la interacción FtsZ-FtsZ, ya que se han observado grandes diferencias entre la tendencia de FtsZ-GDP y la de FtsZ-GTP a auto-ensamblarse (Erickson et al. 2010, Mingorance et al. 2010, Monterroso et al. 2013).

En cuanto a los resultados de microscopía electrónica, se encontró que al recubrir una rejilla de microscopía electrónica con Nd-ZipA, pero no con nanodiscos vacíos, los filamentos de FtsZ quedaban atrapados en la superficie, sin cambios significativos en la estructura de esos filamentos. Este resultado sugiere que los aspectos estructurales de la interacción ZipA y FtsZ podrían diferir de los modelos propuestos a partir de los datos obtenidos en ausencia de membrana. Se ha sugerido que ZipA afecta a la morfología del polímero de FtsZ produciendo redes de filamentos (Hale et al. 2000, Kuchibhatla et al. 2011). En el trabajo de (Kuchibhatla et al. 2011) se usó la proteína ZipA completa en ausencia de detergentes o lípidos, mientras que en el de (Hale et al. 2000) se empleó la forma soluble de ZipA la cual carece de la región transmembrana y los experimentos de polimerización se llevaron a cabo a pH 5.8.

Discusión

Estos efectos no se encontraron bajo las condiciones probadas en esta tesis, lo que sugiere que las diferencias pueden deberse a la presencia de la membrana lipídica, lo que apoya la importancia de la reconstitución de ZipA en nanodiscos como modelo en el estudio de interacciones. No se puede descartar que la estructura de los nanodiscos pueda limitar de alguna forma la formación de redes de polímeros de FtsZ. Si el dominio ZBD colapsa cuando se une a una rejilla de microscopía electrónica, la distancia entre nanodiscos adyacentes mantendría los dominios ZBDs lo suficientemente separados para impedir la formación de redes de polímeros de FtsZ. Sin embargo, los resultados del análisis de interacción en solución, condiciones en las que el dominio ZBD debería estar unido al nanodiscos de manera flexible, no muestran indicios de la presencia de grandes agrupaciones de filamentos de FtsZ en presencia de Nd-ZipA. En velocidad de sedimentación se observa un aumento relativamente pequeño del coeficiente de sedimentación del complejo Nd-ZipA/polímero con respecto al del polímero sólo, pero este aumento no es el esperado para la formación de grandes agregados de filamentos. Además, en FCCS no se observó una disminución dramática del coeficiente de difusión de FtsZ en presencia de Nd-ZipA, como lo esperada para las enormes agrupaciones de filamentos descritas.

Los resultados aquí presentados, tomados en su conjunto, proporcionan alguna pista sobre los mecanismos que remodelan la arquitectura del anillo de división durante la constricción. Durante el ciclo de división de *E. coli*, ZipA se distribuye a lo largo de toda la superficie interna de la membrana citoplasmática y se localiza, en parte, en la posición septal al mismo tiempo que se ensambla el protoanillo. Al contrario que FtsA, el largo dominio citoplasmático desestructurado de ZipA le confiere una estructura de anclaje flexible, como reflejan los resultados de microscopía electrónica y las mediciones del radio hidrodinámico de nanodiscos. Como sólo el 30 % de la FtsZ parece localizarse en el anillo de división, se asume que una gran cantidad de FtsZ debe encontrarse dispersa en el citoplasma. Como indican las medidas utilizando nanodiscos de ZipA, la afinidad de los oligómeros de FtsZ-GDP por ZipA es de magnitud similar a la afinidad de polímeros de FtsZ-GTP más grandes. Esto indica que el acoplamiento de FtsZ a ZipA es probable que desempeñe un papel de pequeña importancia o incluso insignificante en la polimerización de FtsZ y su ensamblaje en el protoanillo. Sin embargo, como las proteínas SlmA y MinC actúan impidiendo la polimerización fuera de la mitad de la célula, FtsZ, dada su débil asociación con ZipA, puede migrar fácilmente desde otras regiones de la membrana citoplasmática hasta ocupar la posición central cuando se requiera en la división. El riesgo de colapso de un anillo de FtsZ se podría mantener en niveles bajos si los polímeros de FtsZ establecieran interacciones con más de una molécula de ZipA o con otro elemento de anclaje, como FtsA. Estudios recientes sugieren que parte de la proteína ZipA podría encontrarse insertada en la membrana en forma de dímero (Skoog and Daley 2012), lo cual proporcionaría estabilidad a la unión flexible con FtsZ.

El resultado final sería un protoanillo estructuralmente estable con la suficiente capacidad dinámica como para reordenarse y adoptar un diámetro variable. De esta forma se permitiría la constricción una vez que los elementos estuvieran ensamblados. Esta plasticidad en la conexión del protoanillo con la membrana citoplasmática se refleja, por ejemplo, en la incapacidad de los protoanillos ya formados para mantenerse ensamblados cuando se eliminan otros elementos que intervienen en la formación del anillo en últimas etapas, como FtsN (Rico et al. 2010).

En resumen, se han explotado la tecnología de nanodiscos para probar propiedades de elementos de la maquinaria de división bacteriana y sus interacciones bajo entornos lipídicos bien definidos y, de esta forma, obtener información sobre sus funciones concretas. Además, mediante esta tecnología se han diseñado ensayos de fluorescencia aplicables en la búsqueda de inhibidores de la formación del complejo ZipA/FtsZ y potencialmente aplicables al estudio de interacciones entre otros componentes del divisoma.

3. Reconstitución de FtsN en nanodiscos

Uno de los objetivos de este trabajo fue poner a punto la purificación de la proteína de división tardía FtsN. Hasta el comienzo de esta tesis se había usado la proteína en estudios *in vivo* que no implican la purificación de la proteína sino su expresión en células, como en (Rico et al. 2010) o en (Addinall et al. 1997) en donde realizaron estudios de microscopía de fluorescencia. En otros trabajos, como el de (Yang et al. 2004), solamente purificaron el dominio periplasmático soluble de FtsN, y en (Duncan et al. 2013) trabajaron con el dominio SPOR de FtsN, en ningún caso con la proteína completa. Uno de los primeros trabajos que describió la purificación de la proteína FtsN completa fue el de (Busiek et al. 2012), en donde desarrollaron estudios *in vitro* para comprobar la interacción entre FtsA y FtsN. El protocolo que se presenta en el artículo no profundiza en la pureza con la que se obtuvo la proteína ni el rendimiento obtenido. Por todo ello, el protocolo puesto a punto en esta tesis es el primero en desarrollar en detalle numerosos aspectos de la purificación de FtsN hasta ahora no descritos en la literatura.

La proteína FtsN se obtuvo con una pureza, medida por densitometría de geles, que se situó entre en 75 % y el 90 %. La presencia de bandas de menor peso molecular hizo pensar en la degradación proteolítica, bien en las células durante la expresión, bien durante el proceso de purificación. Mediante análisis de muestras de proteína pura incubadas a distintos tiempos mediante SDS-PAGE y *western blot* se vio que parte de estas bandas de menor peso molecular se incrementaban en importancia con el tiempo, lo que indicaría que efectivamente corresponden a fragmentos resultantes de degradación proteolítica y que ésta continúa en la proteína pura. Dada la estructura de FtsN, el dominio más desplegado entre el segmento transmembrana y el dominio de unión a peptidoglicano sería el más expuesto a una posible degradación proteolítica, al estar más accesible y es probable que sea el que se esté digiriendo en este caso.

Discusión

Desgraciadamente, la secuenciación de aminoácidos de las bandas de degradación no funcionó y no se pudo analizar la secuencia exacta de corte, aunque la presencia de múltiples bandas indica que esta degradación ocurre en varios puntos de la secuencia.

A pesar de estas bandas contaminantes, en experimentos de velocidad de sedimentación, las muestras de FtsN solubilizada en detergente muestran que la especie principal representaba al menos el 90 % de la señal. A partir del cociente friccional y el coeficiente de sedimentación, se pudo estimar la masa molecular de la proteína, que sería compatible con la esperada para un monómero. Se ha descrito que FtsN podría formar dímeros *in vivo*, lo cual sería importante para su función, especialmente para una posible interacción con FtsA (Karimova et al. 2005, Busiek et al. 2012).

Dado que el dominio globular es monomérico de forma aislada, esta dimerización deber ocurrir bien en el segmento transmembrana, bien en la región desplegada de FtsN, o bien mediada por la interacción con alguna otra proteína de división. Si esta dimerización ocurre gracias al segmento transmembrana sería interesante comprobar si la proteína reconstituida en una bicapa es dimerica o si en otros detergentes la proteína se comporta como dímero, como se discute más abajo.

La proteína FtsN tiene dos residuos de cisteína, ambos presentes en el dominio globular de FtsN. En la estructura reportada de dicho dominio mediante RMN las cisteínas estarían libres pero cerca una de otra, sólo que a una distancia mayor de la necesaria para la formación de un puente disulfuro (Yang et al. 2004, Duncan et al. 2013) (Figura D1). Con la proteína completa, usando el método bioquímico clásico de Ellman (Evans and Ellman 1959), se ha comprobado en esta tesis que estas cisteínas forman efectivamente un puente disulfuro. Recientemente, otros autores han llegado a la misma conclusión al observar cambios en la movilidad electroforética de FtsN, detectada en un ensayo de *western blot* de extractos celulares, al añadir un agente reductor (Duncan et al. 2013). Otras observaciones importantes del mencionado trabajo incluyen la inestabilidad observada al intentar expresar mutantes de FtsN con las cisteínas cambiadas por alaninas o la reducción de la unión del dominio C-terminal de FtsN al peptidoglicano al añadir agentes reductores (Duncan et al. 2013). Los resultados de nuestras pruebas permiten confirmar de forma concluyente la presencia de un puente disulfuro intramolecular en la proteína FtsN. La importancia de este puente disulfuro estaría relacionada con una estabilización estructural de la proteína según se discute el trabajo de Duncan y colaboradores, lo que concuerda con el alto grado de conservación de estos residuos de cisteína en FtsN de distintos organismos (Duncan et al. 2013). Por último, es interesante destacar que FtsN es el primer ejemplo de una proteína de división que contiene un puente disulfuro (Duncan et al. 2013).

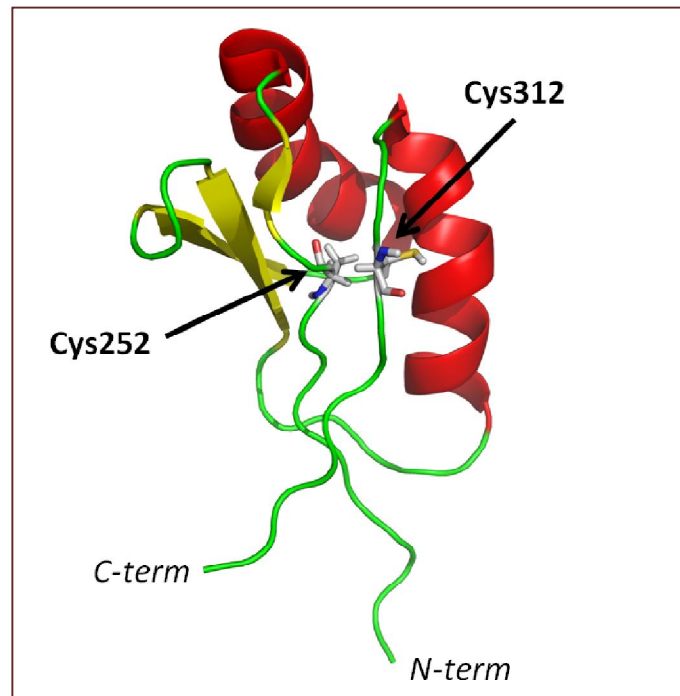


Figura D1: Situación de las dos cisteínas presentes en FtsN, dentro del dominio SPOR de esta proteína. La figura se preparó usando el programa Pymol a partir de la entrada 1UTA de la base de datos PDB (Yang et al. 2004).

Con el objetivo de estabilizar la proteína y eliminar el uso del detergente, que podría interferir en futuros experimentos para comprobar la interacción de esta proteína con otras proteínas de división, se incorporó FtsN en nanodiscos. En principio, se prepararon nanodiscos con lípidos de *E. coli* y MSP1D1, que forma nanodiscos de 10 nm, de forma similar a como se hizo con ZipA en el Apartado 2 de Resultados. A pesar de que FtsN se incorporaba a los nanodiscos, ya que aparecía la proteína FtsN en un pico definido en el cromatograma de exclusión molecular junto con MSP1D1, no fue posible aislar este pico con el mismo grado de pureza que se consiguió con ZipA. Esta mayor dificultad al aislar el pico de Nd-FtsN podría deberse en gran medida a que el pico de Nd-FtsN eluye más próximo (~11.3 ml) al de nanodiscos vacíos (~12.6 ml) que el de Nd-ZipA (~11.0 ml). En todo caso, se intentó mejorar la preparación de Nd-FtsN usando MSP1D1(-) (Denisov et al. 2004), que al no tener cola de histidinas permite la separación de nanodiscos vacíos de nanodiscos con proteína incorporada mediante cromatografía de afinidad a metales.

Los nanodiscos preparados con FtsN y ECL de esta manera no se retuvieron en absoluto en la columna de afinidad, lo que llevó a pensar si podría existir alguna influencia de los lípidos con los que se forman los nanodiscos en su interacción con la resina cargada del metal en la columna. Por ello, se formaron nanodiscos de FtsN con EPC y MSP1D1(-) y se comprobó que en este caso, sí se retenían en la columna.

Discusión

Posteriormente, los nanodiscos retenidos se sometieron a una cromatografía de exclusión molecular, obteniéndose de nuevo un perfil muy heterogéneo, con un pico principal a ~11.3 ml y un hombro a ~12.5 ml, ambos conteniendo FtsN y MSP1D1(-). Mediante densitometría de los geles SDS-PAGE, pudo estimarse que habría una molécula de FtsN por cada nanodisco en el caso de los Nd-FtsN con EPC. Sin embargo, habría que realizar otras pruebas para confirmar este resultado, como el equilibrio de sedimentación utilizado para los Nd-ZipA. Estos resultados, indican que los lípidos sí poseen una gran influencia en la capacidad de la cola de histidinas de FtsN de interactuar con la resina quelante de níquel. El efecto podría consistir bien en algún tipo de impedimento estérico debido a la disposición de la región adyacente a la cola de histidinas con respecto a los lípidos (por ejemplo, si la región adyacente a la cola de histidinas es capaz de interactuar con los lípidos, ésta podría perder la flexibilidad necesaria para unirse a la resina), o bien en algún efecto de los lípidos de *E. coli* en la afinidad de la propia proteína o la molécula completa de nanodiscos por la resina (por ejemplo, la carga negativa de parte de los fosfolípidos de *E. coli* que podrían causar algún tipo de repulsión entre el metal o la resina y el nanodisco).

Por un lado, la región adyacente a la cola de histidinas es un conector flexible de 26 aminoácidos con sólo 2 residuos cargados en la zona más alejada de las histidinas (Figura D2), que en teoría debe ser lo suficientemente flexible para permitir la unión de las histidinas a la resina. Por otro lado, la unión a la resina de afinidad tiene lugar en presencia de una alta concentración de NaCl (0.3 M), que debería apantallar posibles repulsiones electrostáticas. Serían necesarias más pruebas para dilucidar entre ambas hipótesis. Por ejemplo, se podría cambiar el conector entre la cola de histidinas y FtsN, para ver el efecto de esta región; o se podrían crear nanodiscos de FtsN con mezclas de fosfatidilcolina y fosfatidilglicerol para ver el efecto de los lípidos con carga negativa en esta unión de la cola de histidinas a la resina. Un estudio de este tipo podría ser interesante para diseñar estrategias de purificación de proteínas en nanodiscos.

```
MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQQMGRGSEFMAQRDYVRRSQPAPSRRKKSTSRK
KQRNLPVAVSPAMVAIAAAVLVTFIGGLYFITHHKKEESETLQSQKVTGNGLPCKPEERWR
YIKELESRQPGVRAPTPEPSAGGEVKTPEQLTPEQRQLLEQMQADMRQQPTQLVEVPWNEQ
TPEQRQQT LQRQRQAQQLAEQORLAQQSRTTEQSWQQQTRTSQAAPVQAQPRQSKPASSQ
QPYQDLLQTPAHTTAQSKPQQAAPVARAADAPKPTAEKKDERRWMVQCGSFRGAEQAETV
RAQLAFEGFDSKITTNNGWNRVVI GPKVKGKENADSTLNRLKMAGHTNCIRLAAGG
```

Figura D2: Secuencia de aminoácidos de His₆-FtsN. Se muestran en gris los aminoácidos añadidos a la secuencia de FtsN nativa, con la cola de histidinas subrayada y en negrita, los residuos de arginina y ácido glutámico que se discuten en el texto. A continuación, en rojo se destacan los residuos citoplásmicos de FtsN, con los residuos cargados destacados en negrita. Seguidamente, se presentan en azul los residuos que forman la hélice transmembrana, en negro los residuos que conectan con el dominio C-terminal y, por último, en verde los residuos del dominio SPOR de unión a peptidoglicano. En este último dominio, se destacan en negrita los dos únicos residuos de cisteína presentes en FtsN.

Discusión

Por otro lado, es interesante destacar que en el caso de EPC, aparecen dos tipos de especies de nanodiscos con FtsN, uno que eluye en el mismo volumen que los nanodiscos vacíos y otro que eluye a un menor volumen, indicando que ésta poseería un mayor radio hidrodinámico. Dado que no se pueden separar los nanodiscos vacíos de los Nd-FtsN en el caso de los lípidos de *E. coli*, no puede descartarse que la especie de menor radio hidrodinámico también esté presente en el caso de estos lípidos. En cualquier caso, se pudo comparar mediante velocidad de sedimentación la especie que eluye a ~11.3 ml para ambos tipos de lípidos, encontrándose que en ambos casos aparece una única especie mayoritaria, siendo esta especie mayoritaria más rápida en sedimentar en el caso de los Nd-FtsN con lípidos de *E. coli*. Este resultado es consistente con el análisis que se hizo de nanodiscos vacíos con EPC y ECL, siendo los nanodiscos de ECL más rápidos en sedimentar (ver Apartado 1, Discusión de nanodiscos vacíos).

Por último, es importante destacar que, a pesar de que la preparación de FtsN utilizada no tenía un nivel de pureza similar al que se pudo obtener con otras proteínas, encontrándose fragmentos de degradación de FtsN en estas preparaciones, las preparaciones de Nd-FtsN mostraron una gran pureza en cuanto a la ausencia de especies distintas a His₆-FtsN completa y además no se detectó degradación proteolítica. Esta estabilización de la proteína por parte de los nanodiscos es una de las ventajas que conlleva su uso y que ha sido observada en otros casos (Ritchie et al. 2009).

En cuanto a la visualización mediante microscopía electrónica de las muestras de Nd-FtsN de ECL, se observó la presencia mayoritaria de estructuras discoidales de 10-12 nm, como era de esperar, en donde sólo se apreciaron vistas frontales y no hubo evidencia de vistas laterales, como en el caso de Nd-ZipA, o del dominio globular de FtsN. El dominio SPOR de FtsN, de sólo 79 aminoácidos, es muy pequeño para poder ser visualizado en el TEM, especialmente si este no se encuentra siempre en una posición fija respecto al nanodisco, como se discutió para el caso de ZipA. Por otro lado, se podría utilizar una estrategia similar a la desarrollada para el caso de la proteína de membrana ZipA, haciendo uso de anticuerpos para localizar la presencia de esta región en microscopía electrónica.

Aunque no se ha conseguido obtener un nivel de homogeneidad similar al obtenido para los Nd-ZipA, los resultados obtenidos en esta tesis proporcionan información muy importante de cara a conseguir preparaciones mejores de FtsN que sirvan para estudios de interacción posteriores.

Una cuestión interesante y que no se ha podido abordar en este trabajo, es la dimerización de FtsN. Como se comenta más arriba, hay indicios de que FtsN es capaz de autoasociar en experimentos de doble híbrido bacteriano (Karimova et al. 2005) así como en experimentos de transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET) *in vivo*, usando fusiones de FtsN con proteínas fluorescentes (Alexeeva et al. 2010). Por otro lado, en (Busiek et al. 2012) para comprobar la supuesta necesidad de

Discusión

dimerización de FtsN para interactuar con FtsA construyeron mutantes con una cremallera de leucina que forzaba la dimerización. Según los autores, el dominio citoplasmático de FtsN es el responsable de la interacción con FtsA, por ello los mutantes sólo contenían esta parte de la proteína seguida por la cremallera de leucina que forzaba la dimerización de la proteína en paralelo. Otra construcción, en la que la dimerización se producía de forma antiparalela sirvió de control negativo. Sólo el dímero de este mutante realizado en paralelo fue capaz de interactuar con FtsA en un ensayo de *far western blot*, a la vez que la proteína FtsN completa, lo que indicaría la importancia de esta autoasociación. Por otro lado, cabe reseñar la importancia de la interacción entre FtsA y FtsN, ya que al ser la primera de ellas una proteína de división temprana y la otra tardía, ésta serviría como nexo entre el comienzo de la división y el final.

Para poder reproducir estos resultados con la proteína en su totalidad reconstituida en nanodiscos, lo que permitiría estudiar el efecto de los lípidos en la interacción FtsN-FtsA, es necesario la construcción de nanodiscos con 2 moléculas de FtsN por nanodisco. En nuestro caso, no hemos podido comprobar mediante técnicas apropiadas, como el equilibrio de sedimentación, exactamente el número de moléculas de FtsN en cada nanodisco. Para poder controlar de forma precisa la estequiometría de FtsN dentro del nanodisco, se podrían diseñar construcciones dimericas de FtsN (bien con la proteína completa o bien sólo con la región N-terminal de FtsN más la hélice transmembrana, asociadas a una cremallera de leucinas) que se introducirían en nanodiscos. Otro abordaje parecido, pero más fisiológico, consistiría en la siguiente construcción (de N- a C-terminal): una secuencia con cola de histidinas, una cremallera de leucinas que provocase la dimerización, una secuencia SUMO (Mossessova et al. 2000) y finalmente la proteína FtsN completa.

Tras la inserción en nanodiscos de esta proteína, que formaría dímeros, se usaría la proteasa SUMO para digerir toda la región anterior a la secuencia SUMO, quedando dos copias de FtsN nativa, sin ningún aminoácido añadido, insertadas en cada nanodisco. Una ventaja de añadir la secuencia SUMO y la cremallera de leucinas al N-terminal de la proteína sería incrementar la separación entre los lípidos y la cola de histidinas en el nanodisco completo, lo que podría reducir el efecto de los lípidos de *E. coli* sobre la unión a metales de la cola de histidinas facilitando su purificación.

En resumen, se ha conseguido purificar FtsN unida a una cola de histidinas e introducir esta proteína dentro de nanodiscos. La caracterización de éstos se vio limitada por la dificultad en separar nanodiscos vacíos de nanodiscos con FtsN, así como por la heterogeneidad de especies de nanodiscos con FtsN observada. Estos resultados por lo tanto, suponen un punto de partida para futuros estudios estructurales y funcionales de la proteína FtsN utilizando la tecnología de nanodiscos.

Conclusiones

Conclusiones

Nanodiscos vacíos

- Se han formado nanodiscos vacíos de unos 10 nm de diámetro a partir de tres composiciones lipídicas distintas: palmitoiloleilfosfatidilcolina (POPC), extracto de L- α -fosfatidilcolina de huevo de gallina (EPC) y extracto polar de lípidos de *E. coli* (ECL).
- El tipo de lípido empleado en la formación de nanodiscos influye considerablemente en sus propiedades hidrodinámicas y no en sus dimensiones.
- Los nanodiscos vacíos formados por ECL presentan un coeficiente de sedimentación y una masa de flotación mayores que los nanodiscos de POPC o EPC.
- El volumen específico parcial de los nanodiscos de ECL es menor que el obtenido para el caso de nanodiscos formados, tanto por POPC como por EPC, a través de experimentos de dispersión de luz dinámica. Los valores obtenidos tanto para el caso de nanodiscos de POPC como de EPC encajan dentro del valor descrito para las partículas de lipoproteína de alta densidad de tipo 3 (HDL-3).

Nanodiscos con ZipA

- Se ha incorporado una única copia de la proteína completa y funcional ZipA en nanodiscos formados por extracto polar de lípidos de *E. coli*.
- El complejo Nd-ZipA se comporta como una especie homogénea con una masa de flotación de 34000 Da \pm 3000 y un coeficiente de sedimentación de 4.9 S \pm 0.1.
- Las dimensiones de los Nd-ZipA en solución son de aproximadamente 13 nm de diámetro hidrodinámico, según se ha medido mediante DLS, FCS y cromatografía de exclusión molecular.
- En las imágenes de microscopía electrónica de transmisión de los Nd-ZipA se observan dos poblaciones de discos con distinto diámetro, una de 10-11 nm y otra de 12-13 nm.
- ZipA resulta accesible a anticuerpos preparados contra esta proteína tras su inserción en nanodiscos, a pesar de no ser capaces de detectar el dominio de interacción con FtsZ de ZipA en el microscopio electrónico.
- La presencia o ausencia de la región transmembrana de ZipA no afecta a la afinidad de esta proteína por FtsZ, lo que apoya la idea de que ésta sólo proporciona un punto de anclaje a la membrana, donde se ensambla el protoanillo de *E. coli*.

Conclusiones

- La polimerización de FtsZ con GTP o GMPCPP no incrementa la afinidad de ZipA por FtsZ, siendo el valor de $\log K_{AZ}$ del orden de 6, cuando se considera la unión de ZipA por oligómero de FtsZ.
- En las condiciones probadas, la proteína ZipA reconstituida en los nanodiscos no afecta a la disposición de los filamentos, ni en solución, ni en superficies para microscopía electrónica.
- Los experimentos *in vitro* de reconstitución de ZipA en nanodiscos han ofrecido la oportunidad de investigar reacciones complejas asociadas a la membrana bajo condiciones experimentales definidas, permitiendo de esta forma, nuevas formas de abordar la complejidad de la maquinaria de división celular en *E. coli*.

Nanodiscos con FtsN

- Se ha puesto a punto un protocolo para sobreexpresar y purificar FtsN a partir de la cepa C41(DE3) de *E. coli* con un rendimiento de ~5 mg por litro de cultivo.
- FtsN es un monómero en presencia de detergentes.
- Los dos residuos de cisteína de FtsN, ambos presentes en el dominio globular de FtsN, forman un puente disulfuro.
- Se ha reconstituido FtsN en nanodiscos de 10 nm formados por extracto polar de lípidos de *E. coli* y por extracto de L- α -fosfatidilcolina de huevo de gallina.
- FtsN insertada en nanodiscos no se degrada con el tiempo, al contrario que la proteína en detergentes.

Publicaciones durante la tesis

Publicaciones durante la tesis

Publicaciones durante la tesis

1. Hernandez-Rocamora, V. M., Reija, B., **Garcia, C.**, Natale, P., Alfonso, C., Minton, A. P., Zorrilla, S., Rivas, G. and Vicente, M. (2012). "Dynamic interaction of the Escherichia coli cell division ZipA and FtsZ proteins evidenced in nanodiscs." J Biol Chem **287**(36): 30097-30104.
2. Hernandez-Rocamora, V. M., **Garcia-Montanes, C.**, Rivas, G. and Llorca, O. (2012). "Reconstitution of the Escherichia coli cell division ZipA-FtsZ complexes in nanodiscs as revealed by electron microscopy." J Struct Biol **180**(3): 531-538.
3. Hernández-Rocamora, V. M., **Garcia-Montanes, C.**, Reija, B., Monterroso, B., Margolin, W., Alfonso, C., Zorrilla, S., and Rivas, G. (2013). "MinC shortens FtsZ protofilaments by preferentially interacting with GDP-bound subunits." J Biol Chem. **288**(34):24625-35.
4. Hernández-Rocamora, V. M., **Garcia-Montanes, C.**, Rivas, G. (2014). "Phospholipid bilayer nanodiscs: a powerful tool to study the biochemical reactivity of proteins in membrane-like environments". Enviado.

Bibliografía

Bibliografía

Aarsman, M. E., A. Piette, C. Fraipont, T. M. Vinkenvleugel, M. Nguyen-Disteche and T. den Blaauwen (2005). "Maturation of the Escherichia coli divisome occurs in two steps." Mol Microbiol **55**(6): 1631-1645.

Adams, D. W. and J. Errington (2009). "Bacterial cell division: assembly, maintenance and disassembly of the Z ring." Nat Rev Microbiol **7**(9): 642-653.

Addinall, S. G., C. Cao and J. Lutkenhaus (1997). "FtsN, a late recruit to the septum in Escherichia coli." Mol Microbiol **25**(2): 303-309.

Ahijado-Guzman, R., C. Alfonso, B. Reija, E. Salvarelli, J. Mingorance, S. Zorrilla, B. Monterroso and G. Rivas (2013). "Control by potassium of the size distribution of Escherichia coli FtsZ polymers is independent of GTPase activity." J Biol Chem **288**(38): 27358-27365.

Ahijado-Guzman, R., P. Gomez-Puertas, R. A. Alvarez-Puebla, G. Rivas and L. M. Liz-Marzan (2012). "Surface-Enhanced Raman scattering-based detection of the interactions between the essential cell division FtsZ protein and bacterial membrane elements." ACS Nano **6**(8): 7514-7520.

Akkaladevi, N., L. Hinton-Chollet, H. Katayama, J. Mitchell, L. Szerszen, S. Mukherjee, E. P. Gogol, B. L. Pentelute, R. J. Collier and M. T. Fisher (2013). "Assembly of anthrax toxin pore: lethal-factor complexes into lipid nanodiscs." Protein Sci **22**(4): 492-501.

Alami, M., K. Dalal, B. Lelj-Garolla, S. G. Sligar and F. Duong (2007). "Nanodiscs unravel the interaction between the SecYEG channel and its cytosolic partner SecA." EMBO J **26**(8): 1995-2004.

Alcorlo, M., M. Jimenez, A. Ortega, J. M. Hermoso, M. Salas, A. P. Minton and G. Rivas (2009). "Analytical ultracentrifugation studies of phage phi29 protein p6 binding to DNA." J Mol Biol **385**(5): 1616-1629.

Alexeeva, S., T. W. Gadella, Jr., J. Verheul, G. S. Verhoeven and T. den Blaauwen (2010). "Direct interactions of early and late assembling division proteins in Escherichia coli cells resolved by FRET." Mol Microbiol **77**(2): 384-398.

Baas, B. J., I. G. Denisov and S. G. Sligar (2004). "Homotropic cooperativity of monomeric cytochrome P450 3A4 in a nanoscale native bilayer environment." Arch Biochem Biophys **430**(2): 218-228.

Bacia, K. and P. Schwille (2007). "Practical guidelines for dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy." Nat Protoc **2**(11): 2842-2856.

Bayburt, T. H., Y. V. Grinkova and S. G. Sligar (2002). "Self-Assembly of Discoidal Phospholipid Bilayer Nanoparticles with Membrane Scaffold Proteins." Nano Letters **2**(8): 853-856.

Bayburt, T. H., Y. V. Grinkova and S. G. Sligar (2006). "Assembly of single bacteriorhodopsin trimers in bilayer nanodiscs." Arch Biochem Biophys **450**(2): 215-222.

Bayburt, T. H., A. J. Leitz, G. Xie, D. D. Oprian and S. G. Sligar (2007). "Transducin activation by nanoscale lipid bilayers containing one and two rhodopsins." J Biol Chem **282**(20): 14875-14881.

Bayburt, T. H. and S. G. Sligar (2003). "Self-assembly of single integral membrane proteins into soluble nanoscale phospholipid bilayers." Protein Sci **12**(11): 2476-2481.

Bayburt, T. H. and S. G. Sligar (2010). "Membrane protein assembly into Nanodiscs." FEBS Lett **584**(9): 1721-1727.

Bayburt, T. H., S. A. Vishnivetskiy, M. A. McLean, T. Morizumi, C. C. Huang, J. J. Tesmer, O. P. Ernst, S. G. Sligar and V. V. Gurevich (2011). "Monomeric rhodopsin is sufficient for normal rhodopsin kinase (GRK1) phosphorylation and arrestin-1 binding." J Biol Chem **286**(2): 1420-1428.

Bernard, C. S., M. Sadasivam, D. Shiomi and W. Margolin (2007). "An altered FtsA can compensate for the loss of essential cell division protein FtsN in Escherichia coli." Mol Microbiol **64**(5): 1289-1305.

Bernhardt, T. G. and P. A. de Boer (2003). "The Escherichia coli amidase AmiC is a periplasmic septal ring component exported via the twin-arginine transport pathway." Mol Microbiol **48**(5): 1171-1182.

Bertsche, U., T. Kast, B. Wolf, C. Fraipont, M. E. Aarsman, K. Kannenberg, M. von Rechenberg, M. Nguyen-Disteche, T. den Blaauwen, J. V. Holtje and W. Vollmer (2006). "Interaction between two murein (peptidoglycan) synthases, PBP3 and PBP1B, in Escherichia coli." Mol Microbiol **61**(3): 675-690.

Boldog, T., S. Grimme, M. Li, S. G. Sligar and G. L. Hazelbauer (2006). "Nanodiscs separate chemoreceptor oligomeric states and reveal their signaling properties." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(31): 11509-11514.

Boldog, T., M. Li and G. L. Hazelbauer (2007). "Using Nanodiscs to Create Water Soluble Transmembrane Chemoreceptors Inserted in Lipid Bilayers." **423**: 317-335.

Borch, J., F. Torta, S. G. Sligar and P. Roepstorff (2008). "Nanodiscs for immobilization of lipid bilayers and membrane receptors: kinetic analysis of cholera toxin binding to a glycolipid receptor." Anal Chem **80**(16): 6245-6252.

Bordignon, E. and Y. Polyhach (2013). "EPR techniques to probe insertion and conformation of spin-labeled proteins in lipid bilayers." Methods Mol Biol **974**: 329-355.

Bowler, L. D. and B. G. Spratt (1989). "Membrane topology of penicillin-binding protein 3 of Escherichia coli." Mol Microbiol **3**(9): 1277-1286.

Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-254.

Busiek, K. K., J. M. Eraso, Y. Wang and W. Margolin (2012). "The early divisome protein FtsA interacts directly through its 1c subdomain with the cytoplasmic domain of the late divisome protein FtsN." J Bacteriol **194**(8): 1989-2000.

Cabre, E. J., A. Sanchez-Gorostiaga, P. Carrara, N. Roperio, M. Casanova, P. Palacios, P. Stano, M. Jimenez, G. Rivas and M. Vicente (2013). "Bacterial Division Proteins FtsZ and ZipA Induce Vesicle Shrinkage and Cell Membrane Invagination." J Biol Chem **288**(37): 26625-26634.

Casassa, E. F. and H. Eisenberg (1964). "THERMODYNAMIC ANALYSIS OF MULTICOMPONENT SOLUTIONS." Adv Protein Chem **19**: 287-395.

Cavigiolio, G., B. Shao, E. G. Geier, G. Ren, J. W. Heinecke and M. N. Oda (2008). "The interplay between size, morphology, stability, and functionality of high-density lipoprotein subclasses." Biochemistry **47**(16): 4770-4779.

Civjan, N. R., T. H. Bayburt, M. A. Schuler and S. G. Sligar (2003). "Direct solubilization of heterologously expressed membrane proteins by incorporation into nanoscale lipid bilayers." Biotechniques **35**(3): 556-560, 562-553.

Clifton, L. A., C. Neylon and J. H. Lakey (2013). "Examining protein-lipid complexes using neutron scattering." Methods Mol Biol **974**: 119-150.

Cole, J. L. (2004). "Analysis of heterogeneous interactions." Methods Enzymol **384**: 212-232.

Corbin, B. D., B. Geissler, M. Sadasivam and W. Margolin (2004). "Z-ring-independent interaction between a subdomain of FtsA and late septation proteins as revealed by a polar recruitment assay." J Bacteriol **186**(22): 7736-7744.

Cruz, F. and D. E. Edmondson (2007). "Kinetic properties of recombinant MAO-A on incorporation into phospholipid nanodisks." J Neural Transm **114**(6): 699-702.

Culbertson, C. T., S. C. Jacobson and J. Michael Ramsey (2002). "Diffusion coefficient measurements in microfluidic devices." Talanta **56**(2): 365-373.

Chen, J. C. and J. Beckwith (2001). "FtsQ, FtsL and FtsI require FtsK, but not FtsN, for co-localization with FtsZ during Escherichia coli cell division." Mol Microbiol **42**(2): 395-413.

Chen, Y. and H. P. Erickson (2009). "FtsZ filament dynamics at steady state: subunit exchange with and without nucleotide hydrolysis." Biochemistry **48**(28): 6664-6673.

Christopher R. Morgan, C. M. H., Kasper D. Rand, Darrel W. Stafford, James W. Jorgenson, and John R. Engen (2011). "Conformational Transitions in the Membrane Scaffold Protein of Phospholipid Bilayer Nanodiscs." Mol Cell Proteomics **10**(9): **M111.010876**.

Chu, B. (1991). Laser Light Scattering: Basic Principles and Practice. New York.

D'Ulisse, V., M. Fagioli, P. Ghelardini and L. Paolozzi (2007). "Three functional subdomains of the Escherichia coli FtsQ protein are involved in its interaction with the other division proteins." Microbiology **153**(Pt 1): 124-138.

Dai, K. and J. Lutkenhaus (1991). "ftsZ is an essential cell division gene in Escherichia coli." J Bacteriol **173**(11): 3500-3506.

Dai, K., Y. Xu and J. Lutkenhaus (1993). "Cloning and characterization of ftsN, an essential cell division gene in Escherichia coli isolated as a multicopy suppressor of ftsA12(Ts)." J Bacteriol **175**(12): 3790-3797.

Dai, K., Y. Xu and J. Lutkenhaus (1996). "Topological characterization of the essential Escherichia coli cell division protein FtsN." J Bacteriol **178**(5): 1328-1334.

Dalal, K. and F. Duong (2010). "Reconstitution of the SecY translocon in nanodiscs." Methods Mol Biol **619**: 145-156.

Dalal, K., N. Nguyen, M. Alami, J. Tan, T. F. Moraes, W. C. Lee, R. Maurus, S. S. Sligar, G. D. Brayer and F. Duong (2009). "Structure, binding, and activity of Syd, a SecY-interacting protein." J Biol Chem **284**(12): 7897-7902.

Das, A., Y. V. Grinkova and S. G. Sligar (2007). "Redox potential control by drug binding to cytochrome P450 3A4." J Am Chem Soc **129**(45): 13778-13779.

Das, A., J. Zhao, G. C. Schatz, S. G. Sligar and R. P. Van Duyne (2009). "Screening of type I and II drug binding to human cytochrome P450-3A4 in nanodiscs by localized surface plasmon resonance spectroscopy." Anal Chem **81**(10): 3754-3759.

de Kruijff, B. (1997). "Biomembranes. Lipids beyond the bilayer." Nature **386**(6621): 129-130.

de Pereda, J. M., D. Leynadier, J. A. Evangelio, P. Chacon and J. M. Andreu (1996). "Tubulin secondary structure analysis, limited proteolysis sites, and homology to FtsZ." Biochemistry **35**(45): 14203-14215.

Denisov, I. G., Y. V. Grinkova, B. J. Baas and S. G. Sligar (2006). "The ferrous-dioxygen intermediate in human cytochrome P450 3A4. Substrate dependence of formation and decay kinetics." J Biol Chem **281**(33): 23313-23318.

Denisov, I. G., Y. V. Grinkova, A. A. Lazarides and S. G. Sligar (2004). "Directed self-assembly of monodisperse phospholipid bilayer Nanodiscs with controlled size." J Am Chem Soc **126**(11): 3477-3487.

Denisov, I. G., Y. V. Grinkova, M. A. McLean and S. G. Sligar (2007). "The one-electron autoxidation of human cytochrome P450 3A4." J Biol Chem **282**(37): 26865-26873.

Devaux, P. F. and M. Seigneuret (1985). "Specificity of lipid-protein interactions as determined by spectroscopic techniques." Biochim Biophys Acta **822**(1): 63-125.

Di Lallo, G., M. Fagioli, D. Barionovi, P. Ghelardini and L. Paolozzi (2003). "Use of a two-hybrid assay to study the assembly of a complex multicomponent protein machinery: bacterial septosome differentiation." Microbiology **149**(Pt 12): 3353-3359.

Dror, R. O., H. F. Green, C. Valant, D. W. Borhani, J. R. Valcourt, A. C. Pan, D. H. Arlow, M. Canals, J. R. Lane, R. Rahmani, J. B. Baell, P. M. Sexton, A. Christopoulos and D. E. Shaw (2013). "Structural basis for modulation of a G-protein-coupled receptor by allosteric drugs." Nature.

Duan, H., N. R. Civjan, S. G. Sligar and M. A. Schuler (2004). "Co-incorporation of heterologously expressed Arabidopsis cytochrome P450 and P450 reductase into soluble nanoscale lipid bilayers." Arch Biochem Biophys **424**(2): 141-153.

Duncan, T. R., A. Yahashiri, S. J. Arends, D. L. Popham and D. S. Weiss (2013). "The Cell Division Protein FtsN: Identification of SPOR Domain Amino Acids Important for Septal Localization, Peptidoglycan-binding, and a Disulfide Bond." J Bacteriol.

Duong, F., J. Eichler, A. Price, M. R. Leonard and W. Wickner (1997). "Biogenesis of the gram-negative bacterial envelope." Cell **91**(5): 567-573.

E.Margeat (2007). "The characterization of biomolecular interactions using fluorescence fluctuation techniques." Protein Interactions: pp. 1-38.

Erickson, H. P. (1995). "FtsZ, a prokaryotic homolog of tubulin?" Cell **80**(3): 367-370.

Erickson, H. P. (2001). "The FtsZ protofilament and attachment of ZipA--structural constraints on the FtsZ power stroke." Curr Opin Cell Biol **13**(1): 55-60.

Erickson, H. P., D. E. Anderson and M. Osawa (2010). "FtsZ in bacterial cytokinesis: cytoskeleton and force generator all in one." Microbiol Mol Biol Rev **74**(4): 504-528.

Erickson, H. P., D. W. Taylor, K. A. Taylor and D. Bramhill (1996). "Bacterial cell division protein FtsZ assembles into protofilament sheets and minirings, structural homologs of tubulin polymers." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(1): 519-523.

Etzkorn, M., T. Raschle, F. Hagn, V. Gelev, A. J. Rice, T. Walz and G. Wagner (2013). "Cell-free expressed bacteriorhodopsin in different soluble membrane mimetics: biophysical properties and NMR accessibility." Structure **21**(3): 394-401.

Evans, J. C. and G. L. Ellman (1959). "The ionization of cysteine." Biochim Biophys Acta **33**(2): 574-576.

Fu, G., T. Huang, J. Buss, C. Coltharp, Z. Hensel and J. Xiao (2010). "In vivo structure of the E. coli FtsZ-ring revealed by photoactivated localization microscopy (PALM)." PLoS One **5**(9): e12682.

Gawrisch, K., O. Soubias and M. Mihailescu (2008). "Insights from biophysical studies on the role of polyunsaturated fatty acids for function of G-protein coupled membrane receptors." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids **79**(3-5): 131-134.

Geissler, B., D. Elraheb and W. Margolin (2003). "A gain-of-function mutation in ftsA bypasses the requirement for the essential cell division gene zipA in Escherichia coli." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(7): 4197-4202.

Gendron, P. O., F. Avaltroni and K. J. Wilkinson (2008). "Diffusion coefficients of several rhodamine derivatives as determined by pulsed field gradient-nuclear magnetic resonance and fluorescence correlation spectroscopy." J Fluoresc **18**(6): 1093-1101.

Gerding, M. A., Y. Ogata, N. D. Pecora, H. Niki and P. A. de Boer (2007). "The trans-envelope Tol-Pal complex is part of the cell division machinery and required for proper outer-membrane invagination during cell constriction in E. coli." Mol Microbiol **63**(4): 1008-1025.

Gill, S. C. and P. H. von Hippel (1989). "Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data." Anal Biochem **182**(2): 319-326.

Gluck, J. M., B. W. Koenig and D. Willbold (2011). "Nanodiscs allow the use of integral membrane proteins as analytes in surface plasmon resonance studies." Anal Biochem **408**(1): 46-52.

Goehring, N. W., M. D. Gonzalez and J. Beckwith (2006). "Premature targeting of cell division proteins to midcell reveals hierarchies of protein interactions involved in divisome assembly." Mol Microbiol **61**(1): 33-45.

Goehring, N. W., C. Robichon and J. Beckwith (2007). "Role for the nonessential N terminus of FtsN in divisome assembly." J Bacteriol **189**(2): 646-649.

Gonzalez, J. M., M. Jimenez, M. Velez, J. Mingorance, J. M. Andreu, M. Vicente and G. Rivas (2003). "Essential cell division protein FtsZ assembles into one monomer-thick ribbons under conditions resembling the crowded intracellular environment." J Biol Chem **278**(39): 37664-37671.

Gonzalez, J. M., M. Velez, M. Jimenez, C. Alfonso, P. Schuck, J. Mingorance, M. Vicente, A. P. Minton and G. Rivas (2005). "Cooperative behavior of Escherichia coli cell-division protein FtsZ assembly involves the preferential cyclization of long single-stranded fibrils." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(6): 1895-1900.

Grinkova, Y. V., I. G. Denisov, M. A. McLean and S. G. Sligar (2013). "Oxidase uncoupling in heme monooxygenases: human cytochrome P450 CYP3A4 in Nanodiscs." Biochem Biophys Res Commun **430**(4): 1223-1227.

Grinkova, Y. V., I. G. Denisov, M. R. Waterman, M. Arase, N. Kagawa and S. G. Sligar (2008). "The ferrous-oxy complex of human aromatase." Biochem Biophys Res Commun **372**(2): 379-382.

Guzman, L. M., J. J. Barondess and J. Beckwith (1992). "FtsL, an essential cytoplasmic membrane protein involved in cell division in Escherichia coli." J Bacteriol **174**(23): 7716-7728.

Guzman, L. M., D. S. Weiss and J. Beckwith (1997). "Domain-swapping analysis of FtsI, FtsL, and FtsQ, bitopic membrane proteins essential for cell division in Escherichia coli." J Bacteriol **179**(16): 5094-5103.

Hale, C. A. and P. A. de Boer (1997). "Direct binding of FtsZ to ZipA, an essential component of the septal ring structure that mediates cell division in E. coli." Cell **88**(2): 175-185.

Hale, C. A. and P. A. de Boer (1999). "Recruitment of ZipA to the septal ring of Escherichia coli is dependent on FtsZ and independent of FtsA." J Bacteriol **181**(1): 167-176.

Hale, C. A. and P. A. de Boer (2002). "ZipA is required for recruitment of FtsK, FtsQ, FtsL, and FtsN to the septal ring in Escherichia coli." J Bacteriol **184**(9): 2552-2556.

Hale, C. A., A. C. Rhee and P. A. de Boer (2000). "ZipA-induced bundling of FtsZ polymers mediated by an interaction between C-terminal domains." J Bacteriol **182**(18): 5153-5166.

Harry, E., L. Monahan and L. Thompson (2006). "Bacterial cell division: the mechanism and its precision." Int Rev Cytol **253**: 27-94.

Hazelwood, R. N. (1958). "The Molecular Weights and Dimensions of Some High-density Human Serum Lipoproteins." Journal of the American Chemical Society **80**(9): 2152-2156.

Hernandez-Rocamora, V. M., C. Garcia-Montanes, G. Rivas and O. Llorca (2012). "Reconstitution of the Escherichia coli cell division ZipA-FtsZ complexes in nanodiscs as revealed by electron microscopy." J Struct Biol **180**(3): 531-538.

Hernandez-Rocamora, V. M., B. Reija, C. Garcia, P. Natale, C. Alfonso, A. P. Minton, S. Zorrilla, G. Rivas and M. Vicente (2012). "Dynamic interaction of the Escherichia coli cell division ZipA and FtsZ proteins evidenced in nanodiscs." J Biol Chem **287**(36): 30097-30104.

Hjelmeland, L. M. and A. Chrambach (1984). "Solubilization of functional membrane proteins." Methods Enzymol **104**: 305-318.

Hopkins, A. L. and C. R. Groom (2002). "The druggable genome." Nat Rev Drug Discov **1**(9): 727-730.

Inagaki, S., R. Ghirlando and R. Grishammer (2012). "Biophysical characterization of membrane proteins in nanodiscs." Methods.

Inagaki, S., R. Ghirlando, J. F. White, J. Gvozdenovic-Jeremic, J. K. Northup and R. Grishammer (2012). "Modulation of the interaction between neurotensin receptor NTS1 and Gq protein by lipid." J Mol Biol **417**(1-2): 95-111.

Insel, P. A., A. Snead, F. Murray, L. Zhang, H. Yokouchi, T. Katakia, O. Kwon, D. Dimucci and A. Wilderman (2012). "GPCR expression in tissues and cells: are the optimal receptors being used as drug targets?" Br J Pharmacol **165**(6): 1613-1616.

Ishii, S. and M. J. Sadowsky (2008). "Escherichia coli in the Environment: Implications for Water Quality and Human Health." Microbes Environ **23**(2): 101-108.

Jimenez, M., A. Martos, M. Vicente and G. Rivas (2011). "Reconstitution and organization of Escherichia coli proto-ring elements (FtsZ and FtsA) inside giant unilamellar vesicles obtained from bacterial inner membranes." J Biol Chem **286**(13): 11236-11241.

Justesen, B. H., T. Laursen, G. Weber, A. T. Fuglsang, B. L. Moller and T. G. Pomorski (2013). "Isolation of monodisperse nanodisc-reconstituted membrane proteins using free flow electrophoresis." Anal Chem **85**(7): 3497-3500.

Kadner, R. J. (1996). Cytoplasmic membrane.

Karimova, G., N. Dautin and D. Ladant (2005). "Interaction network among Escherichia coli membrane proteins involved in cell division as revealed by bacterial two-hybrid analysis." J Bacteriol **187**(7): 2233-2243.

Kenny, C. H., W. Ding, K. Kelleher, S. Benard, E. G. Dushin, A. G. Sutherland, L. Mosyak, R. Kriz and G. Ellestad (2003). "Development of a fluorescence polarization assay to screen for inhibitors of the FtsZ/ZipA interaction." Anal Biochem **323**(2): 224-233.

Kijac, A. Z., Y. Li, S. G. Sligar and C. M. Rienstra (2007). "Magic-angle spinning solid-state NMR spectroscopy of nanodisc-embedded human CYP3A4." Biochemistry **46**(48): 13696-13703.

Knepp, A. M., T. P. Sakmar and T. Huber (2013). "Homogeneous time-resolved fluorescence assay to probe folded G protein-coupled receptors." Methods Enzymol **522**: 169-189.

Kralicek, A. V., N. A. Vesper, G. B. Ralston, R. G. Wake and G. F. King (1993). "Symmetry and secondary structure of the replication terminator protein of Bacillus subtilis: sedimentation equilibrium and circular dichroic, infrared, and NMR spectroscopic studies." Biochemistry **32**(38): 10216-10223.

Kratky, O., H. Leopold and H. Stabinger (1973). "The determination of the partial specific volume of proteins by the mechanical oscillator technique." Methods Enzymol **27**: 98-110.

Krol, E. and D. J. Scheffers (2013). "FtsZ Polymerization Assays: Simple Protocols and Considerations." J Vis Exp(81).

Kuchibhatla, A., A. Bhattacharya and D. Panda (2011). "ZipA binds to FtsZ with high affinity and enhances the stability of FtsZ protofilaments." PLoS One **6**(12): e28262.

Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.

Laue, T. M. (1992). "Computer-aided interpretation of analytical sedimentation data for proteins. ." Analytical Ultracentrifugation in Biochemistry and Polymer Science: 90-125.

le Maire, M., P. Champeil and J. V. Moller (2000). "Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents." Biochim Biophys Acta **1508**(1-2): 86-111.

Leitz, A., T. Bayburt, A. Barnakov, B. Springer and S. Sligar (2006). "Functional reconstitution of β 2-adrenergic receptors utilizing self-assembling Nanodisc technology." BioTechniques **40**(5): 601-612.

Li, Y., A. Z. Kijac, S. G. Sligar and C. M. Rienstra (2006). "Structural analysis of nanoscale self-assembled discoidal lipid bilayers by solid-state NMR spectroscopy." Biophys J **91**(10): 3819-3828.

Li, Z., M. J. Trimble, Y. V. Brun and G. J. Jensen (2007). "The structure of FtsZ filaments in vivo suggests a force-generating role in cell division." EMBO J **26**(22): 4694-4708.

Loose, M., E. Fischer-Friedrich, C. Herold, K. Kruse and P. Schwille (2011). "Min protein patterns emerge from rapid rebinding and membrane interaction of MinE." Nat Struct Mol Biol **18**(5): 577-583.

Loose, M., K. Kruse and P. Schwille (2011). "Protein self-organization: lessons from the min system." Annu Rev Biophys **40**: 315-336.

López Navajas, P. (2007). Interacción de las proteínas de división celular FtsZ y ZipA de Escherichia coli: caracterización bioquímica, biofísica y estructural., Universidad Complutense de Madrid.

Lowe, J. and L. A. Amos (1998). "Crystal structure of the bacterial cell-division protein FtsZ." Nature **391**(6663): 203-206.

Lu, C., J. Stricker and H. P. Erickson (1998). "FtsZ from Escherichia coli, Azotobacter vinelandii, and Thermotoga maritima--quantitation, GTP hydrolysis, and assembly." Cell Motil Cytoskeleton **40**(1): 71-86.

Ludtke, S. J., P. R. Baldwin and W. Chiu (1999). "EMAN: semiautomated software for high-resolution single-particle reconstructions." J Struct Biol **128**(1): 82-97.

Luthra, A., M. Gregory, Y. V. Grinkova, I. G. Denisov and S. G. Sligar (2013). "Nanodiscs in the studies of membrane-bound cytochrome P450 enzymes." Methods Mol Biol **987**: 115-127.

Lutkenhaus, J. (2007). "Assembly dynamics of the bacterial MinCDE system and spatial regulation of the Z ring." Annu Rev Biochem **76**: 539-562.

- M. Schaechter, J. L. I., F. C. Neidhardt (2006). Microbe. Washington, ASM Press.
- Mahabir, S., D. Small, M. Li, W. Wan, N. Kucerka, K. Littrell, J. Katsaras and M. P. Nieh (2013). "Growth kinetics of lipid-based nanodiscs to unilamellar vesicles-a time-resolved small angle neutron scattering (SANS) study." Biochim Biophys Acta **1828**(3): 1025-1035.
- Maniatis T., F. E. F., Sambrook J. (1982). "Molecular cloning: a laboratory manual." Cold. Spring. Harbour.
- Margolin, W. (2000). "Themes and variations in prokaryotic cell division." FEMS Microbiol Rev **24**(4): 531-548.
- Margolin, W. (2005). "FtsZ and the division of prokaryotic cells and organelles." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(11): 862-871.
- Marin, V. L., T. H. Bayburt, S. G. Sligar and M. Mrksich (2007). "Functional assays of membrane-bound proteins with SAMDI-TOF mass spectrometry." Angew Chem Int Ed Engl **46**(46): 8796-8798.
- Marr, A. G. and J. L. Ingraham (1962). "EFFECT OF TEMPERATURE ON THE COMPOSITION OF FATTY ACIDS IN ESCHERICHIA COLI." J Bacteriol **84**(6): 1260-1267.
- Martos, A., C. Alfonso, P. Lopez-Navajas, R. Ahijado-Guzmn, J. Mingorance, A. P. Minton and G. Rivas (2010). "Characterization of self-association and heteroassociation of bacterial cell division proteins FtsZ and ZipA in solution by composition gradient-static light scattering." Biochemistry **49**(51): 10780-10787.
- Marty, M. T., A. Das and S. G. Sligar (2012). "Ultra-thin layer MALDI mass spectrometry of membrane proteins in nanodiscs." Anal Bioanal Chem **402**(2): 721-729.
- Mi, L. Z., M. J. Grey, N. Nishida, T. Walz, C. Lu and T. A. Springer (2008). "Functional and structural stability of the epidermal growth factor receptor in detergent micelles and phospholipid nanodiscs." Biochemistry **47**(39): 10314-10323.
- Mingorance, J., G. Rivas, M. Velez, P. Gomez-Puertas and M. Vicente (2010). "Strong FtsZ is with the force: mechanisms to constrict bacteria." Trends Microbiol **18**(8): 348-356.
- Mitra, N., Y. Liu, J. Liu, E. Serebryany, V. Mooney, B. T. DeVree, R. K. Sunahara and E. C. Yan (2013). "Calcium-dependent ligand binding and G-protein signaling of family B GPCR parathyroid hormone 1 receptor purified in nanodiscs." ACS Chem Biol **8**(3): 617-625.

Mohammadi, T., G. E. Ploeger, J. Verheul, A. D. Comvalius, A. Martos, C. Alfonso, J. van Marle, G. Rivas and T. den Blaauwen (2009). "The GTPase activity of Escherichia coli FtsZ determines the magnitude of the FtsZ polymer bundling by ZapA in vitro." Biochemistry **48**(46): 11056-11066.

Moller (1986). Progress in Protein-Lipid Interactions 2

Monterroso, B., R. Ahijado-Guzman, B. Reija, C. Alfonso, S. Zorrilla, A. P. Minton and G. Rivas (2012). "Mg(2+)-linked self-assembly of FtsZ in the presence of GTP or a GTP analogue involves the concerted formation of a narrow size distribution of oligomeric species." Biochemistry **51**(22): 4541-4550.

Monterroso, B., C. Alfonso, S. Zorrilla and G. Rivas (2013). "Combined analytical ultracentrifugation, light scattering and fluorescence spectroscopy studies on the functional associations of the bacterial division FtsZ protein." Methods **59**(3): 349-362.

Morrissey, J. H., V. Pureza, R. L. Davis-Harrison, S. G. Sligar, Y. Z. Ohkubo and E. Tajkhorshid (2008). "Blood clotting reactions on nanoscale phospholipid bilayers." Thromb Res **122 Suppl 1**: S23-26.

Mossessova, E. and C. D. Lima (2000). "Ulp1-SUMO crystal structure and genetic analysis reveal conserved interactions and a regulatory element essential for cell growth in yeast." Mol Cell **5**(5): 865-876.

Mosyak, L., Y. Zhang, E. Glasfeld, S. Haney, M. Stahl, J. Seehra and W. S. Somers (2000). "The bacterial cell-division protein ZipA and its interaction with an FtsZ fragment revealed by X-ray crystallography." EMBO J **19**(13): 3179-3191.

Moy, F. J., E. Glasfeld, L. Mosyak and R. Powers (2000). "Solution structure of ZipA, a crucial component of Escherichia coli cell division." Biochemistry **39**(31): 9146-9156.

Mukherjee, A., C. Cao and J. Lutkenhaus (1998). "Inhibition of FtsZ polymerization by SulA, an inhibitor of septation in Escherichia coli." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(6): 2885-2890.

Mukherjee, A., K. Dai and J. Lutkenhaus (1993). "Escherichia coli cell division protein FtsZ is a guanine nucleotide binding protein." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(3): 1053-1057.

Mukherjee, A. and J. Lutkenhaus (1998). "Dynamic assembly of FtsZ regulated by GTP hydrolysis." EMBO J **17**(2): 462-469.

Mukherjee, A. and J. Lutkenhaus (1999). "Analysis of FtsZ assembly by light scattering and determination of the role of divalent metal cations." J Bacteriol **181**(3): 823-832.

Murphy, R. M. (1997). "Static and dynamic light scattering of biological macromolecules: what can we learn?" Curr Opin Biotechnol **8**(1): 25-30.

Naito, H. K. (1975). "Modification of the Fiske and SubbaRow method for total phospholipid in serum." Clin Chem **21**(10): 1454-1456.

Namork, E. and B. V. Johansen (1982). "Surface activation of carbon film supports for biological electron microscopy." Ultramicroscopy **7**(4): 321-329.

Nath, A., W. M. Atkins and S. G. Sligar (2007). "Applications of phospholipid bilayer nanodiscs in the study of membranes and membrane proteins." Biochemistry **46**(8): 2059-2069.

Nath, A., Y. V. Grinkova, S. G. Sligar and W. M. Atkins (2007). "Ligand binding to cytochrome P450 3A4 in phospholipid bilayer nanodiscs: the effect of model membranes." J Biol Chem **282**(39): 28309-28320.

Nath, A., P. K. Koo, E. Rhoades and W. M. Atkins (2008). "Allosteric effects on substrate dissociation from cytochrome P450 3A4 in nanodiscs observed by ensemble and single-molecule fluorescence spectroscopy." J Am Chem Soc **130**(47): 15746-15747.

Nath, A., A. J. Trexler, P. Koo, A. D. Miranker, W. M. Atkins and E. Rhoades (2010). "Single-molecule fluorescence spectroscopy using phospholipid bilayer nanodiscs." Methods Enzymol **472**: 89-117.

Ng, K. K., J. F. Lovell, A. Vedadi, T. Hajian and G. Zheng (2013). "Self-assembled porphyrin nanodiscs with structure-dependent activation for phototherapy and photodiagnostic applications." ACS Nano **7**(4): 3484-3490.

Niu, L. and J. Yu (2008). "Investigating intracellular dynamics of FtsZ cytoskeleton with photoactivation single-molecule tracking." Biophys J **95**(4): 2009-2016.

Nogales, E. (2010). "When cytoskeletal worlds collide." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(46): 19609-19610.

Nogales, E., K. H. Downing, L. A. Amos and J. Lowe (1998). "Tubulin and FtsZ form a distinct family of GTPases." Nat Struct Biol **5**(6): 451-458.

Numata, M., Y. V. Grinkova, J. R. Mitchell, H. W. Chu, S. G. Sligar and D. R. Voelker (2013). "Nanodiscs as a therapeutic delivery agent: inhibition of respiratory syncytial virus infection in the lung." Int J Nanomedicine **8**: 1417-1427.

Ohashi, T., C. A. Hale, P. A. de Boer and H. P. Erickson (2002). "Structural evidence that the P/Q domain of ZipA is an unstructured, flexible tether between the membrane and the C-terminal FtsZ-binding domain." J Bacteriol **184**(15): 4313-4315.

Ohashi, T., C. A. Hale, P. A. J. de Boer and H. P. Erickson (2002). "Structural Evidence that the P/Q Domain of ZipA Is an Unstructured, Flexible Tether between the Membrane and the C-Terminal FtsZ-Binding Domain." Journal of Bacteriology **184**(15): 4313-4315.

Oliva, M. A., S. C. Cordell and J. Lowe (2004). "Structural insights into FtsZ protofilament formation." Nat Struct Mol Biol **11**(12): 1243-1250.

Oliver, D. B. (1996). "Periplasm. In Escherichia Coli and Salmonella." American Society for Microbiology Press **Vol. 1**: pp. 88–104.

Olsen, P. H., N. L. Esmo, C. T. Esmo and T. M. Laue (1992). "Ca²⁺ dependence of the interactions between protein C, thrombin, and the elastase fragment of thrombomodulin. Analysis by ultracentrifugation." Biochemistry **31**(3): 746-754.

Oursel, D., C. Loutelier-Bourhis, N. Orange, S. Chevalier, V. Norris and C. M. Lange (2007). "Lipid composition of membranes of Escherichia coli by liquid chromatography/tandem mass spectrometry using negative electrospray ionization." Rapid Commun Mass Spectrom **21**(11): 1721-1728.

Pacheco-Gomez, R., D. I. Roper, T. R. Dafforn and A. Rodger (2011). "The pH dependence of polymerization and bundling by the essential bacterial cytoskeletal protein FtsZ." PLoS One **6**(6): e19369.

Padrick, S. B., R. K. Deka, J. L. Chuang, R. M. Wynn, D. T. Chuang, M. V. Norgard, M. K. Rosen and C. A. Brautigam (2010). "Determination of protein complex stoichiometry through multisignal sedimentation velocity experiments." Anal Biochem **407**(1): 89-103.

Pandit, K. R. and J. B. Klauda (2012). "Membrane models of E. coli containing cyclic moieties in the aliphatic lipid chain." Biochim Biophys Acta **1818**(5): 1205-1210.

Pazos, M., P. Natale and M. Vicente (2013). "A specific role for the ZipA protein in cell division: stabilization of the FtsZ protein." J Biol Chem **288**(5): 3219-3226.

Phillips, R., T. Ursell, P. Wiggins and P. Sens (2009). "Emerging roles for lipids in shaping membrane-protein function." Nature **459**(7245): 379-385.

Pichoff, S. and J. Lutkenhaus (2005). "Tethering the Z ring to the membrane through a conserved membrane targeting sequence in FtsA." Mol Microbiol **55**(6): 1722-1734.

Pichoff, S., B. Shen, B. Sullivan and J. Lutkenhaus (2012). "FtsA mutants impaired for self-interaction bypass ZipA suggesting a model in which FtsA's self-interaction competes with its ability to recruit downstream division proteins." Mol Microbiol **83**(1): 151-167.

Popp, D., M. Iwasa, A. Narita, H. P. Erickson and Y. Maeda (2009). "FtsZ condensates: an in vitro electron microscopy study." Biopolymers **91**(5): 340-350.

Puthenveetil, R. and O. Vinogradova (2013). "Optimization of the design and preparation of nanoscale phospholipid bilayers for its application to solution NMR." Proteins **81**(7): 1222-1231.

Raschle, T., S. Hiller, T. Y. Yu, A. J. Rice, T. Walz and G. Wagner (2009). "Structural and functional characterization of the integral membrane protein VDAC-1 in lipid bilayer nanodiscs." J Am Chem Soc **131**(49): 17777-17779.

Raskin, D. M. and P. A. de Boer (1999). "Rapid pole-to-pole oscillation of a protein required for directing division to the middle of Escherichia coli." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(9): 4971-4976.

RayChaudhuri, D. (1999). "ZipA is a MAP-Tau homolog and is essential for structural integrity of the cytokinetic FtsZ ring during bacterial cell division." EMBO J **18**(9): 2372-2383.

Reija, B., B. Monterroso, M. Jimenez, M. Vicente, G. Rivas and S. Zorrilla (2011). "Development of a homogeneous fluorescence anisotropy assay to monitor and measure FtsZ assembly in solution." Anal Biochem **418**(1): 89-96.

Reim, D. F. and D. W. Speicher (1994). "A Method for High-Performance Sequence Analysis Using Polyvinylidene Difluoride Membranes with a Biphasic Reaction Column Sequencer." Analytical Biochemistry **216**(1): 213-222.

Rico, A. I., M. Garcia-Ovalle, J. Mingorance and M. Vicente (2004). "Role of two essential domains of Escherichia coli FtsA in localization and progression of the division ring." Mol Microbiol **53**(5): 1359-1371.

Rico, A. I., M. Garcia-Ovalle, P. Palacios, M. Casanova and M. Vicente (2010). "Role of Escherichia coli FtsN protein in the assembly and stability of the cell division ring." Mol Microbiol **76**(3): 760-771.

Ritchie, T. K., Y. V. Grinkova, T. H. Bayburt, I. G. Denisov, J. K. Zolnerciks, W. M. Atkins and S. G. Sligar (2009). "Chapter 11 - Reconstitution of membrane proteins in phospholipid bilayer nanodiscs." Methods Enzymol **464**: 211-231.

Rivas, G., A. Lopez, J. Mingorance, M. J. Ferrandiz, S. Zorrilla, A. P. Minton, M. Vicente and J. M. Andreu (2000). "Magnesium-induced linear self-association of the FtsZ bacterial cell division protein monomer. The primary steps for FtsZ assembly." J Biol Chem **275**(16): 11740-11749.

Romberg, L. and P. A. Levin (2003). "Assembly dynamics of the bacterial cell division protein FtsZ: poised at the edge of stability." Annu Rev Microbiol **57**: 125-154.

Romberg, L., M. Simon and H. P. Erickson (2001). "Polymerization of Ftsz, a bacterial homolog of tubulin. is assembly cooperative?" J Biol Chem **276**(15): 11743-11753.

Rueda, S., M. Vicente and J. Mingorance (2003). "Concentration and assembly of the division ring proteins FtsZ, FtsA, and ZipA during the Escherichia coli cell cycle." J Bacteriol **185**(11): 3344-3351.

Sass, P. and H. Brotz-Oesterhelt (2013). "Bacterial cell division as a target for new antibiotics." Curr Opin Microbiol.

Schagger, H., W. A. Cramer and G. von Jagow (1994). "Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis." Anal Biochem **217**(2): 220-230.

Scheffers, D. J., J. G. de Wit, T. den Blaauwen and A. J. Driessen (2002). "GTP hydrolysis of cell division protein FtsZ: evidence that the active site is formed by the association of monomers." Biochemistry **41**(2): 521-529.

Schuck, P. (2000). "Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and lamm equation modeling." Biophys J **78**(3): 1606-1619.

Schwille, P., F. J. Meyer-Almes and R. Rigler (1997). "Dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy for multicomponent diffusional analysis in solution." Biophys J **72**(4): 1878-1886.

Segrest, J. P., M. K. Jones, A. E. Klön, C. J. Sheldahl, M. Hellinger, H. De Loof and S. C. Harvey (1999). "A detailed molecular belt model for apolipoprotein A-I in discoidal high density lipoprotein." J Biol Chem **274**(45): 31755-31758.

Sen, A. and S. W. Hui (1988). "Direct measurement of headgroup hydration of polar lipids in inverted micelles." Chem Phys Lipids **49**(3): 179-184.

Serebryany, E., G. A. Zhu and E. C. Yan (2012). "Artificial membrane-like environments for in vitro studies of purified G-protein coupled receptors." Biochim Biophys Acta **1818**(2): 225-233.

Shaw, A. W., V. S. Pureza, S. G. Sligar and J. H. Morrissey (2007). "The local phospholipid environment modulates the activation of blood clotting." J Biol Chem **282**(9): 6556-6563.

Shen, H. H., T. Lithgow and L. Martin (2013). "Reconstitution of membrane proteins into model membranes: seeking better ways to retain protein activities." Int J Mol Sci **14**(1): 1589-1607.

Shi, L., Q. T. Shen, A. Kiel, J. Wang, H. W. Wang, T. J. Melia, J. E. Rothman and F. Pincet (2012). "SNARE proteins: one to fuse and three to keep the nascent fusion pore open." Science **335**(6074): 1355-1359.

Singer, S. J. and G. L. Nicolson (1972). "The fluid mosaic model of the structure of cell membranes." Science **175**(4023): 720-731.

Skakun, V. V., M. A. Hink, A. V. Digris, R. Engel, E. G. Novikov, V. V. Apanasovich and A. J. Visser (2005). "Global analysis of fluorescence fluctuation data." Eur Biophys J **34**(4): 323-334.

Skar-Gislinge, N. and L. Arleth (2011). "Small-angle scattering from phospholipid nanodiscs: derivation and refinement of a molecular constrained analytical model form factor." Phys Chem Chem Phys **13**(8): 3161-3170.

Skar-Gislinge, N., J. B. Simonsen, K. Mortensen, R. Feidenhans'l, S. G. Sligar, B. Lindberg Moller, T. Bjornholm and L. Arleth (2010). "Elliptical structure of phospholipid bilayer nanodiscs encapsulated by scaffold proteins: casting the roles of the lipids and the protein." J Am Chem Soc **132**(39): 13713-13722.

Skoog, K. and D. O. Daley (2012). "The Escherichia coli cell division protein ZipA forms homodimers prior to association with FtsZ." Biochemistry **51**(7): 1407-1415.

Springer, C. L., H. P. Huntoon and O. B. Peersen (2013). "Polyprotein context regulates the activity of poliovirus 2CATPase bound to bilayer nanodiscs." J Virol **87**(10): 5994-6004.

Stewart, J. C. (1980). "Colorimetric determination of phospholipids with ammonium ferrothiocyanate." Anal Biochem **104**(1): 10-14.

Stora, T., Z. Dienes, H. Vogel and C. Duschl (2000). "Histidine-Tagged Amphiphiles for the Reversible Formation of Lipid Bilayer Aggregates on Chelator-Functionalized Gold Surfaces." Langmuir **16**(12): 5471-5478.

Stricker, J., P. Maddox, E. D. Salmon and H. P. Erickson (2002). "Rapid assembly dynamics of the Escherichia coli FtsZ-ring demonstrated by fluorescence recovery after photobleaching." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(5): 3171-3175.

Swift, J. L., R. Heuff and D. T. Cramb (2006). "A two-photon excitation fluorescence cross-correlation assay for a model ligand-receptor binding system using quantum dots." Biophys J **90**(4): 1396-1410.

T. J. Stevens, I. T. a. (2000). "Proteins." **39**: 417-420.

Talian, J. C., J. B. Olmsted and R. D. Goldman (1983). "A rapid procedure for preparing fluorescein-labeled specific antibodies from whole antiserum: its use in analyzing cytoskeletal architecture." J Cell Biol **97**(4): 1277-1282.

Tang, G., L. Peng, P. R. Baldwin, D. S. Mann, W. Jiang, I. Rees and S. J. Ludtke (2007). "EMAN2: an extensible image processing suite for electron microscopy." J Struct Biol **157**(1): 38-46.

Tormo, A., A. Dopazo, A. G. de la Campa, M. Aldea and M. Vicente (1985). "Coupling between DNA replication and cell division mediated by the FtsA protein in Escherichia coli: a pathway independent of the SOS response, the "TER" pathway." J Bacteriol **164**(2): 950-953.

Torres, M. Á. M. (2002). Técnicas de detección y análisis de biomoléculas individuales.

Tzitzilonis, C., C. Eichmann, I. Maslennikov, S. Choe and R. Riek (2013). "Detergent/nanodisc screening for high-resolution NMR studies of an integral membrane protein containing a cytoplasmic domain." PLoS One **8**(1): e54378.

Ursinus, A., F. van den Ent, S. Brechtel, M. de Pedro, J. V. Holtje, J. Lowe and W. Vollmer (2004). "Murein (peptidoglycan) binding property of the essential cell division protein FtsN from Escherichia coli." J Bacteriol **186**(20): 6728-6737.

Valpuesta J.M., M.-B. J. (2003). "La microscopía electrónica de transmisión aplicada a la determinación estructural de macromoléculas biológicas." Estructura de proteínas: pp. 357-390.

van Holde, K. E. (1998). "Principles of physical biochemistry."

van Holde, K. E. and K. I. Miller (1985). "Association-dissociation equilibria of Octopus hemocyanin." Biochemistry **24**(17): 4577-4582.

Verschoor, A., J. Frank and M. Boublik (1985). "Investigation of the 50 S ribosomal subunit by electron microscopy and image analysis." J Ultrastruct Res **92**(3): 180-189.

Vicente, M. and A. I. Rico (2006). "The order of the ring: assembly of Escherichia coli cell division components." Mol Microbiol **61**(1): 5-8.

Vicente, M., A. I. Rico, R. Martinez-Arteaga and J. Mingorance (2006). "Septum enlightenment: assembly of bacterial division proteins." J Bacteriol **188**(1): 19-27.

Víctor M. Hernández-Rocamora, C. G.-M., Belén Reija, Begoña and W. M. Monterroso, Carlos Alfonso, Silvia Zorrilla, Germán Rivas (2013). "MinC shortens FtsZ protofilaments by preferentially interacting with GDP-bound subunits."

Weiss, D. S. (2004). "Bacterial cell division and the septal ring." Mol Microbiol **54**(3): 588-597.

White, G. F., K. I. Racher, A. Lipski, F. R. Hallett and J. M. Wood (2000). "Physical properties of liposomes and proteoliposomes prepared from Escherichia coli polar lipids." Biochim Biophys Acta **1468**(1-2): 175-186.

Whorton, M. R., M. P. Bokoch, S. G. Rasmussen, B. Huang, R. N. Zare, B. Kobilka and R. K. Sunahara (2007). "A monomeric G protein-coupled receptor isolated in a high-density lipoprotein particle efficiently activates its G protein." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(18): 7682-7687.

Woldringh, C. L., E. Mulder, P. G. Huls and N. Vischer (1991). "Toporegulation of bacterial division according to the nucleoid occlusion model." Res Microbiol **142**(2-3): 309-320.

Wu, L. J. and J. Errington (2012). "Nucleoid occlusion and bacterial cell division." Nat Rev Microbiol **10**(1): 8-12.

Yang, J. C., F. Van Den Ent, D. Neuhaus, J. Brevier and J. Lowe (2004). "Solution structure and domain architecture of the divisome protein FtsN." Mol Microbiol **52**(3): 651-660.

Ye, F., G. Hu, D. Taylor, B. Ratnikov, A. A. Bobkov, M. A. McLean, S. G. Sligar, K. A. Taylor and M. H. Ginsberg (2010). "Recreation of the terminal events in physiological integrin activation." J Cell Biol **188**(1): 157-173.

Yu, X. C. and W. Margolin (1997). "Ca²⁺-mediated GTP-dependent dynamic assembly of bacterial cell division protein FtsZ into asters and polymer networks in vitro." EMBO J **16**(17): 5455-5463.

Yu, X. C. and W. Margolin (1998). "Inhibition of assembly of bacterial cell division protein FtsZ by the hydrophobic dye 5,5'-bis-(8-anilino-1-naphthalenesulfonate)." J Biol Chem **273**(17): 10216-10222.

Yu, X. C. and W. Margolin (1999). "FtsZ ring clusters in min and partition mutants: role of both the Min system and the nucleoid in regulating FtsZ ring localization." Mol Microbiol **32**(2): 315-326.

Zorrilla, S., A. Ortega, D. Chaix, C. Alfonso, G. Rivas, S. Aymerich, M. P. Lillo, N. Declerck and C. A. Royer (2008). "Characterization of the control catabolite protein of gluconeogenic genes repressor by fluorescence cross-correlation spectroscopy and other biophysical approaches." Biophys J **95**(9): 4403-4415.

