



UNIVERSIDAD DE CHILE

**Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Programa de Doctorado en Bioquímica**

TITULO DEL PROYECTO DE TESIS:

**Efecto de la oxidación mediada por radicales peroxilo sobre la
capacidad polimérica de la proteína FtsZ del termófilo
*Methanocaldococcus jannaschii***

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de
Doctor en Bioquímica por:**

Juan Sebastián Reyes Valenzuela

DIRECTORES DE TESIS

Dr. Octavio Monasterio Opass

Dr. Christian A.M. Wilson

Santiago – Chile 2021

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato:

JUAN SEBASTIÁN REYES VALENZUELA

Ha sido aprobado por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Bioquímica, en el examen de defensa de Tesis en:

Santiago, día _____ de _____, 2021

Directores

Dr. Octavio Monasterio O. _____

Dr. Christian A.M. Wilson M. _____

Comisión

Dra. M^a Cecilia Rojas G. (Pdta.) _____

Dr. Mauricio Báez L. _____

Dr. Nelson Barrera R. _____

Dr. César Ramírez S. _____

**A mis Madres Mercedes y Mary.
A mi Compañera María Fernanda.
A mi Primo Hermano Ignacio.**

“Quod quisque possit, nisi tentando nesciat”
[No se puede saber de lo que cada uno es capaz, sino se pone a prueba]
—Publius Syrus
-Santiago Posteguillo, *Las legiones malditas*

“Siempre acabamos llegando donde nos esperan”
—Libro de los itinerarios
-José Saramago, *El viaje del elefante*

Agradecimientos

Quiero agradecer a mi Madres Mercedes y Mary por su inagotable apoyo. Además, quiero dar gracias a mi compañera de vida María Fernanda que siempre me ha regalado su tiempo y dedicación cada vez que lo necesito, y a mi primo hermano Ignacio que siempre tiene un tiempo para escucharme. Gracias a todos mis compañeros del laboratorio de Biología Estructural y Molecular junto a mis compañeros del laboratorio de Radicales Libres y Proteínas que me siempre que lo necesité me ayudaron a resolver problemas y aclarar muchas ideas. Gracias al Dr. Octavio, al Dr. Christian y al Dr. Camilo que me han dado su apoyo constante en cada paso de este camino. Finalmente, quiero agradecer a la Dr. Jenny por su ayuda durante la realización del Doctorado.

El trabajo experimental de esta tesis de doctorado se realizó gracias al apoyo del **Dr. Octavio Monasterio** en el laboratorio de Biología Estructural y Molecular (BEM), ubicado en la Facultad de Ciencias de la Universidad Chile, además del apoyo del **Dr. Camilo López** en el laboratorio de Radicales Libres y Proteínas, ubicado en la Facultad de Química y de Farmacia de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

Finalmente, se pudo realizar esta tesis gracias a los siguientes financiamientos:

Financiamiento otorgado al Dr. Octavio Monasterio.

- Proyecto FONDECYT 1161232.

Financiamiento otorgado al Dr. Camilo López.

- Proyecto FONDECYT 1180642.

Financiamiento otorgado a Juan Sebastián Reyes.

- Beca facultad, Universidad de Chile (2017-2020).

PUBLICACIONES OBTENIDAS DURANTE EL DESARROLLO DE ESTA TESIS

Reyes, J. S., Fuentes-Lemus, E., Aspée, A., Davies, M. J., Monasterio, O., & López-Alarcón, C. (2021). *M. jannaschii* FtsZ, a key protein in bacterial cell division, is inactivated by peroxy radical-mediated methionine oxidation. *Free Radical Biology and Medicine*, 166, 53-66.

Fuentes-Lemus, E., Mariotti, M., **Reyes, J.S.**, Leinisch, F., Hägglund, P., Silva, E., Davies, M. J & López-Alarcón, C. (2020). Photo-oxidation of lysozyme triggered by riboflavin is O₂-dependent, occurs via mixed type 1 and type 2 pathways, and results in inactivation, site-specific damage and intra-and inter-molecular crosslinks. *Free Radical Biology and Medicine*, 152, 61-73.

Araya, G., Benites, J., **Reyes, J. S.**, Marcoleta, A. E., Valderrama, J. A., Lagos, R., & Monasterio, O. (2019). Inhibition of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* FtsZ polymerization and *Bacillus subtilis* growth by dihydroxynaphthyl aryl ketones. *Frontiers in microbiology*, 10, 1225.

PRESENTACIÓN A CONGRESO NACIONAL

XLII reunión anual de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile (SBBMCh), 2019.

POSTER: Peroxy radical-oxidation of *MjFtsZ* generates protein dimerization and functional changes via oxidation of tryptophan, tyrosine and methionine. **Reyes, Juan S.**, López-Alarcón, Camilo, Monasterio, Octavio.

Índice General

<i>Índice de Figuras</i>	x
<i>Índice de Tablas</i>	xii
<i>Resumen</i>	xiii
<i>Abstract</i>	xv
1. Introducción	1
1.1. Estructura, Función y Regulación de la proteína FtsZ	1
1.1.1. Estructura de la proteína FtsZ.....	1
1.1.2. Función de la proteína FtsZ.....	2
1.1.3. Regulación de la proteína FtsZ.....	5
1.2. Extremófilos	8
1.3. Adaptaciones de las proteínas de los extremófilos a la temperatura... 9	
1.4. Agentes oxidantes y sus efectos en las proteínas	11
1.5. Efecto de la Temperatura y Oxidación sobre FtsZ.....	13
Hipótesis	15
Objetivos.....	15
2. Materiales y métodos	17
2.1. Reactivos.....	17
2.2. Purificación de la proteína <i>MjFtsZ</i>	17
2.3. Oxidación de <i>MjFtsZ</i>	19
2.4. Actividad de polimerización de <i>MjFtsZ</i>	19
2.5. Estudios de espectroscopia de dicroísmo circular	20
2.6. Estudios SDS-PAGE.	21
2.7. Consumo de monómeros <i>MjFtsZ</i> determinado por exclusión de tamaño cromatografía (SEC).....	21

2.8. Estudios de fluorescencia	22
2.9. Análisis del consumo de aminoácidos por HPLC con detección de fluorescencia de la derivatización en precolumna.....	23
2.10. Análisis de los productos de oxidación, derivados de Tyr y Trp de <i>MjFtsZ</i> , por HPLC con detección de fluorescencia (HPLC-FL)	25
2.11. Análisis por espectrometría de masas de productos de oxidación ..	26
2.11.1. Análisis de productos de oxidación de Tyr y Trp en muestras <i>MjFtsZ</i> sometidas a hidrólisis ácida (MSA).	26
2.11.2. Análisis de productos de oxidación de Tyr, Trp y Met en muestras de <i>MjFtsZ</i> sometidas a hidrólisis triptica.	28
2.12. Estudios por electro-transferencia de proteínas a membranas de difluoruro de polivinilideno e inmunorevelado de la formación de di-Tyr y nuevos grupos carbonilos	30
2.13. Evaluación de los grupos carbonilo totales	32
2.14. Oxidación de <i>MjFtsZ</i> mediada por cloramina T.	33
2.15. Análisis estadístico	33
3. Resultados.....	35
3.1. Caracterización de la proteína <i>MjFtsZ</i>	35
3.1.1. Purificación y caracterización de la proteína <i>MjFtsZ</i>	35
3.2. Oxidación de <i>MjFtsZ</i> por radicales ROO• derivados de AAPH.....	36
3.2.1 Actividad polimérica de <i>MjFtsZ</i>	36
3.2.2 Modificaciones estructurales en <i>MjFtsZ</i> inducidas por ROO• derivados de AAPH	41
3.2.3. Consumo de aminoácidos de <i>MjFtsZ</i> por ROO• derivados de AAPH	48
3.2.4. Caracterización de la generación de los productos de oxidación producidos por la oxidación de <i>MjFtsZ</i> por ROO• derivados de AAPH	53
3.2.4.1. Cuantificación de Metioninsulfoxido (MetSO).....	54
3.2.4.2. Caracterización de los productos de oxidación de Tyr.....	56
3.2.4.3. Caracterización de los productos de oxidación de Trp.....	57

3.2.4.4. Formación de grupos carbonilos durante la oxidación de <i>MjFtsZ</i> inducida por ROO• derivados de AAPH.....	63
3.3. Oxidación de <i>MjFtsZ</i> con cloramina T.....	67
3.4. Análisis por UPLC-MS de oxidación de Tyr, Trp y Met en péptidos liberados de la hidrólisis triptica de <i>MjFtsZ</i>	72
4. Discusión	75
5. Resumen de resultados y conclusiones	88
6. Proyecciones.....	89
7. Referencias	91

Índice Figuras

1. Introducción

Figura 1.1. Estructura terciaria de la proteína FtsZ de *M. jannaschii*. 4

3. Resultados

Figura 3.1: Purificación y caracterización de *MjFtsZ*. 37

Figura 3.2: Los radicales libres derivados de AAPH afectan la actividad polimérica de *MjFtsZ* 38

Figura 3.3: Los radicales libres derivados de AAPH no modifican la estructura secundaria de *MjFtsZ*. 43

Figura 3.4: SDS-PAGE de cinética de oxidación de *MjFtsZ* por ROO• derivados de AAPH. 44

Figura 3.5: Análisis densitométrico de los geles de SDS-PAGE de la cinética de oxidación *MjFtsZ* por ROO• derivados de AAPH 45

Figura 3.6: Oxidación de *MjFtsZ* mediada por ROO• derivados de AAPH 47

Figura 3.7: Cuantificación del consumo de aminoácidos de *MjFtsZ* por ROO• derivados de AAPH. 51

Figura 3.8: Apagamiento de Trp provocado por radicales peroxilos derivados de AAPH. 52

Figura 3.9: Cuantificación de la generación de Metioninsulfoxido (MetSO) por la oxidación de *MjFtsZ* por radicales derivados de AAPH. 55

Figura 3.10: Detección de los productos de oxidación derivados de Tyr, L-DOPA y di-Tyr generados por la oxidación de *MjFtsZ* por radicales derivados de AAPH. 58

Figura 3.11: Detección de los productos de oxidación derivados de Trp, generados por la oxidación de *MjFtsZ* por radicales derivados de AAPH 61

Figura 3.12: Western Blot de la cinética de generación de carbonilos por la oxidación de *MjFtsZ* por radicales peroxilos derivados de AAPH 65

Figura 3.13: Formación de grupos carbonilos de <i>MjFtsZ</i> por la oxidación por radicales peroxilos derivados de AAPH	66
Figura 3.14: La cloramina T afecta la actividad de polimerización de <i>MjFtsZ</i> , induce el consumo de Met y la formación de MetSO	70
Figura 3.15: Cuantificación del consumo de aminoácidos de <i>MjFtsZ</i> por la acción de cloramina T.....	71
Figura 3.16. Los radicales libres derivados de AAPH inducen modificaciones específicas en los residuos de <i>MjFtsZ</i>	74

4. Discusión

Figura 4.1. Localización de Tyr, Trp y Met en estructuras cristalinas de monómero y dímero de <i>MjFtsZ</i>	78
---	----

Índice Tablas

3.Resultados

Tabla 1. Modificación de aminoácidos en <i>MjFtsZ</i> por ROO• derivados de AAPH.....	50
---	----

Resumen

La oxidación e inactivación de FtsZ es de interés biológico debido al papel clave de esta proteína en la división celular bacteriana. Caracterizamos la oxidación mediada por radicales peroxilo derivados de AAPH (diclorhidrato de 2,2'-azobis(2-metilpropionamida)) de la proteína FtsZ del termófilo *M. jannaschii* (*MjFtsZ*). La proteína *MjFtsZ* posee once residuos de Met, un residuo de Tyr y un residuo de Trp que son susceptibles a la oxidación por radicales peroxilo. Este microorganismo es capaz de replicarse en un ecosistema que posee altas cantidades de agentes oxidantes. Por lo que, nuestra hipótesis es que la proteína FtsZ de este microorganismo termófilo posee una mayor estabilidad frente a radicales peroxilo ($\text{ROO}\bullet$) que la proteína FtsZ de las bacterias mesófilas. La incubación de *MjFtsZ* con AAPH (a una concentración de 10 o 100 mM) a 37 °C durante 3 horas provocaron: La pérdida de la actividad polimérica, afectando el perfil de polimerización/despolimerización, que se evaluó mediante dispersión de luz; además produjo niveles bajos de dímeros covalentes irreversibles, que se analizaron mediante SDS-PAGE y SEC. El consumo de aminoácidos se cuantificó mediante HPLC con detección de fluorescencia o fluorescencia directa (para el residuo de Trp). Los productos de oxidación y las

modificaciones en los residuos de Met individuales se cuantificaron mediante UPLC con detector de masas. Con AAPH 10 mM solo se consumieron Trp y Met dando di-alcoholes, quinurenina y di-Trp (de Trp) y el sulfóxido (de Met). En presencia de AAPH 100 mM también se observaron niveles bajos de oxidación de Tyr (pero no formación de di-Tyr). La correlación con los análisis funcionales indica que la oxidación de Met, y en particular Met164, es el factor clave de la inactivación de *MjFtsZ*, probablemente como resultado de la posición de este residuo en la interfaz proteína-proteína de interacciones longitudinales y muy cerca del sitio de unión de GTP.

Abstract

The oxidation and inactivation of FtsZ is of interest due to the key role of this protein in bacterial cell division. We characterized the oxidation, mediated by peroxy radicals (ROO•) derived from AAPH (2,2'-azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride), of the FtsZ protein of the thermophile *M. jannaschii* (*MjFtsZ*). The *MjFtsZ* protein has eleven Met residues, a single Tyr residue and Trp residue that are susceptible to oxidation by ROO•. This microorganism is capable of replicating itself in an ecosystem that has high amounts of oxidizing agents. Therefore, our hypothesis is that the FtsZ protein of this thermophilic microorganism has greater stability against ROO• than the FtsZ protein of mesophilic bacteria. The incubation of *MjFtsZ* with AAPH (at 10 or 100 mM) at 37 °C for 3 hours caused: The loss of polymeric activity, affecting the polymerization/depolymerization profile, which was evaluated by light scattering; it also produced low levels of irreversible covalent dimers, which were analyzed by SDS-PAGE and SEC. Amino acid consumption was quantified by HPLC with fluorescence detection or direct fluorescence (for Trp residues). The oxidation products and the modifications at individual Met residues were quantified by UPLC with mass detection. With 10 mM AAPH

only Trp and Met were consumed giving di-alcohols, quinurenine and di-Trp (from Trp) and the sulfoxide (from Met). In the presence of 100 mM AAPH low levels of Tyr oxidation (but no di-Tyr formation) were also observed. Correlation of these results with the functional analyzes indicates that the oxidation of Met, in particular Met164, is the key factor in the inactivation of *MjFtsZ*. This probably resulting from the location of this residue in the protein-protein interface of longitudinal interactions and very close to the GTP binding site.

1. Introducción

La citoquinesis es la última fase de la mitosis en donde se produce la separación de las células hijas. En este proceso participan una variedad de proteínas que permiten la división celular. En las bacterias, el Divisoma es un complejo multiproteico que participa en la citoquinesis y tiene la función de invaginar la membrana celular y sintetizar peptidoglican (PG) en el sitio de división (Du & Lutkenhaus, 2017; Lutkenhaus y cols., 2012). El Divisoma se ensambla sobre una estructura del citoesqueleto bacteriano llamado Anillo-Z (Du & Lutkenhaus, 2019). Dicho anillo, es el resultado de la estabilización de una sub-estructura denominada proto-anillo, el cual está compuesto por las proteínas FtsA y ZipA, junto con polímeros de una única proteína llamada FtsZ (Schumacher y cols., 2017; Vicente y Rico, 2006).

1.1. Estructura, función y regulación de la proteína FtsZ.

1.1.1. Estructura de la proteína FtsZ.

La proteína FtsZ tiene una masa molecular de 40,2 kDa, su estructura molecular se determinó al cristalizar la proteína FtsZ de la arquea termófila *Methanocaldococcus jannaschii* – previamente llamada *Methanococcus jannaschii* – (Löwe y Amos, 1998) (Figura 1.1). El extremo N-terminal

(NTD) de su estructura está compuesto por 5 α -hélices que se ordenan por una topología tipo plegamiento Rossmann (Löwe y Amos, 1998; Díaz-Espinoza y cols., 2007). Estas hélices dan origen a un sitio de unión del nucleótido de GTP o GDP (Erickson y cols., 2010) (Figura 1.1, Color Azul). Por otra parte, el extremo C-terminal (CTD) puede subdividirse en una región conservada (CTC) y una región variable (CTV). En bacterias, dentro de esta zona existe una secuencia de entre 8 a 15 aminoácidos la cual es necesaria para interactuar con otras proteínas que participan en su función celular (Schumacher y cols., 2017; Buske y Levin, 2012; Huecas y cols., 2017).

1.1.2. Función de la proteína FtsZ.

FtsZ es un homólogo ancestral de las tubulinas, y al igual que estas últimas, la proteína FtsZ es una GTPasa capaz de polimerizar de manera GTP dependiente (Erickson 1997; Buddelmeijer y Beckwith, 2002). Esta proteína es un monómero que *in vitro* tiene unido un nucleótido de GDP (FtsZ_{GDP}). El intercambio de GDP por una molécula de GTP (FtsZ_{GTP}) promueve la interacción entre estos monómeros FtsZ_{GTP}, lo que provoca la polimerización de esta proteína formando largos filamentos lineales (Krupka y Margolin, 2018). La interacción entre los monómeros FtsZ_{GTP} en el filamento permite el acercamiento de un residuo de aspartato del monómero n-1 a la molécula

de GTP, lo que provoca la hidrólisis de este nucleótido (Sossong y cols. 1999; Scheffers y cols., 2002; Erickson y cols., 2010). La hidrólisis de GTP a GDP genera una curvatura en los filamentos de FtsZ que luego se desestabilizan librando al citoplasma monómeros FtsZ_{GDP} (Erickson y cols., 2010). Estos procesos de despolimerización y polimerización ocurren paralelamente provocando un recambio de los monómeros de FtsZ en el mismo filamento (Krupka y Margolin, 2018).

En una célula bacteriana en división, una vez duplicado su material genético y polarizados sus nucléolos se comienzan a acumular filamentos de FtsZ, que marcan el sitio de división. Esta acumulación de filamentos se produce por la interacción con proteínas accesorias, que en *E. coli* corresponde a las proteínas ZipA y FtsA, que anclan los filamentos de FtsZ a la cara interna de la membrana citoplasmática, conformando el proto-anillo (Vicente y Rico, 2006; Rico y cols., 2013). La completa estabilización de los componentes del proto-anillo en la membrana provoca la formación del Anillo-Z, que delimita finalmente el sitio en donde se producirá la división celular (Buddelmeijer & Beckwith, 2002; Szwedziak y cols., 2014).

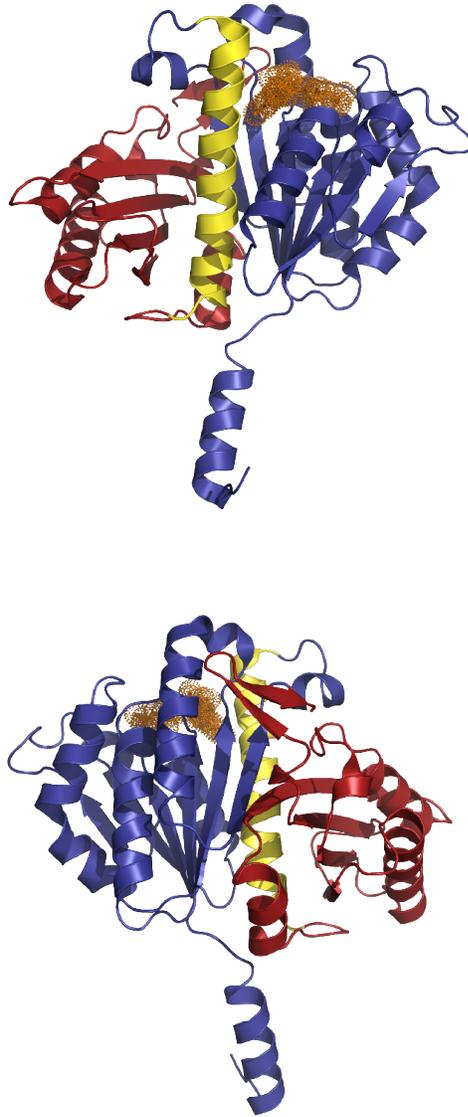


Figura 1.1. Estructura terciaria de la proteína FtsZ de *M. jannaschii*.

Representación de la estructura de la proteína *MjFtsZ* (PDB ID:2VAP). El extremo N-terminal, que posee un plegamiento tipo Rossmann está destacado en Azul, en amarillo se muestra la hélice central H7 y en rojo se muestra el extremo C-Terminal. En anaranjado se muestra una molécula de GDP en el sitio de unión a nucleótido.

El Anillo-Z es el andamio para la conformación del complejo multiproteico llamado Divisoma, este complejo se encarga de la síntesis de nuevo PG en el sitio de división (Du & Lutkenhaus, 2017). Todas las proteínas que conforman este complejo se van reclutando en un orden específico sobre el Anillo-Z (den Blaauwen y cols., 2014; Du & Lutkenhaus, 2017). El Anillo-Z participa activamente en la síntesis de PG a través del fenómeno de *Treadmilling* (Yang y cols., 2017). Este fenómeno se describe como un movimiento del Divisoma sobre el Anillo-Z debido al recambio de monómeros en el filamento. Este movimiento ayuda a direccionar la síntesis del nuevo PG (Bisson-Filho y cols., 2017). La acción combinada de la síntesis de PG junto a la acción de la curvatura en los filamentos, provocada por la hidrólisis de GTP, lleva a la formación de un septo que define el sitio de división lo que lleva finalmente a la separación de las 2 células hijas concluyendo la división celular (Hurley y cols., 2016). Debido a la importancia del mecanismo de polimerización de la proteína FtsZ, este proceso está estrictamente regulado.

1.1.3. Regulación de la proteína FtsZ.

La polimerización de FtsZ tiene una fuerte regulación tanto espacial como temporal, esto debido a que las condiciones intracelulares son muy favorables

para la formación de filamentos de FtsZ (Harry, 2001). En *E. coli*, la proteína FtsZ posee una concentración intracelular cercana a los 10 μM (Lu y cols., 1998). Esta concentración es muy superior a la concentración crítica de polimerización de FtsZ $\sim 1\mu\text{M}$ (Concha-Marambio y cols., 2017). Además, la concentración intracelular de GTP es lo suficientemente alta para inducir la formación de filamentos por el intercambio del nucleótido en los monómeros de FtsZ_{GDP} (Hurley y cols., 2016; Bennett y cols., 2009). Esta regulación está dada por diferentes sistemas que impiden la interacción entre monómeros de FtsZ o la estabilización de los filamentos (Harry, 2001). El sistema Min, que en *E. coli* se compone de las proteínas; MinC, MinD y MinE, se encarga de la regulación espacial (Lutkenhaus, 2007). Las proteínas del sistema Min impiden la acumulación de FtsZ en los polos, permitiendo que FtsZ solamente conformen los filamentos en el centro de célula. Las proteínas Min C y Min D son capaces de formar un heterodímero llamado MinCD. Este dímero es capaz de interactuar con la cara interna de la membrana plasmática además de monómeros de FtsZ. Esta interacción arresta a la proteína FtsZ, lo que a su vez le impide que interactúe con otros monómeros de FtsZ. El complejo MinCD oscila de un extremo al otro de la célula, impidiendo que FtsZ se acumule en los extremos y solamente se formen filamentos en el

medio de la célula (Lutkenhaus, 2007). Un desequilibrio en la regulación de la formación de filamentos de FtsZ por el sistema Min provoca la formación de mini células, debido a que el Anillo-Z se ensambla en cualquier sitio de la célula (Lutkenhaus, 2007).

La regulación temporal del Anillo-Z está dada por el sistema de oclusión del nucleóide (NO) (Schumacher y Zeng, 2016). Este sistema, que en *E. coli* está compuesto por una única proteína: SlmA, inhibe el ensamblaje del Anillo-Z hasta que se haya completado la duplicación del material genético (Woldringh, 2002; Schumacher y Zeng, 2016). La proteína SlmA es capaz de unirse al ADN en secuencias específicas de unión para SlmA (SBSs). Esta interacción ADN-SlmA induce que esta última se una al extremo CTD de la proteína FtsZ (Schumacher y Zeng, 2016). La interacción ADN-SlmA-FtsZ, impide la formación de filamentos de FtsZ, mientras no se complete la replicación del DNA (Schumacher y Zeng, 2016). Errores en la regulación temporal de la formación del Anillo-Z, hacen que la célula se divida sin haber completado la replicación de su genoma o provoca que el Anillo-Z guillotine a los cromosomas no polarizados (Du y Lutkenhaus, 2014).

El mecanismo descrito, en donde la proteína FtsZ participa en la división celular mediante la formación del Anillo-Z, es muy conservado y casi la totalidad de las bacterias y gran parte de las arqueas, sin importar su nicho ecológico, poseen esta proteína (Bernander y Ettema, 2010). Debido a que la función de FtsZ es muy conservada, es de interés determinar cuales son las adaptaciones que tiene esta proteína en los microorganismos que son capaces de dividirse en condiciones extremas.

1.2. Extremófilos.

Desde una visión antropocéntrica, clasificamos a todos los microorganismos que son capaces de reproducirse en condiciones letales para la humanidad como extremófilos (Hendry, 2006). Aunque existe una amplia clasificación de este tipo de organismos, los extremófilos se agrupan según las características de sus ecosistemas (Robbins y Konhauser, 2020). Los microorganismos termófilos e hipertermófilos son capaces de reproducirse a temperaturas superiores a 40 °C o incluso en temperaturas de hasta sobre los 100 °C (Kashefi y Lovely, 2003). Los microorganismos psicrófilos, son capaces de crecer a temperaturas inferiores a 15 °C, incluidas temperaturas bajo los 0 °C como en el mar antártico (Kohshima, 1984; Pikuta y cols.,

2008). Los microorganismos acidófilos y alcalófilos, son capaces de vivir a pH ácido y básico, respectivamente (Edwards y cols., 2000; Takai y cols., 2001). Mientras que los microorganismos barófilos que se reproducen en ambientes con presiones que alcanzan incluso los 80 MPa (Kato y cols., 1998). Por otra parte, el hábitat de los microorganismos halófilos se caracteriza por altas concentraciones de sales, incluso sobre los 2 M (Bowers y Wiegel, 2011). Finalmente, los microorganismos que se adaptaron a vivir a temperaturas cercanas a las condiciones normales de presión y temperatura (~25 °C y 1 atm de presión) se denominan mesófilos (Robbins y Konhauser, 2020). En las células, las proteínas son el efector final de cada proceso biológico y en todos los microorganismos extremófilos mencionados, sus proteínas están constantemente expuestas a las características de su ecosistema, por lo que han desarrollado una serie de adaptaciones estructurales que le permiten mantener su función.

1.3. Adaptación de las proteínas de los extremófilos a la Temperatura.

Las proteínas de los microorganismos termófilos e hipertermófilos, han desarrollado una mayor compactación de sus grupos hidrofóbicos en el interior de la estructura, mayor número de puentes de hidrógeno y puentes

disulfuros, mayor cantidad de enlaces salinos junto a *loops* más cortos en su superficie (Vogt y cols., 1997; Argos y cols., 2002). Aparentemente, tanto la integridad de los aminoácidos como la formación del núcleo hidrofóbico tras el plegamiento de las proteínas son esenciales para la viabilidad (Carpenter y cols., 1993; Timasheff, 1993).

La adaptación de las proteínas en microorganismos psicrófilos incluye: una menor cantidad de puentes salinos en el interior de la estructura; un aumento en las cadenas laterales hidrófobas expuestas a solventes; una disminución de los residuos hidrófobos en el núcleo; una disminución de las interacciones aromático-aromáticas; un aumento de glicinas (Gly); menor cantidad de prolina (Pro) en sus *loops*; menor cantidad de sitios de unión a metales o una menor afinidad por la unión de estos; una menor cantidad de puentes disulfuros; y finalmente una menor interacción de sus residuos aromáticos (Siddiqui y Cavicchioli, 2006). Todo esto se traduce en una mayor flexibilidad en su estructura, que permite la modificación de la cinética de las enzimas lo que mantiene las velocidades de reacción adecuadas en estos ecosistemas extremos (Siddiqui y Cavicchioli, 2006, Piette, y cols., 2011). Muchos estudios indican que solo se necesitan modificaciones estructurales menores para cambiar la estabilidad intrínseca de las enzimas psicrófilas, y

que la flexibilidad local en lugar de la global puede jugar un papel importante (Siddiqui y Cavicchioli 2006). Estos ambientes de temperatura extrema, también se caracterizan por estar expuestos a altas cantidades de agentes oxidantes, que pueden afectar el normal funcionamiento celular.

1.4. Agentes oxidantes y sus efectos en las proteínas.

Los agentes oxidantes afectan el metabolismo de los microorganismos al alterar la funcionalidad de lípidos, nucleótidos y proteínas. Estos agentes oxidantes pueden ser especies radicalarias como no radicalarias y dañan a estas macromoléculas por diferentes mecanismos (Davies, 2016). Estos agentes oxidantes pueden ser especies reactivas (RS) como exposiciones a radiación. El efecto principal sobre las proteínas es la abstracción de un electrón desde la macromolécula, extrayéndolo directamente o a través de un átomo de hidrógeno, generándose un radical secundario en la proteína. Este radical puede generar productos de oxidación que alteran la estructura de la proteína o participar en reacciones radicalarias secundarias (Davies, 2016).

El radical peroxilo ($\text{ROO}\cdot$) es un tipo de RS, en particular una especie reactiva de oxígeno (ROS) y afecta a las proteínas selectivamente en los residuos triptófano (Trp), tirosina (Tyr), metionina (Met) y cisteína (Cys)

(Davies, 2016). La oxidación de Met da como resultado principalmente un sulfóxido (Metioninasulfóxido [MetSO]) (Schöneich, 2005). La oxidación de Met puede alterar la estructura y función de las proteínas (Hawkins y Davies, 2005), mientras que, en algunos casos, se ha sugerido que la oxidación de este residuo actúa como un proceso protector (Levine y cols., 2000). La abstracción de un átomo de hidrógeno de los residuos de Tyr y Trp da como resultado la formación de radicales tirosilo (Tyr•) y triptofanilo (Trp•), respectivamente. Estas especies pueden reaccionar con O₂ ($k < 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para Tyr • (Houée-Lévin y cols., 2015) y $k \leq 4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para Trp• (Candeias y cols., 1997)) lo que produce radicales peroxilo que posteriormente llevan a la formación productos de oxidación como hidroperóxidos, alcoholes y grupos carbonilo (Davies, 2016; Candeias y cols., 1997). Una vez oxidados, los radicales Trp• y Tyr• pueden participar en reacciones de término con otro radical generando un dímero entre estos residuos. En las proteínas se han descrito la formación de dímeros de Tyr (di-Tyr, $k \approx 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Candeias y cols., 1997)), dímeros de Trp (di-Trp, $k \approx 2-6 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Carroll y cols., 2017)) e incluso la generación de un dímero Trp-Tyr (Leinisch y cols., 2017). Estas modificaciones pueden ser intramolecular o intermolecular provocando la dimerización de monómeros de proteína (Annibal y cols., 2016; Leinisch

y cols., 2017; Fuentes-Lemus y cols., 2021) que conducen a cambios estructurales y funcionales irreversibles que pueden afectar el metabolismo celular (Cabisco y cols., 2000; Davies, 2016). Debido a que la citoquinesis es un proceso esencial para la supervivencia, la caracterización del efecto de la temperatura y los agentes oxidantes sobre la proteína FtsZ, es clave para entender las adaptaciones de los extremófilos a sus ecosistemas.

1.5. Efecto de la Temperatura y Oxidación sobre FtsZ.

Se describió el efecto de la temperatura mediante experimentos de dispersión de luz (*light scattering*; LS) sobre la actividad polimérica de la proteína FtsZ del organismo mesófilo *Escherichia coli* (*EcFtsZ*) (Concha-Marambio y cols., 2017). La adición de GTP provoca un inmediato aumento en la intensidad de LS producto de la formación de polímeros de FtsZ, sin embargo, el máximo de LS es dependiente de la temperatura (Concha-Marambio y cols., 2017). *EcFtsZ* es capaz de polimerizar desde los 10 °C hasta los 30 °C con una actividad GTPasa remanente por encima y debajo de este rango de temperaturas.

Escobar-Álvarez y cols. (2017) describieron el efecto de la oxidación inducida por radicales peroxilo derivados de 2,2-azobis-2-amidinopropane

(AAPH) sobre la proteína *EcFtsZ*. El AAPH es una fuente de radicales peroxilo (ROO•), que tiene la ventaja de generar estos radicales a una tasa constante por varias horas (Niki, 1990; López-Alarcón y cols., 2020). La incubación de *EcFtsZ* con AAPH (10 y 100 mM) provoca la oxidación de los residuos Met y Tyr. Esta oxidación afecta notablemente la actividad polimérica y provoca la generación de MetSO en la proteína junto con la generación de nuevos grupos carbonilos. Además, la oxidación de *EcFtsZ* induce la generación de dímeros y agregados de mayor peso molecular mediante enlaces covalentes di-Tyr (Escobar-Álvarez y cols., 2017).

M. jannaschii es un microorganismo termófilo que fue aislado de una chimenea submarina a 2.600 metros de profundidad (Jones y cols. 1983). Este microorganismo es capaz de replicarse a temperaturas de hasta 90 °C, y también tiene una alta tolerancia a las radiaciones ionizantes (Beblo y cols., 2011). En atmósferas anaeróbicas, su metabolismo implica la producción de radicales libres, así como la reducción de CO₂ a CH₄ (Zhu y cols., 2004; Hiscox y cols., 2012; Susanti y cols., 2019). Concha-Marambio y cols. (2017), también describieron el efecto de la temperatura sobre la polimerización de la proteína FtsZ del termófilo *M. jannaschii* (*MjFtsZ*) por experimentos de LS. *MjFtsZ* tiene el mismo comportamiento que posee

EcFtsZ, pero a temperaturas muy superiores (desde los 40 °C a los 80 °C), con una actividad catalítica remanente fuera de este rango de temperaturas. La proteína *MjFtsZ* carece de residuos Cys libres, posee once Met, pero sólo tiene un residuo de Tyr y de Trp. El bajo número de Tyr y Trp puede surgir de la presión evolutiva para eliminar residuos susceptibles de oxidarse en este termófilo, y se podría postular que los niveles relativamente altos de Met están presentes para proporcionar protección ante oxidantes. Por lo tanto, estudios utilizando como modelo la proteína *FtsZ*, la cual posee una función extremadamente conservada, permitirán determinar si existe una mayor resistencia a la oxidación de las proteínas de organismos extremófilos, en comparación con un organismo mesófilo que no está expuesto a condiciones tan drásticas como los primeros.

Por lo que se planteó la siguiente *hipótesis*:

La modificación oxidativa de los residuos de Trp y Tyr de la proteína *MjFtsZ* por la acción de ROO•, llevará a la inactivación de la capacidad polimérica de esta proteína, debido a la generación de dímeros o agregados covalentes de alto peso molecular.

Con los siguientes objetivos.

Objetivo general

Determinar el efecto de la oxidación mediada por ROO• sobre la proteína FtsZ del termófilo M. jannaschii (MjFtsZ) y la relación del daño con la oxidación de aminoácidos y la funcionalidad de la proteína.

Objetivos específicos.

- Determinar el efecto de ROO• sobre la actividad polimérica de *MjFtsZ*.
- Estudiar el efecto de ROO• sobre la estructura secundaria de la proteína *MjFtsZ*.
- Determinar el grado de oxidación de los residuos aminoacídicos de la proteína *MjFtsZ* inducido por ROO•

2. Materiales y métodos

2.1. Reactivos

Los reactivos: Diclorhidrato de 2,2'-azobis(2-metilpropionamida) (AAPH), ácido tricloroacético (TCA), 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), ácido metanosulfónico (MSA), triptamina, o-ftalldialdehído (OPA), sales de fosfato de sodio (Na_2HPO_4 y NaH_2PO_4), cloruro de sodio, cloruro de potasio, perclorato de potasio, persulfato de sodio, Trizma base, hidróxido de sodio, MES, cloruro de magnesio, cloruro de calcio, GTP, GTP- γ -S, glicina (Gly), Acetato de sodio, metanol, tetrahidrofurano, ácido fosfórico, ácido fórmico, clorhidrato de guanidinio, TCA, HCl, DTT, yodoacetamida, glicerol, etanol, Imidazol, acetato de etilo, docecil-sulfato de sodio (SDS), el sulfóxido de Met (MetSO), los estándares de aminoácidos, cloramina T y acrilamida, 2-mercaptoetanol fueron adquiridos desde Sigma Aldrich o Merck. Coomassie coloidal se adquirió de BioRad.

2.2. Purificación de la proteína MjFtsZ.

La proteína MjFtsZ se expresó y purificó de la célula de *E. coli* C41 siguiendo el protocolo descrito previamente por Concha y cols. (2017). Se sembró *E. coli* C41-MjFtsZ en 4 L de medio Luria Broth (LB) suplementado con

ampicilina (10 g/L de Triptona, 5 g/L de Extracto de Levadura, 10 g/L de NaCl, ampicilina 50 μ M/mL) y se incubaron a 37 °C en agitación constante. Se midió periódicamente la OD_{600nm} del cultivo hasta que alcanzó un valor de \sim 0,5. En ese momento se le añadió IPTG a una concentración final de 1 mM y se incubó a 37 °C con agitación constante por 5 horas. Luego se recolectaron las bacterias centrifugándolas en botellas de 250 mL a 5000 \times g por 10 minutos y el *pellet* bacteriano se guardó a -80 °C. El *pellet* se suspendió en *buffer* A (Tris-HCl 50 mM pH 8,0; KCl 300 mM, glicerol 10 %) y se suplementó con inhibidores de proteasas. Luego, la suspensión celular se lisó mediante sonicación y se centrifugó a 20.000 \times g a 4 °C durante 1,5 horas. El sobrenadante se ajustó a 5 mM de imidazol y luego se cargó en una columna de afinidad de Ni-Sepharose (GE Healthcare, Piscataway, NJ). La elución se llevó a cabo con un flujo de 1 mL/minuto utilizando una gradiente lineal de 5 mM a 1 M de imidazol a 4 °C siguiendo la absorbancia a 280 nm del frente de migración. La proteína *MjFtsZ* eluyó a \sim 500 mM de imidazol. Las fracciones de proteína purificadas se dializaron en a *buffer* A frío durante 18 horas. La proteína se cuantificó mediante el Kit de ensayo de proteínas BCA Pierce™ (ThermoFisher) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Finamente, la proteína purificada y cuantificada se almacenó a -80 °C hasta su uso.

2.3. Oxidación de MjFtsZ.

75 μ M de MjFtsZ (en *buffer* fosfato 75 mM, pH 7,4) se incubaron en ausencia y presencia de AAPH 10 o 100 mM a 37 °C durante 3 horas. Cada 30 minutos las soluciones se burbujearon con aire durante 30 s para evitar el agotamiento de O₂, y se tomaron alícuotas de 150 μ L. Para eliminar el exceso de AAPH de cada muestra se utilizó un filtro de corte de 10 kDa (Amicon, Merk). Las muestras (150 μ L) se diluyeron (1:10) con *buffer* fosfato (75 mM, pH 7,4) y se centrifugaron durante 4 ciclos para dar el mismo volumen inicial. Las muestras resultantes (sin AAPH) se utilizaron posteriormente para evaluar la integridad estructural (mediante SDS-PAGE, dicróismo circular y fluorescencia), la actividad de polimerización, los cambios en la composición de aminoácidos y la formación de productos de oxidación.

2.4. Actividad de polimerización de MjFtsZ

La capacidad de polimerización de las proteínas oxidadas y no oxidadas se evaluó siguiendo los cambios en la intensidad de la dispersión de luz (*Light scattering*, LS) (Concha-Marambio y cols., 2017). Las muestras de MjFtsZ

(75 μM) control (no oxidadas) y obtenidas de la cinética de oxidación a tiempos definidos de incubación (0, 1, 2 y 3 horas) en presencia de 10 y 100 mM de AAPH, se diluyeron, en razón de 1:10, a una concentración final de proteína de 7 μM usando *buffer* de polimerización (MES 50 mM pH 6,5; KCl 300 mM; MgCl_2 5 mM). Las soluciones resultantes se incubaron a 65 °C durante 10 minutos, después de lo cual se midió el LS basal durante 1,5 minutos. La polimerización se inició añadiendo GTP o un análogo no hidrolizable (GTP- γ -S, ambos con una concentración final 1 mM). Los perfiles cinéticos de LS se controlaron midiendo en un ángulo de 90° y con una λ_{ex} y λ_{em} a 350 nm (empleando una cubeta de fluorescencia de 200 μL) en un soporte termo-estabilizado (65 °C) de un espectrofluorímetro Perkin Elmer LS-55 (Beaconsfield, Reino Unido).

2.5. Estudios de espectroscopia de dicroísmo circular

Se incubaron alícuotas de *MjFtsZ* (75 μM) en ausencia y presencia de AAPH 10 o 100 mM durante 3 horas, luego se diluyeron en *buffer* fosfato 75 mM, pH 7,4; para dar una concentración final de proteína de 7 μM . Se utilizaron 300 μL de cada muestra para obtener los espectros de dicroísmo circular (CD) resultantes del promedio de barrido, entre 210 y 260 nm, de tres muestras

independientes, (Jasco, J-1500 Circular Dichroism Spectrophotometer). Los espectros se registraron en un espectropolarímetro Jasco 660 utilizando celdas de 1 mm de longitud de trayectoria, con una velocidad de exploración de 20 nm/minutos y filtros de ancho de banda de 1 nm.

2.6. Estudios SDS-PAGE

Las muestras de *MjFtsZ* (75 μ M) incubadas en ausencia y presencia de AAPH 10 o 100 mM durante 3 horas, se trataron como se indica en la sección 2.2. Las muestras (20 μ L) se mezclaron con 7 μ L de *buffer* de carga 4X y se calentaron a 95 °C durante 5 minutos. Todas las muestras se cargaron en geles de poliacrilamida (gel concentrador al 4%, resolutive al 12%). El gel cargado se corrió a corriente constante (50 mA) durante 1 hora, usando *buffer* de corrida (Tris 25 mM, Gly 400 mM, SDS al 0,1%, pH 8,3). Los geles se tiñeron con Coomassie coloidal. El análisis densitométrico de geles SDS-PAGE se realizó utilizando el software ImageJ.

2.7. Consumo de monómeros de MjFtsZ determinado Cromatografía por exclusión de tamaño (SEC)

Alícuotas de *MjFtsZ* (75 μ M) control (no oxidadas) y oxidadas (expuestas a 10 o 100 mM de AAPH durante 3 horas a 37 °C), se diluyeron 5 veces en una

solución que contenía: *buffer* fosfato de sodio 100 mM pH 7,4; Cloruro de sodio 150 mM y 0,1% p/v de SDS. A continuación, las muestras se calentaron a 95 °C durante 10 minutos y se transfirieron a viales de HPLC. Las muestras desnaturalizadas se separaron utilizando una columna Phenomenex, BioSep™ SEC-s3000 (5 µm, 290 Å, 300 Å~ 7.8 mm, Phenomenex, Torrance, CA, EUA), mantenida a 40 °C, en un HPLC Agilent serie 1200, equipado con un *multisampler* Agilent serie 1260 Infinity II (ajustado a 25 °C), acoplado a un detector de arreglo de diodos (serie Agilent 1200). La separación cromatográfica se logró utilizando una fase móvil isocrática que contenía *buffer* fosfato de sodio 100 mM pH 7,4; Cloruro de sodio 150 mM y 0,1% p/v de SDS, fijando un flujo de 0,8 mL/minutos. La absorbancia se controló a 220 nm. El análisis de los datos se realizó con el software OpenLAB (Santa Clara, CA, EUA).

2.8. Estudios de fluorescencia

La disminución de la fluorescencia intrínseca del único residuo Trp de *MjFtsZ* inducido por ROO•, se evaluó mediante espectroscopia de fluorescencia. Se incubó *MjFtsZ* (75 µM) a 37 °C con AAPH (10 o 100 mM) en *buffer* fosfato (75 mM, pH 7,4). La emisión de fluorescencia se registró

continuamente a 360 nm (λ_{ex} 295 nm) empleando un espectrofluorímetro Perkin Elmer LS-55 (Beaconsfield, Reino Unido).

2.9. Análisis del consumo de aminoácidos por HPLC con detección de fluorescencia de la derivatización en precolumna.

La cuantificación de aminoácidos se realizó por HPLC de la derivatización con o-ftaldialdehído (OPA). Las muestras de *MjFtsZ* control (no oxidadas) y oxidadas por 3 horas de incubación con 10 y 100 mM de AAPH, se sometieron a hidrólisis ácida usando ácido metanosulfónico (MSA). Los aminoácidos liberados se derivatizaron con OPA antes del análisis por HPLC (Escobar-Álvarez y cols., 2017). 200 μL de las muestras de *MjFtsZ* preparadas como se describió anteriormente, se transfirieron a viales de vidrio y se precipitaron mediante la adición de 50 μL de TCA al 50% p/v. Las muestras se centrifugaron a 9000 x g 4 °C y los *pellets* de proteína resultante se lavaron dos veces con acetona fría y se secaron usando una corriente de N_2 . Luego, cada *pellet* se suspendió en 150 μL de una solución de MSA 4 M con triptamina al 0,2% p/v. Los viales se transfirieron al sistema Pico-Tag y se eliminó el O_2 del ambiente usando 3 ciclos repetidos de Vacío- N_2 (5 minutos de vacío, 30 segundos de N_2). Luego, las muestras al

vacío se incubaron a 110 °C durante 18 horas. Las muestras ya frías se neutralizaron mediante la adición de 150 µL de NaOH 4 M y las soluciones se filtraron a través de filtros Pall Nanosep de 0,2 µm (Merck). Las soluciones resultantes se diluyeron 20 veces con agua ultrapura (Milli-Q) y se transfirieron a viales de HPLC colocados en un *multisampler*, Agilent 1260 serie Infinity II, ajustado a 8 °C. Las muestras se separaron utilizando un HPLC Agilent serie 1200, junto con un detector de fluorescencia (Agilent serie 1260). Para la derivatización de los aminoácidos libres, el reactivo OPA se activó inmediatamente antes de su uso mediante la adición de 5 µL de 2-mercaptoetanol a 1 mL de reactivo OPA no activo. En el *multisampler* se agregaron 20 µL de reactivo OPA activado a 40 µL de muestras hidrolizadas de *MjFtsZ* y se inyectaron 20 µL de la solución resultante en una columna de fase reversa (Hibar® 250 x 4.3 mm RP-18 cerrada [tamaño de partícula 5 µm] Phurospher® STAR; Millipore) mantenida a 40 °C. Las muestras se eluyeron usando un gradiente de *buffer* A (acetato de sodio 50 mM pH 5,3; 20% metanol; 2,5% tetrahidrofurano [THF]) y *buffer* B (acetato de sodio 50 mM pH 5,3; 80 % metanol; 2,5% THF) con un flujo de 0,8 mL/minutos. El *buffer* A comenzó al 100% y disminuyó al 80% durante los primeros 5 minutos. El *buffer* A disminuyó al 40% en los siguientes 15 minutos,

alcanzando finalmente el 5% durante 25 minutos. Esto se mantuvo durante 10 minutos. Posteriormente, el *buffer* A se devolvió al 100% durante 1 minuto, con la columna luego equilibrada durante 4 minutos. Las especies eluidas se detectaron por fluorescencia (λ_{ex} 340 nm y λ_{em} 440 nm). El análisis de los datos se llevó a cabo con el software OpenLab (Santa Clara, CA). La cuantificación se determinó a partir del área bajo la curva de los picos cromatográficos correspondientes, utilizando curvas de calibración construidas utilizando estándares comerciales de aminoácidos y de MetSO.

2.10. Análisis de los productos de oxidación, derivados de Tyr y Trp de MjFtsZ, por HPLC con detección de fluorescencia (HPLC-FL)

El análisis de los productos de oxidación relacionados con Tyr y Trp producidos en muestras de MjFtsZ se llevó a cabo mediante HPLC-FL, como se describió anteriormente (Hawkins y cols., 2009). 40 μL de las muestras hidrolizadas y neutralizadas (como se describió en la sección 2.8) se diluyeron en una razón 1:5 con agua ultrapura (Milli-Q). Las muestras diluidas se transfirieron a viales de HPLC y se mantuvieron a 8 °C en un dispositivo *multisampler*, Agilent 1260 serie Infinity II. Se inyectaron alícuotas de 30 μL en una columna de fase reversa (descrita en la sección 2.8)

y se eluyeron usando un gradiente de *buffer* A (perclorato de sodio 100 mM; ácido fosfórico 10 mM) y *buffer* B (Metanol al 80%) con un flujo de 0,8 mL/minutos. La cromatografía de separación se llevó a cabo usando un HPLC Agilent serie 1200. Los productos de oxidación se monitorizaron utilizando un detector de fluorescencia parametrizado con valores de λ_{ex} y λ_{em} específicos para cada producto de oxidación; 3,4-dihidroxifenilalanina (*DOPA*): λ_{ex} 280 nm, λ_{em} 320 nm; *di-Tyr*: λ_{ex} 280 nm, λ_{em} 410 nm; y quinurenina (*Kyn*) + N-formilquinurenina (*NFK*): λ_{ex} 370 nm, λ_{em} 510 nm. El análisis de los datos se realizó con el software OpenLAB (Santa Clara, CA, EUA). La identificación de especies específicas se determinó por comparación con los estándares comerciales que se utilizaron para construir curvas de calibración.

2.11 Análisis por espectrometría de masas de productos de oxidación.

2.11.1 Análisis de productos de oxidación de Tyr y Trp en muestras MjFtsZ sometidas a hidrólisis ácida (MSA).

Las muestras de *MjFtsZ*, incubadas en ausencia y presencia de AAPH (10 o 100 mM) durante 3 horas a 37 °C se hidrolizaron como se describió anteriormente (sección 2.8), luego se analizaron usando un sistema de

cromatografía líquida de ultra alta resolución (UPLC) Ekspert ABSciex 4500 acoplado a un triple cuadrupolo detector (Triple Quad™). Se inyectaron 20 µL de muestras en una columna de fase inversa (como se describe en la sección 2.9) mantenida a 40 °C. La separación cromatográfica se realizó usando un gradiente de *buffer* A (ácido fórmico al 0,1% en agua) y *buffer* B (50:50 metanol: agua que contenía ácido fórmico al 1%) a un flujo de 0,8 mL/minutos. El *buffer* A se mantuvo al 100% durante los primeros 2 minutos, antes de disminuir al 20% durante los siguientes 25 minutos. Posteriormente, el *buffer* A se devolvió al 100% durante 35 minutos con una fase de equilibrado adicional de 5 minutos. La detección de masas se llevó a cabo en un modo de polaridad positiva empleando un método de exploración de adquisición dependiente de datos (DDA). El período de adquisición fue de 45 minutos con una tolerancia de masa de 250,0 mDa, y se empleó una exploración de resolución mejorada para confirmar el estado de carga y/o el patrón de isótopos. No se emplearon sustracciones dinámicas de fondo ni energía de colisión rodante. Además, se usó Monitoreo de Reacciones Seleccionadas (*Selective Reaction Monitoring*; SRM) con polaridad positiva y empleando un sistema Turbo Spray™ como fuente de iones (ionización por electropulverización), para recolectar los Q₁ y Q₃ de los productos de

oxidación relacionados con Tyr y Trp. Los espectros de MS² se recopilaron utilizando un tamaño de paso de 0,1 Da de iones originales seleccionados, con un rango de exploración de MS² de 50 a 1000 Da. La energía de colisión y los potenciales de desagrupamiento fueron de 15 y 56 V, respectivamente. Se utilizó N₂ como gas nebulizador, la temperatura dentro de la cámara de nebulización se fijó en 600 °C. El modo SRM se estableció para examinar las siguientes transiciones: 197 → 151 para DOPA; 361 → 315 para di-Tyr; 237 → 118 para NFK; 237 → 146 para di-alcoholes derivados de Trp; para Kyn 209 → 94; y 407 → 203 para di-Trp. Cabe señalar que la transición 237 → 118 es común para los di-alcoholes derivados de Trp, Kyn y NFK, pero cada derivado tiene un tiempo de retención diferente.

2.11.2. Análisis de productos de oxidación de Tyr, Trp y Met en muestras de MjFtsZ sometidas a hidrólisis triptica.

20 µg de muestras de proteína control y oxidadas fueron secados a 30 °C, al vacío. Luego, las muestras se disolvieron en 20 µL de urea (8 M) en Tris-HCl 50 mM pH 8,0. Se agregaron 2 µL de ditioneitol (DTT, 460 mM) a cada muestra y se incubaron a 21 °C durante 1 hora. Luego se añadió 4 µL de yodoacetamida 500 mM y las muestras se incubaron a 21 °C durante 1 hora

en la oscuridad. A continuación, se añadieron a las muestras 74 μL de bicarbonato de amonio 50 mM y 4 μL de 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de tripsina, seguido de incubación durante la noche a 37 °C. A continuación, los péptidos se sometieron a extracción en fase sólida StageTip en discos de fase inversa Empore C18 activados (3 M, St. Paul, MN), y las muestras se eluyeron utilizando 50 μL de ácido trifluoroacético al 0,1% en acetonitrilo al 60%. A continuación, se secaron los eluyentes (concentrador Speedvac TM, 60 minutos) y las muestras se suspendieron en 50 μl de ácido fórmico al 0,1 % en agua ultrapura. Las muestras se analizaron en un espectrómetro de masas Impact II ESI-QTOF (Bruker Daltonics) en el modo de iones positivos conectado en línea a un sistema de cromatografía Dionex Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific). Los analitos se separaron utilizando una columna MabPac de 150 mm x 150 μm de columna (Thermo Fisher Scientific) a 60 °C con un caudal de 10 $\mu\text{L}/\text{minuto}$ mediante elución en gradiente utilizando *buffer* A (0,1% ácido fórmico) y *buffer* B (80% acetonitrilo; 0,1% ácido fórmico). La aguja de electropulverización se mantuvo a 4500 V, con un desplazamiento de la placa terminal de 500 V y una temperatura de 200 °C. Se utilizó gas nitrógeno tanto para el nebulizador (0,7 bar) como para el gas seco (6,0 L/minutos). Las exploraciones de precursores de MS¹

(150-2200 m/z) fueron seguidas por la fragmentación MS² dependiente de los datos de los tres precursores más intensos con frecuencias de muestreo de 2 Hz. Los análisis y la cuantificación de MS se llevaron a cabo a nivel de MS¹. El análisis de datos se realizó utilizando MaxQuant (versión 1.6.1.0) con restricciones tríplicas semi-específicas y una tasa de falso positivo de nivel de péptido del 1%. Se usó carbamidometil de cisteína como una modificación fija y los cambios en Met, Tyr y Trp se usaron como modificaciones variables. Para Met, se seleccionaron $m/z +16$ (sulfóxido) y $m/z +32$ (sulfona) como una modificación variable. Para Trp, las modificaciones variables utilizadas fueron $m/z +4$ (Kyn), $m/z +14$ (formación de carbonilo), $m/z +16$ (adición de un solo átomo de oxígeno) y $m/z +32$ (adición de 2 átomos de oxígeno). Para Tyr, $m/z +16$ (DOPA) fue la modificación de variable utilizada. El porcentaje (%) de modificación en un sitio particular se estimó basándose en la cuantificación sin marcaje de las proporciones del área total de MS¹ de los péptidos modificados o no modificados correspondientes, según se determinó utilizando el software Bruker QuantAnalysis.

2.12. Estudios por electro-transferencia de proteínas a membranas de difluoruro de polivinilideno e inmunorevelado de la formación de di-Tyr y nuevos grupos carbonilos.

Para di-Tyr, se cargaron 20 μ L de muestras de *MjFtsZ* (controles y soluciones tratadas con AAPH) en el gel de poliacrilamida como se describe en la sección 2.5. Para la detección de grupos carbonilo, antes de cargar los geles de poliacrilamida, se mezclaron muestras de *MjFtsZ* (30 μ L) con 45 μ L de solución (1 X) 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) y se incubaron durante 15 minutos, a 21 °C. Después de la electroforesis, las proteínas se transfirieron a membranas de difluoruro de polivinilideno Hybond®-P (PVDF) usando un Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad). Para di-Tyr, la membrana de PVDF se incubó con un anticuerpo anti-di-Tyr monoclonal primario (Abcam, [ab243067], dilución 1:2.000) e IgG H&L anti-ratón de cabra policlonal secundaria conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP, Abcam, [ab205719], dilución 1:10.000). Para los grupos carbonilo, la membrana de PVDF se incubó con un anticuerpo policlonal contra 2,4-dinitrofenilhidrazona como se describe en las instrucciones del *kit*: “*Oxybolt™ Protein Oxidation Detection Kit*” (MERK). Las membranas de PVDF se revelaron utilizando un sustrato de transferencia Western Pierce™ ECL (ThermoFisher Scientific) como se describe en las instrucciones del fabricante.

2.13. Evaluación de los grupos carbonilo totales.

Las concentraciones totales de carbonilo se determinaron mediante un ensayo colorimétrico basado en la derivatización de carbonilos con DNPH y la determinación de la absorbancia de los productos de hidrazona (Hawkins y cols., 2009). Se mezclaron 250 μL de DNPH 10 mM con 250 μL de muestras de *MjFtsZ* (75 μM) control y obtenidas cada 30 minutos durante la cinética de incubación con AAPH (10 o 100 mM). La mezcla se incubó durante 20 minutos, como describen Hawkins y cols., (2009). Luego, las proteínas se precipitaron mediante la adición de 125 μL de TCA (50% p/v) y se centrifugaron a 14000 x g a temperatura ambiente durante 15 minutos. Los *pellets* resultantes se lavaron con una mezcla fría de etanol/acetato de etilo (1: 1) y se volvieron a centrifugar a 14000 x g a temperatura ambiente durante 15 minutos, repitiéndose este proceso tres veces. A continuación, los *pellets* se solubilizaron añadiendo 200 μl de clorhidrato de guanidinio 6 M y se transfirieron a una placa de 96 pocillos. La absorbancia se midió a 370 nm y la concentración total del aducto de carbonil-DNPH se calculó usando un $\epsilon = 22.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Hawkins y cols., 2009).

2.14. Oxidación de *MjFtsZ* mediada por cloramina T

Se incubó *MjFtsZ* (75 μ M) con cloramina T: 0,1; 1 y 10 mM en *buffer* Tris-HCl 50 mM, pH 7,4 a 25 °C por 20 minutos. Luego se eliminó la cloramina T mediante cromatografía de exclusión por tamaño (poliacrilamida P-100, BioRad) y se analizó la actividad de polimerización-despolimerización de las muestras de *MjFtsZ* mediante LS (350 nm). El consumo de aminoácidos se cuantificó mediante el ensayo HPLC-OPA, como se describe en la sección 2.8. En el caso de Trp, su consumo se evaluó siguiendo el espectro de fluorescencia (λ_{ex} 295 nm, λ_{em} 310 - 500 nm) de las muestras de *MjFtsZ* libres de cloramina T.

2.15. Análisis estadístico

Todos los datos se procesaron usando el software GraphPad versión 8.0 y se expresan como la media de al menos tres experimentos independientes, cada uno medido por triplicado. En el caso del consumo de aminoácidos (Figura 4 y Tabla 1), los datos de producción de grupos carbonilo (Figura 5C) y determinación de MetSO (Figura 4) se presentan como la media \pm desviación estándar (DE). Los datos de consumo de aminoácidos se analizaron

estadísticamente utilizando una prueba ANOVA de una vía con la prueba post-hoc de Holm-Šídák. Se asumió la significancia en el nivel $p < 0,05$.

3. Resultados

3.1. Caracterización de la proteína MjFtsZ.

3.1.1. Purificación y caracterización de la proteína MjFtsZ.

El lisado bacteriano que contenía la proteína sintetizada se cargó en una columna de afinidad según lo descrito por Concha y cols. (2017). La proteína se eluyó de la columna utilizando un gradiente de imizadol. A todas las diferentes fracciones obtenidas de la columna de purificación se les midió la absorbancia a 280 nm (Abs_{280}). Las fracciones que tuvieron una señal sobre el blanco se juntaron y dializaron para eliminar el imidazol. Se determinó una concentración final de 12 mg/mL luego de la diálisis. La integridad de la proteína purificada se evaluó mediante SDS-PAGE. En el gel de poliacrilamida se cargó una alícuota del lisado bacteriano antes de pasar por la columna; una alícuota del frente de migración que no fue retenido por la columna y una alícuota de la proteína una vez dializada. En el gel se observa una banda principal con una masa molecular cercana a los 40 kDa (Figura 3.1.A; carril 3, flecha negra). Para corroborar si esta proteína purificada correspondía a la proteína *MjFtsZ*, se evaluó los cambios en la dispersión de luz (*Light Scattering*; LS) debido a la actividad polimérica por la adición de

GTP (Concha-Marambio y cols., 2017). En ausencia de GTP, no se produjo cambios en LS. La adición de GTP generó un aumento inmediato de la dispersión provocado por la formación de polímeros de *MjFtsZ* (Figura 3.1.B).

*3.2. Oxidación de *MjFtsZ* por ROO• derivados de AAPH*

*3.2.1 Actividad polimérica de *MjFtsZ*.*

A alícuotas de *MjFtsZ* no oxidada (control) y oxidada por 1, 2 y 3 horas de exposición a AAPH (10 o 100 mM) se determinaron los cambios de LS provocados por la adición de 1 mM de GTP (Figura 3.2). Como se describió anteriormente, solamente la adición de GTP indujo un rápido aumento en LS en las muestras Control. La oxidación de *MjFtsZ* inducida por AAPH 10 mM provocó una disminución del máximo de dispersión luego de añadir GTP a la solución. La oxidación por 1, 2 y 3 horas provocó una disminución de 14, 70 y 82 % del máximo de la intensidad de LS (Figura 3.2.A; línea azul, verde, roja, respectivamente).

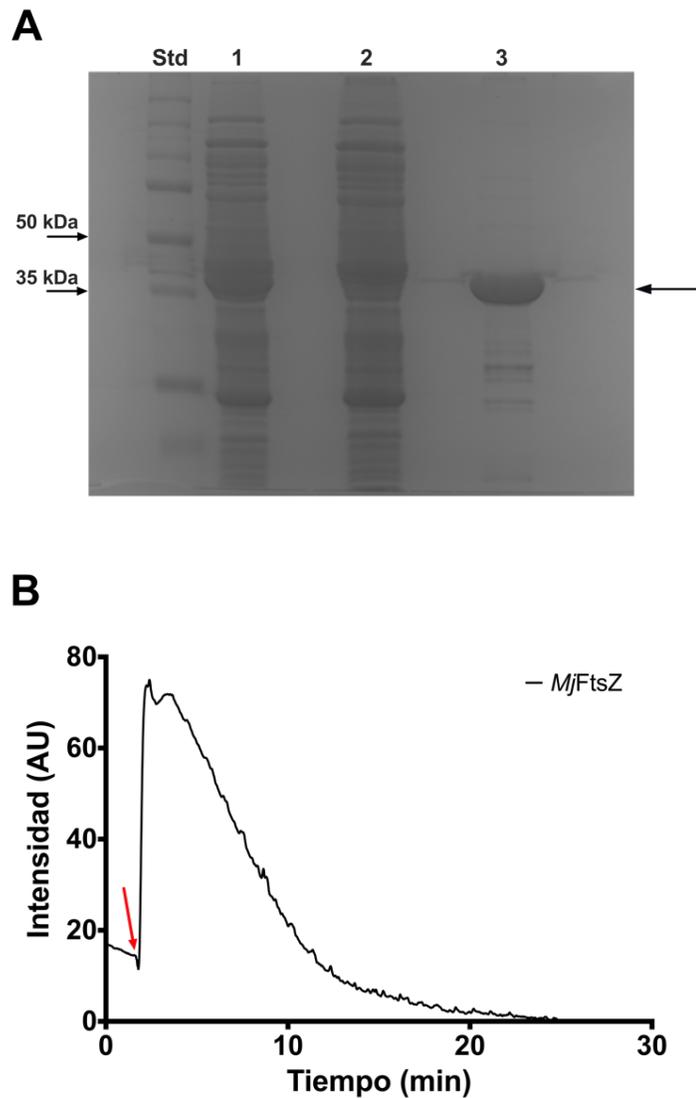


Figura 3.1: Purificación y caracterización de *MjFtsZ*.

Panel A. Purificación mediante una columna de afinidad (Ni^{+2}). La flecha de la derecha indica la proteína de 40 kDa que corresponde a *MjFtsZ*. Carriles; Std, Estándar de masa molecular; Carril 1, lisado bacteriano antes de pasar por la columna; Carril 2, lisado bacteriano luego de pasar por la columna, Carril 3, fracciones eluidas a partir del gradiente de imidazol. 5 μL de cada solución se cargó en cada carril. **Panel B.** 7 μM de *MjFtsZ* se incubó a 65° C por 10 minutos. Se midió la dispersión de luz provocada por la formación de polímeros de *MjFtsZ* inducido por la adición de 1 mM de GTP (Flecha roja). La dispersión se siguió a 350 nm (λ_{ex} 350 nm).

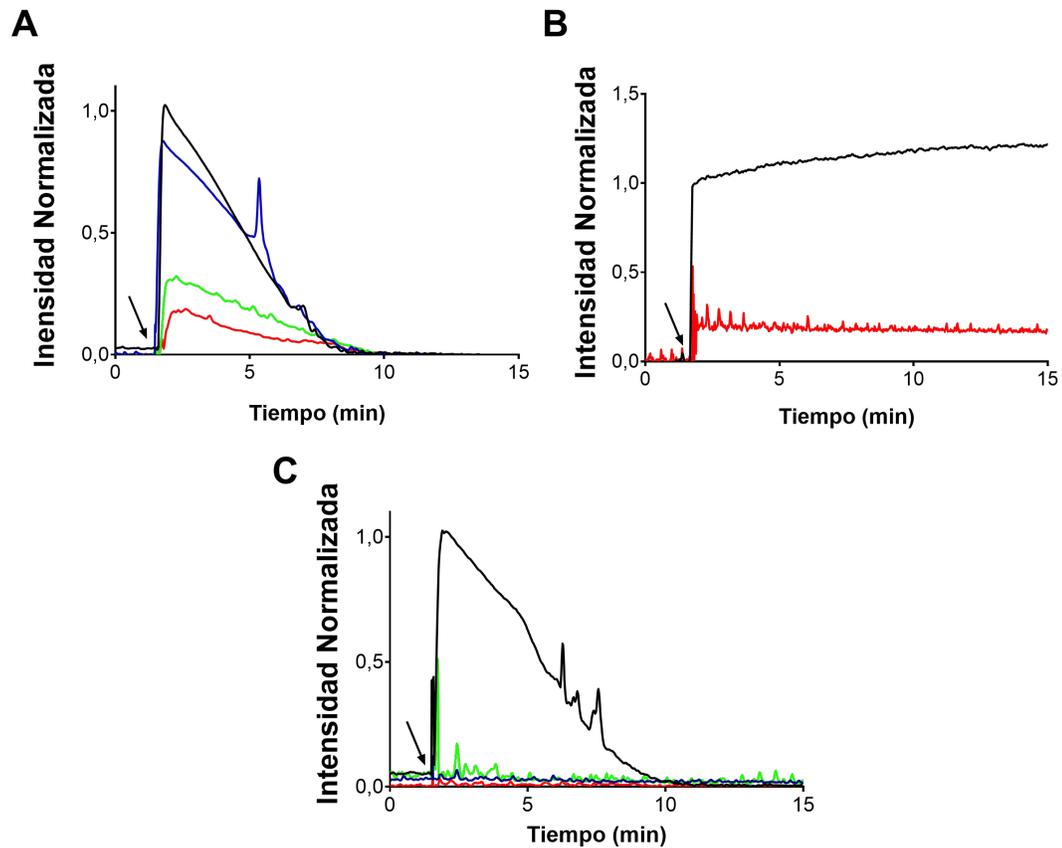


Figura 3.2: Los radicales libres derivados de AAPH afectan la actividad polimérica de *MjFtsZ*.

MjFtsZ (7 μ M) incubada a 37 °C en ausencia (Control, Curvas negras) y presencia de AAPH 10 mM y 100 mM durante 3 horas. **Panel A:** LS (unidades normalizadas) de la actividad polimérica de *MjFtsZ* evaluadas con GTP hidrolizable, para muestras incubadas con 10 mM de AAPH durante 1 (azul), 2 (verde) y 3 (roja) horas. **Panel B:** LS (unidades normalizadas) de la actividad polimérica de *MjFtsZ* evaluadas con GTP no hidrolizable (GTP- γ -S), para muestras incubadas con 10 mM de AAPH durante 3 horas (roja). **Panel C:** LS (unidades normalizadas) de la actividad polimérica de *MjFtsZ* con GTP hidrolizable, para muestras incubadas con 100 mM de AAPH durante 1 (azul), 2 (verde) y 3 (roja) horas. Las muestras se incubaron por 10 minutos a 65 °C antes de medir el LS basal a 350 nm. Las flechas negras indican el momento en que se agregó GTP.

Estos resultados permiten realizar un análisis considerando el siguiente modelo utilizando una reacción para la elongación de los filamentos de FtsZ:



En donde: $FtsZ_m$ es la proteína en estado monomérico, filamento_{i-1} es un filamento en cualquier estado de polimerización, filamento_i es el filamento elongado en un monómero.

El máximo de LS está relacionado con el largo y la cantidad del filamento_n . En estas condiciones con un exceso de GTP, la extensión y la cantidad del filamento_n depende estrictamente de la cantidad de $FtsZ_m$ disponible. Esto nos sugiere que la pérdida del máximo de LS ocasionado por la oxidación del monómero por $\text{ROO}\cdot$ (Figura 3.2.A), se debe a que $MjFtsZ$ se está inactivando o que su cinética de despolimerización cambió y afecta el estado estacionario de los filamentos.

Por lo que para evaluar si existe alguna contribución de la despolimerización en la pérdida de LS, equiparamos el fenómeno de polimerización y despolimerización de FtsZ en presencia de GTP a lo que ocurre con la polimerización de microtúbulos (Haga y cols.,1974), mediante la siguiente relación:

$$-dm/dt = f_n(k_1m - k_2) \quad (2)$$

En donde: m es la concentración de monómeros de FtsZ_{GTP}, f_n es el número de filamentos, k_1 y k_2 son las constantes de velocidad de polimerización y despolimerización, respectivamente. Además, se considera que durante la polimerización GTP es saturante respecto al monómero de FtsZ y k_1 es una constante de pseudo primer orden que considera la concentración de GTP como constante ($k_1 = k_o [GTP]$). La ecuación (2) no considera el fenómeno de nucleación.

A partir de la ecuación (2), podemos interpretar que solamente un aumento de la velocidad de despolimerización (k_2) producirá una disminución del máximo de LS debido a que no permitirá que se acumulen o que se elonguen los filamentos de FtsZ por el aumento de la hidrólisis del GTP. Así, la disminución del máximo de LS provocado por la oxidación de *MjFtsZ* (Figura 3.2), se puede explicar por la disminución de la concentración de monómeros capaces de polimerizar y por lo tanto también el número de filamentos. Esto finalmente produce la disminución de la velocidad de polimerización y de despolimerización luego de la hidrólisis de GTP. Por lo tanto, para determinar si había cambios en la velocidad de hidrólisis de GTP

que podría inducir estos cambios de LS, se utilizó el análogo no hidrolizable de GTP (GTP- γ -S). Éste último permite la estabilización de los polímeros de *MjFtsZ* atrapando a los monómeros en el filamento. La adición de GTP- γ -S indujo un aumento inmediato de LS, al igual que GTP, pero al contrario de este último, se mantuvo la señal de máxima dispersión (Figura 3.2.B; línea negra). La adición de GTP- γ -S a la proteína *MjFtsZ* oxidada por 3 horas con 10 mM de AAPH, indujo un aumento mucho menor de intensidad máxima (~20 % del valor del control) (Figura 3.2.B; línea roja), confirmando que la disminución de la velocidad de polimerización se debe a la disminución de la concentración de monómero en conformación nativa de FtsZ y como se esperaba, que la despolimerización es inducida por la presencia de GDP, luego de la hidrólisis de GTP, en el sitio del unión al nucleótido. Finalmente, la oxidación a una concentración inicial de 100 mM de AAPH, inactivó por completo la proteína (Figura 3.2.C).

*3.2.2 Modificaciones estructurales en *MjFtsZ* inducidas por ROO• derivados de AAPH.*

Para determinar si la inactivación de la polimerización de *MjFtsZ* se debe a cambios en la estructura secundaria del monómero se evaluó su contenido

por dicroísmo circular. Se determinó la elipticidad molar de proteínas expuestas a AAPH. La oxidación por ROO• no provocó cambios significativos de la señal de elipticidad molar, en comparación al control. Es decir, al exponer a la proteína a 10 y 100 mM de AAPH por 3 horas se registraron espectros similares a las muestras control (Figura 3.3).

Se ha descrito que la oxidación mediada por ROO• deriva en procesos que llevan a cambios en la masa molecular de proteínas (Annibal y cols., 2016; Leinisch y cols., 2017 Fuentes-Lemus y cols., 2021). Para evaluar el efecto de la oxidación inducida por ROO• sobre el monómero de la proteína *MjFtsZ*, se incubó la proteína con AAPH (10 y 100 mM) a 37 °C por un tiempo máximo de 3 horas. Cada media hora se tomó una alícuota para evaluar el efecto de la oxidación sobre la proteína. A cada alícuota se eliminó el AAPH, y se cargaron 60 µg en un gel de poliacrilamida. En el análisis de la proteína incubada en ausencia de AAPH solo se detectó una banda principal con una masa molecular de ~40 kDa, que corresponde a la masa molecular de la *MjFtsZ* (Figura 3.4; flechas negras).

Los procesos oxidativos sobre *MjFtsZ* gatillados por ROO•, generado por la termólisis de AAPH (10 y 100 mM), se evidenciaron por la formación de una

banda tenue con una masa de ~80 kDa, la que podría corresponder a un dímero de *MjFtsZ* (Figura 3.4; flechas rojas). La intensidad de esta banda aumentó al aumentar el tiempo de incubación con AAPH (Figura 3.4.A y 3.4.B; flechas rojas). La exposición de la proteína a 100 mM de AAPH indujo además la formación de bandas de mayor tamaño (Figura 3.4.A y 3.4.B; flecha azul).

Mediante un análisis de la densidad de píxeles de los geles de poliacrilamida para cada una de las bandas se determinó: una disminución de la banda correspondiente al monómero (Figura 3.5.A) y aumento en la formación de estas bandas correspondientes a agregados covalentes de mayor tamaño (Figura 3.5.B y 3.5.B).

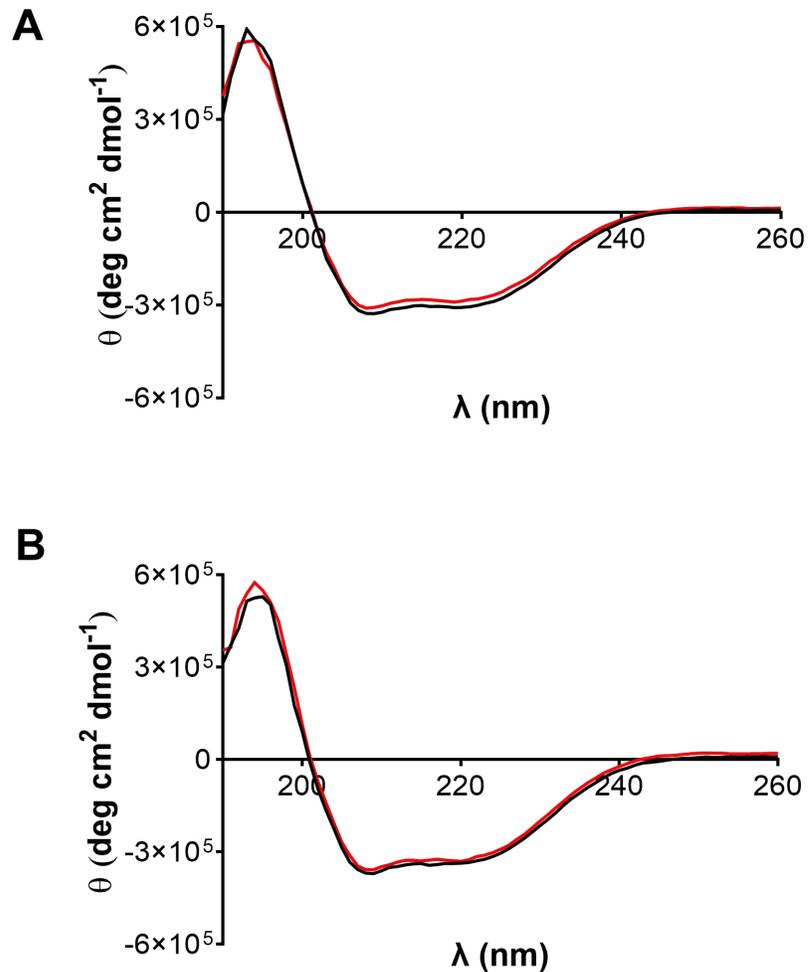


Figura 3.3: Los radicales libres derivados de AAPH no modifican la estructura secundaria de *MjFtsZ*

Se incubó *MjFtsZ* (75 μM) en *buffer* fosfato (75 mM, pH 7,4) a 37 °C en ausencia (Curva negras) y presencia de AAPH 10 mM (**Panel A**) y 100 mM (**Panel B**) durante 3 horas (Curva rojas). Se tomaron muestras de las soluciones de *MjFtsZ*-AAPH y se registraron los espectros de CD para las soluciones diluidas (en *buffer* fosfato 75 mM) con una concentración final de *MjFtsZ* de 7 μM .

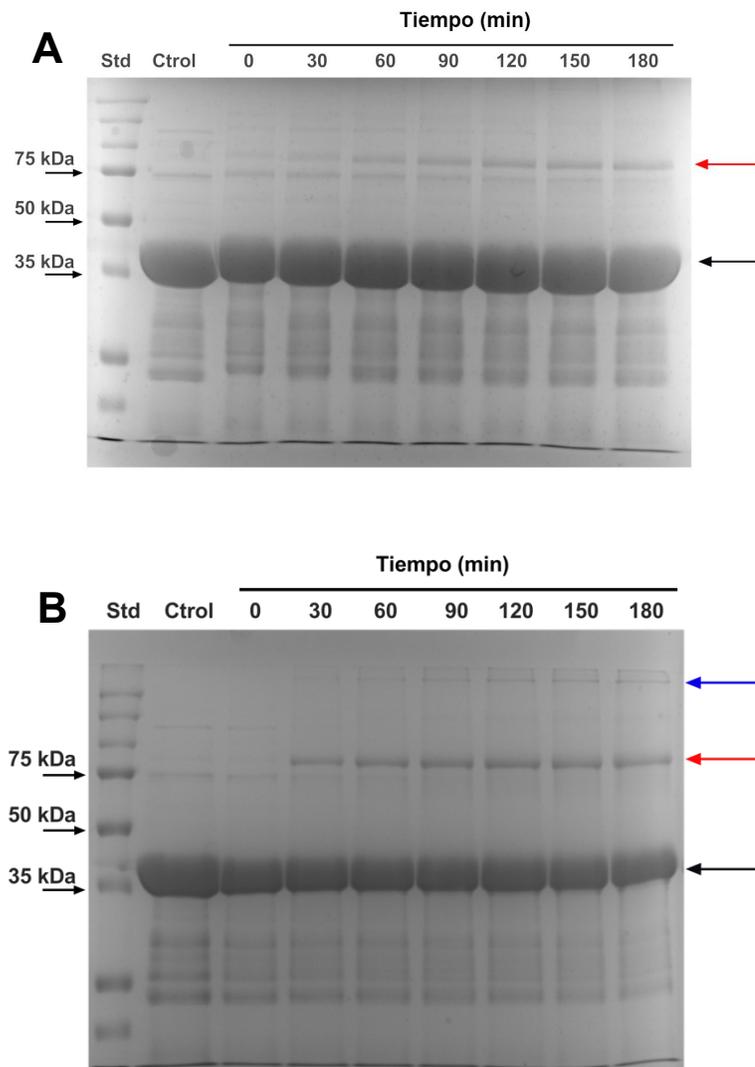


Figura 3.4: SDS-PAGE de la cinética de oxidación de *MjFtsZ* por ROO• derivados de AAPH.

Se incubó *MjFtsZ* (75 μ M) con 10 mM (**Panel A**) y 100 mM (**Panel B**) de AAPH en *buffer* fosfato (75 mM, pH 7,4) a 37 °C. Se cargó 60 μ g de proteína de cada alícuota en cada carril SDS-PAGE. En la derecha de cada gel; las flechas negras, rojas y azules indican el monómero, el dímero covalente y los agregados de alta masa molecular, respectivamente. *Std*, corresponde el estándar de peso molecular. *Ctrol*, corresponde a 60 μ g de *MjFtsZ* sin oxidar. El número de cada carril corresponde al tiempo de incubación con AAPH.

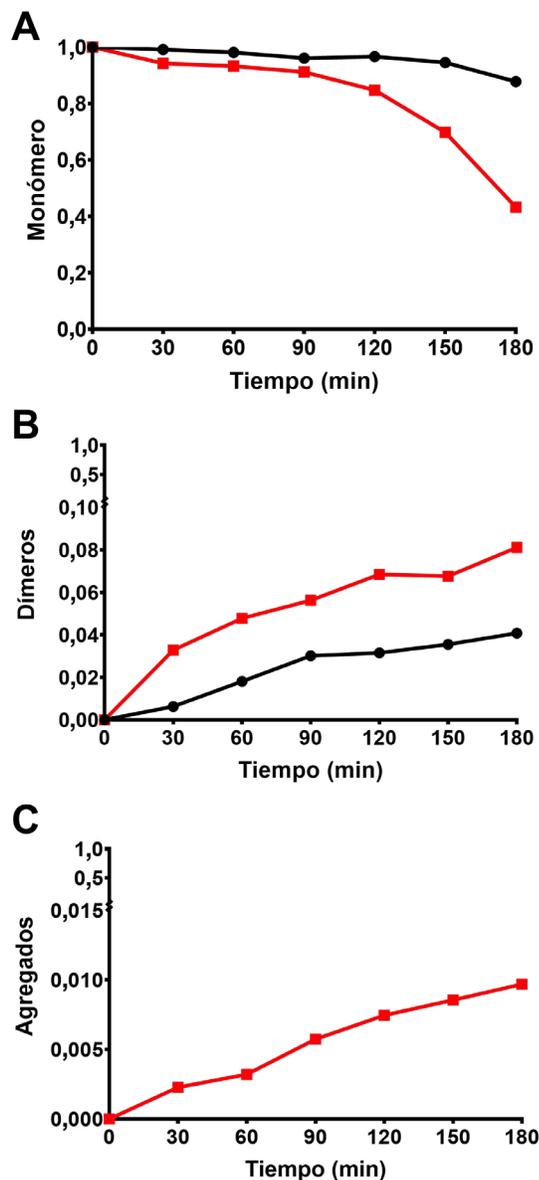


Figura 3.5: Análisis densitométrico de los gels de SDS-PAGE de la cinética de oxidación *MjFtsZ* por ROO• derivados de AAPH.

Se incubó *MjFtsZ* (75 μ M) con 10 mM (Curvas negras) y 100 mM (Curvas rojas) de AAPH en *buffer* fosfato (75 mM, pH 7,4) a 37 °C. **Panel A.** Densidades correspondientes a la banda del monómero del gel de SDS-PAGE. **Panel B.** Densidades correspondientes a la banda del doble de la masa molecular del monómero del gel de SDS-PAGE. **Panel C.** Densidades correspondientes a la banda la banda de alta masa molecular del gel de SDS-PAGE.

Debido a la pérdida en la banda correspondiente a la masa molecular del monómero, se cuantificó el efecto de ROO• sobre el monómero de *MjFtsZ* mediante cromatografía de exclusión molecular (Figura 3.6). Se identificó el pico correspondiente al monómero de la proteína incubada en ausencia de AAPH con un tiempo de retención entre los 9,5 a los 10 minutos (Figura 3.6; curvas negras). La incubación de la proteína con 10 mM de AAPH por 3 horas a 37 °C no indujo cambios en el área bajo la curva del pico cromatográfico correspondiente al monómero (Figura 3.6.B). Esto último muestra que, aunque la oxidación generada por AAPH 10 mM fue capaz de inducir la formación de agregados covalentes de mayor masa molecular (Figura 3.6.A; Inserto), su concentración sería mínima ya que tal proceso no se reflejó en una disminución del monómero de *MjFtsZ*. La oxidación de *MjFtsZ* inducida por 100 mM de AAPH en 3 horas, provocó una disminución significativa del área bajo la curva del pico cromatográfico del monómero de ~55 % (Figura 3.6.B). Además, esta oxidación provocó la aparición de señales de masa molecular mayor al monómero, con tiempos de retención de ~7,9 y ~8,5 minutos. Estas señales podrían corresponder al dímero y agregados covalentes de alta masa molecular, respectivamente (Figura 3.6.B; inserto).

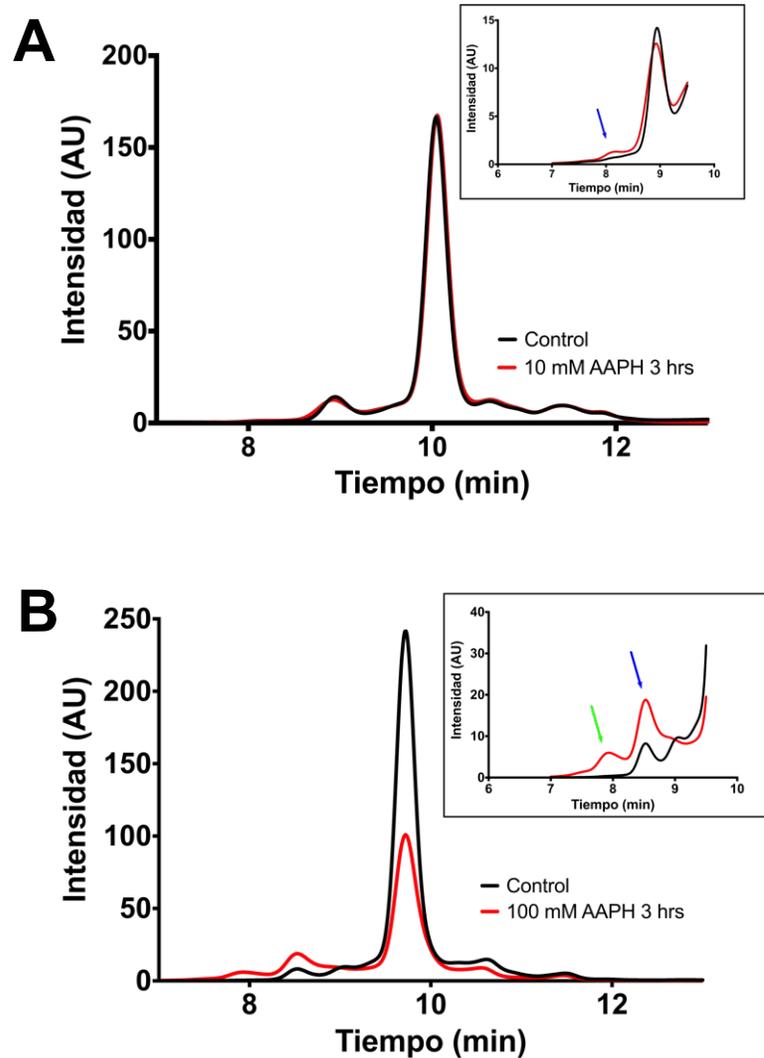


Figura 3.6: Oxidación de *MjFtsZ* mediada por ROO• derivados de AAPH.

Análisis cromatográfico (HPLC-DAD) a 220 nm de *MjFtsZ* (75 μ M) oxidada (curva roja) y no oxidada (curva negra). La proteína se incubó con SDS al 0,1% y DTT 50 mM en PBS (*buffer* fosfato 50 mM, pH 7,0, NaCl 150 mM) a 90 °C, previo a la cromatografía. **Panel A.** Cromatograma de la proteína expuesta a 10 mM de AAPH. **Panel B.** Cromatograma de la proteína expuesta a 100 mM de AAPH. Insertos. Zoom del análisis cromatográfico para los agregados de mayor masa molecular, las flechas azules y verdes indican el dímero y los agregados de proteínas de más alta masa molecular, respectivamente.

Se han descrito dos posibles mecanismos de generación de dímeros y agregados covalentes iniciados por ROO• (Fuentes-Lemus y cols., 2018; Hägglund y cols., 2018). La oxidación mediada por ROO• induce la formación de radicales Triptofanil (Trp•) y/o Tirosinil (Tyr•), que generan reacciones radicalarias de término entre estos residuos (Hawkins y Davies., 2001). Éstas reacciones finalmente provocan la formación de un nuevo enlace covalente de características intramolecular (Leinisch y cols., 2017) o intermolecular (Escobar-Álvarez y cols., 2017). Por otra parte, la oxidación de residuos puede generar moléculas que posean nuevos grupos carbonilos en la proteína. Estos grupos carbonilo pueden reaccionar con residuos de lisina, por un mecanismo de base de Schiff, lo que también generaría la dimerización (Fuentes-Lemus y cols., 2018-2).

3.2.3. Consumo de aminoácidos de MjFtsZ por ROO• derivados de AAPH.

El efecto de los ROO• generados por la termólisis de AAPH sobre los aminoácidos de MjFtsZ se determinó por la cuantificación mediante HPLC de la derivatización de cada aminoácido con OPA y por fluorescencia. La oxidación de MjFtsZ por ROO• derivados de AAPH solamente afecta a los residuos de Met, Trp y Tyr de MjFtsZ (Figura 3.7 y 3.8). La oxidación de

MjFtsZ mediada por su incubación con 10 mM de AAPH, provocó un consumo total de amino ácidos de $\sim 130 \mu\text{M}$, siendo Met y Trp los únicos blancos oxidables (Figura 3.7.C; Tabla 1) y la oxidación con una concentración de 100 mM de AAPH, provocó un consumo total de $\sim 260 \mu\text{M}$ afectando a los residuos de Met, Trp y Tyr (Figura 3.7.D Tabla 1). Se cuantificó un consumo de $115,4 \pm 3,5 \mu\text{M}$ (0,8 moles por mol de proteína) de los residuos de Met al oxidar la proteína con 10 mM de AAPH (Tabla 1). Mientras que, al incubar la proteína con 100 mM de AAPH se cuantificó un consumo de $14 \pm 5,1 \mu\text{M}$ (0,2 moles por mol de proteína) de Tyr, y $210 \pm 5,0 \mu\text{M}$ (1,5 moles por mol de proteína) de Met (Tabla 1). Este análisis no mostró un consumo del residuo de Trp, a pesar de que es un blanco principal de $\text{ROO}\cdot$ (Davies, 2016). No obstante, este resultado se debería a la susceptibilidad de Trp a sufrir oxidaciones durante la hidrólisis ácida de la proteína. Por tal motivo se cuantificó el consumo del único residuo Trp de *MjFtsZ* mediante fluorescencia. Su oxidación provoca el apagamiento de su fluorescencia. La incubación con AAPH provocó una pérdida de la fluorescencia del $\sim 20 \%$ y $\sim 93 \%$ al exponer la proteína por 3 horas a AAPH de 10 y 100 mM, respectivamente (Figura 3.8). Estos valores equivalen a un

consumo de $15,0 \pm 4,0$ y $70 \pm 6,0$ μM Trp (0,2 y 0,9 moles por mol de proteína) (Tabla 1).

Tabla 1. Modificación de aminoácidos en *MjFtsZ* por ROO• derivados de AAPH. Las muestras de proteínas se trataron con AAPH 10 o 100 mM durante 3 horas a 37 °C en *buffer* fosfato (75 mM a pH 7,4). Se determinó el consumo de aminoácidos por UPLC.

AAPH		Tyr	Trp	Met	Σ
	Consumo (μM)	ns	$15 \pm 4,0$	$115 \pm 3,5$	130
10 mM	por Proteína	---	0,2	1,5	1,7
	Por ROO•	---	0,1	0,8	0,9
	Consumo (μM)	$14 \pm 5,0$	$70 \pm 6,0$	$210 \pm 5,0$	294
100 mM	por Proteína	0,2	0,9	2,8	3,9
	Por ROO•	--	0,05	0,15	0,2

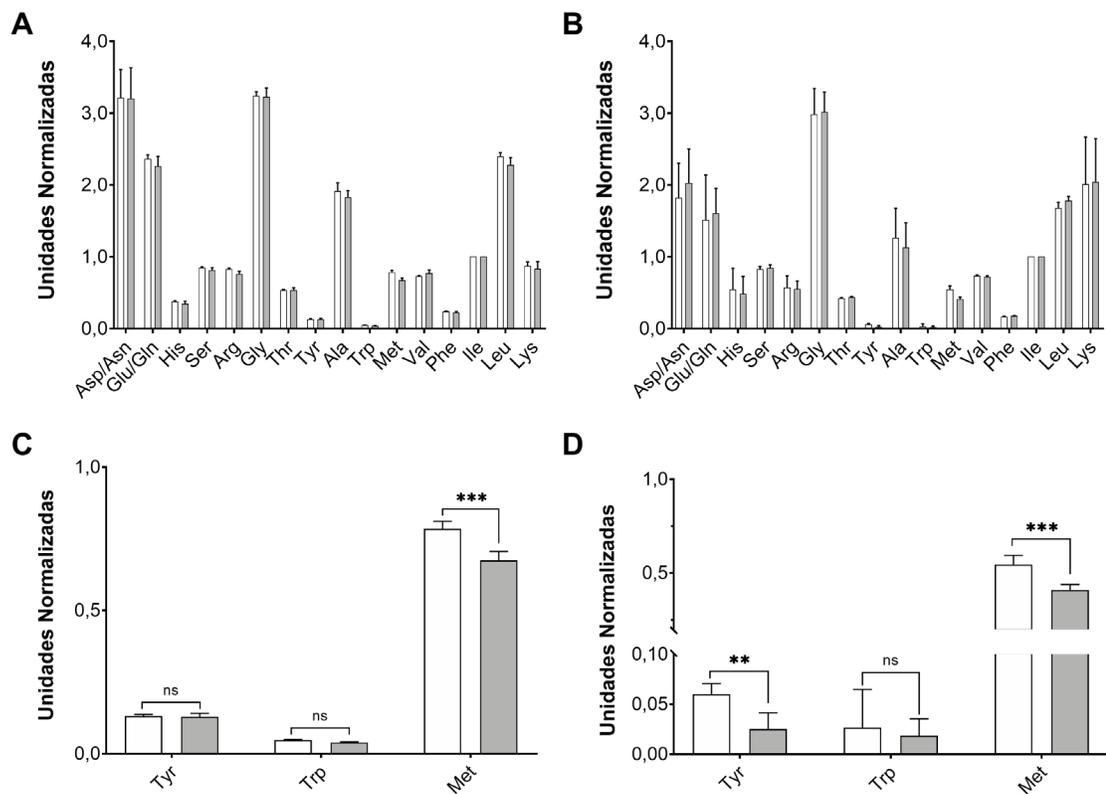


Figura 3.7: Cuantificación del consumo de aminoácidos de *MjFtsZ* por ROO• derivados de AAPH.

Se incubó *MjFtsZ* (75 μ M) en *buffer* fosfato (75 mM, pH 7.4) a 37 °C por 3 horas en ausencia (control, barras blancas) y presencia (barras grises) de 10 (**Panel A**) y 100 mM (**Panel B**) de AAPH. La cuantificación se realizó mediante HPLC de la derivatización por OPA. **Panel C y D**. Detalle de los residuos que son objetivo de los radicales peroxilos de los paneles A y B, respectivamente. La concentración de cada aminoácido se determinó mediante una curva de calibración y se normalizó por la concentración de Ile, debido a que este residuo no se ve afectado por la oxidación. ** indica una diferencia de $p < 0,01$; *** indica una diferencia de $p < 0,001$, ns indica una diferencia no significativa.

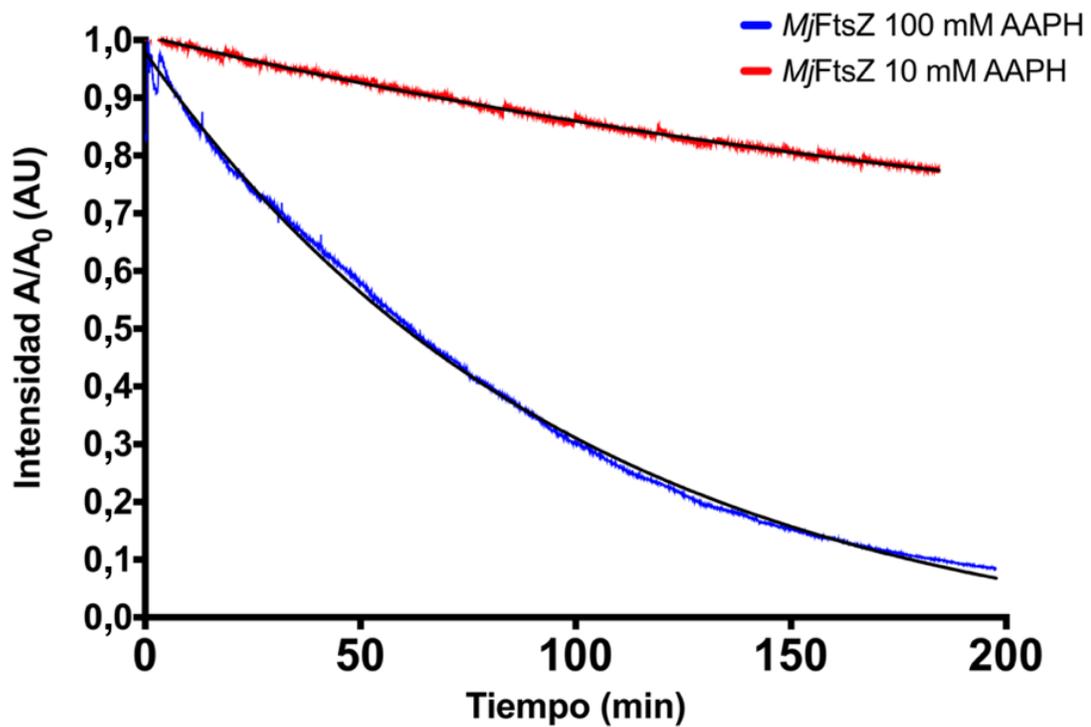


Figura 3.8: Apagamiento de la fluorescencia de Trp provocado por ROO• derivados de AAPH.

Se incubó *MjFtsZ* (75 μM) con 10 (curva roja) y 100 (curva azul) mM de AAPH en *buffer* fosfato (75 mM, pH 7,4) a 37 °C a una dosis final de 144 μM y 1,44 mM a las 3 horas respectivamente. Las curvas negras corresponden a un ajuste de decaimiento exponencial simple. La fluorescencia de Trp se siguió a 350 nm (λ_{ex} 295 nm).

Se determinó que durante la exposición de *MjFtsZ* a 10 mM de AAPH se consumen un total de $\sim 130 \mu\text{M}$ de aminoácidos, que representan un total de 1,7 moles de aminoácidos modificados por mol de proteína. Esto último equivale a con un consumo de 0,9 moles de residuos oxidados por mol de $\text{ROO}\cdot$ producidos (Tabla 1). En contraste, con AAPH 100 mM, se modificaron 3,9 residuos por mol de proteína. Esto equivale a un consumo de 0,2 moles de aminoácidos por mol de $\text{ROO}\cdot$ producidos (Tabla 1). Esto indica que se produce una oxidación parcial de la proteína, debido a que un nivel general más alto de radicales, provoca un nivel de oxidación menos eficiente (Tabla 1).

*3.2.4. Caracterización de la generación de los productos de oxidación producidos por la oxidación de *MjFtsZ* por $\text{ROO}\cdot$ derivados de AAPH.*

Se ha descrito que la oxidación de Tyr genera principalmente la formación de 3,4-dihidroxiifenilalalina (DOPA) y dímeros de Tyr (di-Tyr), mientras que la oxidación de Met lleva a metioninsulfóxido (MetSO). La oxidación de Trp genera una serie de moléculas en donde la quinurenina (Kyn), N-Formilquinurenina (NFK), alcoholes e hidroperóxidos, destacan como

productos de oxidación, además de dímeros de Trp (di-Trp). Los últimos formados por reacciones entre radicales Trp• (Hawkins y Davies., 2001).

3.2.4.1. Cuantificación de Metioninsulfóxido (MetSO).

La cuantificación de MetSO se determinó mediante HPLC de la derivatización con OPA de la hidrólisis en medio ácido de *MjFtsZ* (Escobar-Álvarez y cols., 2017). Se determinó que con la incubación de *MjFtsZ* con 10 y 100 mM de AAPH por 3 horas, se generaron $88 \pm 5 \mu\text{M}$ y $197 \mu\text{M} \pm 21 \mu\text{M}$ de MetSO, respectivamente (Figura 3.9). Estos valores se corresponden con el consumo de Met reportado en la Tabla 1).

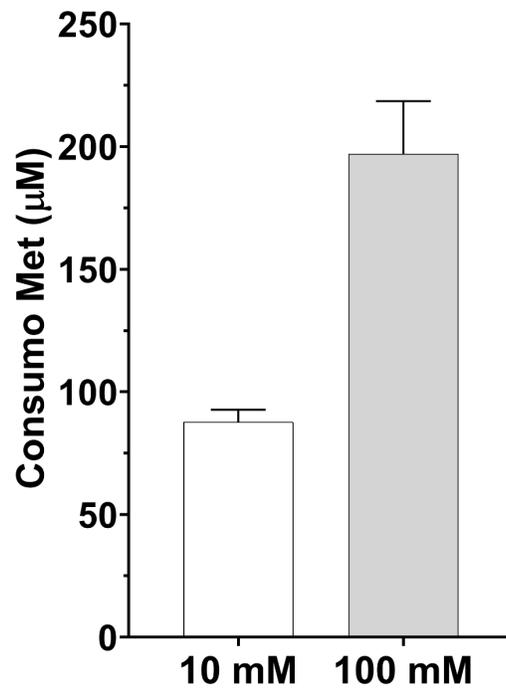


Figura 3.9: Cuantificación de la generación de Metioninsulfóxido (MetSO) por la oxidación de *MjFtsZ* por radicales derivados de AAPH.

Cuantificación por HPLC de MetSO de la derivatización por OPA de la hidrólisis en medio ácido de *MjFtsZ* (75 µM) oxidado con AAPH a una concentración de 10 y 100 mM.

3.2.4.2. Caracterización de los productos de oxidación de Tyr.

La detección de los productos de oxidación derivados de Tyr, L-DOPA y di-Tyr, se realizó mediante HPLC y UPLC-MS (Figura 3.10) (Fuentes-Lemus y cols., 2018). No se detectó la presencia de L-DOPA en ninguna condición de oxidación (Figura 3.10.A). Este resultado fue corroborado por UPLC-MS; se exploró la formación de L-DOPA por monitoreo de reacciones seleccionadas (SRM) con una relación masa/carga (m/z) del ion padre e hijo de m/z 197 \rightarrow 151. Solamente se logró detectar L-DOPA en muestras de *MjFtsZ* expuestas a 100 mM de AAPH por 3 horas (pico cromatográfico con tiempo cercano a los 11 minutos, Figura 3.10.B). La aparición de este producto de oxidación concuerda con el consumo de Tyr reportado, ya que solamente a esta dosis de radicales se produce la oxidación de este residuo (Tabla 1). El análisis por HPLC de di-Tyr no mostró formación de este producto en las condiciones de oxidación estudiadas; no se detectó ninguna señal mediante HPLC con detección de fluorescencia (Figura 3.10.C). La detección por UPLC-MS para di-Tyr, (SMR m/z 360 \rightarrow 315), tampoco evidenció señales con el tiempo de retención para este producto \sim 12,3 minutos (Figura 3.10.D). Una situación similar se observó al

analizar las muestras por Western blot (WB) utilizando anticuerpos anti-di-Tyr; no se detectó la presencia de este producto (resultados no mostrados).

3.2.4.3. Caracterización de los productos de oxidación de Trp.

Los productos de oxidación de Trp son complejos y variados (Ronsein y cols., 2011; Silva y cols., 2019), aunque se destacan quinurenina (Kyn), N-Formilquinurenina (NFK), alcoholes, hidroperóxidos, y di-Trp. La cuantificación de algunos de estos productos de oxidación se realizó mediante HPLC y UPLC-MS (Figura 3.11). En el análisis por HPLC se cuantificó la suma de Kyn y NFK, debido a que en las condiciones ácidas empleadas para la hidrólisis de proteínas la molécula de NFK se hidroliza a Kyn. Se lograron detectar picos consistentes con la formación de una o ambas de estas especies, en muestras de *MjFtsZ* incubadas con AAPH 10 y 100 mM. Sin embargo, no fue posible cuantificar estos picos utilizando estándares comerciales, ya que, la presencia de estos productos generados en la oxidación de *MjFtsZ* tiene niveles muy bajos, consistente con la presencia de un único residuo de Trp en *MjFtsZ*, además de que existe la posibilidad de generar otros productos derivados de Trp (Figura 3.11.A).

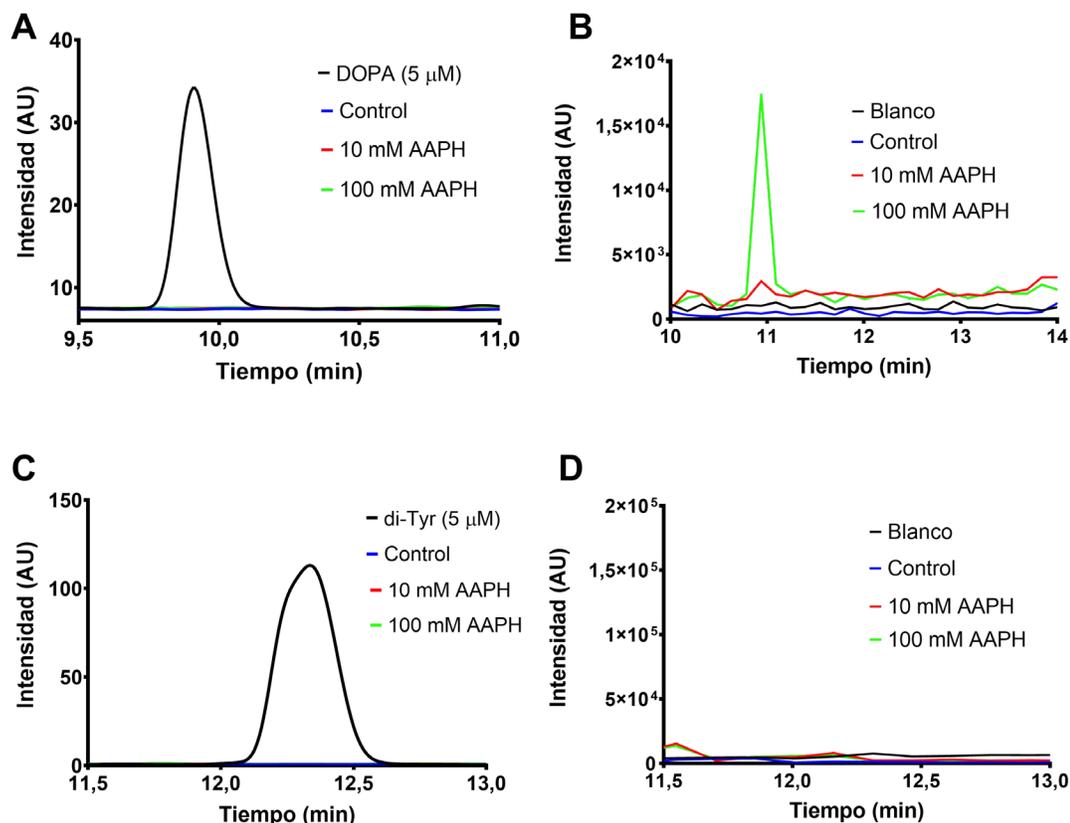


Figura 3.10: Detección de los productos de oxidación derivados de Tyr, L-DOPA y di-Tyr generados por la oxidación de *MjFtsZ* por radicales derivados de AAPH.

Análisis por HPLC y UPLC-MS de los productos de la oxidación de *MjFtsZ* ($75 \mu\text{M}$) oxidado con AAPH a una concentración inicial de 10 y 100 mM. **Panel A.** Cromatograma de la cuantificación de L-DOPA, se siguió la fluorescencia a 320 nm (λ_{ex} 280 nm). **Panel B.** Cromatograma SMR de la detección de la fragmentación de la masa $197 \rightarrow 151$, correspondiente a L-DOPA. **Panel C.** Cromatograma de la cuantificación de di-Tyr, se siguió la fluorescencia a 410 nm (λ_{ex} 280 nm). **Panel D.** Cromatograma SMR de la detección de la fragmentación de la masa $360 \rightarrow 315$, correspondiente a di-Tyr. Las curvas negras, azules, rojas y verdes corresponden al estándar ($5 \mu\text{M}$) o blanco, *MjFtsZ* control (sin oxidar), *MjFtsZ* oxidado a 10 mM y *MjFtsZ* oxidado a 100 mM, respectivamente.

El análisis por UPLC-MS utilizando el método SMR con una transición m/z $209 \rightarrow 94$ mostró una señal cromatográfica, con un tiempo de retención $\sim 14,5$ minutos, que corresponde a la generación de Kyn (Figura 3.11.B). El espectro de masas (Ms-Ms) de la señal muestra el patrón de fraccionamiento correspondiente a la molécula de Kyn (Vázquez y cols., 2001) (Figura 3.11.C). Además, esta señal SMR se observó con mayor intensidad al aumentar la concentración de AAPH (Figura 3.11.B). Para la detección de NFK se utiliza un SMR con una relación m/z de $237 \rightarrow 118$. Este análisis no mostró la presencia de esta especie, esto probablemente se deba a la hidrólisis de esta molécula a Kyn en medio ácido. El análisis de SMR usando una relación m/z de $237 \rightarrow 146$, mostró dos picos cromatográficos (a 11,5 y 12,9 minutos) (Figura 3.11.D). El espectro Ms-Ms de estas señales es consistente con la formación de di-alcoholes derivados de Trp o posiblemente peróxidos derivados de Trp (inestables) (Ronsein y cols., 2011) (Figura 3.11.E). Finalmente, el análisis de UPLC-MS en modo SRM usando una relación m/z de $407 \rightarrow 203$, reveló un pico cromatográfico con un tiempo de retención ~ 33 minutos reflejando la generación de bajos niveles de di-Trp (Figuroa y cols., 2020). Además, el área bajo la curva de esta señal aumentó

al aumentar la concentración de AAPH a la que fue expuesta la proteína *MjFtsZ* durante 3 horas (Figura 3.11.F).

Estos resultados excluyen la participación de di-Tyr en la dimerización de *MjFtsZ*, sin embargo, permiten determinar que la oxidación de Trp participa en la dimerización de *MjFtsZ*. El nuevo enlace covalente generado (di-Trp), se debe a una reacción radicalaria de término. Esto podría explicar la rápida dimerización observada al oxidar *MjFtsZ* con 100 mM de AAPH. No obstante, estos resultados no descartan la participación de reacciones secundarias de otros residuos oxidados como por ejemplo aquellas asociadas a procesos de dimerización por grupos carbonilos.

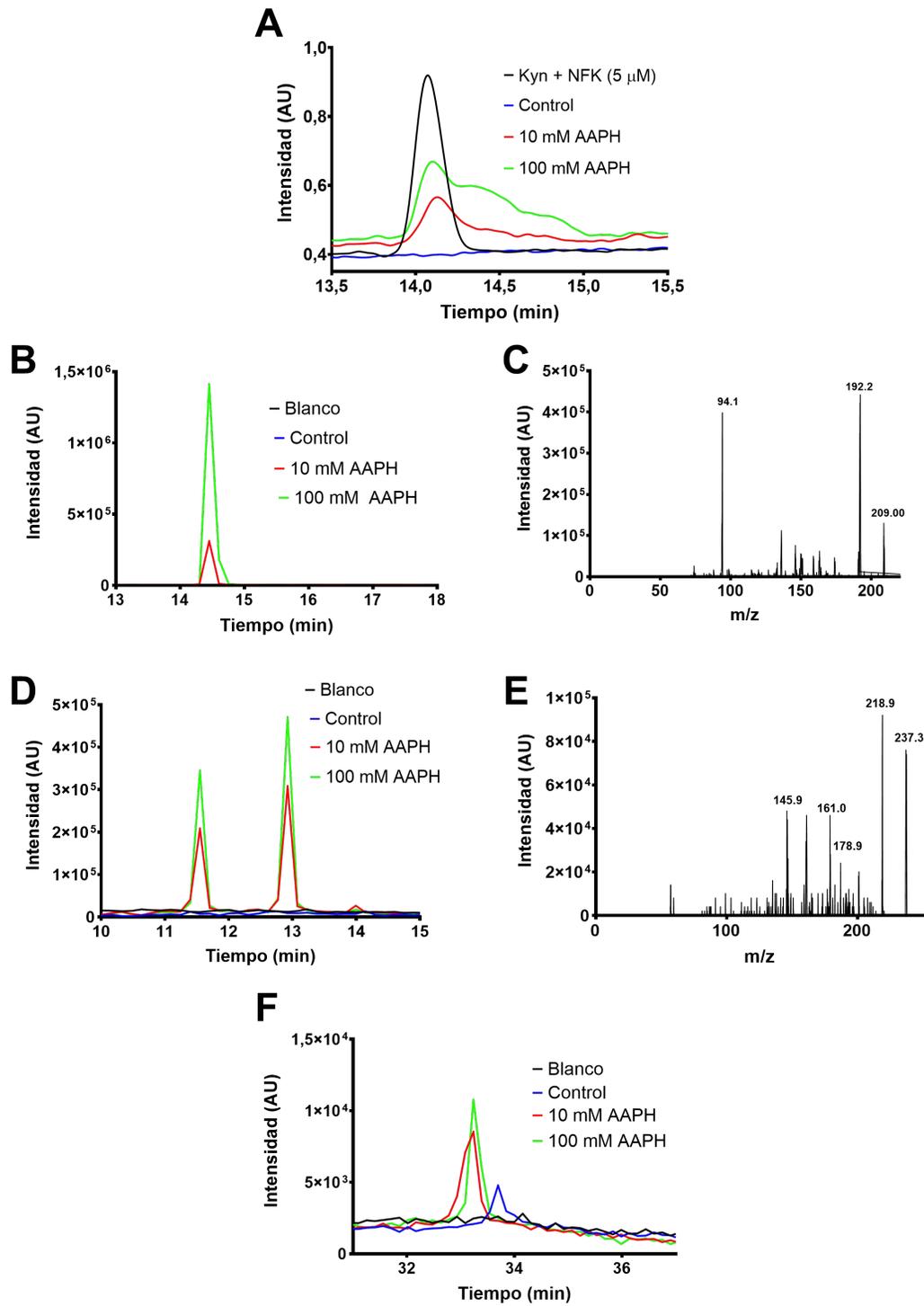


Figura 3.11: Detección de los productos de oxidación derivados de Trp, generados por la oxidación de *Mj*FtsZ por radicales derivados de AAPH.

(Cont.)

Figura 3.11: Detección de los productos de oxidación derivados de Trp, generados por la oxidación de *MjFtsZ* por radicales derivados de AAPH.

Análisis por HPLC y UPLC-MS de los productos de la oxidación de *MjFtsZ* (75 μ M) oxidado con AAPH a una concentración inicial de 10 y 100 mM. **Panel A.** Cromatograma de la cuantificación de Kyn y NFK, se siguió la fluorescencia a 510 nm (λ_{ex} 370 nm). **Panel B.** Cromatograma SMR de la detección de la fragmentación de la masa 209 \rightarrow 94, correspondiente a Quinurenina (Kyn). **Panel C.** Espectro Ms-Ms del pico del Cromatograma SRM (209 \rightarrow 94) a una concentración 100 mM. **Panel D.** Cromatograma SMR de la detección de la fragmentación de la masa 237 \rightarrow 146, correspondiente a di-alcoholes. **Panel E.** Espectro Ms-Ms del pico del Cromatograma SRM (237 \rightarrow 146) a una concentración 100 mM. **Panel F.** Cromatograma SMR de la detección de la fragmentación de la masa 407 \rightarrow 203, correspondiente a di-Trp. Las curvas negras, azules, rojas y verdes corresponden al estándar (5 μ M) o blanco, *MjFtsZ* control (sin oxidar), *MjFtsZ* oxidado a 10 mM y *MjFtsZ* oxidado a 100 mM, respectivamente.

3.2.4.4. Formación de grupos carbonilos durante la oxidación de MjFtsZ inducida por ROO• derivados de AAPH.

Los grupos carbonilos se han descrito como un marcador de oxidación de proteínas (Hawkins y cols., 2009). La acumulación de estos grupos puede llevar a dimerizaciones por reacciones con mecanismos de base de Schiff (Fuentes-Lemus y cols., 2018-2). Se determinó la presencia de grupos carbonilos mediante electrotransferencia de proteínas a membranas de Fluoruro de polivinilideno e inmunorevelado (*Western Blot*; WB). Adicionalmente se cuantificó el contenido total de grupos carbonilo mediante derivatización con 4-dinitrofenilhidrazina, la cual reacciona con los grupos carbonilos expuestos y genera un compuesto coloreado que absorbe a 370 nm (Hawkins y cols., 2009). El análisis por WB, demostró la ausencia de grupos carbonilos en las muestras control (proteína no oxidada) (Figura 3.12.A y 3.12.B: Carril C). La exposición a AAPH 10 y 100 mM durante 3 horas, generó niveles crecientes de estas especies. Se detectó que la señal de WB está presente no solo para la banda de monómero de la proteína, sino que también para las bandas correspondientes a dímeros y agregados de alta masa molecular. Además, la intensidad de estas bandas aumentó al aumentar la concentración de AAPH, junto con el tiempo de exposición a ROO• (Figura

3.12.A y 3.12.B: Carriles 1,2,3). La cuantificación de la generación de grupos carbonilos en muestras de *MjFtsZ* incubadas con AAPH 100 mM, mostraron un aumento en el contenido hasta ~150 minutos de incubación. Posteriormente, el contenido alcanzó un máximo (Figura 3.13; Curva verde). El rendimiento máximo de carbonilos se determinó como ~ 0,17 moles por mol de proteína (Figura 3.13). Al oxidar *MjFtsZ* con 10 mM de AAPH no se observó aumento significativo en el contenido total de carbonilos hasta 2 horas de incubación; más allá de este tiempo, solamente se detectó un ligero aumento, con un rendimiento máximo de ~ 0,12 moles por mol de proteína (Figura 3.13; Curva roja).

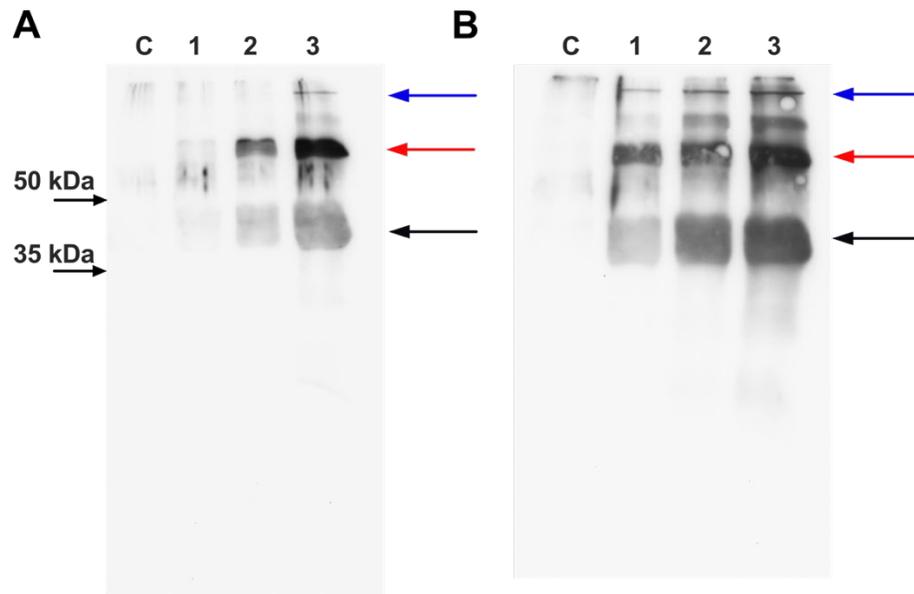


Figura 3.12: Western Blot de la cinética de generación de carbonilos por la oxidación de *MjFtsZ* por ROO• derivados de AAPH.

Se incubó *MjFtsZ* (75 μ M) a una concentración inicial de 10 mM (**Panel A**) y 100 mM (**Panel B**) de AAPH en *buffer* fosfato (75 mM, pH 7,4) a 37 °C. Se tomó una alícuota cada 1 hora. Se cargó 60 μ g de proteína de cada alícuota en cada carril SDS-PAGE. Los carriles etiquetados con “C” corresponden a muestras no oxidadas de *MjFtsZ*. Los carriles 1, 2 y 3 corresponden a los tiempos de incubación 1, 2 y 3 horas, respectivamente. En la derecha de cada membrana; las flechas negras, rojas y azules indican el monómero, el dímero covalente y los agregados de alta masa molecular, respectivamente.

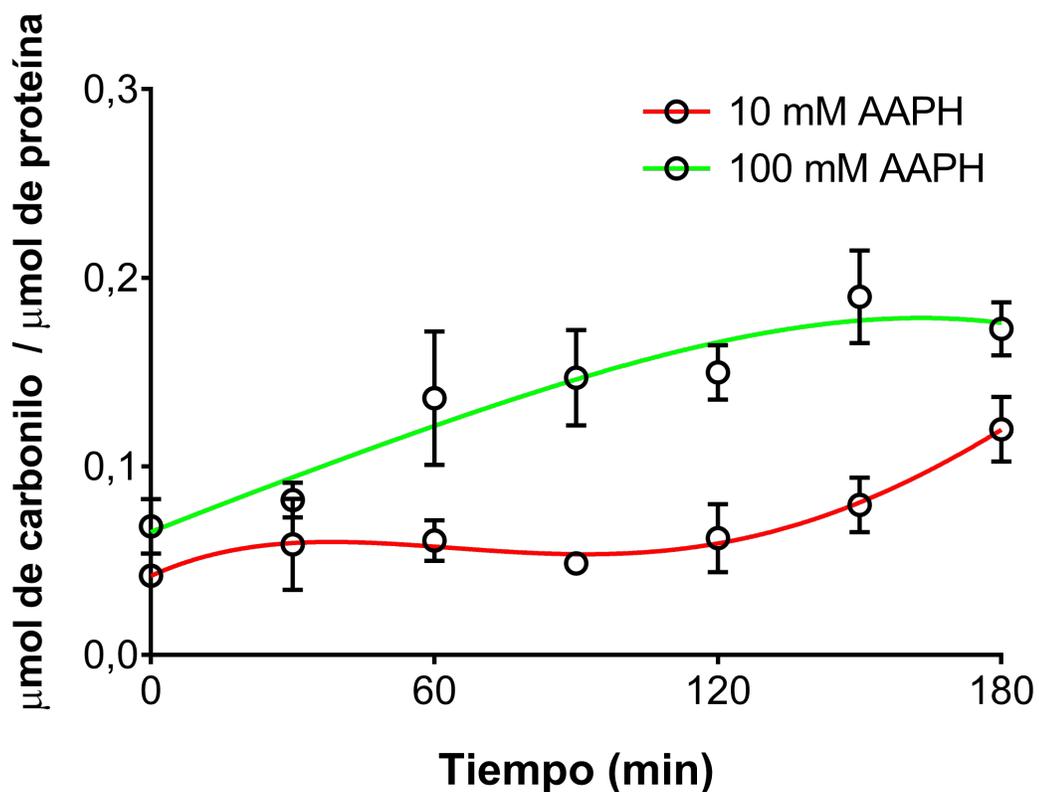


Figura 3.13: Formación de grupos carbonilos de *MjFtsZ* por la oxidación por ROO• derivados de AAPH.

Se incubó *MjFtsZ* (75 μM) a una concentración inicial de 10 mM (Curva Roja) y 100 mM (Curva Verde) de AAPH en *buffer* fosfato (75 mM, pH 7,4) a 37 °C. Se tomó una alícuota cada 30 minutos y se derivatizó con DNPH. Se determinó la absorbancia a 370 nm y se utilizó un $\epsilon = 22.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

En conjunto, los resultados anteriormente presentados, permiten concluir que la dimerización y la formación de productos de oxidación de Trp y Tyr, no dan cuenta de la pérdida de actividad polimérica evidenciada (Figura 3.2). La oxidación del residuo de Tyr solamente se produce al incubar la proteína con una concentración de 100 mM de AAPH por 3 horas (Tabla 1), mientras que la actividad polimérica se pierde completamente después de 1 hora de incubación (Figura 3.2.C). El consumo de Trp en presencia de 10 mM de AAPH reflejó que 0,2 moles de Trp se oxidaron por mol de proteína (Tabla 1), mientras que la actividad polimérica se pierde en un ~80 % del valor del control (Figura 3.2.A y 3.2.B). Contrariamente, el consumo de Met inducido por ROO• permite explicar el nivel de inactivación de la proteína determinado en idénticas condiciones. Se consumieron 1,5 y 2,8 moles de Met por mol de proteína al incubar *MjFtsZ* con 10 y 100 mM de AAPH, respectivamente.

*3.3. Oxidación de *MjFtsZ* con cloramina T.*

La cloramina T posee una alta selectividad para oxidar residuos de Met (Shechter y cols., 1975). Por ello, para confirmar la importancia de la oxidación de Met y su relación con la actividad polimérica de *MjFtsZ*, se optó

por utilizar cloramina T como oxidante. La actividad polimérica de *MjFtsZ*, incubada por 20 minutos a 25 °C con cloramina T (0,1 mM), mostró un perfil de polimerización y despolimerización similar al de las muestras Control incubadas en ausencia de cloramina T (Figura 3.14; curvas Azul y negra, respectivamente). Al incubar *MjFtsZ* con una concentración de cloramina T de 1 o 10 mM, se observó una modificación en el perfil de polimerización-despolimerización (Figura 3.14; curvas verde y roja, respectivamente). La exposición a 1 mM de cloramina T indujo una polimerización más lenta que los controles, sin embargo, se alcanzó un máximo de intensidad de LS similar al control. Esto refleja una formación de polímeros similar, tanto para la muestra control, como aquella incubada con 1 mM de cloramina T (Figura 3.14; curvas verde). Además, la oxidación con 1 mM de cloramina T inhibió por completo el proceso de despolimerización, lo que indica una inhibición total de la actividad GTPasa y una alta estabilidad de los polímeros durante el período de tiempo examinado (Figura 3.14; curva verde). Las muestras de *MjFtsZ* expuestas a 10 mM de cloramina T mostraron un patrón similar, sin embargo, el máximo de intensidad de LS fue menor, lo que se debe a una menor formación de polímeros (Figura 3.14; curva roja). La oxidación con cloramina T no modificó el contenido de Tyr

(Figura 3.15.A), y sólo se observó una ligera disminución en la fluorescencia de Trp después de la exposición de *MjFtsZ* a 10 mM de cloramina T (Figura 3.15.B y 3.15.C). Se cuantificó por HPLC el consumo de residuos Met en muestras de *MjFtsZ* incubadas con cloramina T. Al incubar *MjFtsZ* en presencia de cloramina T 0,1, 1 o 10 mM, se consumieron 267 ± 70 , 362 ± 82 y 572 ± 70 μM de Met, respectivamente (Figura 3.15.D). Estos valores implican que se consumieron 3,6, 4,8 y 7,6 moles de Met por mol de *MjFtsZ* al incubar con 0,1; 1 y 10 mM de cloramina T, respectivamente. Se determinó la formación de MetSO en las muestras expuestas a cloramina T a 0,1; 1 y 10 mM, que fue de 249 ± 47 , 382 ± 15 y 537 ± 77 μM (Figura 3.15.D).

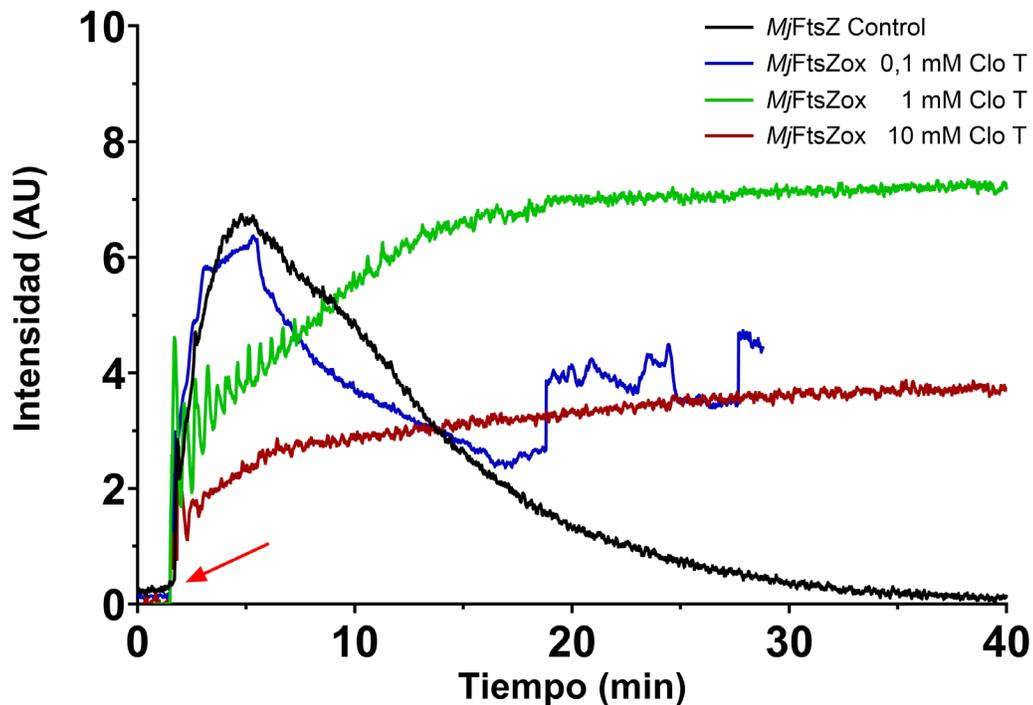


Figura 3.14: La cloramina T afecta la actividad de polimerización de *MjFtsZ*, induce el consumo de Met y la formación de MetSO.

Se incubó *MjFtsZ* (75 μM) (en Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, 25 $^{\circ}\text{C}$) en ausencia y presencia de cloramina T (0,1, 1 y 10 mM). Después de la incubación durante 20 minutos, se eliminó la cloramina T mediante SEC. La actividad de polimerización de *MjFtsZ* se siguió por dispersión de luz (LS, 350 nm) a 65 $^{\circ}\text{C}$, después de la adición de GTP (flecha roja). Las curvas negras, azul, verde y roja muestran a la proteína incubadas en ausencia de cloramina T (control), e incubadas en presencia de cloramina T 0,1, 1 y 10 mM, respectivamente.

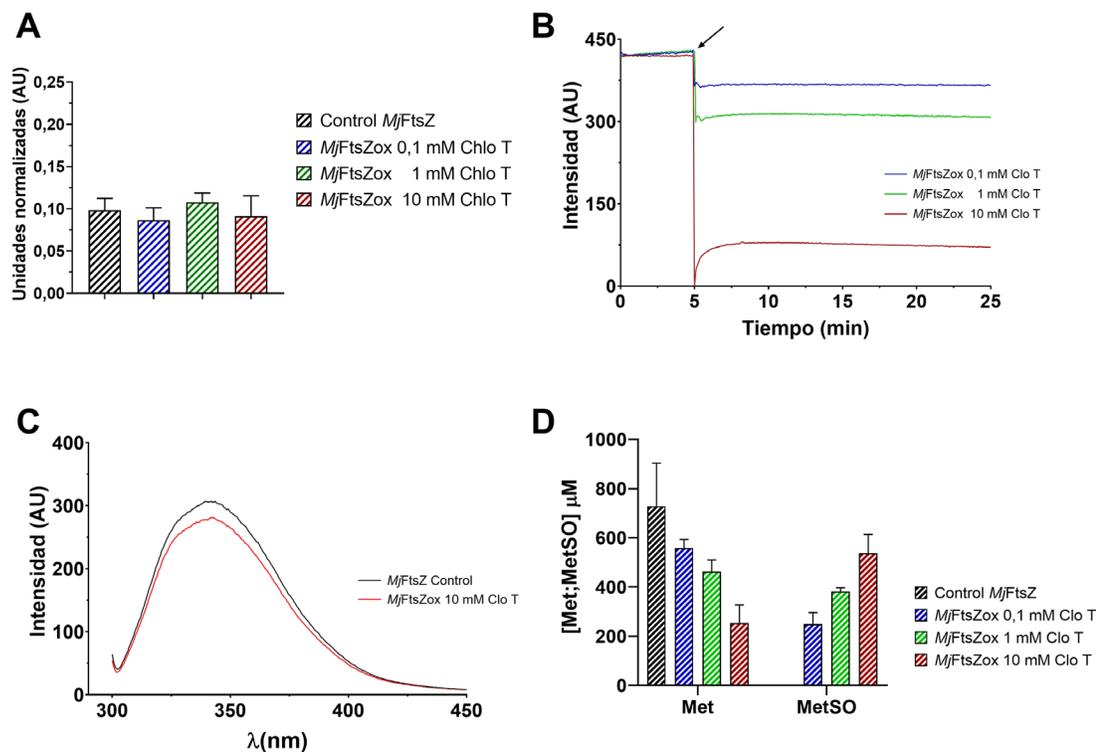


Figura 3.15: Cuantificación del consumo de aminoácidos de *MjFtsZ* por la acción de cloramina T.

Se incubó *MjFtsZ* (75 μ M) (en Tris-HCl 50 mM, pH 7,4 a 25 °C) en ausencia y presencia de cloramina T (0,1, 1 y 10 mM). **Panel A.** Cuantificación de la oxidación del residuo de Tyr mediante HPLC de la derivatización por OPA de la hidrólisis ácida de *MjFtsZ* incubada con cloramina T a una concentración de 0,1, 1 y 10 mM. **Panel B.** Fluorescencia de Trp de *MjFtsZ* seguida a 350 nm (λ_{ex} 295 nm). Se midió la fluorescencia basal por 5 minutos y se añadió cloramina T a una concentración de 0,1, 1 y 10 mM y se incubó por 20 minutos. Las curvas azul, verde y roja corresponde a la oxidación con 0,1, 1 y 10 mM de cloramina T, respectivamente. La flecha indica el momento en que se añadió la cloramina T. La disminución de fluorescencia luego de agregar cloramina T se debe a que esta molécula absorbe parte de la luz de excitación (filtro interno). **Panel C.** Espectro de Fluorescencia de Trp de *MjFtsZ*. La proteína se incubó en ausencia (control) y en presencia de cloramina T 10 mM por 20 minutos, luego se eliminó la cloramina T mediante cromatografía de exclusión por tamaño y se obtuvo el espectro de emisión de fluorescencia de Trp (λ_{em} 300-450 nm; λ_{ex} de 295 nm). Las curvas negra y roja corresponden a la proteína control y a la oxidada 10 mM de cloramina T, respectivamente. **Panel D.** Cuantificación de la oxidación del residuo de Met (y formación de MetSO) mediante HPLC de la derivatización por OPA de la hidrólisis ácida de *MjFtsZ* incubada con cloramina T a una concentración de 0,1, 1 y 10 mM.

3.4. Análisis por UPLC-MS de oxidación de Tyr, Trp y Met en péptidos liberados de la hidrólisis triptica de MjFtsZ.

Los resultados de esta sección fueron realizados por el Dr. Eduardo Fuentes-Lemus, en el Departamento de Ciencias Biomédicas en el Instituto Panum de la Universidad de Copenhague, Dinamarca. Estos experimentos se realizaron en un trabajo en cooperación para la publicación del artículo relacionado a esta tesis.

Las proteína MjFtsZ no oxidada (control) y oxidada con 10 mM de AAPH, se digirieron con tripsina y los péptidos liberados se analizaron mediante UPLC-MS. De la digestión con tripsina de MjFtsZ se obtuvieron 51 péptidos, lo que representa una cobertura del 95,3% de la proteína. Se estudiaron los cambios de masa específicos (m/z +4, +14, +16 y +32) correspondientes a los productos de oxidación de los residuos de Tyr, Trp y Met. El porcentaje de modificación en cada sitio se estimó basándose en la cuantificación sin marcaje de las áreas proporcionales del MS¹ total de los péptidos modificados y no modificados correspondientes. Se determinó un alto grado de oxidación de Met después de incubaciones de 1, 2 y 3 horas de MjFtsZ (75 μ M) con una concentración inicial de 10 mM de AAPH (Figura 3.16). Después de 3 horas de incubación, se modificaron cerca del 12% de los residuos de Met (relación m/z +16, que corresponde a la adición de un solo átomo de oxígeno, asignado al sulfóxido de Met [MetSO]) (Figura 3.16.A). Estos datos implican que se modificaron cerca de 100 μ M de residuos de Met, lo que concuerda con los

datos obtenidos por el ensayo HPLC-OPA (Tabla 1). El análisis de la oxidación de Trp mostró bajos niveles de modificación después de 1 hora de incubación con una concentración de 10 mM AAPH, alcanzando cerca del 10% después de 2 horas, y el 7% después de 3 horas de incubación (Figura 3.16.A). El menor porcentaje de modificaciones detectadas a las 3 horas en comparación con las 2 horas de incubación, se atribuye a la formación de productos de oxidación secundarios de Trp que no se detectaron utilizando el enfoque experimental de masa específicos (m/z +4, +14, +16 y +32). Estos productos adicionales pueden incluir especies de di-Trp, que se detectaron por UPLC-MS en modo SRM, en proteínas oxidadas después de 3 horas de incubación con AAPH (Figura 3.11.F). Además, se determinaron niveles bajos de modificaciones de Tyr, de acuerdo con los datos presentados en la Tabla 1 y la Figura 3.10. Con respecto a los sitios específicos de los residuos de Met modificados en la secuencia de proteínas, los análisis de mapeo de masas de péptidos mostraron que de los 11 residuos de Met presentes en *MjFtsZ*, sólo seis se vieron afectados por la exposición a AAPH 10 mM (Figura 3.16.B). Después de 3 horas de incubación, se detectaron altos niveles de oxidación de Met164 y Met58, seguido de la modificación de

Met170 y Met174 (estos residuos se encuentran en el mismo péptido),
Met243 y Met202.

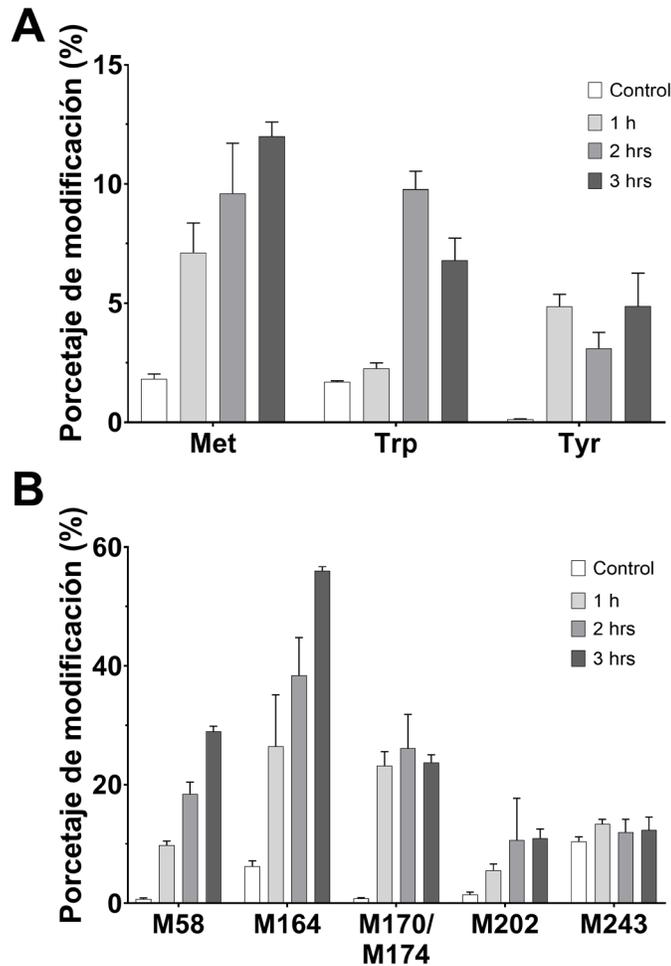


Figura 3.16. Los radicales libres derivados de AAPH inducen modificaciones específicas en los residuos de *MjFtsZ*.

Panel A. Grado de modificación (%) detectado mediante análisis LC-MS/MS de las cadenas laterales de Met, Tyr y Trp en muestras de *MjFtsZ* incubadas con una concentración inicial de 10 mM de AAPH. Los datos corresponden a los cambios en la intensidad de iones m/z específicos (+4, +14, +16, +32) en relación con la suma total de especies detectadas para cada tipo de aminoácido. **Panel B.** Grado de modificación (%) en los residuos de Met individuales en la secuencia de *MjFtsZ* determinada por el mapeo de masas de péptidos tripticos.

4. Discusión

Los estudios destinados a comprender la capacidad de los extremófilos, y en particular de los microorganismos termófilos, para proliferar en condiciones extremas son de gran importancia. Sin embargo, aún no se han reportado datos sobre la susceptibilidad al estrés oxidativo de la maquinaria de división de los termófilos. En este contexto, son de gran relevancia las investigaciones sobre los mecanismos de oxidación de FtsZ. Se describió que la exposición de FtsZ de *Escherichia coli* (*EcFtsZ*), a radicales libres derivados de AAPH da como resultado un entrecruzamiento de proteínas que involucra enlaces di-Tyr, oxidación de Met y pérdida de funcionalidad de la proteína (Escobar-Álvarez y cols., 2017). Además, se demostró que la oxidación de una mutante de esta proteína (Y222W) afecta fuertemente tanto a su actividad de polimerización como a su perfil de oxidación (Escobar-Álvarez y cols., 2017).

Está bien establecido que la oxidación de Tyr y Trp genera radicales; Tyr• y Trp•, respectivamente. Estos pueden reaccionar con O₂ para dar productos oxidación, o dimerizar para dar enlaces di-Tyr o di-Trp (Houée-Lévin y cols., 2015, Carroll y cols., 2017; Figueroa y cols., 2020). Estas especies, cuando se forman entre proteínas (intermolecularmente), contribuyen a la formación

de dímeros covalentes, oligómeros y/o agregados de alta masa molecular. Nuestro modelo de estudio de un microorganismo extremófilo fue *M. jannaschii*. Debido a que la proteína FtsZ de este microorganismo (*MjFtsZ*), posee un único residuo de Tyr y Trp, que están expuestos al solvente (Figura 4.1.A), se planteó que la exposición de *MjFtsZ* a AAPH podría inducir la formación de di-Tyr y/o enlaces di-Trp que impactarían en la función *MjFtsZ*. Como se muestra en la Figura 3.2, la exposición de *MjFtsZ* a AAPH 10 mM afectó fuertemente su actividad de polimerización, dependiente del tiempo de incubación con AAPH. La exposición a 100 mM de AAPH inactivó totalmente la capacidad de polimérica de *MjFtsZ* (Figura 3.2.C). Esto sugiere que la oxidación de *MjFtsZ* modula la formación de oligómeros debido a que disminuye la cantidad de monómeros capaces de polimerizar (Ecuación (1) y (2)). Así, después de 1, 2 y 3 horas de exposición a AAPH, las intensidades LS representaron 86, 30 y 18% del valor inicial. Teniendo en cuenta una concentración inicial de 75 μM de *MjFtsZ* que se expuso a $\text{ROO}\cdot$, la oxidación inactivó $\sim 62 \mu\text{M}$ de *MjFtsZ* después de la incubación por 3 horas con AAPH 10 mM. Como la dosis de radicales libres generados a partir de AAPH por 3 horas a 37 °C es $\sim 144 \mu\text{M}$ (López-Alarcón y cols., 2020), se

puede estimar que el número de moles de ROO• necesarios para inactivar 1 mol de *MjFtsZ* es ~ 2,3 moles.

En comparación, la oxidación de la proteína *EcFtsZ* mediada por ROO• en las mismas condiciones que *MjFtsZ*, afectó la capacidad de polimerización de *EcFtsZ* en un grado significativamente menor, ya que, la oxidación de *EcFtsZ* con 10 mM de AAPH solamente afecta la pendiente de despolimerización que se observa en el perfil de LS (Escobar-Álvarez y cols., 2017). Mientras que, la oxidación descrita aquí para *MjFtsZ* además de producir cambios en la pendiente de despolimerización, también afecta el máximo de LS luego de agregar GTP. Es necesario recordar que existen diferencias significativas en la composición de estas proteínas, que tienen un 44,2 % de identidad según se determina a partir de la comparación de la secuencia primaria de *EcFtsZ* (UniProt ID: P0A9A6) con *MjFtsZ* (UniProt ID: Q57816). Sin embargo, los análisis de CD de *MjFtsZ* mostraron que su estructura secundaria no se alteró significativamente por incubación durante 3 horas con AAPH 10 o 100 mM (Figura 3.3).

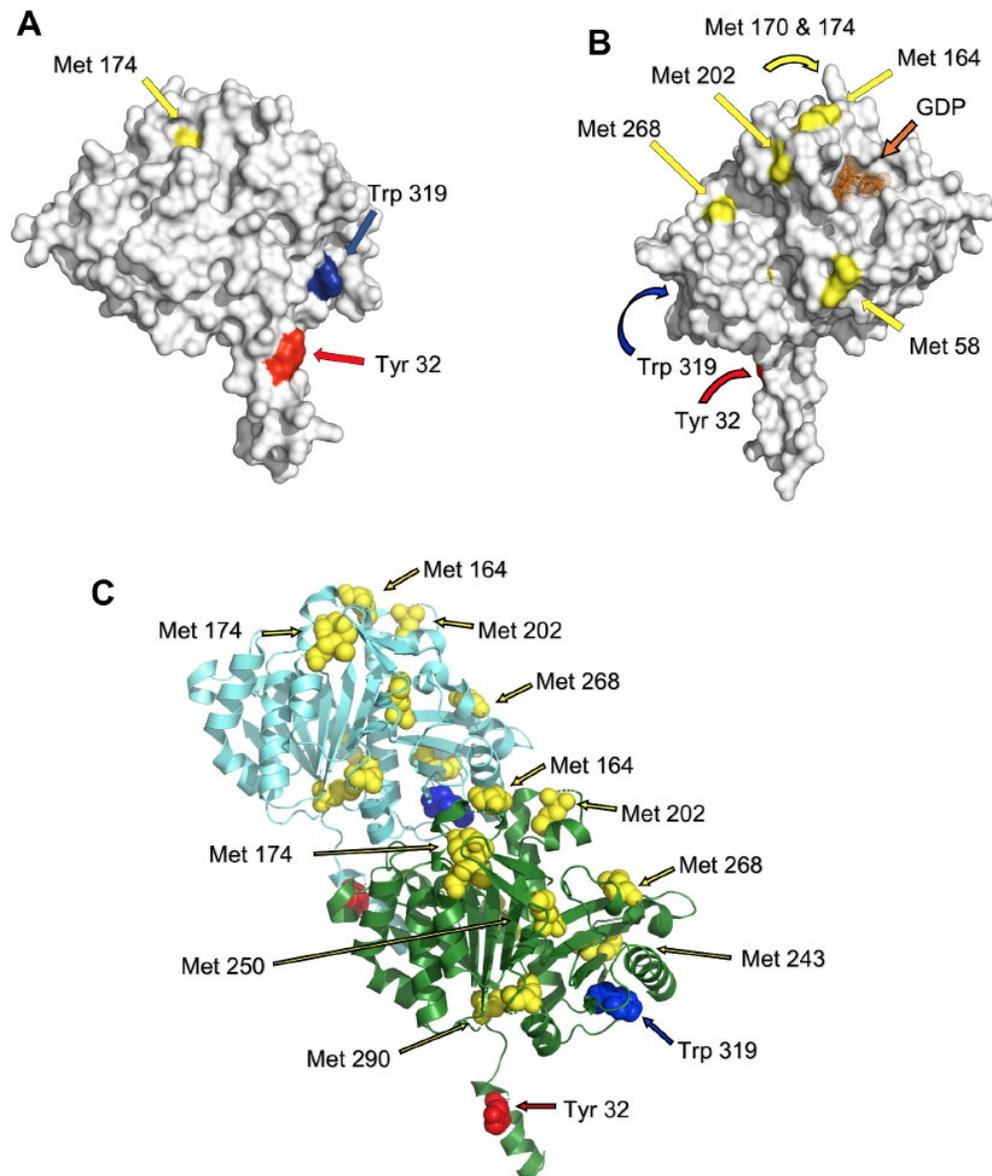


Figura 4.1. Localización de Tyr, Trp y Met en la estructura cristalina del monómero y el dímero de *MjFtsZ*.

Paneles A y B: Ubicación de los residuos de Tyr, Trp y Met en la estructura de *MjFtsZ* (ID de PDB: 2VAP). La superficie del radio de van der Waals de la proteína se muestra en blanco, mientras que Tyr, Trp y Met se indican en rojo, azul y amarillo, respectivamente. Además, se indica la molécula de GDP (naranja) que interactúa con *MjFtsZ*. **Panel C.** Dímero de *MjFtsZ* obtenido de PDB ID: 1W5B. El verde y el cian representan las cadenas A y B de cada monómero, el amarillo, el azul y el rojo representan el radio de van der Waals de los residuos Met, Trp y Tyr, respectivamente.

La evaluación de la oligomerización del monómero, por medio de experimentos de SDS-PAGE mostraron la formación de cantidades limitadas de dímeros *MjFtsZ* con AAPH 10 y 100 mM (Figura 3.4), y agregados de alta masa molecular con AAPH 100 mM (Figura 3.4.B). En condiciones experimentales utilizando 10 mM de AAPH 10 mM, la formación de estos agregados estuvo acompañada por una pérdida modesta de la forma monomérica de *MjFtsZ*. Contrariamente, las incubaciones con 100 mM de AAPH indujeron una pérdida significativa del monómero (Figura 3.5.A) después de 3 horas de incubación. Estos datos están en línea con los resultados obtenidos por SEC, donde no se detectó consumo de monómeros con AAPH 10 mM, pero si una pérdida de ~ 55% con AAPH 100 mM (Figura 3.6). La comparación de estos datos con los ensayos funcionales indica que la pérdida de actividad de *MjFtsZ* no está asociada con cambios en la masa molecular de la proteína (es decir, formación de oligómeros o fragmentos) o grandes cambios en la estructura secundaria.

La cuantificación del consumo de aminoácidos usando HPLC-FL con derivatización de precolumna de OPA mostró un consumo significativo de Tyr y Trp con AAPH 100 mM (Figura 3.7.D), pero sin pérdida de estos residuos con AAPH 10 mM (Figura 3.7.C). Para Tyr, se consumieron $14 \pm$

5,0 μM después de 3 horas de incubación con AAPH 100 mM (Tabla 1), lo que implica una pérdida de solo 0,2 moles de Tyr por mol de *MjFtsZ* (es decir, solo el 20% de las moléculas de proteína tienen un residuo de Tyr modificado). Además, solo se detectaron niveles bajos de DOPA y ninguna di-Tyr con AAPH 100 mM. Estos datos sugieren que el nivel del estado estacionario de Tyr• formado en la proteína es demasiado bajo para las reacciones de dimerización radical-radical significativas, o que las interacciones estéricas o electrónicas entre los monómeros de *MjFtsZ* no favorecen la dimerización. Lo primero puede ser más probable dada la naturaleza aparentemente expuesta del único residuo de Tyr en la estructura de *MjFtsZ* (Figura 4.1A). Los niveles de DOPA detectados son demasiado bajos para explicar el grado de consumo de Tyr, lo que sugiere claramente que se generan otros productos derivados de Tyr (no investigados en la presente tesis), por ejemplo, hidroperóxidos, quinonas o compuestos carbonílicos (Houée-Lévin y cols., 2015).

El consumo de Trp también se cuantificó mediante HPLC-FL, fluorescencia directa y UPLC-MS. Los experimentos de HPLC-FL no mostraron pérdidas marcadas, mientras que esto se detectó por fluorescencia directa y también a través de la formación de producto por UPLC-MS. Las discrepancias entre

estos métodos se atribuyen a la susceptibilidad de los residuos de Trp a la degradación catalizada por ácido durante el procesamiento de la proteína para el análisis por HPLC (Ehrenshaft y cols., 2015). Los estudios de UPLC-MS mostraron, con ambas concentraciones de AAPH, la formación de niveles bajos de Kyn y di-alcoholes derivados de Trp, pero no de NFK. Se detectaron niveles bajos de di-Trp con AAPH tanto 10 como 100 mM (Figura 3.11.F), lo que probablemente explica la formación de dímeros *MjFtsZ* (y especies superiores) por SDS-PAGE.

Estos resultados indican que el único residuo de Trp (Trp319) en *MjFtsZ* sufre oxidación de un electrón para generar Trp^\bullet , que reacciona principalmente con O_2 para producir productos oxigenados, y en menor grado a través de reacciones radical-radical para generar dímeros di-Trp. Al igual que Tyr, la concentración de los productos detectados fue demasiado baja para explicar el grado de consumo del aminoácido (Figura 3.8), lo que sugiere que se forman otras especies (por ejemplo, hidroperóxidos) (Silva y cols., 2019; Gracanin y cols., 2019).

En contraste con los datos anteriores para Tyr y Trp, se detectó una pérdida extensa de Met para *MjFtsZ* expuesta a ambas concentraciones de AAPH (10 y 100 mM, Figura 3.7.C y 3.7.D). Este consumo correspondió a la formación

de MetSO (Figura 3.9). Con AAPH 10 mM, se inactivaron $\sim 61 \mu\text{M}$ de *MjFtsZ* y se consumieron 1,5 moles de Met por mol de *MjFtsZ* (Tabla 1). Estos datos indican que la modificación de los residuos de Met pueden afectar notablemente a la actividad de polimerización de *MjFtsZ*. Con AAPH 100 mM, se observó un mayor consumo de Met, aunque esto no se correlacionó linealmente con el mayor flujo de radicales (10 veces), con solo 2,8 moles de Met consumidos por mol de *MjFtsZ* en estas condiciones (Tabla 1). A una concentración de 10 mM de AAPH, la mayoría de los radicales generados reaccionan con Met, lo que se infiere por el consumo de 0,8 moles de Met por mol de radical generado. Tal estimación permite deducir que los $\text{ROO}\cdot$ son los oxidantes dominantes en estas condiciones, descartándose una tasa importante de reacciones mediadas por otras especies reactivas generadas desde AAPH (López-Alarcón y cols., 2020). Para la condición de AAPH 100 mM, sólo se consumieron 0,15 moles de Met por mol de radicales derivados de AAPH. Una mayor contribución de la dimerización directa de los radicales AAPH, en lugar de la reacción con la proteína, puede contribuir a esta diferencia. Con estas condiciones elevadas de AAPH, la actividad polimérica de *MjFtsZ* se pierde totalmente y se detectó un alto consumo de monómeros (Figuras 3.2.C, 3.4.B y 3.6.B).

Para examinar el papel potencial de la generación de nuevos grupos carbonilos en la pérdida observada de la actividad de *MjFtsZ* y el entrecruzamiento de proteínas (a través de la posible formación de bases de Schiff), estos productos se cuantificaron utilizando el ensayo DNPH (Hawkins y cols., 2009). Los valores detectados para la formación de carbonilos (Figura 3.13), son consistentes con la reacción adicional de estos grupos con, por ejemplo, nucleófilos tales como residuos de Lys, para dar entrecruzamientos de proteínas covalentes. Desafortunadamente, existe una gran variabilidad en la cuantificación de residuos de Lys utilizando el método HPLC-FL, lo que impide una cuantificación precisa de su consumo. Sin embargo, el bajo rendimiento global de carbonilos, y particularmente la ausencia de niveles significativos de estos productos en las incubaciones de AAPH 10 mM en los primeros tiempos (Figura 3.12.A), indica que estas especies no están directa o indirectamente asociadas con la pérdida de actividad de *MjFtsZ*.

Para obtener información adicional sobre el papel de la oxidación de Met en la modulación de la actividad de *MjFtsZ*, se expusieron proteínas a cloramina T, un oxidante con una alta selectividad por los residuos de Met (Shechter y cols., 1975). La exposición de *MjFtsZ* a cloramina T 0,1 mM indujo el

consumo de 3,6 moles de Met por mol de *MjFtsZ*, sin embargo, en esta condición, no se observaron cambios en las actividades de polimerización-despolimerización de *MjFtsZ* (Figura 3.14). La comparación de estos resultados con los obtenidos con ROO• indicaría que los residuos de Met afectados por cloramina T 0,1 mM no son los mismos que los oxidados por ROO•. Esto último probablemente se explica por las diferencias de sus estructuras químicas y reactividades. No obstante, la cloramina T a 1 y 10 mM, donde se modificaron 4,8 y 7,6 moles de Met por mol de *MjFtsZ* (Figura 3.15.D). Estas modificaciones afectaron fuertemente a los perfiles de polimerización-despolimerización (Figura 3.14). En estas condiciones, se observaron cambios en el perfil de polimerización, junto a una permanente estabilidad de los polímeros de *MjFtsZ*, en el tiempo de medición. Estos datos sugieren que los residuos de Met no solo son relevantes para la polimerización de los monómeros *MjFtsZ*, sino que también pueden inhibir la actividad GTPasa de *MjFtsZ*. Por lo tanto, nuestros resultados apoyan firmemente un papel fundamental de los residuos de Met en la función de *MjFtsZ* y excluyen un papel significativo de los residuos de Tyr y Trp en la determinación de la velocidad y extensión del proceso de polimerización-despolimerización.

El análisis UPLC-MS de las modificaciones oxidativas, provocadas por ROO• (Figura 3.16), comprueba la relevancia de la oxidación de los residuos de Met. Los resultados de UPLC-MS mostraron un alto grado de oxidación de este residuo ($m/z +16$) principalmente en las posiciones 164 y 58. Met164 (así como Met174, Met202 y Met243) se encuentra en la zona de interacción de los monómeros de *MjFtsZ*, para producir dímeros y filamentos (Figura 4.1.C). Este análisis indica que Met164 es un residuo clave en el ciclo de polimerización y despolimerización de *MjFtsZ*, y su oxidación explicaría la inactivación de *MjFtsZ* mediada por ROO•.

Considerando que la actividad GTPasa de *MjFtsZ* es inducida por su polimerización, debido a que las interacciones entre los monómeros *MjFtsZ* conforman el sitio activo para la hidrólisis de GTP (Sossong y cols. 1999; Erickson y cols., 2010), una pérdida en la capacidad polimérica de *MjFtsZ* afectará su actividad GTPasa. La oxidación de Met164 o los cambios fisicoquímicos producidos en la superficie de interacción entre los monómeros podrían explicar los cambios observados en el perfil de polimerización/despolimerización observados en la proteína *MjFtsZ* oxidada. Además, Met164 se encuentra cerca de la cavidad donde el GTP/GDP interactúa con la proteína *MjFtsZ*. La distancia estimada entre el carbono alfa

de Met164 y el anillo de guanina de GDP es 12,4 Å, (Figura 4.1.B). La posición y distancia entre Met164 y el anillo de guanina de GDP (Figura 4.1.B), indica que no hay contacto directo entre estos residuos (al menos en el cristal de *MjFtsZ*), pero es probable que las perturbaciones en el ambiente local alrededor del residuo Met164 que surge de su conversión en MetSO, el cual es más voluminoso e hidrófilo, de lugar a perturbaciones en el sitio de unión GTP/GDP vecino, lo que nos permite postular que la oxidación de Met164 podría explicar los cambios observados experimentalmente en la actividad polimérica de *MjFtsZ*. Sin embargo, esto no excluye posibles papeles de los residuos de Met en la posición 58, 170, 174, 202 y 243 en la determinación de la función y actividad de *MjFtsZ*.

En un contexto general, los resultados presentados indican que, a pesar de la presencia en *MjFtsZ* de residuos de Trp y Tyr expuestos al solvente (Figura 4.1.A), la oxidación en estos residuos no es responsable en gran medida de la pérdida de actividad inducida por AAPH. En contraste, los datos obtenidos apoyan que algunos residuos de Met son críticos (Figura 4.1.A y 4.1.B) para la actividad de la proteína, cuya oxidación es una vía clave que conduce a cambios en la función de *MjFtsZ*. En particular, postulamos que la oxidación de Met164, que participa en interacciones longitudinales monómero-

monómero (Figura 4.1.B) y está muy cerca del sitio de unión de GTP (Figura 4.1.B), modula la función biológica de *MjFtsZ*.

5. Resumen de resultados y conclusiones

1. La oxidación de *MjFtsZ* mediada por $\text{ROO}\cdot$ induce una pérdida de la actividad polimérica de *MjFtsZ*.
2. La exposición de *MjFtsZ* a radicales $\text{ROO}\cdot$ derivados de AAPH inducen la generación de dímeros y agregados covalentes de mayor masa molecular.
3. La oxidación del residuo de Trp participa en la dimerización de *MjFtsZ*.
4. Los residuos de aminoácidos de *MjFtsZ* afectados por los radicales $\text{ROO}\cdot$ son Met, Trp y Tyr.
5. La oxidación del residuo Met164 es crítico para la inactivación de la actividad polimérica.

6. Proyecciones.

Este trabajo logró determinar que la oxidación de la proteína FtsZ, del organismo termófilo *M. jannaschii* (*MjFtsZ*), afecta fuertemente su actividad polimérica. Esta alteración oxidativa de la actividad es mayor que la descrita para la proteína FtsZ del organismo mesófilo *E. coli* (*EcFtsZ*) (Escobar-Álvarez y cols., 2017). Por tal motivo es esperable que la caracterización de una proteína FtsZ de un microorganismo psicrófilo permitirá comprender si estos cambios en su capacidad polimérica son compartidos por ambos tipos de organismos extremófilos (termófilos y psicrófilos).

Además, este trabajo permitió comprender que los residuos que normalmente se consideran importantes desde una perspectiva redox, como lo son Trp y Tyr, no poseen una papel relevante en los procesos oxidativos que afectan la actividad polimérica de la proteína *MjFtsZ*. Contrariamente, la oxidación de residuos de Met (aminoácido propuesto como protector frente a oxidantes), se traduce en alteraciones importantes de la actividad polimérica de FtsZ. La comprensión de la(s) razón(es) que llevan a que FtsZ de mesófilos, termófilos y extremófilos en general, contengan a pesar de su evolución, residuos

altamente oxidables como son Tyr y Trp es también una proyección de este trabajo.

7. Referencias

- Annibal, A., Colombo, G., Milzani, A., Dalle-Donne, I., Fedorova, M., & Hoffmann, R. (2016). Identification of dityrosine cross-linked sites in oxidized human serum albumin. *Journal of Chromatography B*, 1019, 147-155.
- Argos, P., Rossmann, M., Grau, U., Zuber, H., Frank, G., & Tratschin, J. (2002). Thermal stability and protein structure. *Biochemistry*, 18(25), 5698–5703.
- Beblo, K., Douki, T., Schmalz, G., Rachel, R., Wirth, R., Huber, H., Reitz, G. & Rettberg, P. (2011). Survival of thermophilic and hyperthermophilic microorganisms after exposure to UV-C, ionizing radiation and desiccation. *Archives of microbiology*, 193(11), 797-809.
- Bennett, B. D., Kimball, E. H., Gao, M., Osterhout, R., Van Dien, S. J., & Rabinowitz, J. D. (2009). Absolute metabolite concentrations and implied enzyme active site occupancy in *Escherichia coli*. *Nature chemical biology*, 5(8), 593-599.
- Bernander, R., & Ettema, T. (2010). FtsZ-less cell division in archaea and bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, 13(6), 747–752.
- Bisson-Filho, A. W., Hsu, Y. P., Squyres, G. R., Kuru, E., Wu, F., Jukes, C., Sun, Y., Dekker, C., Holden, S., Vannieuwenhze, M. S., Brun, Y. V. & Garner, E. C. (2017). Treadmilling by FtsZ filaments drives peptidoglycan synthesis and bacterial cell division. *Science*, 355(6326), 739-743.
- Bowers, K. J., & Wiegel, J. (2011). Temperature and pH optima of extremely halophilic archaea: a mini-review. *Extremophiles*, 15(2), 119-128.
- Buddelmeijer, N., & Beckwith, J. (2002). Assembly of cell division proteins at the *E. coli* cell center. *Current opinion in microbiology*, 5(6), 553-557.
- Buske, P. J., & Levin, P. A. (2012). Extreme C terminus of bacterial cytoskeletal protein FtsZ plays fundamental role in assembly independent of modulatory proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 287(14), 10945-10957.

- Cabiscol Català, E., Tamarit Sumalla, J., & Ros Salvador, J. (2000). Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *International Microbiology*, 2000, vol. 3, núm. 1, p. 3-8.
- Candeias, L. P., Wardman, P., & Mason, R. P. (1997). The reaction of oxygen with radicals from oxidation of tryptophan and indole-3-acetic acid. *Biophysical chemistry*, 67(1-3), 229-237.
- Carpenter JF, Clegg JS, Crowe JH, Somero GiN (1993): Compatible solutes and macromolecular stability. *Cryobiology*, 30:201-241.
- Carroll, L., Pattison, D. I., Davies, J. B., Anderson, R. F., Lopez-Alarcon, C., & Davies, M. J. (2017). Formation and detection of oxidant-generated tryptophan dimers in peptides and proteins. *Free Radical Biology and Medicine*, 113, 132-142.
- Concha-Marambio, L., Maldonado, P., Lagos, R., Monasterio, O., & Montecinos-Franjola, F. (2017). Thermal adaptation of mesophilic and thermophilic FtsZ assembly by modulation of the critical concentration. *PLOS ONE*, 12(10), e0185707.
- Davies, M. J. (2016). Protein oxidation and peroxidation. *Biochem J*, 473(7), 805-825.
- den Blaauwen, T., Andreu, J. M., & Monasterio, O. (2014). Bacterial cell division proteins as antibiotic targets. *Bioorganic chemistry*, 55, 27-38.
- Díaz-Espinoza, R., Garcés, A., Arbildua, J., Montecinos, F., Brunet, J., Lagos, R., & Monasterio, O. (2007). Domain folding and flexibility of *Escherichia coli* FtsZ determined by tryptophan site-directed mutagenesis. *Protein Science*, 16(8), 1543–1556.
- Du, S., & Lutkenhaus, J. (2014). SlmA antagonism of FtsZ assembly employs a two-pronged mechanism like MinCD. *PLoS Genet*, 10(7), e1004460.
- Du, S., & Lutkenhaus, J. (2017). Assembly and activation of the *Escherichia coli* divisome. *Molecular Microbiology*, 105(2), 177–187.
- Du, S., & Lutkenhaus, J. (2019). At the heart of bacterial cytokinesis: The Z ring. *Trends in microbiology*, 27(9), 781-791.
- Edwards, K. J., Bond, P. L., Gihring, T. M., & Banfield, J. F. (2000). An archaeal iron-oxidizing extreme acidophile important in acid mine drainage. *Science*, 287(5459), 1796-1799.

- Erickson, H. P. (1997). FtsZ, a tubulin homologue in prokaryote cell division. *Trends in cell biology*, 7(9), 362-367.
- Erickson, H., Anderson, D., & Osawa, M. (2010). FtsZ in Bacterial Cytokinesis: Cytoskeleton and Force Generator All in One. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(4), 504–528.
- Escobar-Álvarez, E., Leinisch, F., Araya, G., Monasterio, O., Lorentzen, L. G., Silva, E., Davies, M. J., & López-Alarcón, C. (2017). The peroxy radical-induced oxidation of *Escherichia coli* FtsZ and its single tryptophan mutant (Y222W) modifies specific side-chains, generates protein cross-links and affects biological function. *Free Radical Biology and Medicine*, 112, 60-68.
- Ehrenshaft, M., Deterding, L. J., & Mason, R. P. (2015). Tripping up Trp: Modification of protein tryptophan residues by reactive oxygen species, modes of detection, and biological consequences. *Free Radical Biology and Medicine*, 89, 220-228.
- Figueroa, J. D., Zárate, A. M., Fuentes-Lemus, E., Davies, M. J., & López-Alarcón, C. (2020). Formation and characterization of crosslinks, including Tyr–Trp species, on one electron oxidation of free Tyr and Trp residues by carbonate radical anion. *RSC Advances*, 10(43), 25786-25800.
- Fuentes-Lemus, E., Silva, E., Leinisch, F., Dorta, E., Lorentzen, L. G., Davies, M. J., & López-Alarcón, C. (2018). α - and β -casein aggregation induced by riboflavin-sensitized photo-oxidation occurs via di-tyrosine cross-links and is oxygen concentration dependent. *Food chemistry*, 256, 119-128.
- Fuentes-Lemus, E., Silva, E., Barrias, P., Aspee, A., Escobar, E., Lorentzen, L. G., Carroll, L., Leinisch, F., Davies, M. J. & López-Alarcón, C. (2018-2). Aggregation of α - and β -caseins induced by peroxy radicals involves secondary reactions of carbonyl compounds as well as di-tyrosine and di-tryptophan formation. *Free Radical Biology and Medicine*, 124, 176-188.
- Fuentes-Lemus, E., Mariotti, M., Häggglund, P., Leinisch, F., Fierro, A., Silva, E., Davies, M. J. & López-Alarcón, C. (2021). Oxidation of lysozyme induced by peroxy radicals involves amino acid modifications, loss of activity, and formation of specific crosslinks. *Free Radical Biology and Medicine*, 167, 258-270.

- Gracanin, M., Hawkins, C. L., Pattison, D. I., & Davies, M. J. (2009). Singlet-oxygen-mediated amino acid and protein oxidation: formation of tryptophan peroxides and decomposition products. *Free radical biology and medicine*, 47(1), 92-102.
- Haga, T., Abe, T., & Kurokawa, M. (1974) Polymerization and depolymerization of microtubules *in vitro* as studied by flow birefringence. *FEBS Letter* 39(3), 291-295.
- Harry, E. J. (2001). Bacterial cell division: regulating Z-ring formation. *Molecular microbiology*, 40(4), 795-803.
- Hawkins, C. L., & Davies, M. J. (2001). Generation and propagation of radical reactions on proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1504(2-3), 196-219.
- Hawkins, C. L., & Davies, M. J. (2005). The role of aromatic amino acid oxidation, protein unfolding, and aggregation in the hypobromous acid-induced inactivation of trypsin inhibitor and lysozyme. *Chemical research in toxicology*, 18(11), 1669-1677.
- Hawkins, C. L., Morgan, P. E., & Davies, M. J. (2009). Quantification of protein modification by oxidants. *Free Radical Biology and Medicine*, 46(8), 965-988
- Hägglund, P., Mariotti, M., & Davies, M. J. (2018). Identification and characterization of protein cross-links induced by oxidative reactions. *Expert review of proteomics*, 15(8), 665-681.
- Hendry, P. (2006). Extremophiles: there's more to life. *Environmental Chemistry*, 3(2), 75-76.
- Hiscox, M. J., Driesener, R. C., & Roach, P. L. (2012). Enzyme catalyzed formation of radicals from S-adenosylmethionine and inhibition of enzyme activity by the cleavage products. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1824(11), 1165-1177.
- Houée-Lévin, C., Bobrowski, K., Horakova, L., Karademir, B., Schöneich, C., Davies, M. J., & Spickett, C. M. (2015). Exploring oxidative modifications of tyrosine: an update on mechanisms of formation, advances in analysis and biological consequences. *Free radical research*, 49(4), 347-373.
- Huecas, S., Ramírez-Aportela, E., Vergoñós, A., Núñez-Ramírez, R., Llorca, O., Díaz, J. F., Juan-Rodríguez, D., Oliva M. A., Castellen, P. & Andreu, J. M. (2017). Self-Organization of FtsZ Polymers in

Solution Reveals Spacer Role of the Disordered C-Terminal Tail. *Biophysical journal*, 113(8), 1831-1844.

- Hurley, K. A., Santos, T. M., Nepomuceno, G. M., Huynh, V., Shaw, J. T., & Weibel, D. B. (2016). Targeting the bacterial division protein FtsZ. *Journal of medicinal chemistry*, 59(15), 6975-6998.
- Jones, W. J., Leigh, J. A., Mayer, F., Woese, C. R., & Wolfe, R. S. (1983). *Methanococcus jannaschii* sp. nov., an extremely thermophilic methanogen from a submarine hydrothermal vent. *Archives of Microbiology*, 136(4), 254-261.
- Kato, C., Li, L., Nogi, Y., Nakamura, Y., Tamaoka, J., & Horikoshi, K. (1998). Extremely barophilic bacteria isolated from the Mariana Trench, Challenger Deep, at a depth of 11,000 meters. *Applied and environmental microbiology*, 64(4), 1510-1513.
- Kashefi, K., & Lovley, D. R. (2003). Extending the upper temperature limit for life. *Science*, 301(5635), 934-934.
- Kohshima, S. (1984). A novel cold-tolerant insect found in a Himalayan glacier. *Nature*, 310(5974), 225.
- Krupka, M., & Margolin, W. (2018). Unite to divide: Oligomerization of tubulin and actin homologs regulates initiation of bacterial cell division. *F1000Research*, 7.
- Leinisch, F., Mariotti, M., Rykaer, M., Lopez-Alarcon, C., Hägglund, P., & Davies, M. J. (2017). Peroxyl radical-and photo-oxidation of glucose 6-phosphate dehydrogenase generates cross-links and functional changes via oxidation of tyrosine and tryptophan residues. *Free Radical Biology and Medicine*, 112, 240-252.
- Levine, R. L., Moskovitz, J., & Stadtman, E. R. (2000). Oxidation of methionine in proteins: roles in antioxidant defense and cellular regulation. *IUBMB life*, 50(4-5), 301-307
- López-Alarcón, C., Fuentes-Lemus, E., Figueroa, J. D., Dorta, E., Schöneich, C., & Davies, M. J. (2020). Azocompounds as generators of defined radical species: Contributions and challenges for free radical research. *Free Radical Biology and Medicine*, 160, 78-91.
- Löwe, J., & Amos, L. A. (1998). Crystal structure of the bacterial cell-division protein FtsZ. *Nature*, 391(6663), 203.
- Lu, C., Stricker, J., & Erickson, H. P. (1998). FtsZ from *Escherichia coli*, *Azotobacter vinelandii*, and *Thermotoga maritima*—quantitation,

GTP hydrolysis, and assembly. *Cell motility and the cytoskeleton*, 40(1), 71-86.

- Lutkenhaus, J. (2007). Assembly dynamics of the bacterial MinCDE system and spatial regulation of the Z ring. *Annu. Rev. Biochem.*, 76, 539-562.
- Lutkenhaus, J., Pichoff, S., & Du, S. (2012). Bacterial cytokinesis: From Z ring to divisome. *Cytoskeleton*, 69(10), 778–790.
- Mukherjee, A., & Lutkenhaus, J. (1999). Analysis of FtsZ assembly by light scattering and determination of the role of divalent metal cations. *Journal of Bacteriology*, 181(3), 823-832.
- Niki, E. (1990). Free radical initiators as source of water- or lipid-soluble peroxy radicals. *Methods in Enzymology*, 3, 100–108.
- Piette, F., Struvay, C., & Feller, G. (2011). The protein folding challenge in psychrophiles: facts and current issues. *Environmental Microbiology*, 13(8), 1924–1933.
- Pikuta, E., Hoover, R., & Tang, J. (2008). Microbial Extremophiles at the Limits of Life. *Critical Reviews in Microbiology*, 33(3), 183–209.
- Rico, A. I., Krupka, M., & Vicente, M. (2013). In the beginning, *Escherichia coli* assembled the proto-ring: an initial phase of division. *Journal of Biological Chemistry*, 288(29), 20830-20836.
- Silva, E., Barrias, P., Fuentes-Lemus, E., Tirapegui, C., Aspee, A., Carroll, L., Davies, M. J. & López-Alarcón, C. (2019). Riboflavin-induced Type 1 photo-oxidation of tryptophan using a high intensity 365 nm light emitting diode. *Free Radical Biology and Medicine*, 131, 133-143.
- Shechter, Y., Burstein, Y., & Patchornik, A. (1975). Selective oxidation of methionine residues in proteins. *Biochemistry*, 14(20), 4497-4503.
- Scheffers, D. J., de Wit, J. G., den Blaauwen, T., & Driessen, A. J. (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.
- Schöneich, C. (2005). Methionine oxidation by reactive oxygen species: reaction mechanisms and relevance to Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1703(2), 111-119.

- Schumacher, M. A., & Zeng, W. (2016). Structures of the nucleoid occlusion protein SlmA bound to DNA and the C-terminal domain of the cytoskeletal protein FtsZ. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(18), 4988-4993.
- Schumacher, M. A., Huang, K. H., Zeng, W., & Janakiraman, A. (2017). Structure of the Z ring-associated protein, ZapD, bound to the C-terminal domain of the tubulin-like protein, FtsZ, suggests mechanism of Z ring stabilization through FtsZ cross-linking. *Journal of Biological Chemistry*, 292(9), 3740-3750.
- Siddiqui, K., & Cavicchioli, R. (2006). Cold-Adapted Enzymes. *Biochemistry*, 75(1), 403–433.
- Sossong, T. M., Brigham-Burke, M. R., Hensley, P., & Pearce, K. H. (1999). Self-activation of guanosine triphosphatase activity by oligomerization of the bacterial cell division protein FtsZ. *Biochemistry*, 38(45), 14843-14850.
- Susanti, D., Frazier, M. C., & Mukhopadhyay, B. (2019). A Genetic System for *Methanocaldococcus jannaschii*: An Evolutionary Deeply Rooted Hyperthermophilic Methanarchaeon. *Frontiers in microbiology*, 10, 1256.
- Szwedziak, P., Wang, Q., Bharat, T. A., Tsim, M., & Löwe, J. (2014). Architecture of the ring formed by the tubulin homologue FtsZ in bacterial cell division. *Elife*, 3, e04601.
- Robbins, L. J., & Konhauser, K. O. (2020). Geobiology and Geomicrobiology. *Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences*.
- Ronsein, G. E., de Oliveira, M. C. B., de Medeiros, M. H. G., & Di Mascio, P. (2011). Mechanism of dioxindolylalanine formation by singlet molecular oxygen-mediated oxidation of tryptophan residues. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 10(11), 1727-1730.
- Takai, K., Moser, D. P., Onstott, T. C., Spoelstra, N., Pfiffner, S. M., Dohnalkova, A., & Fredrickson, J. K. (2001). *Alkaliphilus transvaalensis* gen. nov., sp. nov., an extremely alkaliphilic bacterium isolated from a deep South African gold mine. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(4), 1245-1256.
- Timasheff. (1993). The Control of Protein Stability and Association by Weak Interactions with Water: How Do Solvents Affect These

Processes? *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 22(1), 67–97.

- Vázquez, S., Truscott, R. J., Richard, A. J., Weimann, A., & Sheil, M. M. (2001). A study of kynurenine fragmentation using electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 12(7), 786-794.
- Vicente, M., & Rico, A. I. (2006). The order of the ring: assembly of *Escherichia coli* cell division components. *Molecular microbiology*, 61(1), 5-8.
- Vogt, G., Woell, S., & Argos, P. (1997). Protein thermal stability, hydrogen bonds, and ion pairs. *Journal of Molecular Biology*, 269(4), 631–643.
- Woldringh, C. L. (2002). The role of co-transcriptional translation and protein translocation (transertion) in bacterial chromosome segregation. *Molecular microbiology*, 45(1), 17-29.
- Yang, X., Lyu, Z., Miguel, A., McQuillen, R., Huang, K. C., & Xiao, J. (2017). GTPase activity–coupled treadmilling of the bacterial tubulin FtsZ organizes septal cell wall synthesis. *Science*, 355(6326), 744-747.
- Zhu, W., Reich, C. I., Olsen, G. J., Giometti, C. S., & Yates, J. R. (2004). Shotgun proteomics of *Methanococcus jannaschii* and insights into methanogenesis. *Journal of proteome research*, 3(3), 538-548.