

UCH- FC  
Doc. Micado b.  
M 773  
C. 1

**UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE POSTGRADO**



**ENSAMBLAJE, DESPLEGAMIENTO Y  
CAMBIOS CONFORMACIONALES DE LA PROTEÍNA  
*FtsZ de Escherichia coli***

**Tesis entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento  
parcial de los requisitos para optar al grado de**

**Doctor en Ciencias con Mención en Microbiología**

**Por**

**FELIPE ANTONIO MONTECINOS FRANJOLA**

**Junio, 2012**

**Director de Tesis Dr. Octavio Monasterio Opazo**

**Co-Directora de Tesis Dra. Rosalba Lagos Mónico**



**UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE POSTGRADO**



**INFORME DE APROBACIÓN  
TESIS DE DOCTORADO**

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato.

**FELIPE ANTONIO MONTECINOS FRANJOLA**

Ha sido aprobada por la comisión de evaluación de la Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Microbiología, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 28 de Junio del año 2012

Director de Tesis

**Dr. Octavio Monasterio Opazo**

Co - Directora de Tesis

**Dra. Rosalba Lagos Mónaco**

Comisión de Evaluación de la Tesis

**Dr. Víctor Cifuentes (Presidente)**

**Dr. Claudio Vásquez**

**Dr. Eugenio Spencer**

**Dr. Juan Brunet**

*[Handwritten signatures in blue ink over horizontal lines]*

I have been thinking about you a great deal lately  
 and wondering how you are getting on. I hope  
 you are well and happy. I have been very busy  
 lately with my work, but I always find time  
 to think of those I love. Please write back  
 when you have a chance and let me hear from  
 you. I would love to hear all the news.  
 Give my love to all the family and hope  
 to see you all soon. I am always  
 thinking of you and missing you.  
 Love,  
 Your affectionate husband,  
 [Name]

*Dedicado a mi esposa Maquita y a mi mascota Mini*  
*a quienes amo con todo mi corazón*

## Biografía



Nací el viernes 11 de septiembre del año 1981. Ingresé al Colegio Alonso de Ercilla ubicado en la comuna de Santiago en el año 1986, donde cursé educación básica y educación media sin mayores contratiempos. Durante mi estadía en el "Alonso" participé en varias actividades de todo tipo, actividades académicas y deportivas, fui seleccionado de atletismo y rugby donde hice grandes amigos. Aún recuerdo a los profesores y entrenadores gritando y dándonos instrucciones y reprimendas, pero más que todo motivándonos a que dar lo mejor de cada uno. También participé en otras actividades, como delegaciones de curso, alianzas con otros colegios, talleres de teatro, etc. Fue una gran etapa de mi vida y guardo los mejores recuerdos. En el año 2000, ingresé a la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular en la Facultad de Ciencias. La mejor decisión que he tomado en mi vida, la etapa en donde pude dedicarme en plenitud a lo que más me gusta, estudiar, carretear, indagar, buscar y encontrar. Durante este tiempo hice grandes amigos y crecí como persona. El resultado es que ingresé al programa de doctorado en Ciencias con mención en Microbiología buscando profundizar mis conocimientos, ampliar mis capacidades y conocer más gente interesante del ámbito universitario. Creo que he logrado mis objetivos pues he conocido una multitud de gente maravillosa y he ganado un gran capital intelectual que espero cosechar para entregarle cosas buenas a la gente que me rodea y por sobre todo a mi país. Aún me queda un gran camino por recorrer y espero ser un aporte.

## **Agradecimientos**

En primer lugar quiero agradecer a mis tutores Dra. Rosalba Lagos y Dr. Octavio Monasterio por entregarme una guía científica extraordinaria y por entregarme apoyo emocional, intelectual y económico durante mi estadía en el laboratorio. Gracias a ellos he podido dar cumplimiento a los objetivos de esta Tesis y también a algunos de los objetivos de mi vida personal.

A través de los profesores Rosalba y Octavio conocí a otros científicos de elite que han jugado un rol fundamental en mi formación científica y en mi decisión de seguir el camino académico. Quiero agradecer al profesor Juan Brunet por facilitarme el uso de su instrumento de fluorescencia ISS K2. A la Dra. Susana Sánchez quien me enseñó los aspectos fundamentales del FCS y del uso de los instrumentos relacionados. A los Drs. Claudio Vásquez, Eugenio Spencer, y Víctor Cifuentes por su contribución al mejoramiento de mi Tesis.

Quiero agradecer especialmente al gran Dr. David M. Jameson por su guía científica sin igual, por su buen humor y seriedad en la investigación. Al Dr. Enrico Gratton por permitirme usar sus instalaciones para los estudios de FCS (junto a Susana Sánchez), a los Drs. Justin Ross y Nick James por su colaboración en los estudios de fluorescencia resuelta en el tiempo y toda la gente que conocí en mis estadías en los laboratorios de la Universidad de California-Irvine y Universidad de Hawaii-Manoa. Agradezco a los Drs. Mauricio Baez y Ricardo Cabrera por su colaboración científica en algunos experimentos de mi Tesis.

Quiero agradecer la compañía de mis amigos y familia en esta etapa, y especialmente a mi esposa Maquita y a toda su familia maravillosa. Quiero agradecer a todos los amigos del Laboratorio de Biología Estructural y Molecular que me han ayudado e inspirado para llevar adelante el desarrollo de esta Tesis. Agradezco especialmente a Maquita Collao y "Don" Pedro Núñez quienes fueron dos pilares importantísimos en el desarrollo de mi trabajo de Tesis

Finalmente, agradezco el apoyo financiero de la Facultad de Ciencias y al programa de Doctorado en Microbiología por el primer año de mi doctorado con una beca MECESUP (2007). Agradezco a CONICYT Becas de Doctorado Nacional por el financiamiento durante el período 2008-2011, y por el financiamiento de Apoyo Tesis #24090139 durante el período 2009-2010, a Becas-Chile por el financiamiento a mi pasantía a la Universidad de California-Irvine el año 2009, a MECESUP por el financiamiento a mi pasantía a la Universidad de Hawaii-Manoa durante el año 2011 y a CONICYT nuevamente por el financiamiento al congreso internacional Weber en Buenos Aires, Argentina.

## **Cursos, pasantías, presentaciones en reuniones científicas y publicaciones relacionadas con esta Tesis**

### **Cursos**

1. Enero 2007. **Principios de Fluorescencia: Teoría y aplicaciones.** Instituto de Química, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso.
2. Enero 2008. **Advanced Bacterial Genetics: Genetics and Physiology of Bacterial Membrane Proteins.** Universidad Andrés Bello.
3. Enero 2009. **Análisis Estructural de Proteínas Mediante Técnicas de Microscopía Electrónica y Procesamiento de Imágenes: Teoría y Aplicaciones.** Escuela de Postgrado, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
4. Octubre 2009. **Advanced Fluorescence Imaging and Dynamics.** Laboratory for Fluorescence Dynamics, University of California at Irvine.
5. Octubre 2011. **School of Optics and Photonics. Center for Optics and Photonics.** Universidad de Concepción.
6. Noviembre 2011. **Molecular Crowding, Quantitative Studies: Tracer Sedimentation Equilibrium and Static Light Scattering.** Escuela de Postgrado, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

### **Pasantías**

1. Octubre 2009 – Enero 2010. **Estudios del Equilibrio de Desplegamiento de FtsZ Mediante Espectroscopía de Fluorescencia de Correlación.** Laboratory for Fluorescence Dynamics, University of California at Irvine.
2. Enero 2011 – Abril 2011. **Caracterización del Equilibrio de Autoasociación de FtsZ silvestre y las mutantes F40W, Y222W y F275W.** Department of Cell and Molecular Biology, John A. Burns School of Medicine, University of Hawaii at Manoa.

### **Presentaciones en Reuniones Científicas**

1. Noviembre 2007. **Caracterización Funcional *In Vitro* de la Mutante Y222W Localizada en la Interfase Interdominio de FtsZ de *E. coli*.** Charla en la Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Chile, Pucón - Chile.
2. Noviembre 2008. **Estabilidad Conformacional del Dímero de FtsZ Silvestre y de las Mutantes Puntuales F40W y Y222W de *E. coli*.** Charla en la Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Chile, Pucón - Chile.

3. Noviembre 2009. **Fluorescencia Intrínseca de Mutantes Puntuales de FtsZ de *E. coli***. Poster en XXVIII Conferencias Chilenas de Química. Termas de Chillán - Chile.
4. Octubre 2010. **The First Steps in *E. coli* FtsZ Polymerization**. Poster en III Latin American Protein Society Meeting. Salta - Argentina.
5. Noviembre 2010. **Análisis de la Flexibilidad de FtsZ de *E. coli* por Medio de la Fluorescencia Resuelta en el Tiempo de las Mutantes Puntuales F40W, Y222W y F275W**. Poster en LIII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Chile, Santa Cruz – Chile.
6. Diciembre 2011. **Assessing Ligand-Induced Conformational Changes in Bacterial Cell Division Protein FtsZ**. Charla en International Gregorio Weber Conference. Buenos Aires – Argentina.

### Publicaciones

1. **Domain folding and flexibility of *Escherichia coli* FtsZ determined by Tryptophan site-directed mutagenesis**. Rodrigo Díaz-Espinoza, Andrea P. Garcés, José J. Arbildúa, Felipe Montecinos, Juan E. Brunet, Rosalba Lagos and Octavio Monasterio. Protein Science 2007 16: 1543-1556.
2. **4', 6'-Diamino-2-phenylindol (DAPI) induces bundling of *Escherichia coli* FtsZ polymers inhibiting the GTPase activity**. Esteban Nova, Felipe Montecinos, Juan E. Brunet, Rosalba Lagos, Octavio Monasterio. Archives of Biochemistry and Biophysics 2007 465: 315-319.
3. **Spontaneous dissociation and unfolding of *E. coli* FtsZ supports the dimer nucleus polymerization model**. Felipe Montecinos-Franjola, Justin A. Ross, Susana A. Sánchez, Juan E. Brunet, Rosalba Lagos, David M. Jameson and Octavio Monasterio. Biophysical Journal 2012 102: 2176-2185.
4. **Single Tryptophan Mutants of FtsZ: Nucleotide Binding/Exchange and Conformational Transitions**. Felipe Montecinos-Franjola, Nicholas G. James, Patricio Leyton, Juan E. Brunet, Luis Concha, Octavio Monasterio, and David M. Jameson. *Manuscrito en preparación para ser enviado a la revista Biochemistry*

## Índice de Contenidos

Índice de contenidos.....	I
Índice de Tablas .....	III
Índice de Figuras.....	IV
Abreviaturas .....	VII
Unidades .....	VIII
<b>Resumen</b> .....	IX
Abstract.....	XI
<b>Introducción</b> .....	1
División bacteriana .....	1
La proteína FtsZ in vivo .....	3
La proteína FtsZ in vitro: mecanismo de polimerización .....	5
Estructura y plegamiento de FtsZ.....	7
Cambios conformacionales y flexibilidad en la estructura de FtsZ.....	10
<b>Hipótesis y Objetivos</b> .....	13
<b>Materiales y Métodos</b> .....	15
Reactivos .....	15
Estructuras, modelos y manejo de imágenes .....	15
Dinámica Molecular para el cálculo de ASA en el modelo del tetrámero de FtsZ .....	16
Electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida .....	16
Purificación y cuantificación de proteína de FtsZ silvestre y las mutantes F40W, Y222W y F275W.....	17
Preparación de FtsZ silvestre para microscopía electrónica .....	18
Medición de la polimerización de FtsZ silvestre y las mutantes F40W, Y222W y F275W .....	19
Medición de la actividad GTPásica de FtsZ silvestre y las mutantes F40W, Y222W y F275W.....	19
Preparación de los conjugados fluorescentes con FITC, DNS y Alexaflúor-488 .....	20
Cromatografía de exclusión molecular.....	21
Fluorescencia en estado estacionario de MANT-GDP y MANT-GTP: espectros de emisión, anisotropía y modelado de los datos .....	21



Fluorescencia en estado estacionario de los conjugados FtsZ-FITC y FtsZ-DNS: anisotropía y modelado de los datos .....	22
Fluorescencia en estado estacionario de las mutantes F40W, Y222W y F275W: espectros de emisión.....	22
Fluorescencia resuelta en el tiempo de los conjugados FtsZ-FITC y FtsZ-DNS: tiempos de vida, polarización dinámica y análisis de los datos .....	23
Fluorescencia resuelta en el tiempo de las mutantes F40W, Y222W y F275W: tiempos de vida y análisis de los datos .....	24
Espectroscopia de dicroísmo circular y modelado de los datos .....	24
Espectroscopia de correlación de fluorescencia: instrumentación, manejo de muestras y análisis de los datos .....	25
<b>Resultados</b> .....	26
Estudio in silico e in vitro de FtsZ silvestre y las mutantes F40W, Y222W y F275W ....	26
Modelo de la estructura de FtsZ: análisis de las mutaciones F40W, Y222W y F275W	26
Expresión y purificación de FtsZ silvestre y las mutantes puntuales F40W, Y222W y F275W.....	32
Caracterización de la función in vitro de FtsZ silvestre y las mutantes puntuales F40W, Y222W y F275W .....	42
Estructura secundaria de FtsZ silvestre y de las mutantes puntuales F40W, Y222W y F275W.....	45
Estado de agregación de FtsZ silvestre y de las mutantes puntuales F40W, Y222W y F275W.....	50
Estudio de la auto-asociación y del desplegamiento en el equilibrio de FtsZ silvestre .	56
Cromatografía de exclusión molecular: efecto de la concentración de proteína sobre la oligomerización de FtsZ silvestre.....	56
Fluorescencia en estado estacionario: efecto de la concentración de proteína sobre la anisotropía de FtsZ conjugada con las sondas FITC y DNS.....	59
Fluorescencia resuelta en el tiempo: tiempos de vida y tiempos de correlación rotacional de los conjugados FtsZ-FITC y FtsZ-DNS.....	61
Vía de desplegamiento de FtsZ silvestre: efecto de la concentración de proteína sobre la estabilidad termodinámica .....	70
Desplegamiento de los conjugados FtsZ-Alexa488 seguidos por espectroscopia de fluorescencia de correlación (FCS).....	75
Cambios conformacionales de FtsZ inducidos por el intercambio de los nucleótidos GDP y GTP .....	80

Caracterización de la fluorescencia intrínseca: espectros de emisión y apagamiento colisional de las mutantes puntuales F40W, Y222W y F275W .....	80
Determinación de las constantes de disociación para MANT-GDP y MANT-GTP de las mutantes F40W, Y222W y F275W .....	86
Tiempos de vida de la fluorescencia intrínseca en las mutantes F40W, Y222W y F275W en presencia de los nucleótidos GDP y GTP.....	93
<b>Discusión</b> .....	101
Secuencia y estructura tridimensional de FtsZ de E. coli portando a las mutaciones F40W, Y222W y F275W .....	102
Expresión, purificación y caracterización in vitro de FtsZ silvestre y las mutantes F40W, Y222W y F275W .....	106
Los monómeros de FtsZ se auto-ensamblan espontáneamente en dímeros y tetrameros .....	112
El desplegamiento de tres estados de FtsZ se debe a la presencia del dímero.....	116
El monómero de FtsZ se despliega siguiendo una transición de dos estados .....	118
Los triptófanos en las posiciones 40, 222 y 275 se encuentran ocultos del solvente. ....	120
El intercambio de los nucleótidos GDP y GTP en FtsZ induce un cambio conformacional en la interfase interdominio.....	124
<b>Conclusiones</b> .....	129
<b>Apéndices</b> .....	133
Apéndice A Espectroscopía de fluorescencia como herramienta para estudiar a las proteínas en solución. ....	133
Apéndice B Teoría del equilibrio de auto-asociación de FtsZ .....	146
Apéndice C Teoría del desplegamiento en el equilibrio de FtsZ.....	152
Apéndice D Teoría de la interacción de FtsZ con los nucleótidos fluorescentes MANT-GDP y MANT-GTP .....	159
<b>Referencias</b> .....	164

### Índice de Tablas

Tabla 1 Concentraciones de proteína total y contenido de nucleótido de las purificaciones de FtsZ silvestre, F40W, Y222W y F275W.....	41
Tabla 2 Concentraciones críticas de polimerización y actividad GTPásica de FtsZ silvestre y las mutantes F40W, Y222W y F275W .....	44
Tabla 3 Parámetros cinéticos de la actividad GTPásica de FtsZ silvestre, F40W, Y222W y F275W .....	47

Tabla 4 Constantes catalíticas de la actividad GTPásica.....	48
Tabla 5 Contenido de estructura secundaria de FtsZ silvestre y las mutantes puntuales .....	51
Tabla 6 Poblaciones relativas de las especies detectadas en la cromatografía de exclusión molecular .....	55
Tabla 7 Poblaciones relativas de las especies monómero, dímero y tetramero de FtsZ silvestre .....	58
Tabla 8 Constantes de equilibrio de disociación de los dímeros y tetrameros de FtsZ silvestre .....	62
Tabla 9-Tiempos de vida de los conjugados fluorescentes de FtsZ .....	67
Tabla 10 Tiempos de correlación de los conjugados FtsZ-FITC y FtsZ-DNS.....	69
Tabla 11 Parámetros termodinámicos del desplegamiento inducido con Urea de FtsZ silvestre .....	73
Tabla 12 Parámetros termodinámicos del desplegamiento con GdmCl de FtsZ silvestre .....	74
Tabla 13 Longitud de onda en el máximo y centro de masa de las fluorescencia intrínseca de F40W, Y222W y F275W .....	82
Tabla 14 Constantes de Stern-Volmer para el apagamiento colisional de la fluorescencia intrínseca de F40W, Y222W y F275W .....	85
Tabla 15 Parámetros de accesibilidad de los triptófanos en las mutantes F40W, Y222W y F275W .....	87
Tabla 16 Constantes de disociación de los nucleótidos MANT-GDP y MANT-GTP.....	92
Tabla 17 Análisis de tiempos de vida en presencia de GDP usando componentes discretos.....	95
Tabla 18 Análisis de tiempos de vida en presencia de GTP usando componentes discretos.....	95
Tabla 19 Análisis de tiempos de vida en presencia de GDP usando distribuciones continuas.....	96
Tabla 20 Análisis de tiempos de vida en presencia de GTP usando distribuciones continuas.....	96

## Índice de Figuras

Figura 1 Inmunofluorescencia anti-FtsZ, -FtsA y -ZipA de bacterias en división .....	2
Figura 2 Alineamiento de estructura y secuencia de las proteínas tubulina y FtsZ .....	4
Figura 3 Plegamiento y flexibilidad de la proteína FtsZ.....	9

Figura 4 Secuencia de aminoácidos y estructura secundaria de FtsZ de <i>E. coli</i> .....	27
Figura 5 Modelo de cintas de la estructura 3D de FtsZ de <i>E. coli</i> .....	29
Figura 6 Modelo de las mutaciones F40W, Y222W y F275W .....	31
Expresión y purificación de FtsZ silvestre y las mutantes puntuales F40W, Y222W y F275W.....	32
Figura 7 Experimento de sobre-expresión de FtsZ silvestre en <i>E. coli</i> BL21(DE3) .....	33
Figura 8 Comparación de dos métodos de purificación de FtsZ silvestre .....	35
Figura 9 Comparación mediante SDS-PAGE de dos métodos de purificación de FtsZ silvestre .....	37
Figura 10 Imágenes de microscopía electrónica de los polímeros de FtsZ.....	38
Figura 11 SDS-PAGE con los resultados de la purificación de FtsZ silvestre, F40W, Y222W y F275W .....	40
Figura 12 Experimentos de polimerización y actividad GTPásica con FtsZ silvestre y las mutantes puntuales F40W, Y222W y F275W .....	43
Figura 13 Curvas de saturación de sustrato de la actividad GTPásica de FtsZ silvestre y F40W, Y222W y F275W .....	46
Figura 14 Espectros de dicroísmo circular de FtsZ silvestre y las mutantes puntuales	49
Figura 15 Calibración de la columna de exclusión molecular TOSOH .....	53
Figura 16 Cromatogramas de exclusión molecular de FtsZ silvestre y las mutantes F40W, Y222W y F275W .....	54
Figura 17 Cromatogramas de FtsZ silvestre a tres concentraciones de proteína.....	57
Figura 18 Anisotropía de fluorescencia de los conjugados FtsZ-FITC y FtsZ-DNS.....	60
Figura 19 Comparación de los modelos de disociación de dos y tres estados.....	63
Figura 20 Fracciones de las especies monómero, dímero y tetrámero de FtsZ en función de la concentración de proteína .....	64
Figura 21 Medición del tiempo de vida de la fluorescencia de los conjugados FtsZ-FITC y FtsZ-DNS .....	66
Figura 22 Mediciones de polarización dinámica de la fluorescencia de FtsZ-FITC y FtsZ-DNS .....	68
Figura 23 Desplegamiento de FtsZ silvestre inducido con Urea y GdmCl.....	71
Figura 24 Fracciones de las especies nativo, intermediario y desplegado de FtsZ en función de la concentración de agente desnaturalante.....	76
Figura 25 Desplegamiento de FtsZ-Alexa488 seguido con FCS.....	78
Figura 26 Comparación del despliegamiento de FtsZ seguido por CD y FCS .....	79

Figura 27 Espectros de emisión de fluorescencia intrínseca de F40W, Y222W y F275W .....	<b>81</b>
Figura 28 Experimentos de apagamiento de la fluorescencia intrínseca de F40W, Y222W y F275W .....	<b>84</b>
Figura 29 Espectros de emisión de fluorescencia de los nucleótidos MANT libres y unidos a las proteínas FtsZ silvestre y las mutantes F40W, Y222W y F275W .....	<b>88</b>
Figura 30 Experimentos de unión de los nucleótidos MANT a las proteínas FtsZ silvestre, F40W, Y222W y F275W .....	<b>90</b>
Figura 31 Mediciones de fluorescencia intrínseca resuelta en el tiempo de las mutantes F40W, Y222W y F275W .....	<b>94</b>
Figura 32 Representaciones gráficas de los análisis de tiempo de vida de F40W, Y222W y F275W .....	<b>98</b>
Figura 33 Efecto de la unión de los nucleótidos GDP y GTP en la fluorescencia de F40W, Y222W y F275W usando Phasor plots.....	<b>99</b>
Figura 34 Modelo de las etapas de la polimerización de FtsZ in vitro .....	<b>131</b>
Figura 35 Esquema de los cambios conformacionales de FtsZ inducidos por el intercambio de los nucleótidos GDP y GTP .....	<b>132</b>

## Abreviaturas

Amp	Antibiótico Ampicilina
ASA	Área de Accesibilidad al solvente
CD	Dicroísmo Circular
D	Coefficiente de Difusión
DNS	cloruro de 1-dimetilaminonaftaleno-5-sulfonilo
EcFtsZ	FtsZ de <i>Escherichia coli</i>
FCS	Espectroscopía de Correlación de Fluorescencia
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
FtsZ	<i>Filamentous thermosensitive protein Z</i>
GdmCl	Cloruro de Guanidinio
GFP	Proteína Fluorescente Verde
GDP	Guanosina bi-fosfato
GTP	Guanosina tri-fosfato
IF	Filamentos Intermedios
IPTG	isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido
MANT	<i>2',3'-O-(N-methylantraniloyl)fluorophore</i>
MtbFtsZ	FtsZ de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MjFtsZ	FtsZ de <i>Methanococcus jannaschii</i>
NATA	N-Acetiltryptofanamida
PALM	Microscopía de Localización Fotoactivable
R <sub>H</sub>	Radio Hidrodinámico
R.M.S.D.	Desviación Cuadrática Media
SDS-PAGE	Electroforesis en Geles de Poliacrilamida

## Unidades

Å	ångstrom
°C, °K	grados Celsius ó kelvin
kDa	kilo dalton
nm	nanómetro
M	molar
µg	microgramos
µM	micromolar
s	segundos
µL	microlitros
mL	mililitros
W	watts
mm	milimetro
mdeg	miligrados de elipticidad
µm	micrometro
g	aceleración de gravedad
V	volts
Kcal	kilocalorías

## Resumen

La proteína FtsZ tiene un rol clave en la citoquinesis bacteriana donde se polimeriza formando el anillo Z. *In vitro*, la proteína FtsZ se auto-ensambla en presencia de GDP formando polímeros curvos mientras que en presencia de GTP polimeriza formando polímeros rectos. El modelo que parece explicar mejor a la polimerización de FtsZ es el modelo cooperativo con una concentración crítica, donde el primer paso consiste en la formación del núcleo dimérico a través de un cambio conformacional que permite la elongación del polímero recto. Posteriormente, la hidrólisis del nucleótido conduce a la despolimerización a través de una transición entre los estados recto y curvo de FtsZ que debilita la interacción de las subunidades en el polímero. El trabajo desarrollado en esta Tesis abordó desde un punto de vista experimental la hipótesis de que FtsZ se auto-ensambla en presencia de GDP y GTP y que ocurren cambios conformacionales en la estructura por el intercambio entre los nucleótidos.

La influencia del auto-ensamblaje sobre la estructura de FtsZ se estudió con una caracterización termodinámica de la oligomerización y del desplegamiento. El ensamblaje se estudió con cromatografía de exclusión molecular y espectroscopía de fluorescencia y el desplegamiento se estudió con dicroísmo circular y espectroscopía de correlación de fluorescencia. El análisis cromatográfico demostró la presencia de monómeros, dímeros y tetrámeros cuyas poblaciones dependen de la concentración total de proteína. Los experimentos de dilución de conjugados fluorescentes de FtsZ revelaron que las constantes de disociación de los dímeros y tetrámeros son del orden de  $10^{-6}$ . Las mediciones de fluorescencia resuelta en el tiempo apoyaron la presencia de tetrámeros a altas concentraciones de proteína y la presencia de monómeros a



bajas concentraciones de proteína. El estudio de desplegamiento demostró que el desplegamiento de tres estados de FtsZ se debe a la presencia del dímero en la solución y que el monómero posee un mecanismo de desplegamiento de dos estados. El equilibrio de disociación de los dímeros en monómeros indica que hay una fracción significativa de dímeros en la concentración crítica de polimerización lo que apoya el modelo del dímero como especie nucleadora de la polimerización de FtsZ.

Para estudiar a los cambios conformacionales inducidos por el intercambio de los nucleótidos GDP y GTP en FtsZ, es decir formando polímeros curvos y rectos, respectivamente, en esta Tesis se usó la fluorescencia intrínseca del triptófano introducido por mutagénesis sitio-dirigida. Los residuos de triptófano se encuentran en tres regiones relevantes de la estructura de FtsZ, F40W en el dominio N, F275W en el dominio C y Y222W en la interfase entre los dominios N y C. Sobre la base de estudios de dinámica molecular, y también de estudios de apagamiento de la fluorescencia, se encontró que los tres residuos de triptófano se encuentran ocultos del solvente. Se midió a las constantes de disociación de los nucleótidos a las proteínas y se encontró que las mutaciones no afectaron la afinidad por los mismos. Usando fluorescencia resuelta en el tiempo se midieron los tiempos de vida de los triptófanos, cuya fluorescencia es sensible al ambiente local, y se encontró que los mayores cambios estructurales ocurren entre los dominios N y C, en la interfase interdominio, donde un movimiento tipo bisagra entre los dominios sería el cambio conformacional responsable de la transición desde los polímeros rectos a los polímeros curvos.

## Abstract

FtsZ is a major protein in bacterial cytokinesis that polymerizes to form the Z-ring. In vitro, FtsZ self-assembles in the presence of GDP nucleotide to form curved polymers while in the presence of GTP it polymerizes to form straight filaments. The best model that explains FtsZ polymerization is a cooperative mechanism with a critical concentration where the first step is the formation of a dimer nucleus through a conformational change allowing straight polymer elongation. Subsequently, nucleotide hydrolysis drives depolymerization through a transition between straight and curved states of FtsZ that weakens subunit interactions in the polymer. Work developed in this dissertation assessed experimentally the hypothesis that FtsZ self-assembles in the presence of GDP and GTP and that a conformational change occurs in FtsZ structure when the nucleotides exchange at the active site.

The influence of the self-assembly on FtsZ structure was studied with a characterization of its oligomerization and unfolding thermodynamics. The assembly was studied using size-exclusion chromatography and fluorescence spectroscopy, and the unfolding was studied using circular dichroism and two-photon fluorescence correlation spectroscopy. The chromatographic analysis demonstrated the presence of monomers, dimers, and tetramers with populations dependent on protein concentration. Dilution experiments using fluorescent conjugates revealed dimer-to-monomer and tetramer-to-dimer dissociation constants in the micromolar range. Time resolved fluorescence measurements of FtsZ conjugates supported the presence of tetramers at high protein concentrations and monomers at low protein concentrations. The unfolding study demonstrated that the three-state unfolding of FtsZ was due to the mainly dimeric state of the protein, and that the monomer unfolds through a two-state mechanism. The

monomer-to-dimer equilibrium characterized here indicates a significant fraction of stable dimers at the critical concentration for polymerization, supporting a role of the dimeric species in the first steps of FtsZ polymerization.

To study the conformational changes induced by exchange between GDP and GTP nucleotides, i.e., in the presence of straight and curved polymers, respectively, in this work the intrinsic fluorescence of site-directed tryptophan mutants was used. The tryptophan residues were located in three relevant regions along FtsZ structure, F40W at the N-domain, F275W at the C-domain and Y222W at the interdomain interface. Based on molecular dynamics simulations, and in intrinsic fluorescence collisional quenching experiments, the tryptophan located at the three sites in FtsZ structure were found to be buried from solvent accessibility. Measurement of nucleotide dissociation constants indicated that the mutations did not affect the nucleotide affinity. Tryptophan lifetimes were measured using time-resolved fluorescence. Knowing that the excited state is sensitive to changes in local environment, and changes at the interdomain interface were detected upon nucleotide exchange. These conformational changes were related to a hinge-like movement between domains that might be responsible for the transition between straight and curved polymers.

## Introducción

### División bacteriana

La arquitectura básica de una célula contempla membranas, organelos y citosol. Cada tipo celular exhibe un diseño distintivo en su morfología y en la distribución de sus organelos. La base estructural de los distintos diseños celulares es el citoesqueleto, una red filamentosa que entrama al citosol y provee de soporte mecánico a las membranas celulares. El citoesqueleto de células eucariontes se compone fundamentalmente de tres filamentos que se diferencian en el diámetro, el tipo y el arreglo de sus subunidades: los polímeros de tubulina (microtúbulos), los filamentos de actina (microfilamentos) y los filamentos intermedios (IFs). De manera similar, en procariontes se han identificado al menos tres clases de polímeros que guardan homología con los elementos del citoesqueleto eucarionte: las tubulinas bacterianas, las actinas bacterianas y los miembros de la familia ParA/MinD, similares a los IFs. Entre las tubulinas bacterianas encontramos a FtsZ que participa en la división celular y a BtubA/B que tiene un rol en la morfología celular. Las actinas bacterianas MreB, FtsA y ParM participan en procesos como división y mantención de la forma celular. Finalmente, la superfamilia de ATPasas ParA/MinD constituye un grupodiverso de proteínas en que su capacidad de formar polímeros de manera dinámica es necesaria para la localización de otras proteínas que cumplen funciones importantes en la célula (Pogliano, 2008).

En *Escherichia coli*, la división celular ocurre a través de la invaginación de la membrana en forma simultánea con la síntesis de un septo de péptido-glicano que separará a las células hijas. En el proceso de septación participan al menos 15

proteínas que se ensamblan jerárquicamente en el sitio de división para conformar el divisoma bacteriano. Las proteínas que participan son citoplasmáticas, de membrana y periplasmáticas y cada una de ellas se ubica en torno a un polímero localizado en el ecuador de la célula (*figura 1*). La localización subcelular de algunas de estas proteínas aparece como un anillo en el centro de la bacteria. De todos estos “anillos”, el de distribución más definida es el anillo de FtsZ, también llamado “anillo Z”. Cuando la célula se divide, el anillo desaparece y también lo hace el complejo de proteínas que lo acompaña. Las proteínas de división son reclutadas siguiendo un orden jerárquico. El orden es el siguiente: FtsZ, (FtsA,ZapA,ZipA), (FtsE, FtsX), FtsK, FtsQ, (FtsB, FtsL), FtsW, FtsI, FtsN, AmiC y EnvC; donde las proteínas entre paréntesis lo hacen en forma simultánea. Sólo ZapA no es esencial en la lista. No todas las proteínas del divisoma poseen actividad enzimática sugiriendo un rol estructural o regulatorio en la división bacteriana (Errington y col., 2003; Vicente y col., 2006).

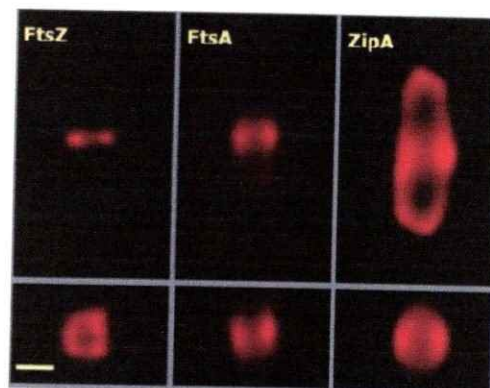


Figura 1. *Escherichia coli* MC1061 en fase exponencial de crecimiento se marcaron con anticuerpos policlonales anti-FtsZ, -FtsA, -ZipA y se revelaron con un anticuerpo secundario fluorescente. Se presume que estas proteínas se ubican en el sitio de división coordinadamente y constituyen el “divisoma bacteriano”. La barra indica 0,5  $\mu\text{m}$  (*Reproducido con modificaciones de Vicente y col., 2006*).

## La proteína FtsZ *in vivo*

La primera descripción de un elemento del citoesqueleto bacteriano se hizo con FtsZ (Lutkenhaus y col., 1980). Posteriormente, se comprobó el requerimiento de FtsZ en la división bacteriana donde una mutante por delección del gen *ftsZ* presentó un fenotipo letal (Dai y Lutkenhaus, 1991; Pla y col., 1991). Sin embargo, la verdadera función de FtsZ se hizo aparente con el estudio de su localización subcelular (Addinall y Lutkenhaus, 1996; Sun y Margolin, 1998). El gen *ftsZ* está presente en casi todas las bacterias y arqueas cuyos genomas se encuentran secuenciados, con algunas excepciones en especies del género *Sulfolobus* y en los organismos *Ureaplasma urealyticum* y *Streptomyces coelicolor* (Erickson y Osawa, 2010; Graumann, 2007; Vaughan y col., 2004). La conservación de la secuencia aminoacídica entre las FtsZ de bacterias y arqueas las agrupa en una familia de proteínas conservadas y divergentes de las tubulinas, donde sólo los residuos involucrados en la unión e hidrólisis de GTP aparecen conservados en ambas familias (*figura 2D*). Se predijo que FtsZ era una proteína de citoesqueleto en base a la conservación de motivos de unión a nucleótido ("tubulin signature motif") presentes en la secuencia de FtsZ que son característicos de las tubulinas eucariontes (de Pereda y col., 1996). Sin embargo, en base a su estructura tridimensional se comprobó que FtsZ y tubulina son homólogos (*figura 2A*), lo que llevó a considerarlas como integrantes de una familia única sugiriendo un ancestro común (Nogales y col., 1998). FtsZ es la primera proteína en ubicarse en el ecuador de la célula durante la división, en el mismo sitio donde se formará el septo. Una reconstrucción de la constricción de la membrana durante la citocinesis, en bacterias que expresan la proteína de fusión GFP-FtsZ, mostró que el anillo Z fluorescente disminuye su radio, es decir, se constriñe junto con la invaginación de la

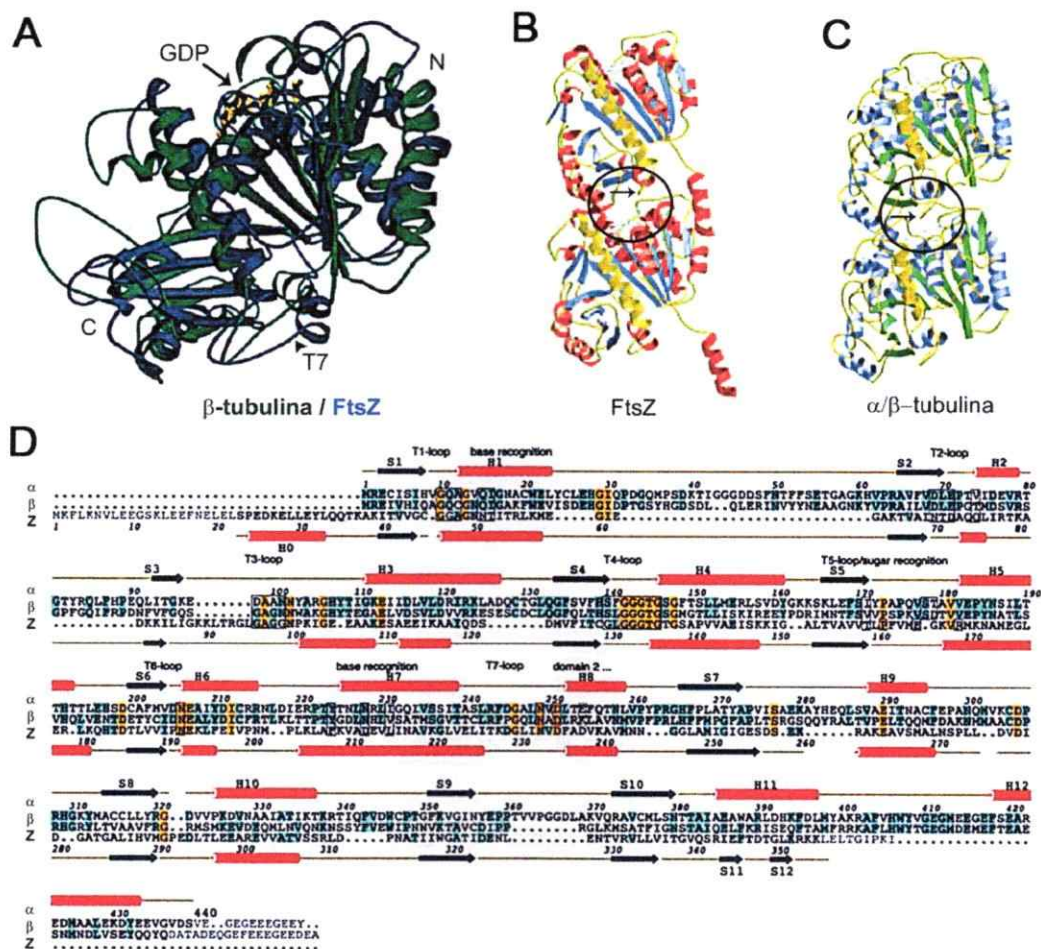


Figura 2. La similitud estructural de FtsZ y tubulina no se refleja en la secuencia aminoacídica. A, alineamiento estructural de FtsZ de *Methanococcus jannaschii* (azul, 1FSZ.PDB) y  $\beta$ -tubulina de cerebro de cerdo (verde, 1TUB.PDB), en amarillo se muestra el nucleótido unido (GDP); N y C indican los dominios amino y carboxilo de ambas proteínas y T7 indica el "loop"-T7. B y C, estructura cristalina del dímero de MjFtsZ (1W59.PDB) y del heterodímero de  $\alpha/\beta$ -tubulina (1JFF.PDB), que muestra la interacción longitudinal que se establece con el sitio activo del nucleótido, en amarillo se destaca la hélice H7. El círculo señala el sitio activo (sin nucleótido) y la flecha negra interior muestra la posición del "loop-T7". D, alineamiento de la secuencia aminoacídica de  $\alpha/\beta$ -tubulina y FtsZ. Se muestra la topología de los elementos de estructura secundaria donde las flechas indican hebras beta y los cilindros indican hélices alfa. Los "loop" que contactan al nucleótido se denominaron T1 a T6 (en el dominio amino) y T7 (en el dominio carboxilo). En celeste y amarillo se destacan los aminoácidos conservados e idénticos en las tres secuencias, respectivamente. A,D y B,C se reprodujeron con modificaciones, respectivamente, de Nogales y col., 1998 y Oliva y col., 2004.

membrana (Sun y Margolin, 1998). Esto sugiere una probable función motriz de la proteína FtsZ en la constricción de la membrana que se ha atribuido a su actividad GTPásica (Osawa y col., 2008).

FtsZ es una proteína abundante en el citoplasma bacteriano, se estima que hay de 3.500 a 15.000 moléculas de FtsZ por célula de *E. coli*. FtsZ forma protofilamentos *in vitro* y se ha sugerido que las estructuras observadas *in vivo* podrían corresponder a estos filamentos. Sin embargo, estudios *in vivo* sugieren que estaría conformado por varios filamentos, es decir, una estructura más compleja que el protofilamento simple observado *in vitro* (Stricker y col., 2002). En una criotomografía electrónica de células en división de *Caulobacter crescentus*, se observó que la proteína FtsZ se ubica bajo la membrana plasmática, en el sitio de septación, en forma de múltiples filamentos cortos no asociados de aproximadamente 100 nm de largo y 5 nm de ancho cada uno. Estos resultados mostraron que los polímeros observados *in vitro* se parecen a los filamentos detectados *in vivo* y cuestiona la relevancia fisiológica de la interacción lateral entre los protofilamentos de FtsZ (Li y col., 2007). Recientemente, un estudio de microscopía PALM en células vivas de *E. coli*, permitió confirmar que la FtsZ se ubica bajo la membrana plasmática, pero en forma de un polímero helicoidal, que corresponde al anillo Z, cuya estructura está formada por 2 o 3 filamentos de FtsZ no asociados lateralmente (Fu y col., 2010).

### **La proteína FtsZ *in vitro*: mecanismo de polimerización**

FtsZ es una enzima globular de ~40 kDa cuyo sitio activo para la actividad GTPásica se forma con la asociación de dos monómeros a través de la interacción longitudinal (figura 2 B y C). La actividad GTPásica y la polimerización de FtsZ presentan una concentración crítica alrededor de 1  $\mu$ M y por debajo de esta



concentración de proteína ambas actividades son prácticamente indetectables (Mukherjee y Lutkenhaus, 1999; Oliva y col., 2003). La proteína FtsZ se auto-ensambla en protofilamentos cortos y no asociados de 4 a 8 nm de ancho de una manera GTP-dependiente *in vitro*. Sin embargo, en diferentes condiciones experimentales, FtsZ forma una variedad de estructuras como filamentos simples, filamentos dobles, anillos y hojas. Aunque la hidrólisis de GTP no es requerida para la polimerización, la presencia del ión  $Mg^{+2}$  y la hidrólisis del nucleótido son requeridos para la despolimerización de la proteína (Erickson y col., 2010; Sossong y col., 1999). Todo esto indica que la polimerización y la actividad GTPásica de FtsZ se encuentran ligadas y ocurren concomitantemente, por lo tanto ambos aspectos se pueden considerar para estudiar a la dinámica de FtsZ *in vitro*.

La construcción de un modelo termodinámico que explique cabalmente el mecanismo de polimerización de FtsZ es una tarea que no está terminada. En primera instancia se propusieron los mecanismos isodésmico y cooperativo para la polimerización de FtsZ. El modelo isodésmico se caracteriza por la ausencia de una concentración crítica y la formación de polímeros de largo infinito, es decir, sólo un tipo de interacción (*longitudinal*). El modelo cooperativo contempla una concentración crítica, una fase de retardo en la polimerización y la aparición de estructuras asociadas lateralmente, es decir, dos tipos de interacción (*longitudinal y lateral*). Es aceptado que la proteína  $\alpha/\beta$ -tubulina polimeriza con un mecanismo cooperativo mediado por interacciones laterales, sin embargo, la evidencia bioquímica y estructural indica que tubulina y FtsZ no comparten el mismo tipo de asociación lateral durante la polimerización (Andreu y col., 2002; Nogales y col., 1998). Es también aceptado que la polimerización de FtsZ inducida por GTP se desarrolla a través de un proceso

cooperativo. Esto se debe a que la actividad GTPásica y la polimerización presentan una concentración crítica y a la observación de una fase de retardo en la polimerización de la proteína (Caplan y Erickson, 2003; Chen y col., 2005). En contraste, la polimerización dependiente de GDP se desarrolla con un proceso isodésmico (Martos y col., 2010). El problema es que FtsZ-GTP forma polímeros simples, es decir no asociados lateralmente, por tanto los modelos clásicos de polimerización cooperativa (actina y tubulina) no se pueden usar para explicar la polimerización de FtsZ. Por esto, el modelo actualmente aceptado es "el modelo cooperativo del núcleo dimérico" que considera una fase de nucleación con un cambio conformacional y la posterior polimerización en filamentos simples. En este modelo, el monómero pasa desde una conformación de baja afinidad para la polimerización hasta una conformación de alta afinidad para la polimerización, en el paso de nucleación, lo que permite la formación del núcleo dimérico y la elongación del polímero lineal (Huecas y col., 2008; Miraldi y col., 2008).

## **Estructura y plegamiento de FtsZ**

FtsZ y tubulina poseen una estructura tridimensional similar con dos dominios separados por una hélice central, denominada H7 (*figura 2A-C*). En FtsZ, el dominio amino terminal posee un plegamiento Rossmann con una molécula de GDP o GTP unida y el dominio carboxilo terminal tiene un plegamiento tipo corismato mutasa (1COM.PDB) que participa en la interacción con otras proteínas de división (Nogales y col., 1998; Osawa y Erickson, 2005). El "loop-T7" del dominio carboxilo posee el residuo catalítico clave que contacta al nucleótido unido al dominio amino terminal de la proteína. En la FtsZ de *Methanococcus jannaschii* (MjFtsZ, 1FSZ.PDB), el residuo catalítico es un aspartato en la posición 238. La estructura de FtsZ de *E. coli* (EcFtsZ)

aún no ha sido resuelta pero se determinó por modelaje comparativo y por mediciones de actividad GTPásica que el aspartato 212 sería el residuo catalítico más importante y equivalente al de MjFtsZ. En  $\alpha$ -tubulina (1TUB.PDB) se encuentra un glutamato en la posición 254 que corresponde al residuo catalítico (Erickson, 1998; Oliva y col., 2004; Scheffers y col., 2002). Aunque FtsZ y tubulina presentan una baja identidad de secuencia primaria (10-18%), ambas proteínas son homólogas debido al parecido de su estructura terciaria y a que se ensamblan en protofilamentos muy similares *in vitro* (Michie y Lowe, 2006). El alineamiento estructural entre FtsZ y tubulina arroja un R.M.S.D. de 4,3 Å. El alineamiento de secuencia asociado mostró que las mayores diferencias se encuentran en inserciones de hasta 90 aminoácidos en la secuencia de tubulina. A su vez, el alineamiento estructural sin considerar las inserciones arrojó un R.M.S.D. de 2,3 Å entre ambas proteínas (Andreu y col., 2002). Estos segmentos están asociados a funciones exclusivas de las tubulinas tales como la interacción lateral en la formación de los microtúbulos y en la interacción con la chaperonina CCT, que asiste el plegamiento de la proteína. Debido a esto último, la tubulina recombinante no es funcional, pues no alcanza el plegamiento nativo *in vitro* (Bertrand y col., 2005; Llorca y col., 2001).

La proteína FtsZ de la arquea termófila *Methanococcus jannaschii* (MjFtsZ) presenta un desplegamiento reversible y cooperativo de dos estados (figura 3A) a diferencia de la proteína FtsZ del mesófilo *Escherichia coli* (EcFtsZ), que presenta un desplegamiento reversible y de tres estados con la presencia de un intermediario termodinámico (figura 3B). Esto indica que el plegamiento de FtsZ no requiere de factores adicionales como cofactores o chaperonas para adquirir la conformación nativa. En el caso particular de EcFtsZ, el desplegamiento inducido con agentes

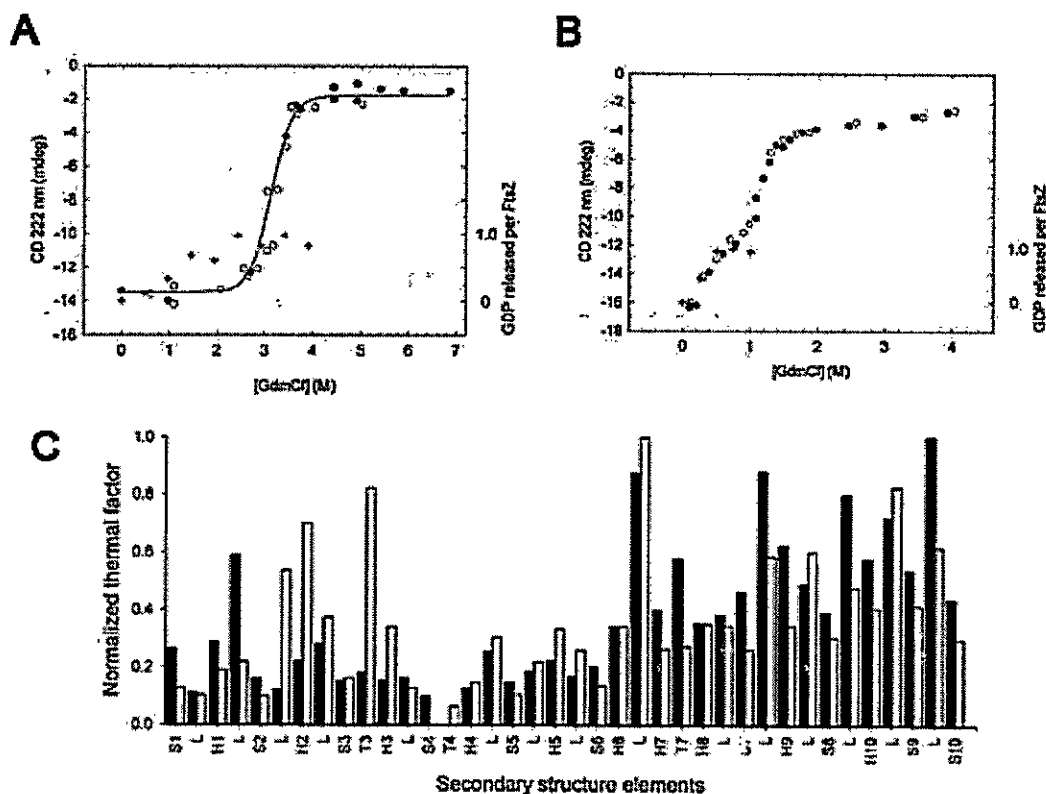


Figura 3. Estudios de plegamiento y flexibilidad de FtsZ. A, la desnaturación de MjFtsZ presenta un comportamiento de dos estados con  $GdmCl_{50\%} = 3,1$  M. B, la desnaturación de EcFtsZ muestra un proceso bifásico con  $GdmCl_{50\%} = 1,1$  M. En ambos casos se encontró que la liberación de 1 mol de GDP (símbolos "+") ocurre a una concentración de agente desnaturante menor al  $GdmCl_{50\%}$ . C, flexibilidad implícita (factor térmico normalizado) de los elementos de estructura secundaria de FtsZ obtenido a partir de los cristales de MjFtsZ (barras negras) y MtbFtsZ (barras blancas). A y B se reprodujeron de Andreu y col., 2002; C, se reprodujo de Diaz-Espinoza y col., 2007.

caotrópicos se estudió con espectroscopía de dicroísmo circular y de fluorescencia con el fin de seguir a la estructura secundaria y terciaria, respectivamente (Andreu y col., 2002; Díaz-Espinoza y col., 2007; Santra y Panda, 2003). En los estudios de fluorescencia se usó la sonda extrínseca ANS, que se une a los bolsillos hidrofóbicos de la proteína, y la sonda intrínseca triptófano que se introdujo por mutagénesis sitio-dirigida (pues EcFtsZ carece de ellos) y en ambos casos se detectó la presencia del intermediario. La presencia de este intermediario se ha atribuido a diferentes mecanismos en relación a la vía de plegamiento de FtsZ y siempre considerando a una proteína monomérica. Un modelo plantea que la primera etapa de desnaturación, desde el estado nativo al estado intermediario, se debería a la liberación del nucleótido desde el bolsillo de unión localizado en el dominio N y la segunda etapa, desde el estado intermediario al estado desplegado, correspondería a la desnaturación de la apoproteína (Andreu y col., 2002). Otro modelo propuesto para explicar la presencia de un intermediario sugiere una interacción fuerte entre los dominios N y C de FtsZ de manera que la primera etapa se debería a la separación de los dominios y la segunda etapa correspondería a la desnaturación concertada de los dominios por separado. (Díaz-Espinoza y col., 2007). En estos estudios, que son los únicos de este tipo para EcFtsZ, no se consideró el estado de agregación en los cálculos de estabilidad termodinámica. Esto último es de suma importancia, pues FtsZ tiende a auto-asociarse tanto en presencia de GTP como en presencia de GDP.

### **Cambios conformacionales y flexibilidad en la estructura de FtsZ**

Las proteínas globulares despliegan una variedad de movimientos internos que abarcan desde deformaciones de la estructura debidas a la colisión de moléculas del solvente, hasta la interacción específica de átomos dentro de la estructura. Varios

ejemplos de movimientos atómicos están conectados específicamente con la actividad bioquímica, entre ellos se pueden mencionar los cambios conformacionales grandes de proteínas motoras como kinesina y dineina (Skowronek y col., 2007; Vogel, 2005) y los movimientos alostéricos en hemoglobina (Bettati y col., 2009). La estructura cristalina del heterodímero de  $\alpha/\beta$ -tubulina muestra la existencia de dos conformaciones, la conformación "recta" en los microtúbulos polimerizados y la conformación "curva" en los microtúbulos helicoidales, es decir, que simulan la despolimerización del protofilamento (Oliva y col., 2007). A su vez, FtsZ-GDP polimeriza formando filamentos curvos y FtsZ-GTP polimeriza forma filamentos rectos *in vitro* (Huecas y Andreu, 2004). Es por esta evidencia que se han buscado dos conformaciones de FtsZ en relación al estado de fosforilación del nucleótido como mecanismo de regulación para la polimerización. No obstante, los cristales de FtsZ en presencia de GDP y GTP no mostraron grandes cambios conformacionales (Díaz-Espinoza y col., 2007; Oliva y col., 2007). Esto indica que los cambios a nivel de la estructura terciaria de FtsZ deben ser sutiles entre los estados polimerizado y despolimerizado. Si suponemos que la molécula de FtsZ es rígida, entonces la demostración de una interacción lateral confirmaría el modelo cooperativo de polimerización (ver más arriba). En cambio, si consideramos a FtsZ como una molécula flexible se podría comprobar el modelo cooperativo del núcleo dimérico a través de un cambio conformacional durante la polimerización.

Los estudios de flexibilidad intrínseca a partir del factor térmico cristalográfico (factor  $\beta$ ) se utilizan frecuentemente para probar la existencia de regiones flexibles en las proteínas. El factor  $\beta$  refleja las fluctuaciones de un átomo respecto de su posición promedio y la distribución de estos valores a lo largo de la secuencia se considera un

indicador importante de la estructura de una proteína, pues refleja su flexibilidad y dinámica. Es importante mencionar que este índice, aunque se obtiene experimentalmente, se entiende como una predicción de la flexibilidad de la proteína (Cozzini y col., 2008; Skjaerven y col., 2011; Yuan y col., 2005). En esta línea, se estudió la flexibilidad a partir del factor térmico cristalográfico de las estructuras de MjFtsZ (termófilo) y de MtbFtsZ (mesófilo) (*figura 3C*). La conclusión general del análisis es que el dominio carboxilo terminal es más flexible que el dominio amino terminal (Díaz-Espinoza y col., 2007). En otro estudio teórico de la estructura de FtsZ, usando el factor  $\beta$  y dinámica esencial, se propuso que existen subdominios en la estructura que podrían alojar a los cambios conformacionales. Entre los movimientos propuestos se encuentran movimientos tipo bisagra entre los dominios N y C, como también rotaciones intra-dominio (Martín-Galiano y col., 2010). Un estudio experimental reciente realizado en EcFtsZ, donde se usó fluorescencia intrínseca de mutantes puntuales de triptófano, se concluyó que un cambio conformacional tipo "switch", en la interfase entre los dominios N y C, podría estar relacionado con el cambio conformacional que ocurre en la fase de nucleación de la polimerización (Chen y Erickson, 2011).

## Hipótesis y objetivos

Los antecedentes se presentaron poniendo énfasis en los aspectos que se están investigando actualmente de la función de FtsZ, estos son el mecanismo de polimerización y el mecanismo de desplegamiento. En particular, la proteína FtsZ se auto-ensambla tanto en presencia de GDP como en presencia de GTP, es decir polimeriza con ambos nucleótidos. Por tanto, el estado de oligomerización debiera ser considerado en los modelos termodinámicos de polimerización y desplegamiento. El modelo que parece explicar mejor a la polimerización de FtsZ es el modelo del núcleo dimérico con un cambio conformacional. Sin embargo, la definición de los sitios donde ocurren los cambios conformacionales en la proteína es materia de debate. La evidencia apunta a movimientos tipo bisagra entre los dominios N y C en respuesta al tipo de nucleótido unido (GDP ó GTP), que sería responsable de si los filamentos son rectos y estables o curvos y con tendencia a despolimerizar, respectivamente. Por tanto, proponemos estudiar los cambios conformacionales de FtsZ unida a ambos nucleótidos usando la fluorescencia intrínseca de mutantes puntuales de triptófano. Esta metodología ha sido utilizada previamente para determinar cambios conformacionales y para estudiar el desplegamiento de FtsZ a nivel de dominio. En cuanto al mecanismo de desplegamiento de FtsZ, aún no se ha determinado la naturaleza del intermediario observado por espectroscopía de dicroísmo circular y de fluorescencia. En esta tesis proponemos re-estudiar el desplegamiento de FtsZ pero esta vez considerando el estado de oligomerización de la proteína.





Sobre la base de los antecedentes se formularon las siguientes hipótesis de trabajo:

***“Los cambios conformacionales de FtsZ se deben al intercambio entre los nucleótidos GDP y GTP durante la polimerización”***

***“La estabilidad termodinámica de FtsZ se debe a interacciones intramoleculares e intermoleculares debido a que el monómero se asocia espontáneamente para formar oligómeros de bajo peso molecular”***

Para comprobar las hipótesis propuestas se propuso el siguiente objetivo general:

- **Determinar los cambios conformacionales asociados a la polimerización de FtsZ y cuantificar la estabilidad termodinámica de FtsZ considerando su estado de agregación en solución.**

Para realizar el objetivo general se propusieron los siguientes objetivos específicos:

1. **Determinar experimentalmente a los cambios conformacionales de la estructura de FtsZ de *Escherichia coli* unida a los nucleótidos GDP y GTP.**
2. **Determinar las especies en el equilibrio de auto-asociación de EcFtsZ y cuantificar sus estabilidades termodinámicas.**
3. **Evaluar la funcionalidad *in vitro* de EcFtsZ silvestre y las mutantes puntuales.**

## **Materiales y Métodos**

### **Reactivos**

Los materiales y reactivos más usados en este trabajo son: BSA (albúmina de suero bovino), persulfato de amonio, azida de sodio, azul de coomassie R-250, ioduro de sodio, cloruro de cesio, GTP sal sódica, GDP sal sódica, TEMED, EDTA, FITC, DNS y NATA de Sigma (E.E.U.U.). Los reactivos ampicilina, Cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, cloruro de magnesio hexahidratado, glutamato de potasio, isopropanol, molibdato de amonio, bicarbonato de sodio, fosfato monobásico de potasio, fosfato dibásico de potasio, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, ácido clorhídrico, ácido perclórico, TRIS, IPTG, Urea, cloruro de guanidinio, glicina, dimetilformamida, acrilamida grado espectroscópico, y etanol grado HPLC se obtuvieron de Merck (Alemania). Los reactivos acrilamida y agarosa se obtuvieron de Winkler (Chile). Los reactivos ácido acético, etanol, metanol, glicerol y acetona grado técnico de TCL (Chile). Triptona y extracto de levadura de Difco laboratorios (E.E.U.U.). El cóctel inhibidor de proteasas sin EDTA se obtuvo de Roche (Alemania). Las bolsas de diálisis se obtuvieron de Spectrum (E.E.U.U.). En los experimentos se usó agua ultrapura (18 Mohm-cm) de Barnstead (E.E.U.U.). La sonda fluorescente Alexaflúor-488 y los nucleótidos MANT-GDP y MANT-GTP se obtuvieron de Invitrogen (E.E.U.U.).

### **Estructuras, modelos y manejo de imágenes**

Las estructuras usadas en esta tesis son: FtsZ del hipertermófilo *Methanococcus jannaschii* (1FSZ.PDB) obtenida por difracción de rayos X (Löwe y Amos, 1998), el modelo del monómero, del dímero (tesis pregrado Andrea Garcés) y del tetrámero (Montecinos y col., 2010) de FtsZ de *Escherichia coli*, todos los modelos se fabricaron por modelaje comparativo. Las imágenes se prepararon con el software

de distribución gratuita VMD, Visual Molecular Dynamics(Humphrey y col., 1996) y se refinaron con el software gratuito POVRay (Persistence Of Vision Raytracer, Version 3.6). Las imágenes se manejaron y editaron con el software Photoshop 9 (Adobe Systems Inc.).

### **Dinámica Molecular para el cálculo de ASA en el modelo del tetramero de FtsZ**

El análisis de ASA se hizo mediante dinámica molecular usando el software GROMACS 4.0 con el campo de fuerzas GROMOS 96. El sistema consistió en una caja cúbica de agua del tipo SPC216 usando el estado de ionización de los residuos a pH = 7. Las energías electrostáticas PME se simularon usando un radio de 1 nm. Las interacciones de van der Waals se simularon usando un switch de 0,9 nm de radio. La temperatura se controló con el protocolo V-rescale. El control de la presión en la caja de simulación se logró con el protocolo Berendsen. Los pasos de la dinámica son como sigue: primera minimización de energía con el algoritmo STEEP, segunda minimización de energía con el algoritmo CG (gradientes conjugadas), equilibrado de temperatura a volumen constante usando NVT, todo a 300 °K durante 2 ns, equilibrado de presión a temperatura constante todo a 300 °K por 2 ns. La dinámica de la proteína en estado monomérico se hizo durante 5 ns a 300 °K y para el estado tetramérico se hizo durante 4 ns.

### **Electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida**

Los cultivos inducidos se lavaron tres veces con amortiguador TEN (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM) y se suspendieron en amortiguador de electroforesis (Tris-HCl pH 6,8 75 mM, glicerol 10%, SDS 0,3%, 2-mercaptoetanol 0,1%, azul de bromofenol 0,01%) calentando a 95 °C durante 5 minutos. Las muestras se centrifugaron a 10.000 x g durante 10 minutos antes de cargar el gel para decantar

el material insoluble. Las muestras de proteína purificada se trataron únicamente con amortiguador de electroforesis. Usualmente para el gel resolutivo se usó acrilamida al 12% y la electroforesis se realizó a 100 V (constante) durante 1,5 horas. Los geles después de la electroforesis se revelaron con tinción de azul de coomassie y con tinción de plata de acuerdo a los protocolos tradicionales descritos en el manual Molecular Cloning a laboratory manual (Sambrook y Russell, 2012).

### **Purificación y cuantificación de proteína de FtsZ silvestre y las mutantes F40W, Y222W y F275W**

Las proteínas se sobre-expresaron en la cepa de *E. coli* BL21 (DE3). Los cultivos se crecieron con agitación a 37 °C en 4 litros de medio LB en presencia de 100 µg mL<sup>-1</sup> de ampicilina hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de 0,7 y entonces se agregó IPTG a una concentración de 0,3 mM, después los cultivos se crecieron por 4 horas adicionales. Las células se cosecharon por centrifugación a 7.000 x g durante 45 minutos. El material celular decantado se suspendió en amortiguador A (Tris-HCl 50 mM pH 8, KCl 50 mM, EDTA 1mM y glicerol 5%) y se lisó mediante sonicación con 5 pulsos de 45 Watts (MISONIX 3000, E.E.U.U). Las células lisadas se centrifugaron a 100.000 x g durante 90 minutos y el sobrenadante se saturó con sulfato de amonio al 25% p/v. La proteína precipitada se centrifugó a 10.000 x g a 4 °C, y el material decantado se disolvió en amortiguador A y después se dializó contra 2 L de amortiguador A a 4 °C para remover el exceso de sal. Después, con la proteína dializada se hicieron tres ciclos de polimerización y despolimerización en el amortiguador de polimerización (PIPES pH 6,5 50 mM, ácido glutámico 1 M, cloruro de calcio 10 mM, cloruro de magnesio 10 mM y GTP 2 mM) durante 30 minutos a 37 °C. Los polímeros formados se centrifugaron a 10.000 x g durante 30 minutos a 25 °C. La

proteína se despolimerizó al disolver el material en amortiguador A y se dializó contra 2 L de amortiguador A a 4 °C para remover los componentes del amortiguador de polimerización. La concentración de proteína se determinó con el método de Bradford (BIORAD) y el contenido de nucleótido se determinó espectrofotométricamente con la absorción a 254 nm y 280 nm usando los siguientes coeficientes de extinción molar para FtsZ:  $\epsilon_{254\text{nm}} = 2.750 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ;  $\epsilon_{280\text{nm}} = 3.840 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  y para el nucleótido GDP:  $\epsilon_{254\text{nm}} = 13.700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ;  $\epsilon_{280\text{nm}} = 8.100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Andreu y col., 2002).

### **Preparación de FtsZ silvestre para microscopía electrónica**

Las muestras para microscopía electrónica se prepararon a partir de una muestra polimerizada de FtsZ a una concentración de proteína  $\sim 5 \mu\text{M}$ . El amortiguador de polimerización contenía MES 50 mM pH 6,5, KCl 50 mM,  $\text{MgCl}_2$  10 mM y para las muestras de los ciclos de polimerización se agregó ácido glutámico 1M y  $\text{CaCl}_2$  10 mM, las muestras se incubaron a 30 °C durante 10 minutos para el equilibrado. La polimerización se inició con GTP 1 mM y se dejó por 1 minuto en este estado. Luego se tomaron 10  $\mu\text{L}$  de la muestra polimerizada y se depositó sobre una grilla de cobre para microscopía electrónica de 400 mesh, se incubó por 30 segundos y después se tiñó con acetato de uranilo 1% p/v en agua (previamente esterilizada en filtros de 0,22  $\mu\text{M}$ ). Posteriormente, la grilla se limpió con 3 gotas de agua ultrapura depositadas sobre una hoja de parafilm limpió durante 30 segundos cada vez. El exceso de tinción de acetato de uranilo y de agua se secó con papel filtro. Las grillas se observaron en un microscopio electrónico modelo Zeiss EM-109.

### **Medición de la polimerización de FtsZ silvestre y las mutantes F40W, Y222W y F275W**

La cinética de polimerización se siguió por dispersión de luz a 90° en un espectrofluorímetro Perkin Elmer LS-50. Se utilizó una longitud de onda de excitación y emisión de 350 nm, ancho de banda de 5 nm, paso óptico de 1 cm y se registró a intervalos de 2 segundos durante el tiempo especificado usando un filtro atenuador de emisión de 2%, 4% ó 6% dependiendo de la línea base obtenida. Las reacciones de polimerización se hicieron en amortiguador de polimerización (MES 50 mM pH 6,5, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, KCl 50 mM, GTP 1 mM) a 30 °C. Se usaron concentraciones de proteína y de otros compuestos según se indique. La concentración crítica de FtsZ se calculó como se ha descrito anteriormente (Mukherjee y Lutkenhaus, 1999).

### **Medición de la actividad GTPásica de FtsZ silvestre y las mutantes F40W, Y222W y F275W**

La velocidad de la reacción de hidrólisis de GTP se determinó con el método del verde de malaquita adaptado para el laboratorio (Lanzetta y col., 1979), donde se utilizaron las siguientes soluciones y procedimientos: 1) Solución de colorante. Se preparó una solución de verde de malaquita al 0,045% (VM) y otra de molibdato de amonio al 4,2% en HCl 4 N (MA), ambas soluciones se mezclaron en una proporción de 3:1, respectivamente. A 5 mL de la mezcla VM-MA se le agregaron 100 µL de tritón X-100 al 0,02% (TX) y se obtuvo la mezcla VM-MA-TX. 2) Determinación de fosfato libre. Se transfirieron 70 µL desde la mezcla de reacción de polimerización de FtsZ silvestre y FtsZ reconstituida con los dominios aislados a un tubo eppendorf, y se le agregó ácido perclórico a una concentración final de 10% y se dejó en reposo por 10 minutos a temperatura ambiente. De esta solución se tomaron 50 µL y se transfirieron

a un tubo eppendorf al que se le agregó 800  $\mu\text{L}$  de la solución VM-MA-TX y se mezcló vigorosamente en "vortex" por un minuto y se le agregaron 100  $\mu\text{L}$  de amortiguador citrato al 34%. Se esperó 20 minutos antes de medir la D.O. a 630 nm en el espectrofotómetro. La curva de calibración se hizo con fosfato monopotásico en un rango de 0–10 nanomoles de fosfato. La mezcla de reacción contenía FtsZ silvestre o las mutantes puntuales a la concentración señalada en el amortiguador de polimerización a 30 °C y se inició al agregar el GTP a una concentración de 1 mM, de manera similar a lo descrito para los ensayos de polimerización.

### **Preparación de los conjugados fluorescentes con FITC, DNS y Alexaflúor-488**

Las sondas FITC, DNS, Alexaflúor-488 se disolvieron en dimetilformamida y la proteína FtsZ se conjugó a las sondas usando los protocolos tradicionales. Para el marcaje con FITC y DNS, 300  $\mu\text{L}$  de FtsZ a una concentración de 150  $\mu\text{M}$  se dializó contra el amortiguador fosfato de potasio pH 8,4 50 mM, KCl 50 mM, 1 mM EDTA y 5% v/v glicerol a 4 °C. Para el marcaje con Alexaflúor-488, 300  $\mu\text{L}$  de FtsZ a una concentración de 150  $\mu\text{M}$  se dializó contra el amortiguador fosfato de potasio pH 7 50 mM, KCl 50 mM, 1 mM EDTA y 5% v/v glicerol a 4 °C. Las muestras dializadas se incubaron con las sondas en un exceso molar de 10 veces a temperatura ambiente por 1,5 a 3 horas con agitación ocasional. En todos los casos la sonda libre se removió por cromatografía de exclusión molecular en Sephadex G-25 (Sigma, E.E.U.U.) seguida de una diálisis extensiva contra 2 L del amortiguador A de purificación (ver más arriba) a 4 °C. El grado de marcaje se determinó espectrofotométricamente usando los siguientes coeficientes de extinción molar:  $\epsilon_{\text{FITC}, 494\text{nm}} = 68.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ,  $\epsilon_{\text{DNS}, 340\text{nm}} = 3.400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ,  $\epsilon_{\text{Alexa}, 494\text{nm}} = 71.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , para FtsZ se usó el siguiente coeficiente de extinción molar:  $\epsilon_{\text{FtsZ}, 280\text{nm}} = 11.940 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

### **Cromatografía de exclusión molecular**

Los experimentos de cromatografía de exclusión molecular se hicieron con una bomba de HPLC marca WATERS 1525 (E.E.U.U.) acoplada a un detector WATERS 2487, ambos controlados con el Software Millennium (WATERS). Las muestras de proteína se dializaron contra el amortiguador de la fase móvil (fosfato de potasio pH 6,5 50 mM, KCl 0,3 M) a 4 °C y centrifugaron a 10.000 x g para eliminar los agregados insolubles. Posteriormente se equilibraron a 25 °C y 200 µL se inyectaron en una columna Tosoh Bioscience G3000SW<sub>XL</sub> (300 x 7,8 mm). La elución se llevó a cabo en un flujo de 1 mL min<sup>-1</sup> y el curso de la cromatografía se siguió midiendo la absorbancia a 220 nm. La calibración de la columna se hizo con el conjunto de estándares globulares de filtración en geles MWGF-70 (Sigma) y los detalles de los estándares se muestran en la figura 15. La fase móvil se trabajó a 25 °C. La integración de los cromatogramas se hizo con el software de control del equipo de HPLC.

### **Fluorescencia en estado estacionario de MANT-GDP y MANT-GTP: espectros de emisión, anisotropía y modelado de los datos**

Los espectros de emisión y las mediciones de anisotropía se hicieron en un espectrofluorímetro ISS PC1 (E.E.U.U.). La excitación se hizo a una longitud de onda de 375 nm con un ancho de banda de 16 nm. La emisión se detectó a través de un filtro de corte de 420 nm para bloquear la luz dispersada por la muestra en una celda de cuarzo de 1 x 0,4 cm de paso óptico. Los nucleótidos fluorescentes se usaron a una concentración 1,5 µM en amortiguador fosfato de potasio pH6,5 50 mM a 25 °C. Para la titulación de las proteínas éstas se incubaron a una concentración inicial de 50 µM en presencia de los nucleótidos y se diluyeron agregando el amortiguador con el



nucleótido a una concentración de 1,5  $\mu$ M hasta la concentración de proteína indicada. Los datos de anisotropía se modelaron de acuerdo a lo indicado en el apéndice D.

#### **Fluorescencia en estado estacionario de los conjugados FtsZ-FITC y FtsZ-DNS: anisotropía y modelado de los datos**

Las mediciones de anisotropía se hicieron en un espectrofluorímetro ISS PC1 (E.E.U.U.). La excitación se hizo a una longitud de onda de 490 nm para FITC y a 360 nm para DNS con un ancho de banda de 16 nm. La emisión se detectó a través de un filtro de corte de 515 nm para FITC y a través de un filtro de corte de 445 nm para DNS, para bloquear la luz dispersada por la muestra en una celda de cuarzo de 1 x 0,4 cm de paso óptico. La solución inicial para los experimentos de dilución se obtuvo mezclando una alícuota de las proteínas marcadas con un exceso de proteína no marcada a la concentración indicada. Todas las mediciones se hicieron en fosfato de potasio pH6,5 50 mM a 25 °C. El modelado de los datos de anisotropía se hizo de acuerdo a lo descrito en el apéndice B.

#### **Fluorescencia en estado estacionario de las mutantes F40W, Y222W y F275W: espectros de emisión.**

Las mediciones de fluorescencia de las mutantes puntuales se hicieron en un espectrofluorímetro ISS PC1 (E.E.U.U.). La excitación se hizo a una longitud de onda de 295 nm con un ancho de banda de 16 nm. La emisión se detectó a través de un filtro de corte de 320 nm para bloquear la luz dispersada por la muestra en una celda de cuarzo de 1 x 0,4 cm de paso óptico. Las soluciones de proteína iniciales para los experimentos de apagamiento colisional se obtuvieron incubando a las proteínas, a la concentración deseada, en ausencia de los apagadores en amortiguador fosfato de potasio pH 6,5 50 mM a 25 °C. Los apagadores se agregaron mediante alícuotas

desde soluciones stock previamente equilibradas a la temperatura indicada. Las soluciones stocks de Acrilamida y cloruro de cesio se prepararon en el amortiguador indicado y la solución stock de Ioduro de sodio se suplementó con bisulfito de sodio para prevenir la oxidación. El modelado de los datos de apagamiento se hizo de acuerdo a lo descrito en el apéndice A.

### **Fluorescencia resuelta en el tiempo de los conjugados FtsZ-FITC y FtsZ-DNS: tiempos de vida, polarización dinámica y análisis de los datos**

Las medidas de fluorescencia resuelta en el tiempo en el dominio de la frecuencia se realizaron en un espectrofluorómetro ISS Chronos (E.E.U.U.) con detección en modo análogo. La excitación de las muestras se llevó a cabo con un diodo LED sintonizado a 471 nm y pasándolo a través de un filtro de interferencia pasa banda centrado en 482 nm para la sonda FITC. La excitación para la sonda DNS se hizo con un diodo LED sintonizado a 375 nm y a través de un filtro pasa banda centrado en 375 nm. La emisión se observó a través de dos filtros de corte de 515 nm para FITC y un filtro de corte de 445 nm para DNS. Se usó fluoresceína (4,05 ns, Sigma) disuelta en 0,01 M NaOH como referencia de tiempo de vida para la sonda FITC y dimetil POPOP en 100% etanol (1,45 ns, Sigma) para la sonda DNS. Las mediciones de polarización dinámica se hicieron en las mismas condiciones sin usar las referencias de tiempo vida. Los datos de tiempo de vida y de polarización dinámica se analizaron con el software GLOBALS (<http://www.lfd.uci.edu/globals/>). Todas las mediciones se hicieron en celdas de cuarzo de 1 x 0,4 cm de paso óptico en amortiguador fosfato de potasio pH 6,5 50 mM a 25 °C.

## **Fluorescencia resuelta en el tiempo de las mutantes F40W, Y222W y F275W: tiempos de vida y análisis de los datos**

Las medidas de fluorescencia resuelta en el tiempo en el dominio de la frecuencia se realizaron en un espectrofluorómetro ISS Chronos (E.E.U.U.) con detección en modo análogo. La excitación de las muestras se llevó a cabo con un diodo LED sintonizado a 280 nm y pasándolo a través de un filtro de interferencia pasa banda centrado en 295 nm. La emisión se observó a través de dos filtros de corte de 320 nm para eliminar la luz dispersada desde las muestras. Se usó NATA (3 ns, Sigma) disuelto en 100% etanol como referencia para la estimación de los tiempos de vida. Los datos de tiempo de vida se analizaron con el software GLOBALS (<http://www.lfd.uci.edu/globals/>). Todas las mediciones se hicieron en celdas de cuarzo de 1 x 0,4 cm de paso óptico en amortiguador fosfato de potasio pH 6,5 50 mM a 25 °C.

## **Espectroscopia de dicroísmo circular y modelado de los datos**

Las mediciones de dicroísmo circular se obtuvieron en un espectropolarímetro Jasco-600 controlado por el software J-700 para Windows (Japón). Los espectros de CD se registraron entre 190 y 260 nm usando una resolución de 0,4 nm, una velocidad del registro de 50 nm min<sup>-1</sup> y un ancho de banda de 1 nm. Se usó la señal a 260 nm para corregir la línea base de las medidas. La señal de CD a 222 nm se registró durante 10 minutos después de una incubación de 2 horas a temperatura ambiente a la concentración de los agentes indicados a 25 °C. Las mediciones se hicieron en una celda cilíndrica de cuarzo de 1 cm, de 1 mm y de 0,1 mm de paso óptico para las concentraciones de proteína de 1; 5,6 y 46,3 µM de FtsZ. Para las mutantes se usó sólo la celda de 1 mm de paso óptico. Todas las mediciones se hicieron en

amortiguador fosfato de potasio pH6,5 50 mM a 25 °C. Los datos de los espectros de dicroísmo circular se usaron para determinar el contenido de estructura secundaria usando los algoritmos CONTIN, SELCON3 y CDSSTR en el sitio DICHROWEB (<http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/home.shtml>).

### **Espectroscopia de correlación de fluorescencia: instrumentación, manejo de muestras y análisis de los datos**

Las medidas de FCS se hicieron en un microscopio confocal modificado a partir de un microscopio invertido Zeiss modelo Axiovert S100 (Alemania), equipado con una lente objetivo Zeiss de inmersión para agua. Como fuente de excitación se usó un láser de doble fónon Mai Tai HP titanio-safiro sintonizado a 790 nm con un poder de 40 mW. Las cuentas de fluorescencia se detectaron con un detector híbrido Becker & Hickl GmbH modelo HPM-100-40 (Alemania). La señal se registró y se analizó con el software SimFCS (<http://www.lfd.uci.edu/globals/>). 50  $\mu$ L de las muestras que contenían FtsZ-Alexa488 a una concentración de 100 nM, a la concentración de urea indicada se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente y después se cargaron en un vidrio portaobjetos (Corning) ubicado sobre el objetivo del microscopio usando un portaobjetos hecho a mano. La calibración del volumen de observación se hizo con rodamina 110 usando  $D = 430 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$  (Jameson y col., 2009).

Los datos de FCS se ajustaron a las curvas de autocorrelación de acuerdo a lo descrito en el apéndice A. Los valores de  $D$  calculados a partir de las curvas de autocorrelación se corrigieron por los cambios en la viscosidad debidos a la adición de urea usando la relación  $D = D_0 \times (\eta_0/\eta)$  donde el subíndice 0 indica la solución acuosa en ausencia de urea. Las viscosidades se calcularon para cada concentración de urea usando la ecuación empírica (Kawahara y Tanford, 1966):

$$\frac{\eta}{\eta_0} = 1 + 3.74 \times 10^{-2} m + 1.78 \times 10^{-3} m^2 - 4.4 \times 10^{-5} m^3$$

Donde  $\eta_0$  es la viscosidad en ausencia de urea y  $\eta$  es la viscosidad de la solución con urea a una concentración molal  $m$ . A partir de los coeficientes de difusión corregidos, los valores de radio hidrodinámico se calcularon de acuerdo a lo descrito en el apéndice A.

## Resultados

### Estudio *in silico* e *in vitro* de FtsZ silvestre y las mutantes F40W, Y222W y F275W

En esta tesis se usó la fluorescencia intrínseca del triptófano introducido por mutagénesis sitio-dirigida, para estudiar los cambios conformacionales inducidos por el intercambio de los nucleótidos GDP y GTP en FtsZ, es decir para formar polímeros curvos y rectos, respectivamente. En primera instancia, se describen las mutaciones en un modelo tridimensional de la estructura de FtsZ y posteriormente se describe la caracterización *in vitro* de las proteínas purificadas.

#### Modelo de la estructura de FtsZ: análisis de las mutaciones F40W, Y222W y F275W

La secuencia de FtsZ consta de 383 aminoácidos y posee 16 aminoácidos aromáticos de los cuales 13 son fenilalaninas y 3 son tirosinas (*subrayados en la figura 4*). El dominio N considera a los aminoácidos 1 a 176, con 7 fenilalaninas en las posiciones 2, 39, 40, 99, 135, 137 y 145. El dominio C considera a los aminoácidos 177 a 383 y tiene 6 fenilalaninas en las posiciones 182, 210, 268, 275, 285 y 377, y 3

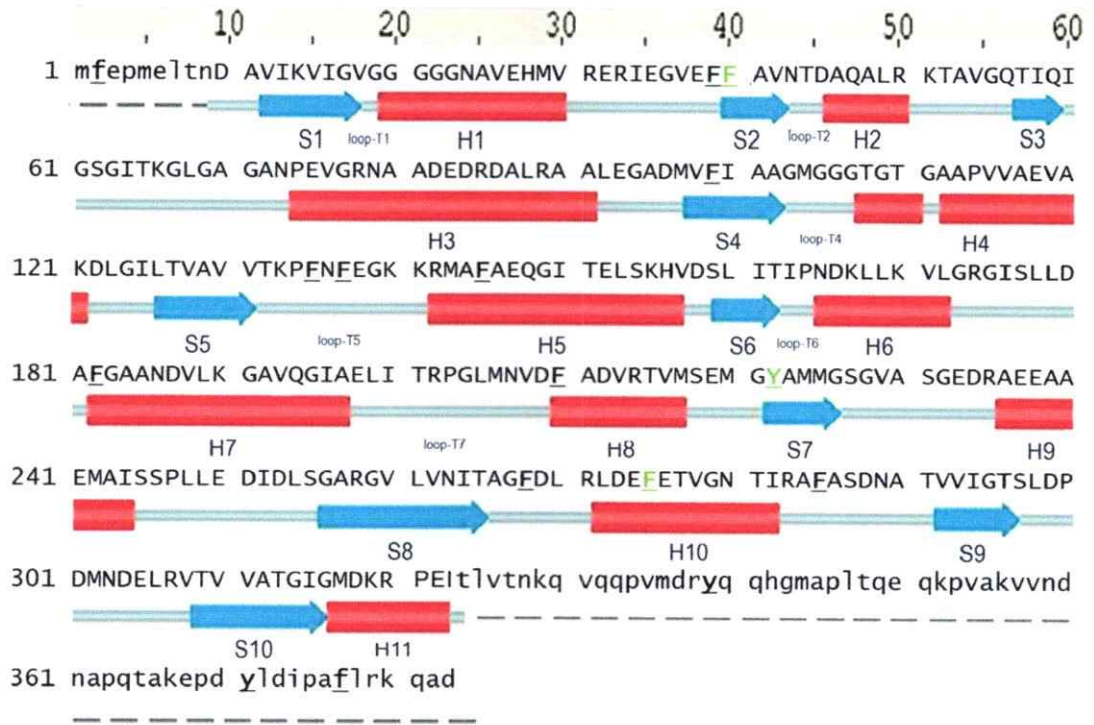


Figura 4 Secuencia de aminoácidos y estructura secundaria de FtsZ de *Escherichia coli*. Los nombres indicados debajo del esquema de estructura secundaria corresponden a las hojas beta (S1-S10), a las hélices alfa (H1-H11) y a los lazos o "loops" (T1-T7). La estructura secundaria de los extremos N- y C-terminales se desconoce por lo que se dibujaron con una línea discontinua en el esquema. Los aminoácidos con cadenas laterales aromáticas se indican subrayados, correspondientes a 13 fenilalaninas y 3 tirosinas. Los aminoácidos F40, Y222 y F275 se destacaron en color verde (ver más abajo).

tirosinas en las posiciones 222, 339 y 371. Previamente en el laboratorio se reemplazaron 5 fenilalaninas y 1 tirosina por el aminoácido triptófano en la proteína FtsZ (Montecinos, 2004). La caracterización bioquímica de estas mutantes puntuales permitió seleccionar tres proteínas que son las mutantes F40W, Y222W y F275W (*destacados en color verde en la figura 4*). Mediante el uso de "Docking Macromolecular" (comunicación personal de Felipe Villanelo, 2010), se construyó un modelo del tetrámero de FtsZ unida a GDP, es decir, en la conformación que produce polímeros curvos (*esquina superior derecha*) (Montecinos y col., 2010). En el centro de la figura 5 se muestra un acercamiento con dos vistas, una frontal y otra posterior, de las subunidades centrales del modelo del tetrámero (*señalado por el recuadro negro*). En ambas subunidades del dímero, los dominios N y C se pintaron de color azul y rojo, respectivamente. Los monómeros se encuentran asociados por la superficie de interacción longitudinal, donde el dominio C del monómero superior encuentra la superficie complementaria en el dominio N del monómero inferior. La hélice H7, pintada en color celeste en la figura 5, es considerada la frontera entre ambos dominios. Si bien las mutantes se fabricaron individualmente para la caracterización bioquímica, y por simplicidad en el análisis del modelo, usaremos una secuencia de FtsZ donde las posiciones 40, 222 y 275 se reemplazaron por triptófano simultáneamente. En el dímero, las cadenas laterales de los triptófanos se pintaron en color salmón para la mutación F40W, en color verde para la mutación Y222W y en color amarillo para la mutación F275W (*figura 5*).

La inspección visual del modelo permite distinguir que el triptófano ubicado en la posición 40 se encuentra en el interior del dominio N, mientras que el triptófano ubicado en la posición 275 se encuentra en el interior del dominio C y cerca del sitio de

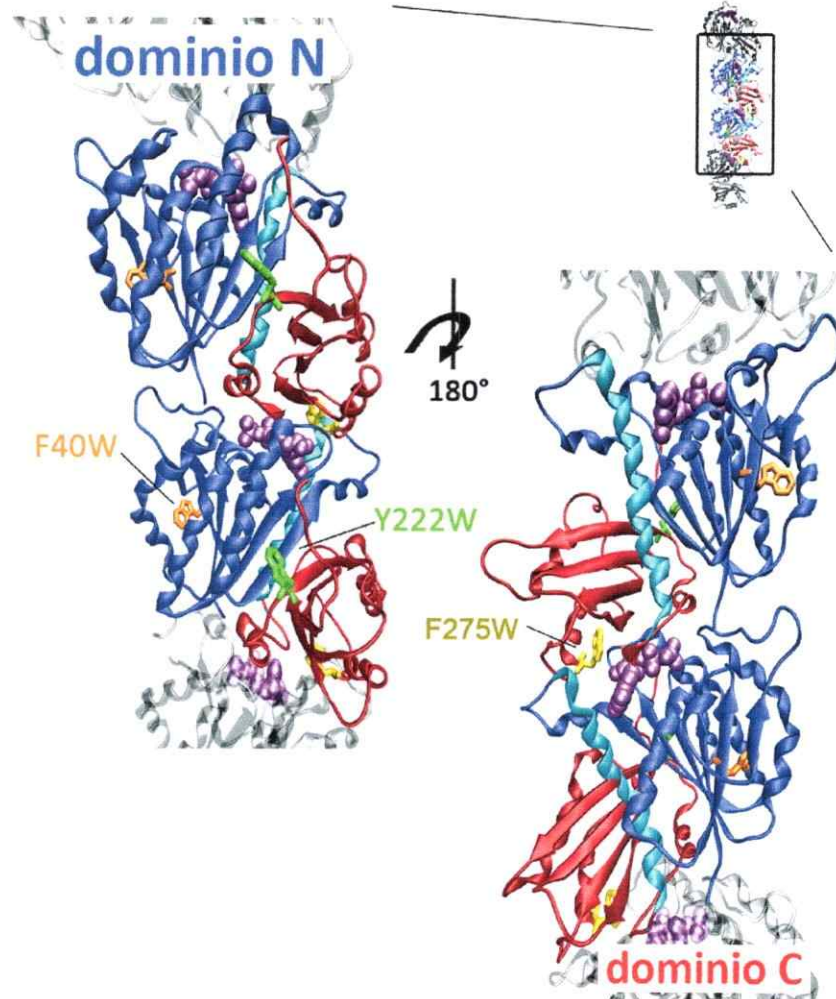


Figura 5 Modelo de cintas de la estructura 3D de FtsZ de *Escherichia coli*. En la parte superior izquierda se muestra el modelo del tetramero de FtsZ construido a partir de la estructura del dímero de FtsZ (1W5A.pdb). En el centro de la figura se muestran dos vistas, una frontal y otra trasera, del dímero de FtsZ, en el contexto del modelo del tetramero (señalado en el recuadro negro), donde las subunidades se encuentran asociadas a través de la interacción longitudinal. En el modelo, los dominios N- y C-terminales se representaron en color azul y rojo, respectivamente, mientras que la hélice H7 se destacó en color celeste. Los aminoácidos F40 (color salmón), Y222 (verde) y F275 (amarillo) se reemplazaron por triptófanos y se muestran sus cadenas laterales en los colores indicados. El nucleótido GTP se representó con la superficie de van der Waals en color púrpura. Las imágenes se prepararon con VMD (Visual Molecular Dynamics, Humphrey y cols., 1996) y se refinaron con POV-Ray (Persistence Of Vision Raytracer, Version 3.6).



unión del nucleótido de la subunidad inferior del dímero. El triptófano introducido en la posición 222 se encuentra entre los dominios N y C y forma parte de la superficie de interacción interdominio (Montecinos, 2010). Para caracterizar en mayor detalle la información estructural que entrega el modelo del tetrámero, se identificaron los aminoácidos que se encuentran a un máximo de 5 Å de distancia en el espacio que rodea a los triptófanos introducidos por mutación (*figura 6*). El triptófano en la posición 40 se encuentra rodeado por las cadenas laterales de 9 aminoácidos: Lys 14, Ile 16, Phe 39, Ala 41, Val 42, Gln 56, Ile 58, Leu 88 y Ala 91. El triptófano en la posición 222 se encuentra rodeado de 7 aminoácidos: Ile 150, Ser 150, Leu 160, Gly 221, Gly 314, Ile 315 y Lys 319. El triptófano en la posición 275 se encuentra rodeado de 8 aminoácidos: Leu 178, Asp 180, Glu 274, Thr 277, Asp 273, Val 278, Ile 294 y Thr 296. Para obtener un dato cuantitativo acerca del grado de exposición del triptófano en los modelos, se hizo una simulación por dinámica molecular del área accesible al solvente (ASA). En este análisis se usó a la proteína en estado monomérico ( $ASA_{mon}$ ) y en el contexto del estado tetramérico ( $ASA_{tet}$ ), es decir, con FtsZ en estado polimerizado (*figura 6 A – C*). El triptófano en la posición 40 presentó  $ASA_{40-mon} = 0,48 \pm 0,18 \text{ nm}^2$  y  $ASA_{40-tet} = 0,40 \pm 0,06 \text{ nm}^2$ , en la posición 222 presentó  $ASA_{222-mon} = 0,59 \pm 0,09 \text{ nm}^2$  y  $ASA_{222-tet} = 0,67 \pm 0,08 \text{ nm}^2$  y en la posición 275 presentó  $ASA_{275-mon} = 0,87 \pm 0,15 \text{ nm}^2$  y  $ASA_{275-tet} = 0,28 \pm 0,08 \text{ nm}^2$ . Entonces, en el estado monomérico de FtsZ, el triptófano presenta  $ASA_{40-mon} \approx ASA_{222-mon} < ASA_{275-mon}$ . En el estado tetramérico de FtsZ, el triptófano presenta  $ASA_{275-tet} < ASA_{40-tet} < ASA_{222-tet}$ . Se observó que los mayores cambios en ASA por efecto de aumentar el grado de oligomerización de FtsZ se producen en el triptófano de la posición 275, es decir en el dominio C ( $P < 0,001$ ). En contraposición, el triptófano en la posición 40 (dominio N) no mostró cambios significativos en ASA por la oligomerización de FtsZ ( $P = 0,428$ ). El triptófano 222, ubi-

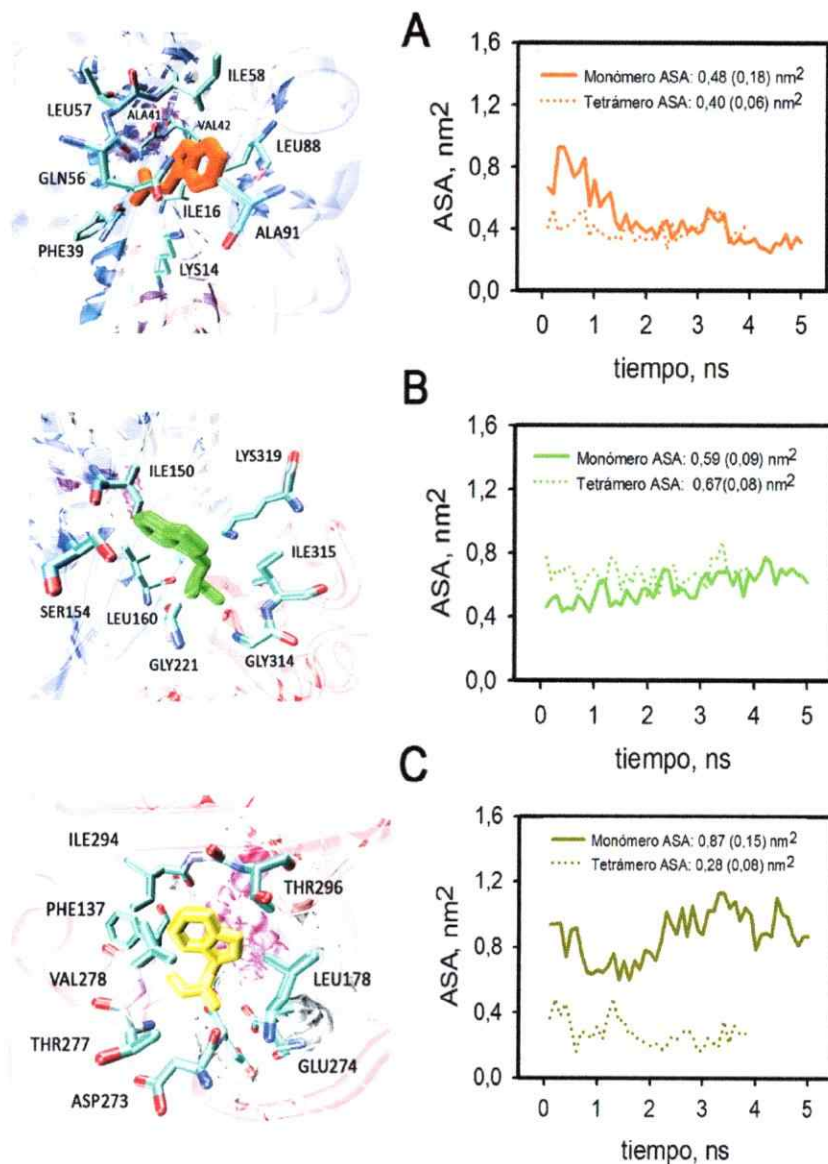


Figura 6 Modelo de las mutaciones F40W, Y222W y F275W en el monómero de FtsZ. A la izquierda se muestran tres vistas del monómero de FtsZ unida a GDP, portando a las mutaciones F40W (A *salmón*), Y222W (B *verde*) y F275W (C *amarillo*). Las cadenas laterales de los aminoácidos que se encuentran a una distancia máxima de 5 Å se representaron con barras. Los modelos se pintaron siguiendo el mismo patrón de la figura 5. A la derecha se muestra una simulación por dinámica molecular del ASA de los triptófanos en las posiciones 40, 222 y 275 para FtsZ en estado monomérico (*línea continua*) y en estado tetramérico (*línea punteada*). Se indica el ASA promedio y su desviación estándar durante el tiempo de la simulación. Las imágenes se prepararon con VMD (Visual Molecular Dynamics, Humphrey y cols., 1996) y se refinaron con POVray (Persistence Of Vision Raytracer, Version 3.6).

cado en la interfase interdominio, tampoco mostró cambios significativos en ASA debidos a los cambios en la oligomerización de FtsZ ( $P = 0,207$ ).

### **Expresión y purificación de FtsZ silvestre y las mutantes puntuales F40W, Y222W y F275W**

Se han descrito varios métodos de purificación de FtsZ silvestre y éstos se pueden clasificar en dos grupos: *los métodos bioquímicos* y *los métodos funcionales*. Los métodos del primer grupo combinan la técnica de precipitación con sulfato de amonio (*salting out*) con cromatografía de intercambio iónico y/o cromatografía de exclusión molecular (Bramhill y Thompson, 1994; Erickson y col., 1996; Mukherjee y col., 1993; Mukherjee y Lutkenhaus, 1998; RayChaudhuri y Park, 1992; Sossong y col., 1999). Los métodos del segundo grupo consideran una o más etapas con técnicas del método bioquímico, más una etapa de selección funcional donde se saca provecho de la capacidad de polimerizar de FtsZ para seleccionar específicamente a la proteína activa (Andreu y col., 2002; Beuria y col., 2003; Mukherjee y col., 2005; Rivas y col., 2000; Romberg y col., 2001). En esta tesis, se implementó un procedimiento de purificación de FtsZ, derivado del método funcional, que permitió aumentar el rendimiento y disminuir el tiempo de trabajo en relación a los métodos usados anteriormente en el laboratorio.

Para explicar la purificación de FtsZ, comenzaremos con una breve descripción del sistema de expresión con que se trabajó en esta tesis. El gen *ftsZ* se expresa desde el vector pET-FtsZ (*figura 7 A*), un derivado del vector comercial pET-28a(+) (NOVAGEN). En este sistema, la transcripción del gen *ftsZ* está controlada por el promotor T7 y se induce con IPTG. El vector pET-FtsZ confiere resistencia a ampicilina y no tiene un sitio de restricción para la endonucleasa *Xba I*, a diferencia del vector

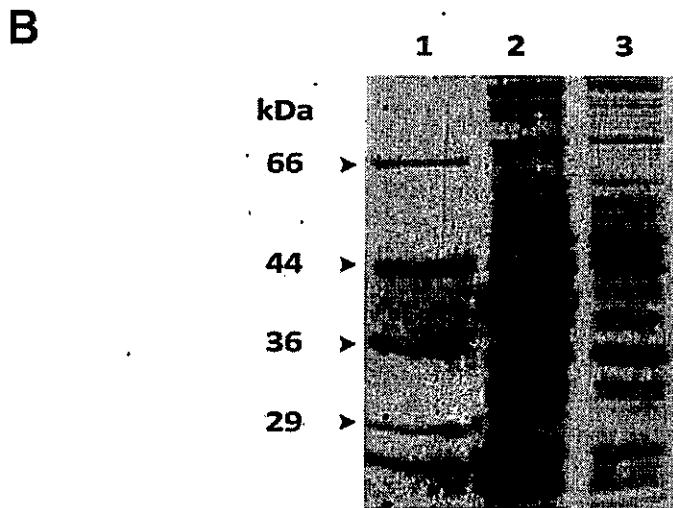
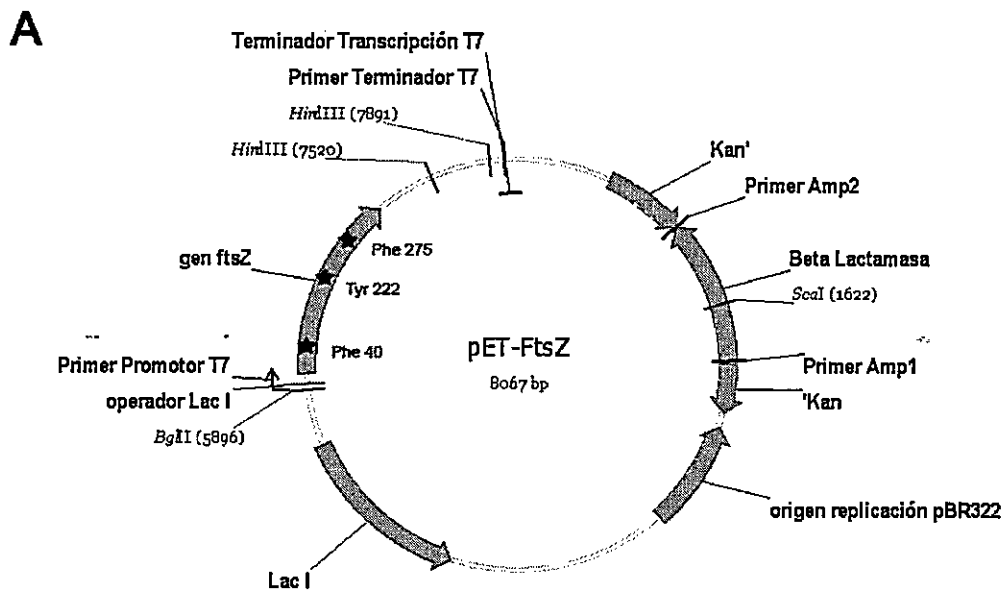


Figura 7 Experimento de sobreexpresión de la proteína FtsZ silvestre en la cepa *E. coli* BL21 (DE3). A, esquema del vector de expresión pET-FtsZ (~ 8 kb). B, SDS-PAGE del experimento de inducción con IPTG (0,3 mM) en la cepa BL21 (DE3) transformada con el vector pET-FtsZ. línea 1, estándar de masa molecular; línea 2, *E. coli* BL21 (DE3)/ pET-FtsZ inducida con IPTG durante 3 horas a 37 °C; línea 3, *E. coli* BL21 (DE3)/ pET-FtsZ no inducida.

pET-28a(+) que confiere resistencia a kanamicina y tiene 1 sitio de restricción *Xba I*. El mapa del vector pET-FtsZ muestra que el marco de lectura abierto "Kan" está interrumpido por un marco de lectura abierto "Amp", entre los fragmentos *Kan'* y *Kan*. Debido a esto el vector pET-FtsZ, que es un derivado del vector comercial pET-28a(+), confiere resistencia al antibiótico ampicilina en lugar del antibiótico kanamicina. Las estrellas pintadas sobre el marco de lectura abierto *ftsZ* (figura 7 A), indican las posiciones en la secuencia nucleotídica donde se reemplazó a la fenilalanina 40, la tirosina 222 y la fenilalanina 275 por triptófano usando mutagénesis sitio-dirigida. En la figura 7 B se muestra un gel SDS-PAGE con los resultados del ensayo de expresión en la cepa *E. coli* BL21 (DE3) electro-transformada con el vector pET-FtsZ. La inducción con IPTG, en la línea 2 de la figura 7 B, produce la expresión de una banda con la migración relativa esperada para FtsZ (~40 kDa), de acuerdo al estándar de masa molecular mostrado en la línea 1. La identidad de la banda se confirmó con un western blot usando anticuerpos policlonales de conejo contra la proteína FtsZ (Montecinos, 2010). La línea 3 de la figura 7 B muestra a la cepa BL21 (DE3)/pET-FtsZ en la condición no inducida donde se puede distinguir la ausencia de la banda correspondiente a FtsZ. En el sistema de expresión pET, la proteína Lac I es el represor que mantiene el promotor T7 inactivo en la condición no inducida.

Con el fin de comparar el resultado de la purificación de FtsZ con el método funcional y el método de los ciclos de purificación se hizo un estudio de su pureza y rendimiento. Los pasos de ambos métodos se esquematizan en los diagramas de flujo mostrados en la figura 8 A y B. Para seguir a la proteína en los pasos de la purificación se hicieron geles SDS-PAGE teñidos con azul de coomassie que se muestran en la figura 8 C y D.

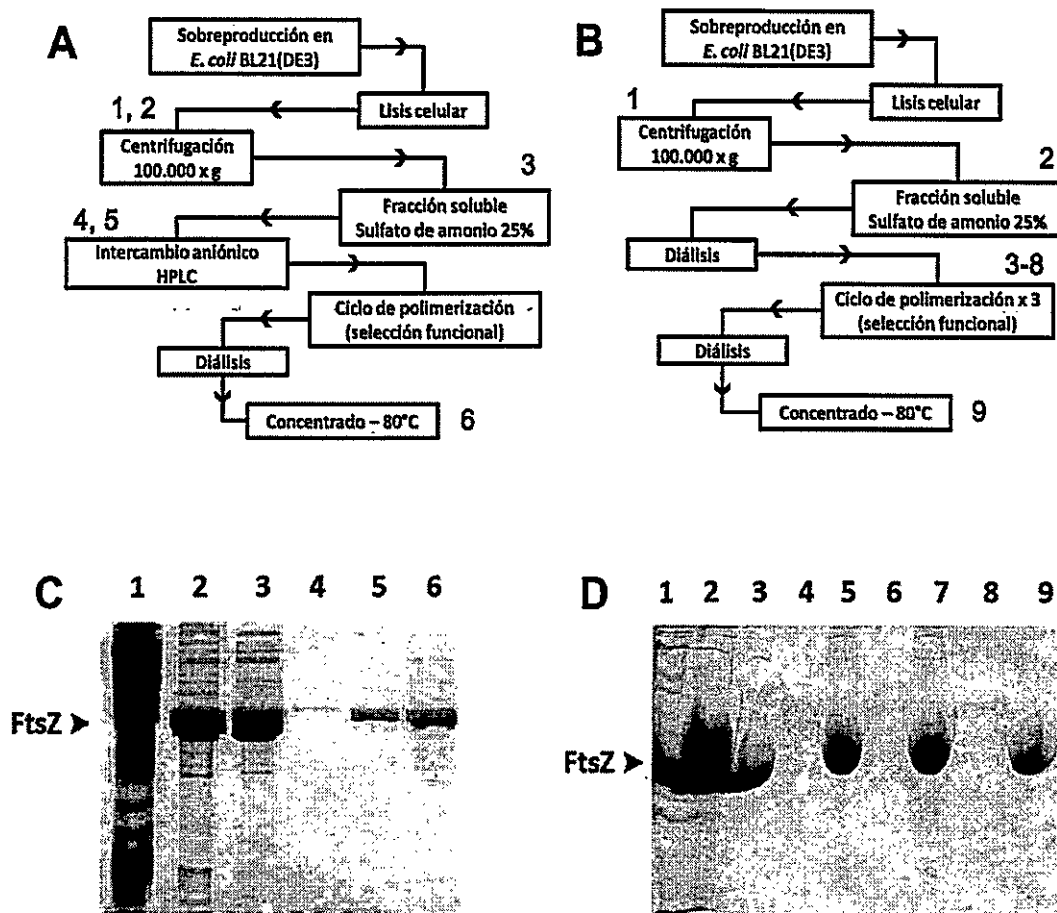


Figura 8 Comparación de dos métodos de purificación de FtsZ. A y C muestran el diagrama de flujo y los testigos de los pasos de purificación al usar el método bioquímico. B y D muestran el diagrama de flujo y los testigos de los pasos de purificación usando el método de los ciclos de polimerización. En el gel mostrado en C, línea 1: fracción de membranas, línea 2: sobrenadante centrifugación, línea 3: precipitado con sulfato de amonio, líneas 4 y 5: picos del lavado y elución (~350 mM KCl) de FtsZ desde la columna de intercambio aniónico, línea 6: concentrado que se almacenó a -80 °C. En el gel mostrado en D, línea 1: sobrenadante de centrifugación, línea 2: precipitado con sulfato de amonio, líneas 3 y 4, 5 y 6, 7 y 8: material sedimentado (polímeros) y sobrenadante de los ciclos de polimerización 1-3, respectivamente, línea 9: concentrado que se almacenó a -80 °C.

El método bioquímico (*figura 8 A y C*) consiste en una precipitación con sulfato de amonio (*línea 3*), seguida de una cromatografía de intercambio aniónico (*líneas 4 y 5*) y un ciclo de polimerización y despolimerización en presencia de Mg-GTP, cloruro de calcio y ácido glutámico. El método funcional (*figura 8 B y D*), implementado en esta tesis, consiste en la precipitación con sulfato de amonio (*línea 2*) seguida de tres ciclos de polimerización y despolimerización en presencia de Mg-GTP, cloruro de calcio y ácido glutámico (*líneas 3 - 8*). En ambos métodos el material resultante de los ciclos de polimerización se almacenó congelado a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  (*líneas 6 y 9*). Para comparar las purificaciones en cuanto a su pureza, se hizo un análisis mediante SDS-PAGE revelado con tinción de plata que provee de una sensibilidad en el rango 10-100 ng de proteína, es decir, unas diez veces más sensible que la tinción con azul de coomassie. La *figura 9* muestra los geles SDS-PAGE revelados con azul de coomassie (*figura 9 arriba*) y con nitrato de plata (*figura 9 abajo*). El análisis densitométrico de la imagen se hizo con las muestras de 2  $\mu\text{g}$  debido a que en las muestras de 5  $\mu\text{g}$  se observó una mayor saturación de la tinción de plata. El método funcional arrojó una pureza  $\geq 93\%$  mientras que el método de los ciclos de polimerización arrojó una pureza  $\geq 96\%$ . El método funcional resultó con un rendimiento de 10 – 20 mg por litro de cultivo bacteriano, mientras que el método de los ciclos de polimerización arrojó un rendimiento de 20 – 40 mg por litro de cultivo bacteriano. La *figura 10* muestra a los productos de polimerización de FtsZ analizados mediante microscopía electrónica. En las imágenes de la izquierda se muestran los polímeros formados por FtsZ en presencia de Mg-GTP que consisten, en su mayoría, en polímeros de una hebra y de doble hebra. Los filamentos simples tienen un ancho homogéneo de  $4 \pm 1\text{ nm}$  ( $n = 20$ ) y los filamentos dobles tiene un ancho homogéneo de  $9 \pm 2\text{ nm}$  ( $n = 20$ ).

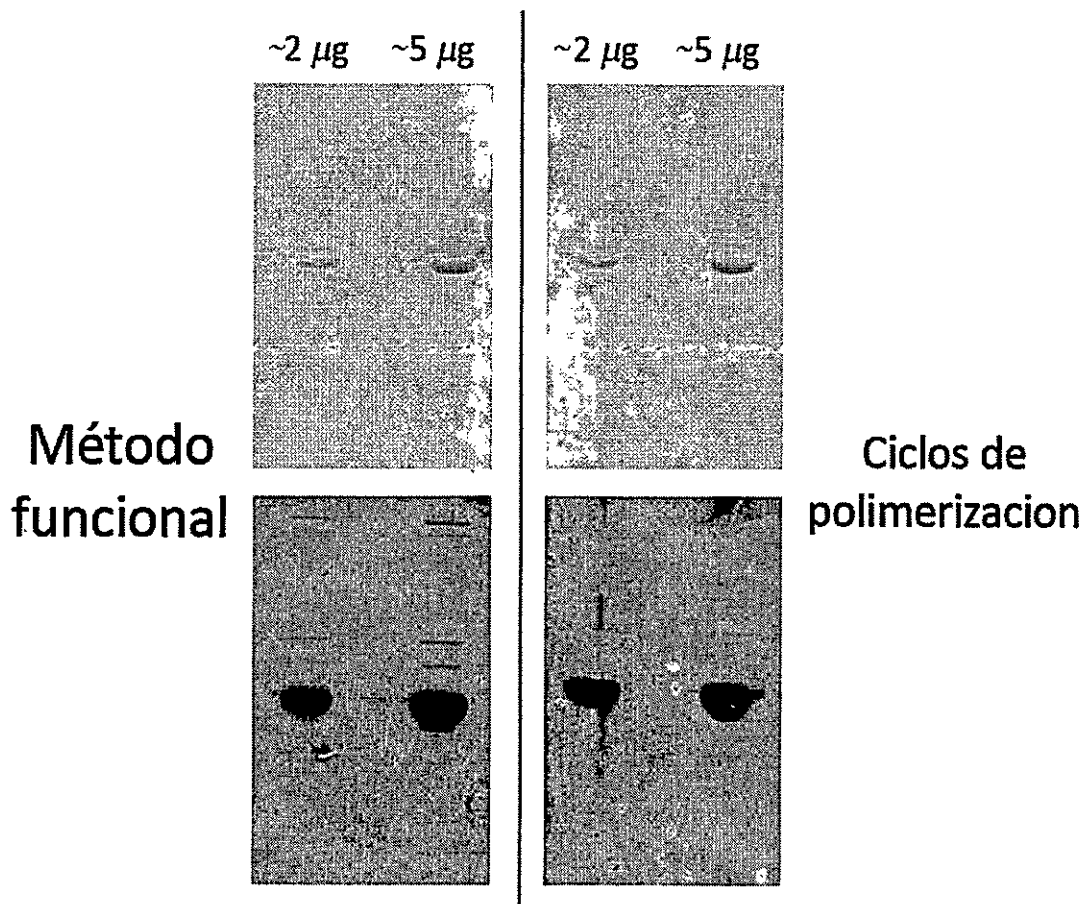


Figura 9 Comparación mediante geles SDS-PAGE de las muestras resultantes la purificación de FtsZ por el método funcional (*geles de la izquierda*) y por el método de los ciclos de polimerización (*geles de la derecha*). Los dos geles de arriba se revelaron con tinción de azul de coomassie y los geles de abajo se revelaron con tinción de nitrato de plata. Los pocillos de ambos geles se cargaron con 2 y 5  $\mu\text{g}$  totales de proteína según lo indicado.



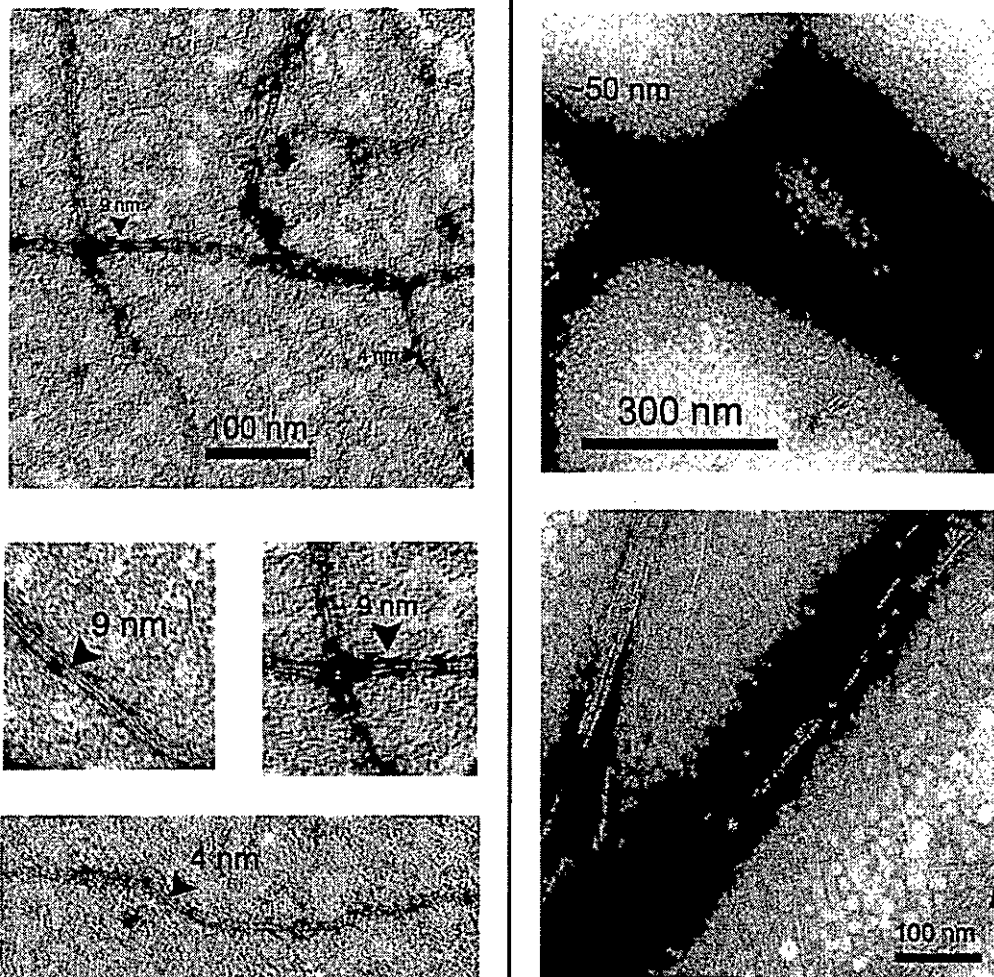


Figura 10 Imágenes de microscopía electrónica reveladas con tinción negativa de los productos de polimerización de FtsZ. A la izquierda se muestran imágenes de los polímeros formados por FtsZ unida a GTP en presencia del ión  $Mg^{2+}$ . Las imágenes de la derecha muestran los polímeros formados por FtsZ unida a Mg-GTP en presencia de ácido glutámico 1 M.

Las imágenes de la derecha (*figura 9*) muestran los polímeros formados por FtsZ en presencia de Mg-GTP, ácido glutámico y cloruro de calcio, es decir en las condiciones de la purificación por ciclos de polimerización. La mayor parte de los polímeros formados en estas muestras corresponden a manojos de filamentos asociados lateralmente. Los manojos están formados por 10 – 20 filamentos de FtsZ. El largo de los polímeros es variable en las muestras de FtsZ polimerizada en presencia de Mg-GTP, mientras que los polímeros observados en las muestras de FtsZ polimerizada en presencia de glutamato y calcio siempre tuvieron largos >1000 nm.

La *figura 11* muestra el gel SDS-PAGE teñido con azul de coomassie con los resultados de la purificación de FtsZ silvestre y de las mutantes F40W, Y222W y F275W usando el método de los ciclos de polimerización. Las purificaciones se cuantificaron con el método de Bradford usando una curva de calibración con BSA (*figura 11 A*). Una inspección visual de la *figura 11 B* muestra que las purificaciones de las mutantes tienen una pureza similar a la FtsZ silvestre. La *tabla 1* muestra los resultados de la cuantificación de FtsZ silvestre y las mutantes F40W, Y222W y F275W. La concentración de proteína que se alcanzó en las cuatro purificaciones fue similar, sin embargo, el contenido de nucleótido de las mismas fue diferente. En general, las proteínas FtsZ silvestre, F40W e Y222W tuvieron un contenido de nucleótido similar ~ 0,5 – 0,7 moles de nucleótido por mol de proteína. La purificación de la mutante F275W mostró menor rendimiento (~10 mg por litro de cultivo inducido) y siempre arrojó un contenido de nucleótido menor, ~ 0,3 moles de nucleótido por mol de proteína.

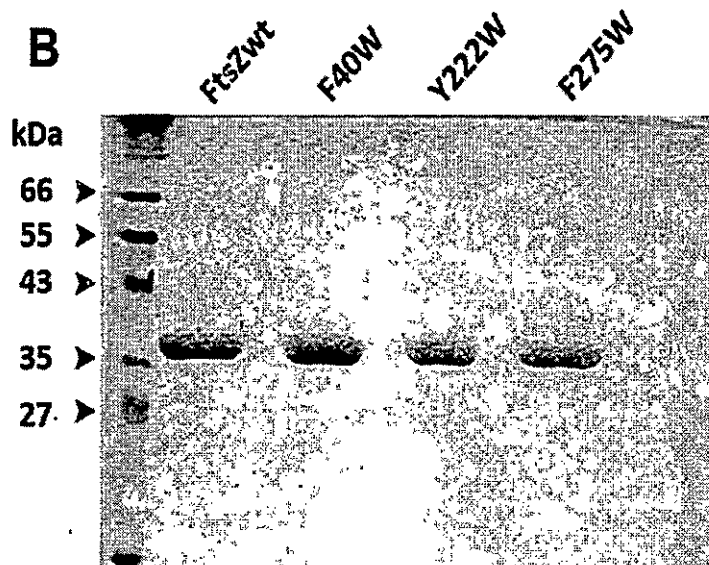
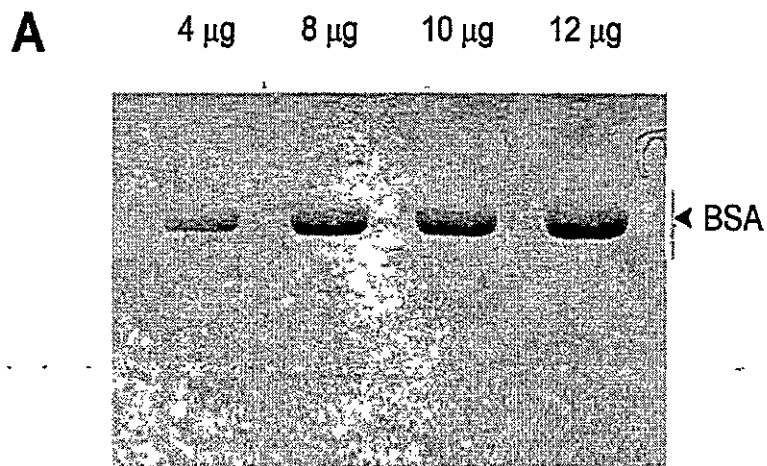


Figura 11 Cuantificación de la concentración de proteína total en las purificaciones de FtsZ silvestre y las mutantes puntuales F40W, Y222W y F275W usando el método de Bradford. *A* estándar de proteína BSA (BIORAD) usado para la determinación de proteína total. *B* aproximadamente 10  $\mu$ g de proteína total de las purificaciones de FtsZ silvestre y las mutantes con el método de ciclos de polimerización.

Tabla 1 Concentraciones de proteína total y contenido de nucleótido de las purificaciones de FtsZ silvestre y las mutantes puntuales F40W, Y222W y F275W por el método de los ciclos de polimerización

	$\mu\text{M}$	mg/mL	$\frac{\text{mol nucleótido}}{\text{mol FtsZ}}$
FtsZwt	566	22	0,7
F40W	547	22	0,6
Y222W	520	21	0,5
F275W	521	21	0,3

## **Caracterización de la función *in vitro* de FtsZ silvestre y las mutantes puntuales F40W, Y222W y F275W**

Con el fin de evaluar la funcionalidad de las proteínas purificadas por el método de los ciclos de polimerización se hicieron experimentos de polimerización y actividad GTPásica (*figura 12*). La cinética del proceso de polimerización se inició con la adición de GTP y se siguió por dispersión de luz a 350 nm que permite detectar cambios en la turbidez de la solución (*figura 12 A*). El aumento en la turbidez de la solución se debe a que los polímeros de FtsZ dispersan la luz en mayor medida que la proteína FtsZ en estado no polimerizado. A partir de la diferencia entre el máximo y la línea base de dispersión de luz ( $\Delta$ ), a distintas concentraciones de proteína, se calcularon las concentraciones críticas ( $C_c$ ) para la polimerización (*figura 12 B*). La cinética de la actividad GTPásica se inició con la adición de GTP y el progreso se siguió por la liberación de fosfato inorgánico producto de la hidrólisis del nucleótido (*figura 12 C*). A partir de las velocidades iniciales ( $V_i$ ) de las curvas de progreso de la actividad GTPásica, a distintas concentraciones de proteína, se calcularon las concentraciones críticas para la actividad GTPásica (*figura 12 D*). Los valores de concentración crítica para la polimerización y actividad GTPásica de FtsZ silvestre y las mutantes puntuales F40W, Y222W y F275W se muestran en la *tabla 2*. Para la polimerización se observaron valores similares de concentración crítica para FtsZwt y F40W, en cambio, los valores observados para Y222W y F275W son similares entre sí pero mayores que los de FtsZ silvestre indicando una disminución en la capacidad de polimerización. Para la actividad GTPásica, en todos los casos se observaron valores de concentración crítica menores a los determinados con la polimerización.

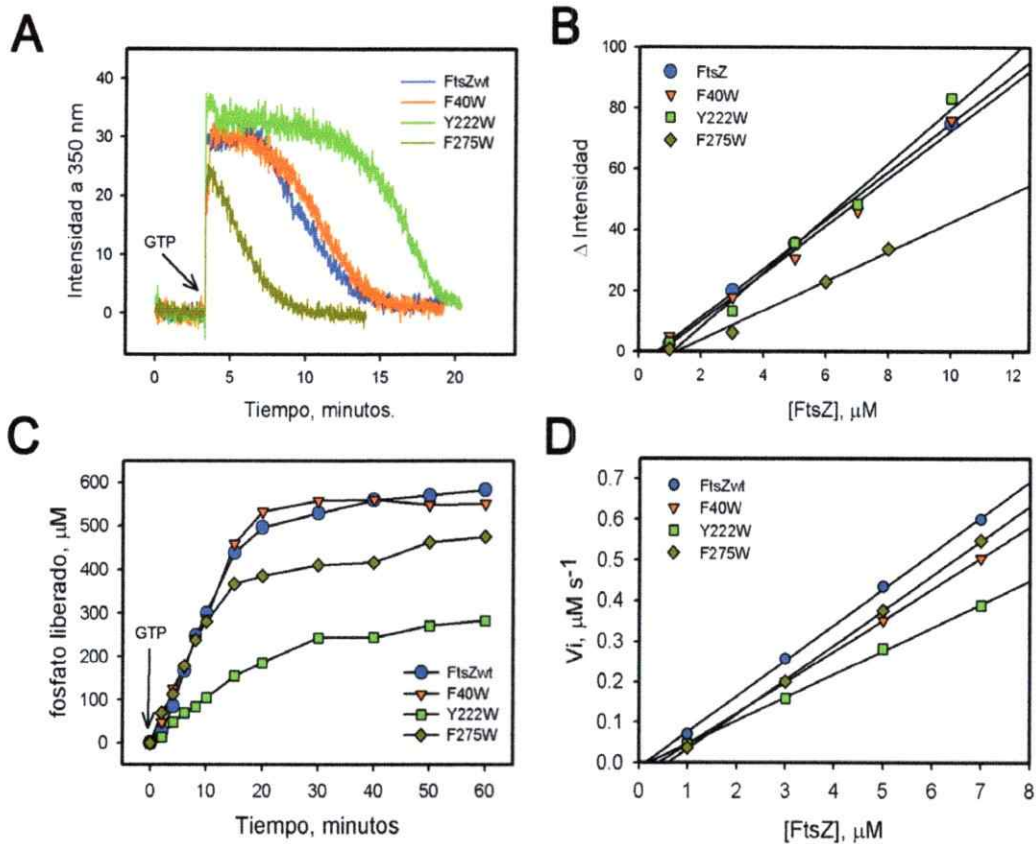


Figura 12 Experimentos de polimerización y actividad GTPásica con las purificaciones de FtsZ silvestre (*azul*) y las mutantes puntuales F40W (*salmon*), Y222W (*verde*) y F275W (*amarillo oscuro*). **A** cinéticas de polimerización a 5 μM de concentración de proteína, seguidas por dispersión de luz a 350 nm e iniciadas por la adición de GTP 0,5 mM (*flecha*). **B** rectas de concentración crítica, obtenidas a partir de las cinéticas de polimerización a distintas concentraciones de proteína. **C** curvas de progreso de la actividad GTPásica a 7 μM de concentración de proteína, seguidas por la liberación de fosfato inorgánico e iniciadas con la adición de GTP 1 mM (*flecha*). **D**, rectas de concentración crítica, obtenidas a partir de las curvas de progreso a distintas concentraciones de proteína.

Tabla 2. Concentraciones críticas para la polimerización y actividad GTPásica de FtsZ silvestre y las mutantes puntuales F40W, Y222W y F275W

	Polimerización $\mu\text{M}$	GTPásica $\mu\text{M}$
FtsZwt*	0,6	0,2
F40W	0,7	0,4
Y222W	1,1	0,2
F275W	1,2	0,6

\*Las rectas de concentración crítica ajustaron a los datos experimentales con  $R^2 > 0.98$ .

Se observaron valores similares de concentración crítica para FtsZwt y Y222W, mientras que los valores de F40W y F275W son similares entre sí pero mayores que los de FtsZ silvestre indicando una disminución de la hidrólisis del nucleótido.

Es sabido que la actividad GTPásica de FtsZ puede describirse con el modelo de Michaelis-Menten (Nova y col., 2007; Sossong y col., 1999). Por ello se hicieron experimentos por saturación sustrato para la actividad GTPásica de FtsZ silvestre y de las mutantes F40W, Y222W y F275W purificadas con el método de los ciclos de polimerización (*figura 13*). Los parámetros de Michaelis-Menten obtenidos a partir del ajuste de los datos experimentales se muestran en la *tabla 3*. En general, se observaron magnitudes similares para las constantes cinéticas  $V_{max}$  y  $K_m$  en todas las purificaciones, con excepción de la proteína F275W donde la  $K_m$  fue unas 15 veces mayor que el promedio observado para las proteínas FtsZwt, F40W y Y222W, sugiriendo una disminución de la afinidad por el nucleótido GTP. Con los datos obtenidos se calcularon las constantes catalíticas de la actividad GTPásica, a partir del ajuste de Michaelis-Menten ( $K_{cat-MM}$ ) y también a partir de los gráficos de concentración crítica ( $K_{cat-Cc}$ ) y los valores se muestran en la *tabla 4*. Se observó que el número de recambio ( $K_{cat}$ ) tiene *magnitudes* similares para las cuatro purificaciones por lo que la velocidad de hidrólisis del nucleótido, en estado estacionario, no se afectó mayormente por efecto de las mutaciones.

#### **Estructura secundaria de FtsZ silvestre y de las mutantes puntuales F40W, Y222W y F275W**

Se midió a través de difracción circular el contenido de estructura secundaria de las proteínas purificadas por ciclos de polimerización para medir el efecto del procedimiento de purificación sobre la estructura de las proteínas (*figura 14*).



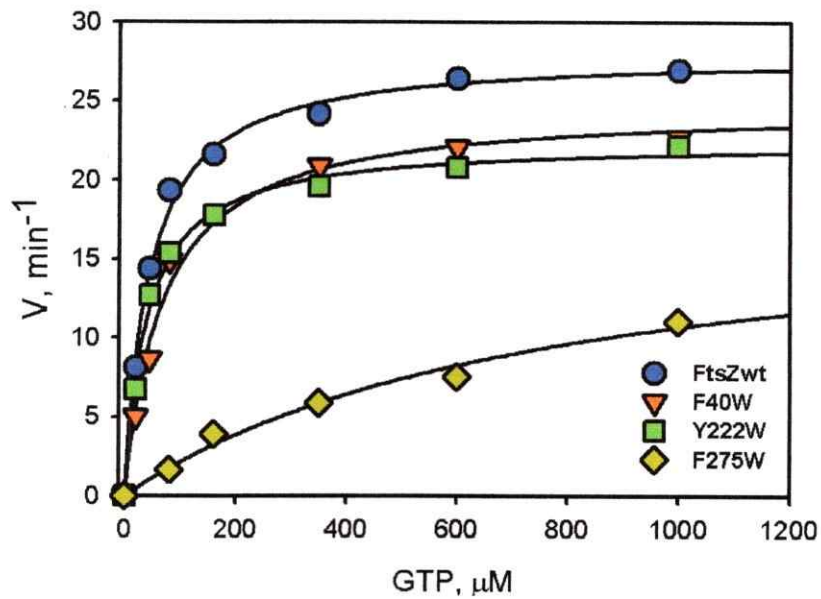


Figura 13 Curvas de saturación de sustrato para la actividad GTPásica de FtsZ (azul) silvestre y las mutantes puntuales F40W (salmón), Y222W (verde) y F275W (amarillo oscuro). Para estos experimentos se usó 5  $\mu\text{M}$  de concentración de proteína. Los símbolos corresponden a los puntos experimentales y la línea continua representa el ajuste de los datos usando el modelo de Michaelis-Menten.

Tabla 3 Parámetros cinéticos de la actividad GTPásica de FtsZ silvestre y de las mutantes puntuales F40W, Y222W y F275W de acuerdo al modelo de Michaelis-Menten

	$K_m$ $\mu\text{M}$	$V_{\text{max}}$ $\mu\text{M min}^{-1}$
FtsZwt*	43 (5)**	28 (1)
F40W	68 (6)	25 (2)
Y222W	39 (4)	22 (1)
F275W	784 (281)	19 (4)

\* Los ajustes de los datos experimentales arrojaron  $\chi^2 = 2,7; 4,5; 2,1$  y  $1,1$  para FtsZwt, F40W, Y222W y F275, respectivamente.

\*\* Los valores entre paréntesis indican el error estándar de los parámetros obtenidos a partir de los ajustes.

Tabla 4 Comparación entre las constantes catalíticas obtenidas con el gráfico de Michaelis-Menten ( $K_{\text{cat-MM}}$ ) y con el gráfico de concentración crítica ( $K_{\text{cat-Cc}}$ )

	$K_{\text{cat-MM}}$ $\times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$	$K_{\text{cat-Cc}}$ $\times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$
FtsZwt	9,3	8,9
F40W	8,3	7,6
Y222W	7,3	5,7
F275W	6,3	8,4

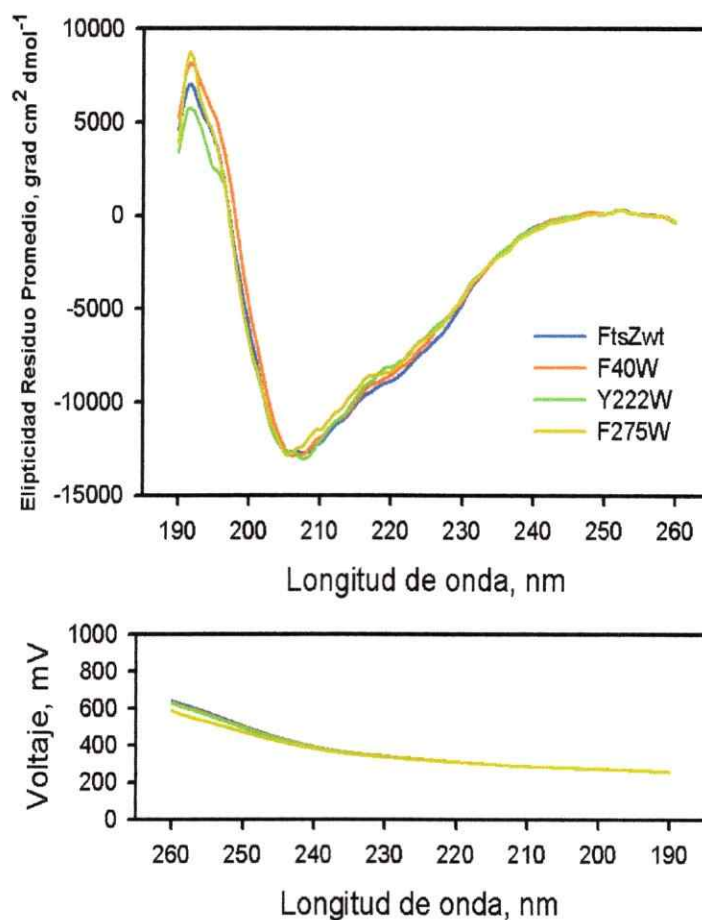


Figura 14 Comparación de los espectros de Dicroísmo Circular en el UV-lejano de las purificaciones de FtsZ silvestre (*azul*) y las mutantes puntuales F40W (*salmón*), Y222W (*verde*) y F275W (*amarillo oscuro*) a una concentración de 20  $\mu$ M. El panel inferior muestra el voltaje del fotomultiplicador en función de la longitud de onda de la medición. A partir de los espectros se calcularon los contenidos de estructura secundaria de las proteínas y se muestran en la tabla 4.

La forma de los espectros de dicroísmo circular mostró pequeñas diferencias en el rango 260 – 200 nm. Las mayores diferencias se observaron en el rango 200 – 190 nm y se pueden atribuir a una menor sensibilidad en la detección por parte del equipo (*figura 14 panel inferior*). Si la detección de la señal de dicroísmo circular ocurre con un voltaje del fotomultiplicador menor a 600 mV podemos afirmar que la razón señal-ruido es lo suficientemente alta como para permitir una detección sensible y significativa. Este parámetro es de suma importancia para extraer información cuantitativa a partir de los espectros de dicroísmo circular. Con esta información, se hizo una estimación del contenido de estructura secundaria de las proteínas. Este procedimiento computacional es posible si los espectros se obtienen al menos en el rango 240 – 190 nm y con detección significativa, es decir con un voltaje del fotomultiplicador <600 mV. Los resultados de la cuantificación de estructura secundaria a partir de los espectros se muestran en la *tabla 5*. El contenido de estructura secundaria se separó en tres grupos, hélice  $\alpha$ , hebra  $\beta$  y otro tipo de estructura secundaria. Se observó que las proteínas FtsZwt, F40W y Y222W tuvieron contenidos similares de hélice  $\alpha$ , hebra  $\beta$  y otro tipo de estructura. La proteína F275W mostró un contenido de hélice  $\alpha$  ligeramente menor y un contenido de hebra  $\beta$  ligeramente mayor a las otras tres proteínas, mientras que el contenido de otro tipo de estructura se mantuvo con proporciones similares a las otras tres proteínas.

#### **Estado de agregación de FtsZ silvestre y de las mutantes puntuales F40W, Y222W y F275W**

La proteína FtsZ polimeriza con GTP a través de un mecanismo cooperativo, es decir, con una concentración crítica y formando polímeros largos (>100 nm). La polimerización con GDP ocurre con un mecanismo isodésmico, es decir, sin una con-

Tabla 5 Porcentajes de estructura secundaria calculados a partir de los espectros de dicroísmo circular

	Hélice $\alpha$	Hebra $\beta$	Otro tipo estructura
FtsZwt	28 (3)*	33 (2)	39 (1)
F40W	27 (3)	34 (3)	37 (1)
Y222W	28 (3)	33 (2)	39 (1)
F275W	24 (1)	38 (1)	38 (1)

\* Los valores entre paréntesis indican el error estándar de los ajustes.

centración crítica y forma polímeros cortos e inestables. Mientras la polimerización dependiente de GTP se ha caracterizado con técnicas como la sedimentación o dispersión de luz (ver más arriba), la polimerización dependiente de GDP produce sólo polímeros cortos que son difíciles de rastrear por lo que las técnicas que se requieren para obtener información cuantitativa son más sofisticadas. Para caracterizar el estado de oligomerización de las proteínas purificadas se usó cromatografía analítica de exclusión molecular. La columna se calibró usando estándares comerciales para determinar el rango de fraccionamiento efectivo (*figura 15*). Los volúmenes de elusión ( $V_e$ ) de los estándares usados para la calibración se encuentran en el rango 7,7 –11,1 mL que corresponde a un rango de masas moleculares de ~132 kDa para el dímero de BSA y ~6,5 kDa para el monómero de aprotinina (*figura 15 A*). El volumen de exclusión se determinó con dextrano ( $V_e = 5,8$  mL) y el volumen interno de la columna se determinó con el nucleótido GTP ( $V_e = 11,3$  mL). Las masas moleculares de los estándares se comprobaron con SDS-PAGE revelado con azul de coomassie y se muestran en la *figura 15 B*.

Los cromatogramas de FtsZ silvestre y las mutantes F40W, Y222W y F275W mostraron un pico mayoritario ( $V_e = 8,9$  mL) correspondiente al monómero de FtsZ (*figura 16*). Si bien presentaron una fracción minoritaria respecto del pico de elusión del monómero, también se detectaron las especies dimérica y tetramérica, de acuerdo a la calibración de la columna. Además, en todos los casos se observó una fracción minoritaria que eluyó en el volumen de exclusión. Las poblaciones relativas de monómero, dímero, tetrámero y de los agregados de alta masa molecular se muestran en la *tabla 6*. Las proteínas FtsZwt y F40W mostraron perfiles de elusión y poblaciones

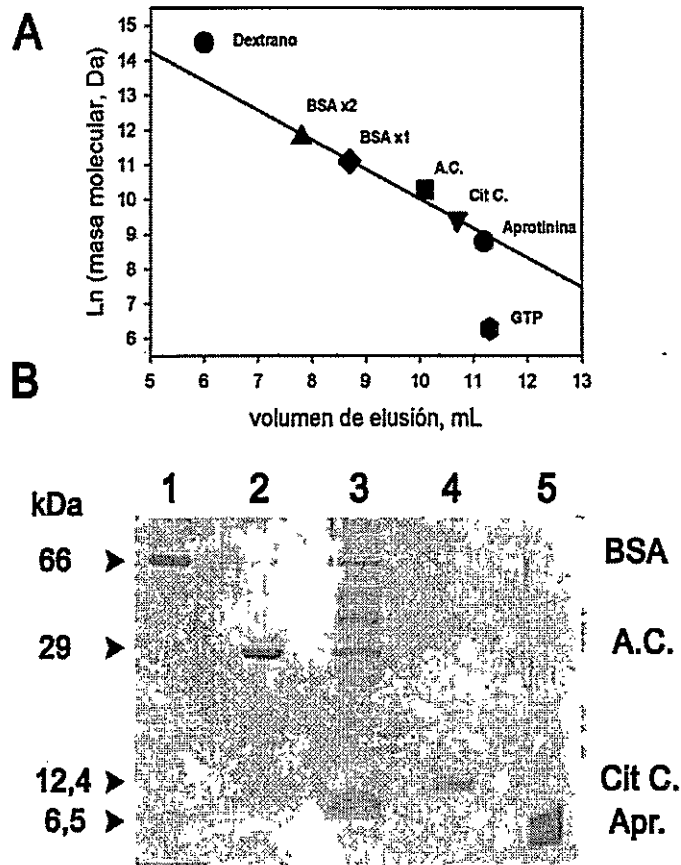


Figura 15 Calibración de la columna de exclusión molecular TOSOH TSKgel G3000SW<sub>XL</sub>. A recta de calibración (línea negra) construido con los estándares globulares BSA x2 (132 kDa), BSA x1 (66 kDa), A.C. (29 kDa) y aprotinina (6,5 kDa). El volumen de exclusión se determinó con el estándar dextrano (~ 2 MDa) y el volumen interno de la columna se determinó con el estándar GTP (523 g mol<sup>-1</sup>). B los estándares usados para determinar el rango de fraccionamiento de la columna se analizaron mediante SDS-PAGE teñido con azul de coomassie.



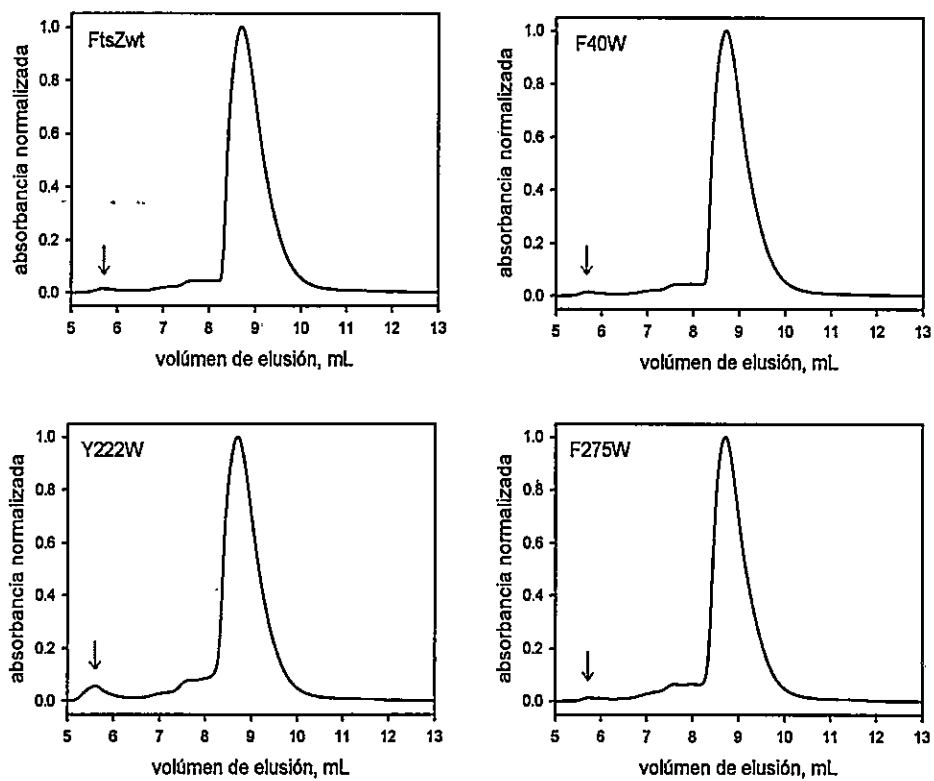


Figura 16 Perfiles de elución de exclusión molecular de FtsZ silvestre y las mutantes puntuales F40W, Y222W y F275W seguidos por la absorbancia a 220 nm. El volumen de exclusión se indica con una flecha. Se usó una concentración de proteína de 5  $\mu$ M.

Tabla 6 Poblaciones relativas de las especies en las muestras de FtsZwt y las mutantes puntuales F40W, Y222W y F275W

	FtsZwt	F40W	Y222W	F275W
<u>Monómero</u>	97	95	92	92
<u>Dímero</u>	2	3	4	5
<u>Tetrámero</u>	1	1	1	2
<u>Agregado</u>	<1	1	3	1

relativas muy similares. Las mutantes Y222W y F275W presentaron fracciones de dímero y tetrámero mayores que los casos anteriores. Notablemente, la mutante Y222W mostró un aumento importante en la población de oligómeros de alta masa molecular respecto de las otras tres proteínas.

### **Estudio de la auto-asociación y del desplegamiento en el equilibrio de FtsZ silvestre**

La proteína FtsZ tiene una tendencia a oligomerizar y su desplegamiento inducido con agentes desnaturantes es reversible y de tres estados con la presencia de un intermediario termodinámico (Andreu y col., 2002; Sossong y col., 1999). Se investigó la influencia de la auto-asociación de FtsZ en su desplegamiento inducido con agentes desnaturantes con el fin de relacionar la distribución de las especies oligoméricas y el intermediario observado en la vía de desplegamiento.

### **Cromatografía de exclusión molecular: efecto de la concentración de proteína sobre la oligomerización de FtsZ silvestre**

Para determinar el efecto de los cambios de la concentración de proteína sobre el estado de oligomerización se hicieron experimentos de cromatografía de exclusión molecular. Los cromatogramas mostraron estados de oligomerización de FtsZ correspondientes al monómero, el dímero y el tetrámero de acuerdo a la calibración de la columna (*figura 17*). Los volúmenes de elusión y las poblaciones relativas de las especies detectadas en los cromatogramas se muestran en la *tabla 7*. Se observó que al incrementar la concentración de proteína desde 3  $\mu\text{M}$  a 40  $\mu\text{M}$ , la población de monómeros disminuyó mientras que las poblaciones de dímero y tetrámero aumentaron lo que es compatible con la auto-asociación de la proteína (*figura 17 A*).

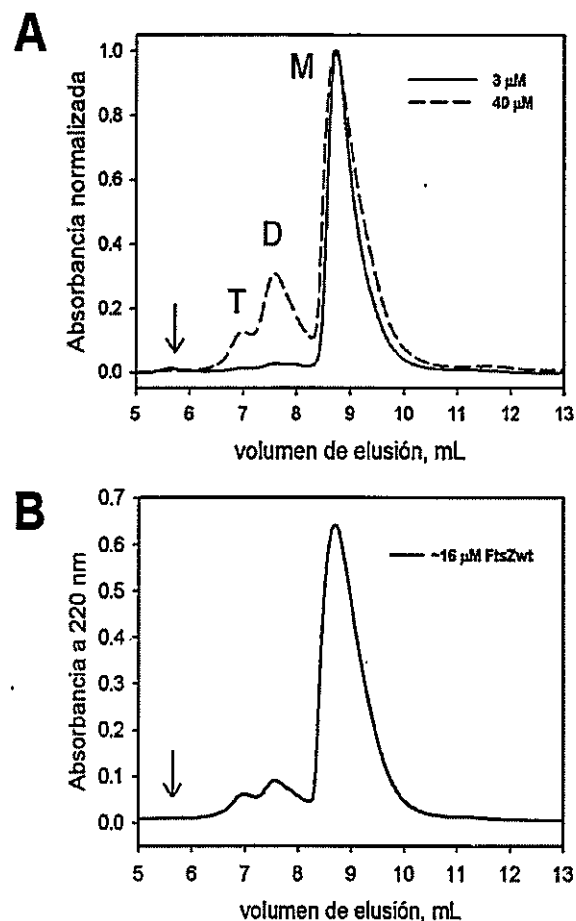


Figura 17 Perfiles de elusión de exclusión molecular de FtsZ silvestre seguidos por la absorbancia a 220 nm. A las muestras de FtsZ a las concentraciones de 3  $\mu$ M (*línea continua*) y a 40  $\mu$ M (*línea discontinua*) se equilibraron previamente en el amortiguador de la fase móvil y se inyectaron en la columna. Los peaks de elusión correspondientes a monómero, dímero y tetramero, se marcaron con M, D y T, respectivamente. Una fracción menor a 1 % eluyó en el volumen de exclusión de la columna y se indicó con una flecha. B perfil de elusión de la fracción monomérica de FtsZ, reinyectada en la columna luego de una incubación a temperatura ambiente, colectada desde una muestra concentrada de FtsZ inyectada previamente en la columna.

Tabla 7 Poblaciones relativas de las especies monómero, dímero y tetrámero de FtsZ silvestre a tres concentraciones de proteína

	Volumen elusión mL	40 $\mu$ M %	16 $\mu$ M %	3 $\mu$ M %
<u>Monómero</u>	8,9	73	83	97
<u>Dímero</u>	7,7	21	12	2
<u>Tetrámero</u>	6,9	6	5	1

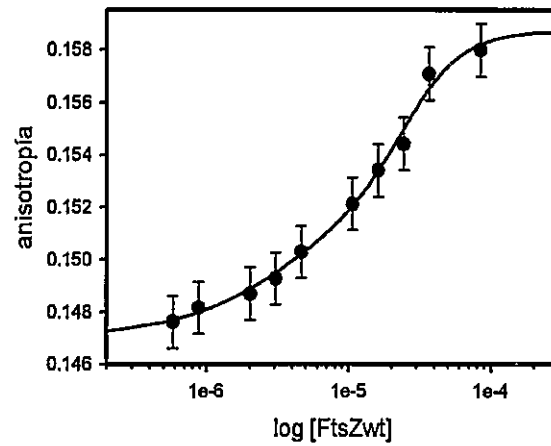
Para evaluar la reversibilidad del proceso de oligomerización, se colectó la fracción correspondiente al monómero de una muestra concentrada de FtsZ cargada previamente en la columna y después de un tiempo de equilibrado se re-inyectó en la columna (*figura 17 B y tabla 7*). En esta muestra, correspondiente a una concentración de proteína de 16  $\mu\text{M}$ , se detectaron las especies monomérica, dimérica y tetramérica y no se detectó la especie que eluye en el volumen de exclusión.

### **Fluorescencia en estado estacionario: efecto de la concentración de proteína sobre la anisotropía de FtsZ conjugada con las sondas FITC y DNS**

Los experimentos de cromatografía de exclusión molecular con FtsZ mostraron la presencia de monómeros, dímeros y tetrámeros dependiendo de la concentración de proteína. Esto indica que la dilución de una solución concentrada de FtsZ induce la disociación desde tetrámeros hasta monómeros a través de un intermediario dimérico. Para determinar cuantitativamente a la disociación de FtsZ, la proteína se conjugó a las sondas fluorescentes FITC y DNS (ver Materiales y Métodos) para seguir los cambios en la anisotropía por efecto de la dilución. El grado de marcaje fue de 10:1 y 2:1 proteína/sonda para FITC y DNS, respectivamente. Una discusión de los aspectos más importantes sobre la fluorescencia en estado estacionario y de la información que se obtiene a partir de estas medidas, se muestra en el *apéndice A* en el apartado *Fluorescencia en estado estacionario*.

Las anisotropías de los conjugados en función de la concentración total de proteína se muestran en la *figura 18*. En ambos casos se observó una disminución de la anisotropía al diluir la solución de FtsZ, indicando la disociación de los oligómeros. Suponiendo un equilibrio de tres estados para la auto-asociación de FtsZ, desde los monómeros a los dímeros y después hasta los tetrámeros ( $2M \leftrightarrow D$ ,  $2D \leftrightarrow T$ ), los datos

A



B

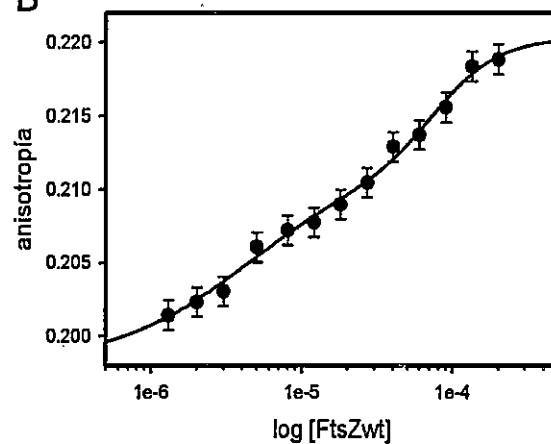


Figura 18 Anisotropía de fluorescencia de los conjugados FtsZ-FITC (A) y FtsZ-DNS (B) en función de la concentración total de proteína. Los datos experimentales (*símbolos*) se ajustaron al modelo del equilibrio de disociación de FtsZ desde el estado tetramérico hasta el estado monomérico a través de un intermediario dimérico  $2M \leftrightarrow D$ ,  $2D \leftrightarrow T$  (*líneas continuas*). Los parámetros obtenidos en los ajustes se muestran en la tabla 8. Las barras de error representan la desviación estándar de 20 iteraciones para calcular la anisotropía.

se ajustaron a las curvas teóricas mostradas en la *figura 18* (*líneas continuas*). La teoría del equilibrio de auto-asociación de FtsZ se muestra en el *apéndice B*. Las anisotropías limitantes para el monómero ( $r_M$ ), el dímero ( $r_D$ ) y el tetrámero ( $r_T$ ), y las constantes de equilibrio de disociación para el tetrámero ( $K_{dT}$ ) y el dímero ( $K_{dD}$ ), obtenidos a partir del ajuste, se muestran en la *tabla 8*. El análisis estadístico de los ajustes reveló una baja precisión de los parámetros en el experimento con FtsZ-FITC ( $\chi^2 = 2,6$ ), mientras que el modelo de tres estados describió mejor el experimento con FtsZ-DNS ( $\chi^2 = 0,1$ ). Debido a esta discrepancia, el modelo de tres estados escogido para ajustar a los datos experimentales se comparó con los modelos de equilibrio de asociación de dos estados monómero-dímero ( $2M \leftrightarrow D$ , *líneas discontinuas*) y monómero-tetrámero ( $4M \leftrightarrow T$ , *líneas punteadas*). Los resultados de éstos análisis se muestran en la *figura 19*. Las simulaciones muestran que los modelos de dos estados no describieron de mejor manera a los datos experimentales en comparación al modelo de tres estados. A partir de los parámetros informados en la *tabla 8*, y usando el modelo de tres estados, se calcularon las fracciones de monómero, dímero y tetrámero en función de la concentración de FtsZ (*figura 20*). Se observó que a una concentración de proteína de  $\sim 0,5 \mu M$ , es decir alrededor de la concentración crítica para la polimerización, las poblaciones de monómero, dímero y tetrámero son 90%, 10% y  $< 1\%$ , respectivamente.

#### **Fluorescencia resuelta en el tiempo: tiempos de vida y tiempos de correlación rotacional de los conjugados FtsZ-FITC y FtsZ-DNS**

Se hicieron mediciones de fluorescencia resuelta en el tiempo para determinar el efecto de los cambios en la concentración de proteína, es decir en la oligomerización de FtsZ, sobre los tiempos de vida y los tiempos de correlación rotacional de los con-



Tabla 8 Constantes de equilibrio para la disociación de dímeros y tetrámeros y anisotropías limitantes de las especies monómero, dímero y tetrámero de acuerdo al modelo  $2M \leftrightarrow D, 2D \leftrightarrow T$

	$K_{dD}$ $\mu M$	$K_{dT}$ $\mu M$	$\Gamma_M$	$\Gamma_D$	$\Gamma_T$
FITC*	9 (8)**	152 (98)	0,147 (0,001)	0,153 (0,002)	0,159 (0,001)
DNS	8 (4)	1500 (600)	0,198 (0,002)	0,211 (0,001)	0,221 (0,001)

\* Los ajustes de los datos experimentales arrojaron  $\chi^2 = 2,6$  y  $0,1$  para los conjugados FITC y DNS, respectivamente.

\*\* Los números entre paréntesis indican el error estándar de los parámetros obtenidos a partir de los ajustes.

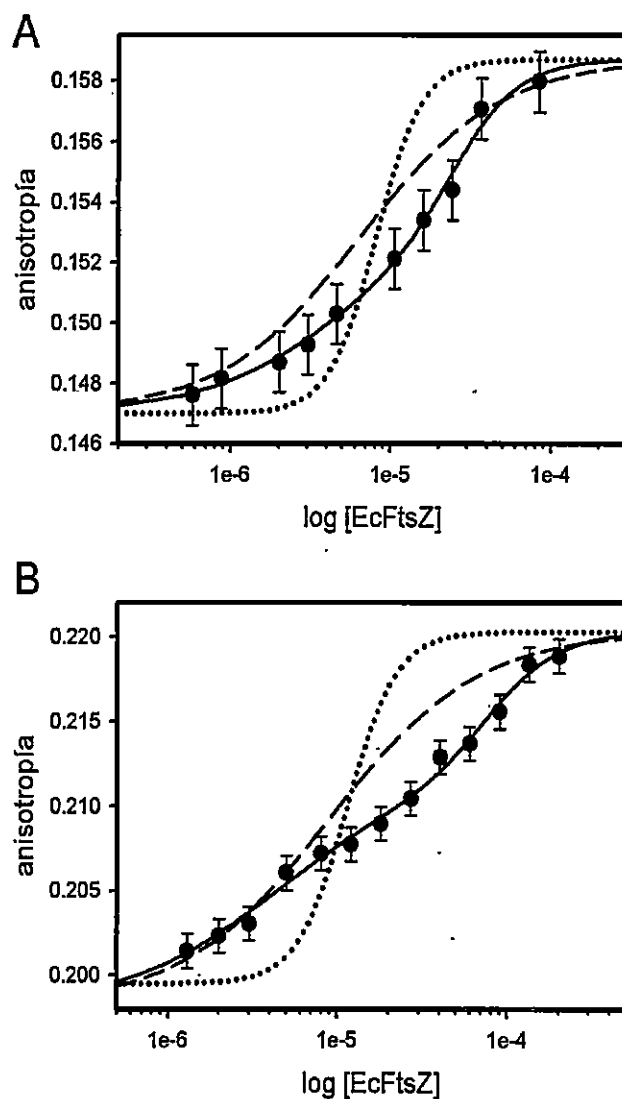


Figura 19 Comparación entre los modelos de equilibrio de disociación de 2 y 3 estados. Los símbolos representan a los datos experimentales de disociación con los conjugados FtsZ-FITC (*gráfico A*) y con los conjugados FtsZ-DNS (*gráfico B*), igual que en figura 18. Las *líneas continuas* son las simulaciones de la disociación de 3 estados ( $2M \leftrightarrow D$ ;  $2D \leftrightarrow T$ ) con las constantes de disociación  $K_{dD} = 9 \times 10^{-6}$  M y  $K_{dT} = 152 \times 10^{-6}$  M para los conjugados FtsZ-FITC y  $K_{dD} = 8 \times 10^{-6}$  M y  $K_{dT} = 1500 \times 10^{-6}$  M para los conjugados FtsZ-DNS, respectivamente. Las *líneas discontinuas* son las simulaciones de la disociación de 2 estados ( $2M \leftrightarrow D$ ) con constantes de disociación  $K_{dD} = 13 \times 10^{-6}$  M y  $K_{dD} = 18 \times 10^{-6}$  M para FtsZ-FITC y FtsZ-DNS, respectivamente. Las *líneas punteadas* son las simulaciones de la disociación de 2 estados ( $4M \leftrightarrow T$ ) con constantes de disociación  $K_{dT} = 2 \times 10^{-15}$  M<sup>3</sup> y  $K_{dT} = 6 \times 10^{-15}$  M<sup>3</sup>, para FtsZ-FITC y FtsZ-DNS, respectivamente. Las anisotropías limitantes del monómero, dímero y tetrámero se escogieron tales que permitieran una mejor comparación entre los modelos.

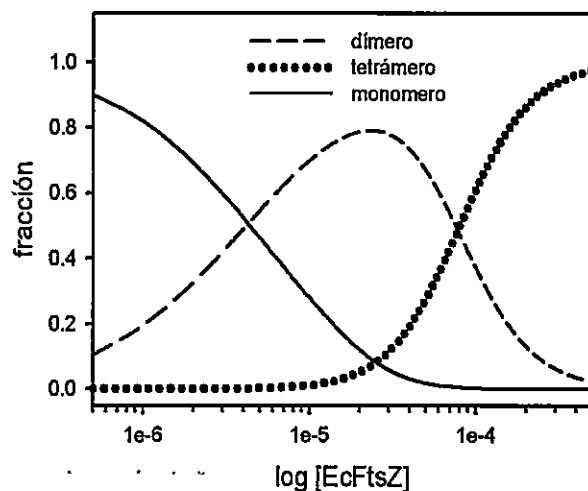
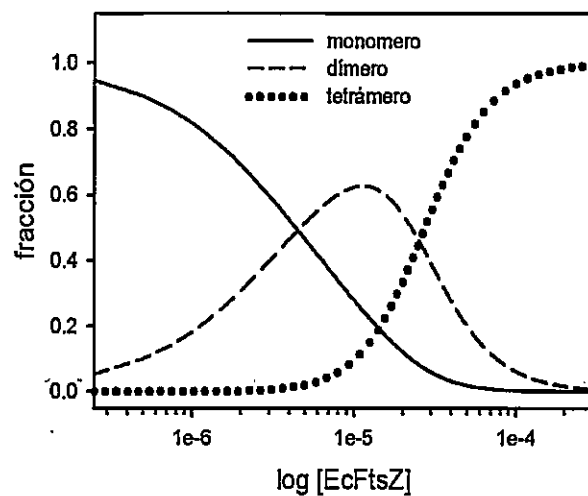


Figura 20 Fracciones de las especies monómero, dímero y tetrámero en función de la concentración de proteína. Las fracciones se calcularon usando el modelo de disociación de tres estados  $2M \leftrightarrow D$ ,  $2D \leftrightarrow T$  y los parámetros informados en la tabla 8.

jugados. La teoría con los aspectos más importantes de la fluorescencia resuelta en el tiempo (en el dominio de la frecuencia) y la información que se obtiene de estas mediciones se describió en el apartado "*Fluorescencia resuelta en el tiempo*" del *apéndice A*. De acuerdo a la teoría, presentada, para cuantificar los cambios en los tiempos de correlación rotacional es necesario medir los tiempos de vida. Las mediciones de tiempo de vida, a tres concentraciones de proteína en el rango de los experimento de dilución, se muestran en la *figura 21*. Los resultados de los ajustes de los datos experimentales se muestran en la *tabla 9*. En todos los casos los datos experimentales de tiempo de vida se ajustaron con dos componentes y en estos casos se usó el tiempo de vida promedio ( $\tau_{\text{promedio}}$ ) para analizar la información. Aunque no se observaron cambios significativos en  $\tau_{\text{promedio-FITC}}$  por efecto de la dilución, un cambio de 3 ns se observó en  $\tau_{\text{promedio-DNS}}$ , que se debe a las propiedades de la sonda DNS que es sensible al ambiente que la rodea. Con esta información, se hicieron mediciones de polarización dinámica (ver *apéndice A*) que permite calcular los tiempos de correlación rotacional de los conjugados. Los datos experimentales y los ajustes de los datos se muestran en la *figura 22* y en la *tabla 10*, respectivamente. Las dos rotaciones encontradas en ambos conjugados se atribuyen a los movimientos locales de la sonda ( $\theta_1$ ), en el caso de los tiempos de correlación cortos, y a la rotación global de la proteína ( $\theta_2$ ), en el caso de los tiempos de correlación más largos. Entonces, en promedio, para las tres concentraciones de proteína analizadas, el movimiento local da cuenta de un 57% y un 15% de la anisotropía medida para los conjugados FtsZ-FITC y FtsZ-DNS, respectivamente. En ambos casos, se observó una disminución del tiempo de correlación global lo que es compatible con la disociación de los oligómeros.

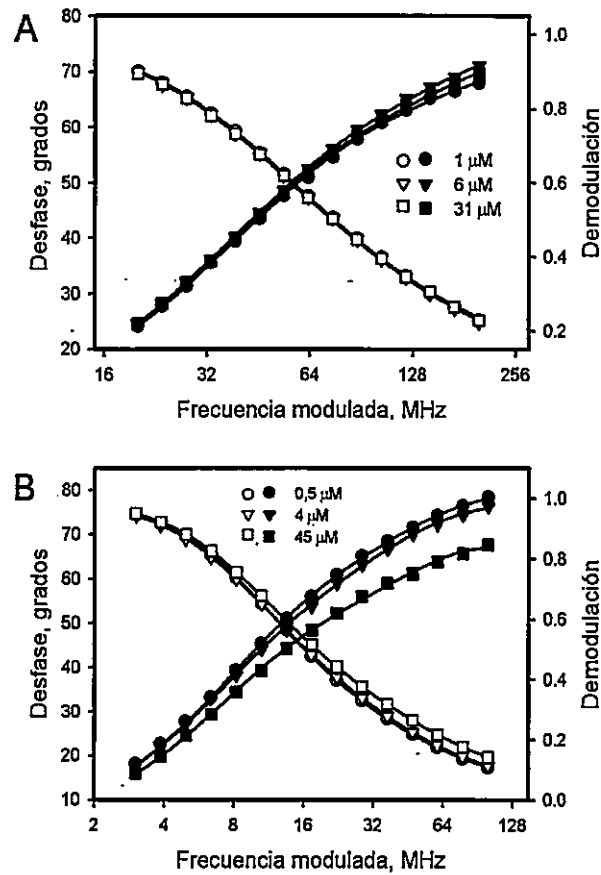


Figura 21 Mediciones de fluorescencia resuelta en el tiempo en el dominio de la frecuencia de los conjugados FtsZ-FITC y FtsZ-DNS. Los datos experimentales corresponden al desfase (*símbolos cerrados*) y a la demodulación (*símbolos abiertos*) de la emisión de fluorescencia en función de la frecuencia. *A* mediciones de tiempo de vida de los conjugados FtsZ-FITC a tres concentraciones de proteína. *B* mediciones de tiempo de vida de los conjugados FtsZ-DNS a tres concentraciones de proteína. Las *líneas continuas* representan el ajuste de los datos experimentales con tiempos de vida e intensidades fraccionales mostrados en la tabla 9.

Tabla 9 Tiempos de vida de los conjugados fluorescentes de FtsZ

FtsZ- FITC*					
FtsZ $\mu\text{M}$	$\tau_1$ ns	$f_1$	$\tau_2$ ns	$f_2$	$\tau_{\text{promedio}}$ Ns
31	0,76** (0,03)	0,08 (<0,01)	3,93 (0,02)	0,92 (<0,01)	3,68
6	0,77 (0,04)	0,07 (<0,01)	3,90 (0,02)	0,93 (<0,01)	3,68
1	0,58 (0,03)	0,08 (<0,01)	3,84 (0,02)	0,92 (<0,01)	3,58
FtsZ-DNS					
FtsZ $\mu\text{M}$	$\tau_1$ ns	$f_1$	$\tau_2$ ns	$f_2$	$\tau_{\text{promedio}}$ ns
45	4,27 (0,11)	0,21 (<0,01)	18,5 (0,14)	0,78 (<0,01)	15,2
4	6,19 (0,20)	0,19 (<0,01)	20,2 (0,19)	0,80 (<0,01)	17,3
0,5	5,68 (0,30)	0,14 (0,01)	19,4 (0,20)	0,86 (<0,01)	17,6

\*Los ajustes simultáneos de los datos experimentales a las tres concentraciones de proteína arrojaron  $\chi^2 = 0,7$  y  $0,4$  para los conjugados FITC y DNS, respectivamente. Para los ajustes se usaron desviaciones estándar constantes de  $0,2^\circ$  y  $0,004$  para el desfase y la demodulación, respectivamente.

\*\*Los números entre paréntesis representan a los errores estándar de los parámetros calculados con el ajuste.

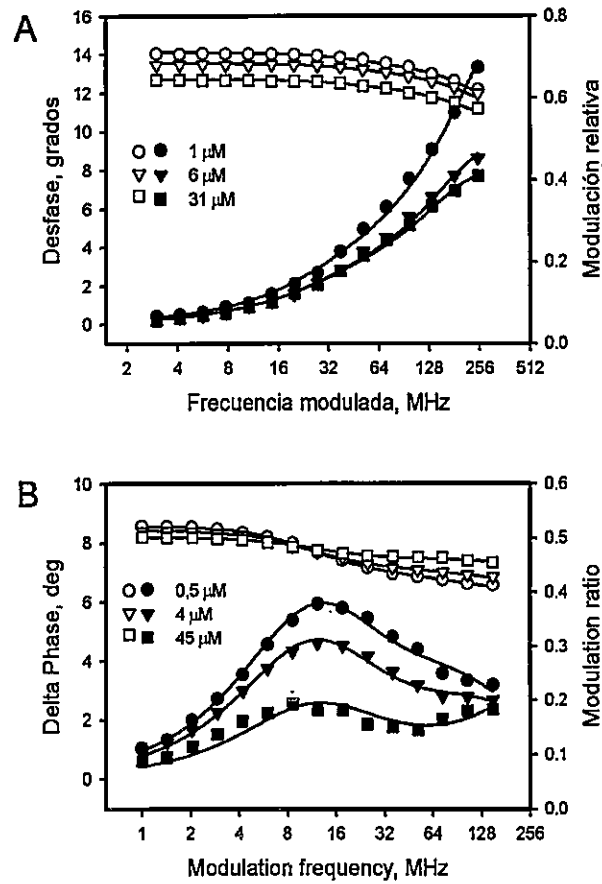


Figura 22 Mediciones de polarización dinámica de la fluorescencia para los conjugados FtsZ-FITC y FtsZ-DNS. Los datos experimentales corresponden al desfase (*símbolos cerrados*) y a la modulación (*símbolos abiertos*) entre los componentes paralelo y perpendicular de la emisión de fluorescencia en función de la frecuencia. *A* mediciones de polarización dinámica de los conjugados FtsZ-FITC a tres concentraciones de proteína. *B* mediciones de polarización dinámica de los conjugados FtsZ-DNS a tres concentraciones de proteína. Las *líneas continuas* representan a los ajustes de los datos experimentales con tiempos de vida promedio, tiempos de correlación y anisotropías fraccionales mostrados en la tabla 10.

Tabla 10 Tiempos de correlación de los conjugados fluorescentes de FtsZ

FtsZ $\mu\text{M}$	$\tau_{\text{promedio}}$ ns	FtsZ-FITC*			
		$\theta_1$ ns	$r_1$	$\theta_2$ ns	$r_2$
31	3,68	0,57 <sup>†</sup> (0,05)	0,16 (<0,01)	38,9 (5,7)	0,15 (<0,01)
6	3,68	0,48 (0,04)	0,18 (<0,01)	34,6 (5,0)	0,13 (<0,01)
1	3,58	0,29 (0,03)	0,19 (<0,01)	19,7 (1,9)	0,12 (0,01)

FtsZ $\mu\text{M}$	$\tau_{\text{promedio}}$ ns	FtsZ-DNS			
		$\theta_1$ ns	$r_1$	$\theta_2$ ns	$r_2$
45	15,2	0,54 (0,25)	0,07 (0,03)	147 (5)	0,27 (<0,01)
4	17,3	1,04 (0,23)	0,05 (<0,01)	67 (2)	0,29 (<0,01)
0,5	17,6	0,99 (0,24)	0,03 (<0,01)	46 (1)	0,31 (<0,01)

\*Los ajustes simultáneos de los datos experimentales a las tres concentraciones de proteína arrojaron  $\chi^2 = 0,7$  y  $0,4$  para los conjugados FITC y DNS, respectivamente. Para los ajustes se usaron desviaciones estándar constantes de  $0,2^\circ$  y  $0,004$  para el desfase y la demodulación, respectivamente.

\*\*Los números entre paréntesis representan a los errores estándar de los parámetros calculados con el ajuste.



### Vía de desplegamiento de FtsZ silvestre: efecto de la concentración de proteína sobre la estabilidad termodinámica

Se estudió la dependencia de la estabilidad de FtsZ con la concentración de proteína siguiendo la pérdida de estructura secundaria con dicroísmo circular a 222 nm. El experimento de desnaturación se hizo con los agentes desnaturantes urea y cloruro de guanidinio (GdmCl) por tratarse de los dos agentes más usados por los investigadores en este tipo de estudios (*figura 23 A y B*). En el experimento con urea, a 1  $\mu$ M de FtsZ, se observó una transición "suave" desde el estado nativo, comenzando a 0 M y se estabilizó entre 2,6 y 3 M urea. No se observaron cambios significativos en la fracción desnaturada entre 3 y 5 M urea. Este comportamiento se asemeja a una transición de dos estados del tipo *N-U* (*ver apéndice C*). En cambio, en el experimento con GdmCl a 1  $\mu$ M FtsZ, se observó una transición de dos etapas (tres estados) donde la primera etapa se produjo entre 0 y 0,8 M GdmCl y la segunda transición entre 0,9 y 2,5 M GdmCl. No se observaron cambios en la fracción entre 2,6 y 4 M GdmCl. A las otras dos concentraciones de proteína (5,6 y 46,3  $\mu$ M FtsZ), tanto con el agente Urea como con el agente GdmCl se observaron vías de desplegamiento de dos etapas, es decir de tres estados. A las tres concentraciones de proteína analizadas se observó una estabilización de la señal de CD entre 3 y 5 M Urea, y para el caso de GdmCl la señal de CD se estabilizó entre 2,6 y 4 M.

Los datos experimentales de CD se ajustaron a las curvas teóricas del equilibrio de desplegamiento de tres estados  $N_2 \leftrightarrow I_2 \leftrightarrow 2U$ , donde la primera etapa corresponde al desplegamiento del dímero en estado nativo ( $N_2$ ) hasta un intermediario dimérico ( $I_2$ ) seguido del desplegamiento y disociación simultáneos del intermediario hasta los monómeros desplegados ( $U$ ) (*líneas continuas en las figura 23 A y B*). Los parámetros

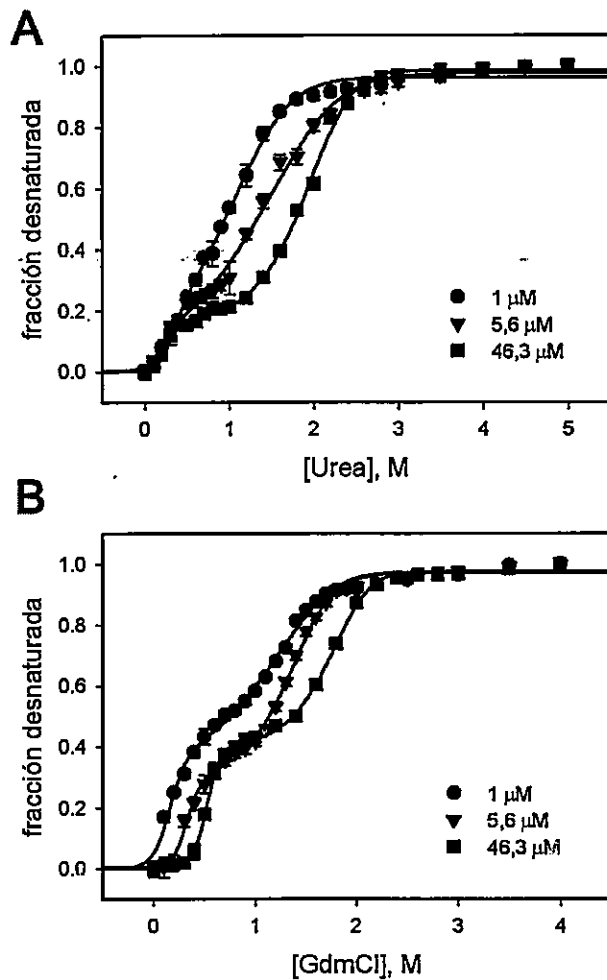


Figura 23 Despliegamiento de FtsZ inducido con agentes desnaturalantes y seguido por el dicróismo circular a 222 nm. *A* despliegamiento inducido con urea a tres concentraciones de FtsZ. *B* despliegamiento inducido con cloruro de guanidinio a tres concentraciones de FtsZ. Los datos experimentales (*símbolos*) se representaron como fracción desnaturalada para su comparación. Las *líneas continuas* representan el ajuste de los datos experimentales con el modelo de 3 estados donde el dímero en estado nativo se despliega hasta el estado monomérico a través de un intermediario dimérico semidesplegado ( $N_2 \leftrightarrow I_2 \leftrightarrow 2U$ ) y los parámetros se informan en las tablas 11 y 12. Las barras de error representan la desviación estándar de la señal de CD a 222 nm.

termodinámicos del ajuste incluyendo la energía libre en ausencia del agente desnaturante ( $\Delta G_{T, H_2O}^0$ ) y la dependencia de la energía libre con la concentración del agente desnaturante (valores  $m$ ) para los agentes Urea y GdmCl se muestran en las *tablas 11 y 12*. La teoría usada para calcular los parámetros termodinámicos del desplegamiento se describió con detalles en el *apéndice C*. De acuerdo al modelo, se esperaban valores similares para las estabilidades ( $C_{50\%}$ ) de la primera transición y también se esperaba un aumento sostenido de la estabilidad en la segunda transición con la concentración de proteína. Esto último se debe a que a mayor concentración de proteína la proporción de oligómeros es mayor, lo que aumentaría la estabilidad. Tanto con Urea como con GdmCl se observó un aumento sostenido de la estabilidad de la segunda etapa con el aumento de la concentración de proteína en acuerdo con lo esperado ( $C_{50\%, N_2-2U}$  en las *tablas 11 y 12*). En cambio, en la primera etapa de desnaturación ( $C_{50\%, N_2-1_2}$  en la *tabla 11*), el comportamiento de la estabilidad calculada fue menos claro para el agente Urea, donde se observó una disminución con la concentración de proteína. El alto valor de la estabilidad a 1  $\mu$ M de FtsZ respecto de lo obtenido a las otras concentraciones de proteína se atribuyó al comportamiento aparente de dos estados en la curva que movió la transición a un valor mayor. Si bien el modelo de dos estados ( $N \leftrightarrow U$ ) también se usó para analizar los datos experimentales de desplegamiento con Urea (ver más abajo), el modelo de tres estado se mantuvo en este punto para comparar con los otros experimentos. En el caso del agente GdmCl se observó un aumento sostenido de la estabilidad de la primera etapa con la concentración de proteína ( $C_{50\%, N_2-1_2}$  en la *tabla 12*) indicando un efecto del grado de asociación de los oligómeros en la estabilidad. Con ambos agentes desnaturantes se observó un corrimiento hacia la derecha de los puntos medios de las curvas al

Tabla 11 Parámetros termodinámicos del desplegamiento inducido con Urea de FtsZ de acuerdo al modelo de tres estados con intermediario dimérico  $N_2 \leftrightarrow I_2 \leftrightarrow 2U$

FtsZ $\mu\text{M}^*$	$\Delta G^0_{H_2O, N_2 \leftrightarrow I_2}$ kcal mol $^{-1}$	$m_{N_2 \leftrightarrow I_2}$ kcal mol $^{-1}\text{M}^{-1}$	$C_{50\%, N_2 \leftrightarrow I_2}$ M $^\dagger$	$\Delta G^0_{H_2O, I_2 \leftrightarrow 2U}$ kcal mol $^{-1}$	$m_{I_2 \leftrightarrow 2U}$ kcal mol $^{-1}\text{M}^{-1}$	$C_{50\%, I_2 \leftrightarrow 2U}$ M	$\Delta G_T^0_{H_2O}$ kcal mol $^{-1}$
1	2,3 (1,9)**	7,2 (4,2)	0,32	11,1 (0,8)	2,5 (0,4)	1,2	13,4 (2,6)
5,6	2,5 (1,8)	10,5 (6,6)	0,24	10,1 (0,2)	1,8 (0,1)	1,7	12,6 (2,1)
46	1,7 (0,9)	7,1 (3,1)	0,25	12,8 (0,3)	3,3 (0,1)	2,1	14,5 (1,3)
G.A	1,8 (0,6)	6,6 (2,0)	---	12,2 (0,4)	3,2 (0,1)	---	14,0 (1,1)

\*Los ajustes de los datos experimentales a las tres concentraciones de proteína y en un análisis global (G.A.) arrojaron  $\chi^2 = 1,3; 1,5; 1,8$  y  $2,2$ , respectivamente.

\*\*Los números entre paréntesis indican el error estándar de los parámetros obtenidos con el ajuste.

Tabla 12 Parámetros termodinámicos del desplegamiento con GdmCl de FtsZ de acuerdo al modelo de tres estados con intermediario dimérico  $N_2 \leftrightarrow I_2 \leftrightarrow 2U$

FtsZ $\mu\text{M}^*$	$\Delta G^0_{H_2O, N_2 \leftrightarrow I_2}$ kcal mol <sup>-1</sup>	$m_{N_2 \leftrightarrow I_2}$ kcal mol <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup>	$C_{50\% N_2 \leftrightarrow I_2}$ M <sup>†</sup>	$\Delta G^0_{H_2O, I_2 \leftrightarrow 2U}$ kcal mol <sup>-1</sup>	$m_{I_2 \leftrightarrow 2U}$ kcal mol <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup>	$C_{50\% I_2 \leftrightarrow 2U}$ M	$\Delta G_T^0_{H_2O}$ kcal mol <sup>-1</sup>
1	1,2 (0,8)**	7,2 (3,3)	0,17	12,1 (0,7)	2,9 (0,5)	1,4	13,3 (1,5)
5,6	2,7 (0,7)	8,3 (2,2)	0,33	13,5 (0,6)	4,3 (0,4)	1,5	16,2 (1,3)
46	4,5 (0,4)	8,7 (0,8)	0,52	14,7 (0,5)	4,7 (0,3)	1,9	19,2 (0,9)
G.A	1,7 (1,3)	4,9 (3,5)	---	14,4 (1,9)	3,2 (1,1)	---	16,1 (3,2)

\*Los ajustes de los datos experimentales a las tres concentraciones de proteína y en un análisis global (G.A.) arrojaron  $\chi^2 = 0,07; 0,01; 0,01$  y  $0,45$ , respectivamente.

\*\*Los números entre paréntesis indican el error estándar de los parámetros obtenidos con el ajuste.

incrementar la concentración de proteína. Esto se interpretó como un aumento de la estabilidad debido a la mayor oligomerización de la proteína, es decir una mayor proporción de dímeros y tetrámeros. Los mayores cambios en la energía libre se observaron en la segunda etapa, con valores promedio 5,5 y 4,8 veces mayor que en la primera etapa, para urea y GdmCl, respectivamente. Con el fin de obtener información representativa e independiente del grado de asociación de FtsZ, se usó un ajuste global (G.A.) de los datos experimentales, a las tres concentraciones de proteína en forma simultánea (*tablas 11 y 12*). Los resultados de estos ajustes confirmaron los resultados previos en el sentido de que los mayores cambios en la estabilidad se observaron en la segunda etapa de desplegamiento. Usando la información de los análisis globales, e introduciendo como variable la concentración de proteína, se calcularon las fracciones de las especies  $N_2$ ,  $I_2$  y  $U$  en función de la concentración de agente desnaturalante (*figura 24 A y B*). En estas simulaciones se observó una disminución rápida de la fracción de dímero nativo al aumentar la concentración de agente desnaturalante (*figura 24, líneas continuas*). También se observó un aumento de la proporción de la especie intermediaria (*líneas punteadas*) por efecto del aumento de concentración de proteína. Tanto para urea como para GdmCl se observó que la fracción de monómero desnaturalado (*líneas discontinuas*) tuvo la mayor influencia sobre la forma de las curvas de desplegamiento.

#### **Desplegamiento de los conjugados FtsZ-Alexa488 seguidos por espectroscopia de fluorescencia de correlación (FCS)**

La observación de una transición parecida a un proceso de dos estados en los experimentos de desplegamiento con urea a 1  $\mu$ M FtsZ, es decir del tipo  $N \leftrightarrow U$ , sugiere una baja proporción del intermediario dimérico. Además, los experimentos de filtración

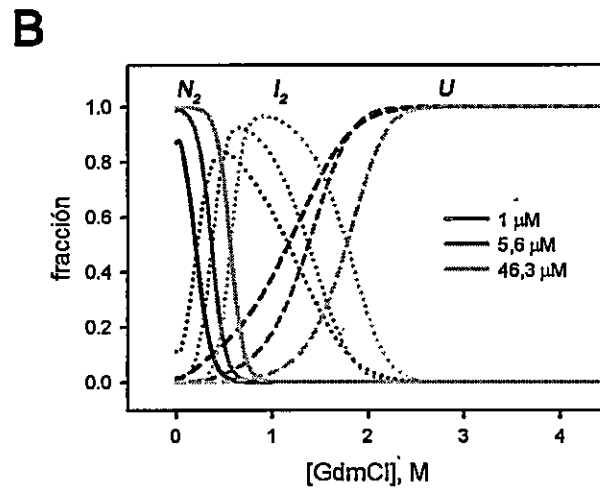
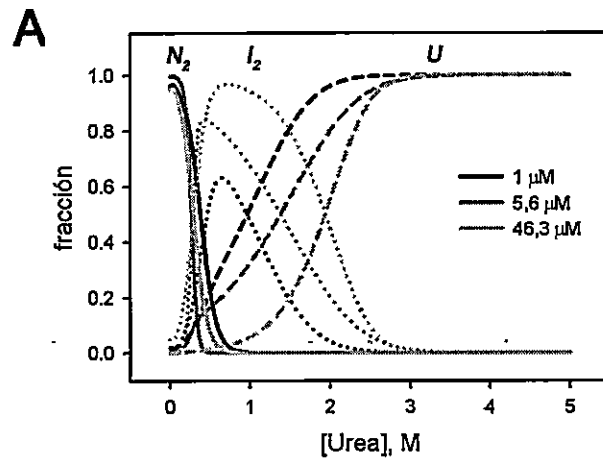


Figura 24 Fracciones de las especies dímero nativo (*líneas continuas*), intermediario dimérico (*líneas punteadas*) y monómero desplegado (*líneas discontinuas*) en función de la concentración de urea (A) y de cloruro de guanidinio (B). Las fracciones se calcularon usando el modelo de desplegamiento de 3 estados  $N_2 \leftrightarrow I_2 \leftrightarrow 2U$  y los parámetros informados en las tablas 11 y 12, respectivamente.

en geles mostraron que FtsZ se disocia casi completamente a monómeros a una concentración de 3  $\mu\text{M}$ , por tanto, una transición de dos estados se espera debido al estado mayoritariamente monomérico de la proteína. Para probar esta hipótesis, se siguió el desplegamiento de FtsZ conjugada a la sonda fluorescente Alexa488 (grado de marcaje de 1:1 sonda/proteína) a una concentración de proteína de 100 nM usando FCS para medir los coeficientes de difusión ( $D$ ) en función de la concentración de urea (*figura 25*). Una descripción de la teoría y los aspectos más importantes de FCS se muestra en el apartado *Espectroscopía de fluorescencia de correlación del apéndice A*. La *figura 25A* muestra las curvas de autocorrelación de la fluorescencia que se ajustaron usando un componente de difusión. El efecto de la adición de urea sobre los coeficientes de difusión se muestra en la *figura 25 B*. Los valores de  $D$  se corrigieron por los cambios en la viscosidad debidos a la adición del agente desnaturalante de acuerdo a lo señalado en Materiales y Métodos. Se observó una disminución gradual desde  $D_{\text{FtsZ}} = 60 \pm 1 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$  hasta  $D_{\text{FtsZ}} = 40 \pm 2 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$  al aumentar la concentración de Urea desde 0 a 1 M. Le siguió una disminución menos pronunciada desde  $D_{\text{FtsZ}} = 40 \pm 2 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$  hasta  $D_{\text{FtsZ}} = 29 \pm 1 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$  al aumentar la concentración de urea desde 1,2 a 3 M. Para caracterizar la expansión de la cadena polipeptídica de FtsZ durante la desnaturalación inducida por urea, se calcularon los radios hidrodinámicos ( $R_H$ ) de la molécula usando la ecuación de Stokes-Einstein (*ver sección FCS en el apéndice A*). Los valores de  $R_H$  se graficaron en la *figura 26* junto a los datos de desplegamiento de FtsZ 1  $\mu\text{M}$  seguido con dicroísmo circular. Los datos de ambos experimentos se ajustaron a un modelo de desplegamiento de dos estados ( $N-U$ ) y a partir de los parámetros del ajuste (no mostrados) se calcularon las estabilidades que se informan en el inserto del gráfico. No se detectaron cambios en la estabilidad al disminuir la con-



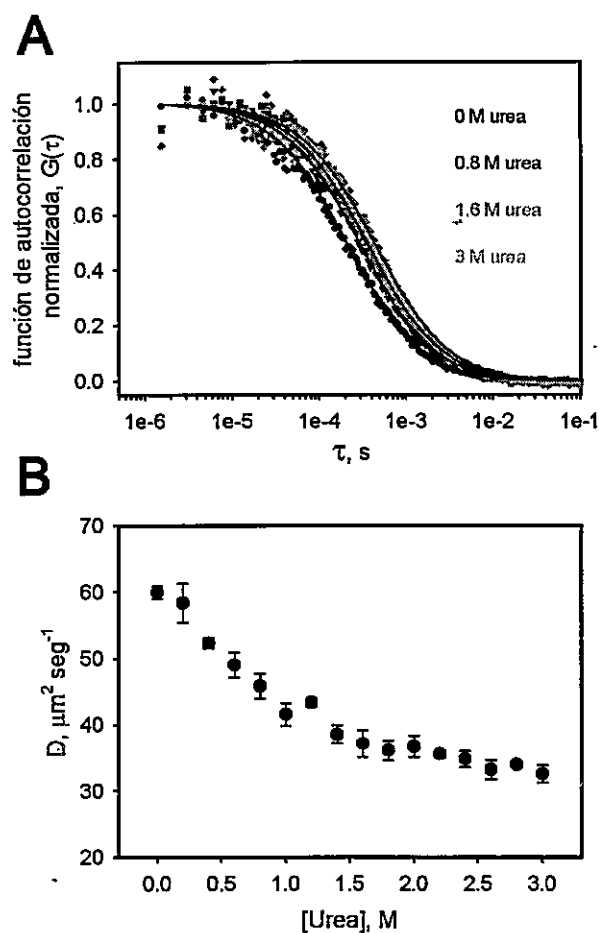


Figura 25 Despliegamiento inducido con urea de los conjugados FtsZ-Alexa488 a nivel de moléculas únicas (<100 nM) usando espectroscopía de correlación de fluorescencia (FCS). *A* las *líneas continuas* representan a los ajustes de los datos experimentales de autocorrelación de fluorescencia (*símbolos*) a cuatro concentraciones de urea. *B* coeficientes de difusión (*D*) de los conjugados fluorescentes en función de la concentración de urea calculados a partir de las curvas de autocorrelación. Las barras de error corresponden a las desviaciones estándar de 3 mediciones.

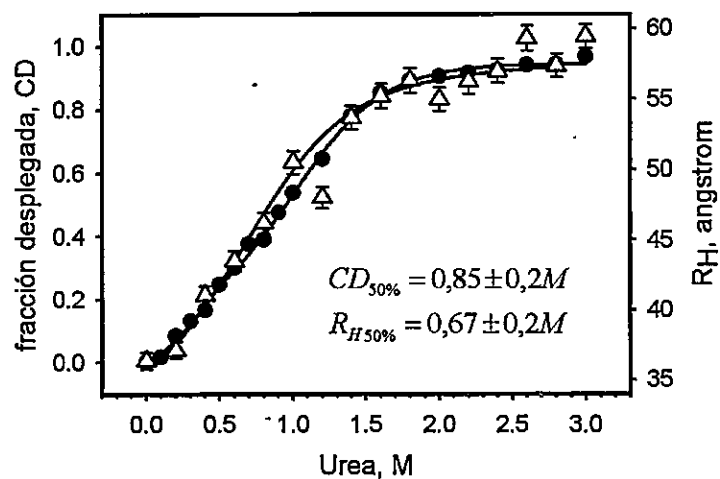


Figura 26 Comparación entre el desplegamiento de FtsZ, 1  $\mu$ M, seguido por el dicrófsmo circular a 222 nm (*círculos*) y el desplegamiento de FtsZ-Alexa488, <100 nM, seguido por FCS. Las *líneas continuas* representan a los ajustes de los datos experimentales (*símbolos*) con el modelo de desplegamiento de 2 estados,  $N \leftrightarrow U$ . Los datos de FCS se graficaron como el radio hidrodinámico,  $R_H$ , calculado a partir de la ecuación de Stokes-Einstein (*triángulos*). El inserto muestra la concentración de urea que produce un 50% de desplegamiento calculado a partir del ajuste de 2 estados.

centración de FtsZ desde 1  $\mu\text{M}$  (CD) hasta 100 nM (FCS), lo que se interpretó como que no hubo cambios significativos en el grado de asociación de la proteína, por tanto sería monomérica bajo 1  $\mu\text{M}$ .

### **Cambios conformacionales de FtsZ inducidos por el intercambio de los nucleótidos GDP y GTP**

La caracterización bioquímica de FtsZ y las mutantes puntuales F40W, Y222W y F275W llevó una caracterización fisicoquímica detallada de la proteína FtsZ silvestre que entregó información acerca del equilibrio de auto-asociación y de la estabilidad termodinámica de la proteína. A continuación se describen los resultados del estudio de los cambios conformacionales inducidos por el intercambio entre los nucleótidos GDP y GTP usando como reportero la fluorescencia intrínseca de las mutantes de triptófano.

#### **Caracterización de la fluorescencia intrínseca: espectros de emisión y apagamiento colisional de las mutantes puntuales F40W, Y222W y F275W**

El primer paso en el estudio de los cambios conformacionales es la caracterización de la emisión de fluorescencia de los triptófanos en las mutantes puntuales. Los espectros de emisión de las proteínas purificadas por el método de los ciclos de polimerización, es decir con una pureza superior a 96%, se muestran en la *figura 27*. Para comparar la emisión de fluorescencia del triptófano en los distintos ambientes donde se encuentra se usó el *máximo de emisión* y el *centro de masa* de los espectros, que se puede ver más claramente en la *figura 27 B*, donde se muestran los espectros normalizados. Los valores de los máximos de emisión y centros de masa de las mutantes F40W, Y222W y F275W se muestran en la *tabla 13*. Se observó que tanto

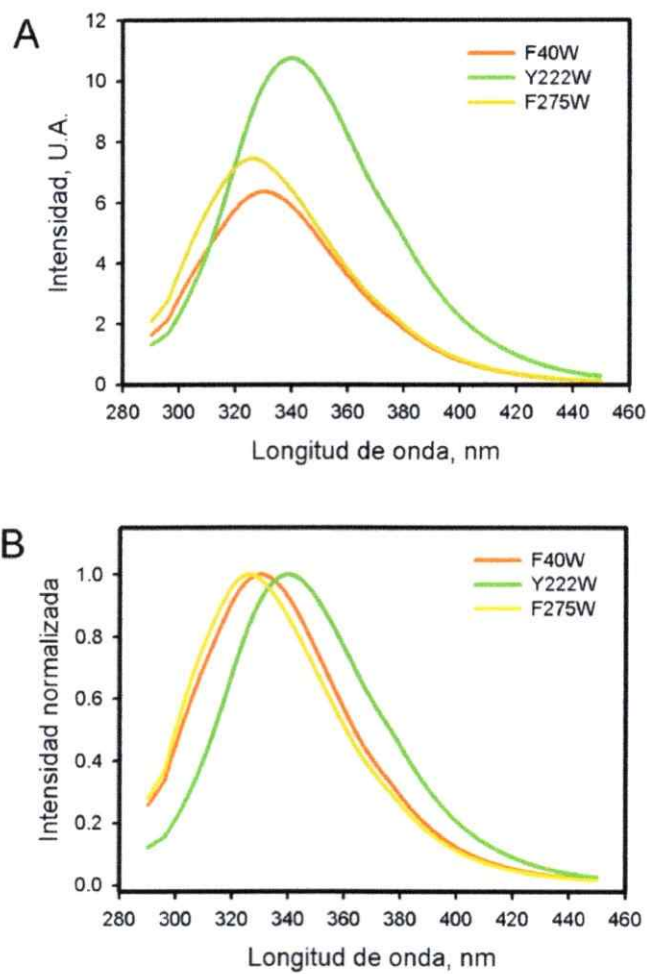


Figura 27 Espectros de emisión de fluorescencia intrínseca usando excitación a 295 nm para las mutantes F40W, Y222W y F275W a una concentración proteína de 25  $\mu$ M. A y B muestran a los espectros de emisión corregidos y normalizados, respectivamente.

Tabla 13 Longitud de onda en el máximo y centro de masa de la fluorescencia intrínseca de las mutantes F40W, Y222W y F275W

	F40W	Y222W	F275W
Máximo de emisión (nm)	330	340	326
Centro de masa (nm)	337	347	335

los máximos como los centros de masa de los espectros siguieron la misma tendencia donde el espectro más desplazado hacia el rojo es el de Y222W, después, hacia el azul le sigue F40W y por último el más desplazado hacia el azul es el espectro de F275W.

Para complementar el estudio de fluorescencia intrínseca en base a los espectros de emisión, se hicieron experimentos de apagamiento que permiten cuantificar el grado de exposición al solvente a partir del gráfico de Stern-Volmer. Una descripción de la información que se obtiene a partir estos experimentos se encuentra en la sección *Apagamiento colisional de la fluorescencia* en el *apéndice A*. Los resultados de los experimentos de apagamiento se muestran en la *figura 28* para las tres mutantes. Las *líneas continuas* en los gráficos de la *figura 28* representan a los ajustes de los datos experimentales con el modelo de apagamiento colisional de Stern-Volmer. Los experimentos se hicieron con los apagadores Ioduro (carga negativa en solución), Cesio (carga positiva en solución) y Acrilamida (neutro en solución) que permiten obtener información acerca del potencial eléctrico que rodea al aminoácido fluorescente. Las constantes de Stern-Volmer ( $K_{SV}$ ) obtenidas a partir de los ajustes se informan en la *tabla 14*. Si consideramos que el apagador tiene un efecto sobre la fluorescencia cuando  $K_{SV} \geq 1$ , entonces podemos descartar al ión Cesio como un apagador eficiente de la fluorescencia del triptófano. En el caso del ión Ioduro se observó un efecto apagador sólo sobre el triptófano en la mutante Y222W indicando ambos resultados que se encuentra en un ambiente con carga positiva. El experimento de apagamiento con acrilamida, que entrega información acerca del grado de exposición al solvente, se muestra en la *figura 28 D* para las tres mutantes.

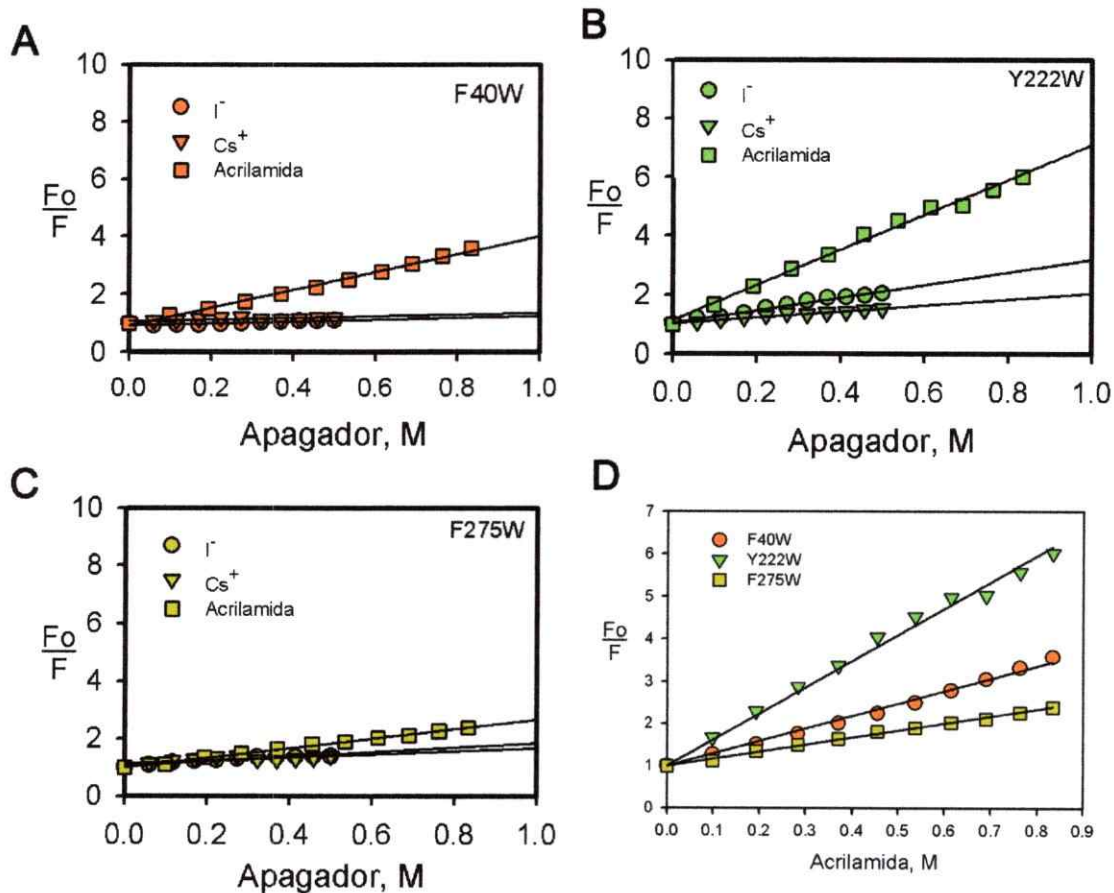


Figura 28 Experimentos de apagamiento de la fluorescencia intrínseca de las mutantes F40W, Y222W y F275W usando los apagadores  $I^-$ ,  $Cs^+$  y acrilamida. Los *símbolos* representan a los puntos experimentales y las *líneas continuas* son los ajustes al modelo de apagamiento colisional de Stern-Volmer con los parámetros informados en la tabla 14. En los experimentos se usó una concentración de proteína 10  $\mu$ M.

Tabla 14 Constantes de Stern-Volmer para el apagamiento colisional de la fluorescencia intrínseca del triptófano

	Nal M <sup>-1</sup>	CsCl M <sup>-1</sup>	Acilamida M <sup>-1</sup>
F40W	0,3	0,3	3,1
Y222W	2,4	1,0	6,0
F275W	0,8	0,5	1,7

\*Las rectas de Stern-Volmer ajustaron a los datos experimentales con  $R^2 > 0,98$ .



Se observó que  $K_{SV-222} > K_{SV-40} > K_{SV-275}$  y esto podría interpretarse como que el triptófano más expuesto es el 222, seguido del triptófano en la posición 40 y en la posición 275, respectivamente. No obstante, de acuerdo a la teoría expuesta en el *apéndice A*, la eficiencia de apagamiento, es decir el verdadero grado de exposición que considera el tiempo de vida de la fluorescencia, corresponde a la constante de apagamiento bimolecular ( $k_q$ ). El valor de  $k_q$  se obtiene a partir de la constante de Stern-Volmer y el tiempo de vida de la fluorescencia. La *tabla 15* reúne a los principales parámetros de la fluorescencia intrínseca de las mutantes F40W, Y222W y F275W que se midieron experimentalmente. Sin bien se incluye el tiempo de vida promedio de la fluorescencia, y estas medidas aún no se han descrito en detalle (ver más adelante), estos datos se informaron en este punto sólo para calcular las constantes de apagamiento bimolecular de los triptófanos (*tabla 15*). Con esta información, se observó que  $k_{q-275} > k_{q-222} \approx k_{q-40}$ , esto indica que el triptófano en la posición 275 está más expuesto al solvente que los triptófanos en las posiciones 40 y 222.

#### **Determinación de las constantes de disociación para MANT-GDP y MANT-GTP de las mutantes F40W, Y222W y F275W**

Con el fin de comprobar que las mutantes puntuales se unen a los nucleótidos GDP y GTP se hicieron experimentos de unión usando a los análogos fluorescentes MANT-GDP y MANT-GTP que permiten rastrear los cambios en sus propiedades fluorescentes por efecto de la unión a las proteínas en solución. La *figura 29* muestra los espectros de emisión de fluorescencia de los nucleótidos libres en solución y unidos a las proteínas FtsZ silvestre (el control positivo de la unión) y a las mutantes puntuales F40W, Y222W y F275W. La estructura de los análogos se muestra en los insertos de la

Tabla 15 Parámetros de accesibilidad de los triptófanos en las mutantes puntuales F40W, Y222W y F275W

	$\lambda_{\text{max.}}$ nm	$\tau_{\text{promedio}}$ ns	$K_{\text{sv}}$ $M^{-1}$	$k_q$ $\times 10^9 M^{-1}s^{-1}$
F40W	330	2,6	3,1	1,2
Y222W	340	6,1	6,0	1,0
F275W	326	3,8	1,7	2,2

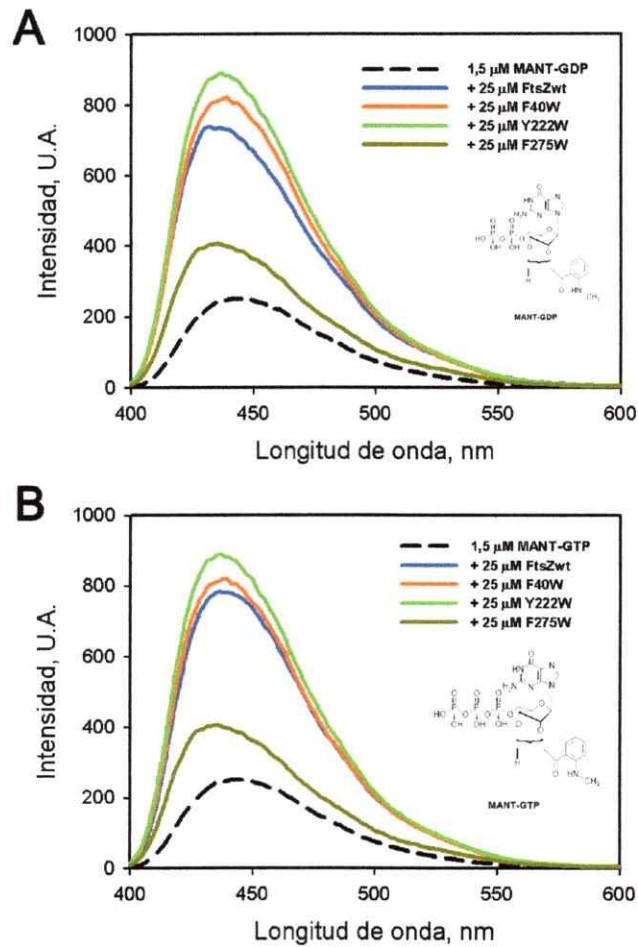


Figura 29 Espectros de emisión de los nucleótidos fluorescentes MANT-GDP (A) y GTP-MANT (B) en estado libre (*línea discontinua*) y en estado unido (*líneas continuas*) a las proteínas FtsZ silvestre (*azul*) y las mutantes puntuales F40W (*salmón*), Y222W (*verde*) y F275W (*amarillo oscuro*). La estructura de los nucleótidos fluorescentes se muestra en los insertos.

*figura 29 A* (MANT-GDP) y *29 B* (MANT-GTP). Se observó que los nucleótidos fluorescentes aumentaron su emisión de fluorescencia cuando se incubaron en presencia de las proteínas purificadas. No obstante, el efecto de la unión sobre la fluorescencia no fue igual para todas las proteínas. El aumento de la fluorescencia es como sigue, desde mayor a menor,  $Y222W \approx F40W > FtsZwt > F275W$ . Estas diferencias se deben probablemente a que el entorno del nucleótido fluorescente, es decir el bolsillo de unión, posee un ambiente diferente. Otra interpretación es que la fracción de nucleótido unido es diferente para todas las proteínas. Sin embargo, como veremos a continuación, los nucleótidos sí se unieron, pues se observaron cambios similares en la anisotropía de fluorescencia de los análogos en todos los casos.

Para determinar cuantitativamente, las constantes de disociación de los nucleótidos MANT-GDP y MANT-GTP se hicieron mediciones de anisotropía de fluorescencia de los análogos en función de la concentración de proteína. Los resultados de estos experimentos se muestran en la *figura 30*. Se observó que los cambios en la anisotropía de los complejos son similares por tanto sí se detectó la unión de los nucleótidos por parte de las proteínas. En el caso del análogo MANT-GDP (*figura 30 A*), los cambios en la anisotropía en función de la concentración de proteína son prácticamente idénticos para las cuatro proteínas probadas. En el caso del análogo MANT-GTP (*figura 30 B*) se detectaron diferencias en las anisotropías registradas en función de la concentración de proteína. Esto podría indicar distintos grados de asociación entre el nucleótido y la proteína, o bien, diferentes estados de oligomerización de las proteínas asociadas a los nucleótidos. Las líneas continuas en la *figura 30* corresponden a los ajustes de los datos experimentales a un modelo de equilibrio de unión de dos estados de acuerdo a lo descrito en el *apéndice D*. Para

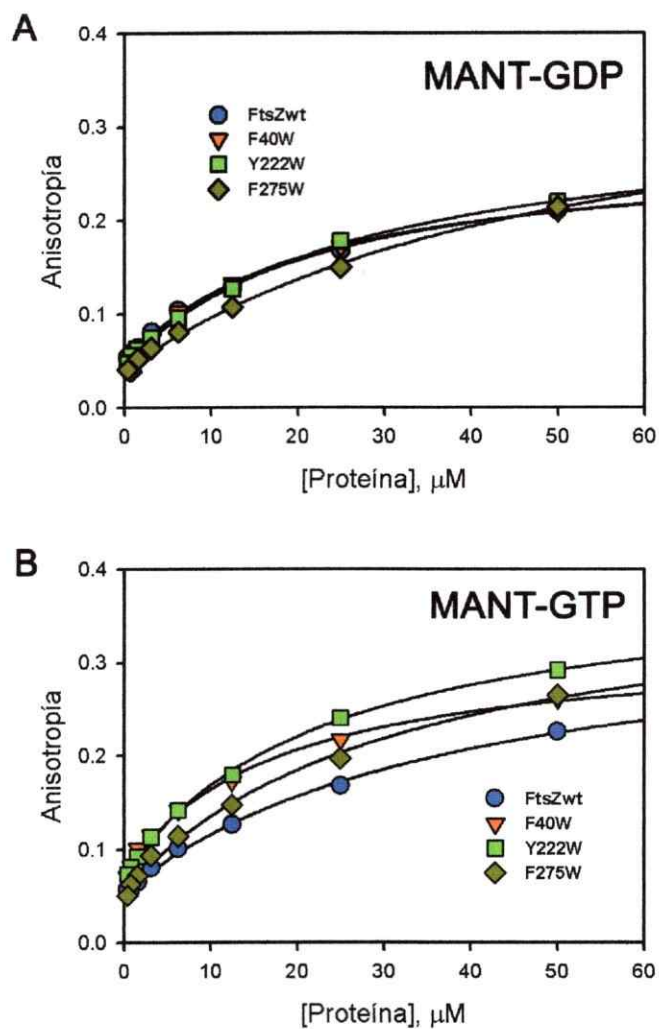


Figura 30 Experimentos de unión de los nucleótidos fluorescentes MANT-GDP y MANT-GTP con las proteínas FtsZ silvestre y las mutantes puntuales F40W, Y222W y F275W seguida por la anisotropía de fluorescencia en función de la concentración de proteína. Los símbolos representan a los datos experimentales y las líneas continuas son el ajuste de los datos con los parámetros informados en la tabla 16. Los nucleótidos se usaron a una concentración constante de 1,5  $\mu\text{M}$ .

estimar correctamente a las constantes de disociación es necesario considerar los cambios en las propiedades fluorescentes de los análogos por efecto de la unión a las proteínas. Esto se logró midiendo los tiempos de vida de los nucleótidos en los estados libre y unido (no mostrado). Las mediciones de tiempo de vida dan cuenta de los cambios en el rendimiento cuántico por efecto de la unión y se determinó que el factor de corrección es  $R = 1,9 \pm 0,3$  para todas las proteínas. Esto significa que se registró un aumento de 1,9 veces en el tiempo de vida promedio de los análogos en la condición unida respecto de la condición libre en solución. Con esta información, y por medio de ajuste globales, se obtuvieron las constantes de disociación informadas en la *tabla 16*. Se observó que la afinidad por MANT-GDP tiene la tendencia  $FtsZwt \approx F40W > Y222W > F275W$ . Para el análogo MANT-GTP se observó que la afinidad tiene la tendencia  $F40W > Y222W \approx F275W \approx FtsZwt$ . Esta información permitió calcular el grado de asociación ( $f_b$ ) de los nucleótidos a una concentración saturante de 500  $\mu M$ , que corresponde a lo usado normalmente en los experimentos *in vitro* (*tabla 16*). Una forma de comprobar que los ajustes y las medidas son correctos, es comparar los valores ajustados y esperados de las anisotropías en estado libre y unido. En el caso de la anisotropía libre se obtuvieron valores cercanos a 0,05 que concuerdan con lo esperado para una molécula pequeña libre en solución. Además se observó que la anisotropía libre fue mayor para MANT-GTP que para MANT-GDP. En el caso de la anisotropía de los análogos en estado unido, se observaron valores menores a 0,4 indicando que las medidas son correctas pues no se puede obtener un valor experimental de anisotropía mayor a este límite teórico. La anisotropía de los análogos en estado unido a las proteínas fue similar en ambos casos.

Tabla 16 Constantes de disociación de los nucleótidos fluorescentes MANT-GDP y MANT-GTP

	MANT-GDP	$f_b$	MANT-GTP	$f_b$
	$K_d$ , $\mu\text{M}$	500 $\mu\text{M}$ GDP	$K_d$ , $\mu\text{M}$	500 $\mu\text{M}$ GTP
FtsZwt	27,9 (4,6)	0,95	21,6 (4)	0,96
F40W	25,3 (4)	0,95	10 (2)	0,98
Y222W	35,6 (6)	0,93	15,5 (2)	0,97
F275W	64,2 (13)	0,89	19,7 (3)	0,96
r libre	0,041		0,054	
calculado	(0,003)		(0,005)	
r unido	0,346		0,322	
calculado	(0,035)		(0,029)	
$\chi^2$	$7e^{-4}$		$1e^{-3}$	

## Tiempos de vida de la fluorescencia intrínseca en las mutantes F40W, Y222W y F275W en presencia de los nucleótidos GDP y GTP

Para estudiar los cambios estructurales que ocurren en FtsZ durante la transición desde los polímeros rectos en presencia de GTP hasta los polímeros curvos en presencia de GDP se usó a la fluorescencia intrínseca de los triptófanos pues son sensibles a los cambios fisicoquímicos del ambiente cercano. Para emular ambas condiciones estructurales se incubó a las proteínas F40W, Y222W y F275W en presencia de los nucleótidos GDP y GTP (500  $\mu\text{M}$ ) y se hicieron mediciones de fluorescencia resuelta en el tiempo. Estas mediciones permitieron cuantificar los tiempos de vida para determinar los efectos de ambos nucleótidos sobre la fluorescencia de los triptófanos. Los resultados de estos experimentos se muestran en la *figura 31*. Los datos experimentales de fluorescencia en el dominio de la frecuencia se ajustaron a las curvas teóricas mostradas en las *figura 31* de acuerdo a lo descrito en el *apéndice A*, sección *Fluorescencia resuelta en el tiempo*. Los parámetros obtenidos en los análisis se informaron en las *tablas 17-20*. Debido a la complejidad del decaimiento de la fluorescencia del triptófano los análisis mostraron que los datos experimentales sólo se pueden explicar con más de un tiempo de vida. Por ello, los ajustes de los tiempos de vida de los triptófanos se hicieron de dos maneras: con una combinación de tres componentes discretos (*tablas 17 y 18*) y con una combinación de un componente discreto y una distribución continua de tiempos de vida (*tablas 19 y 20*). El aspecto más importante en estos análisis es el tiempo de vida promedio puesto que es difícil explicar el origen de los diferentes componentes encontrados en los análisis. En los análisis donde se usó componentes discretos se observó que los tiempos de vida promedio en presencia de GDP siguen la tendencia  $Y222W > F275W > F40W$  y en presencia de GTP siguen la misma tendencia  $Y222W > F275W > F40W$ .



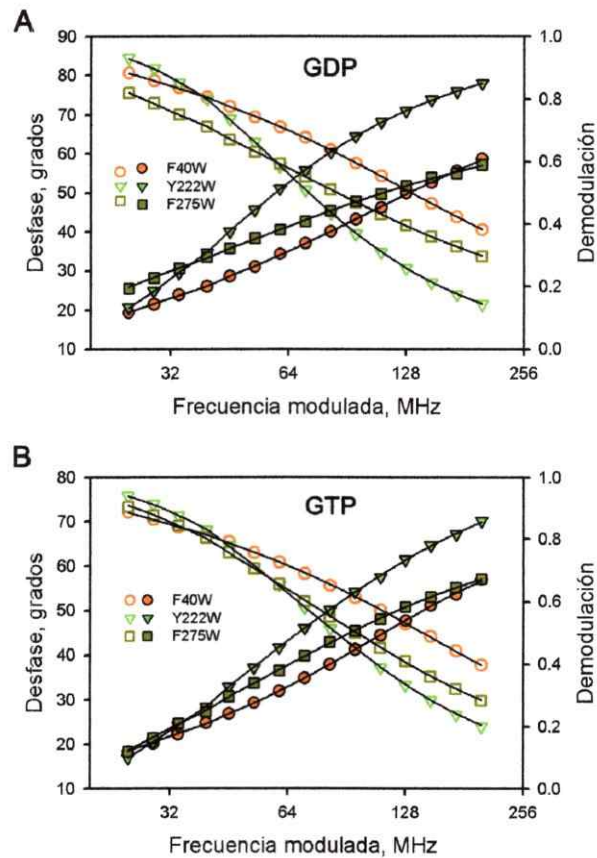


Figura 31 Mediciones de fluorescencia resuelta en el tiempo en el dominio de la frecuencia de las mutantes puntuales F40W, Y222W y F275W. Los datos experimentales corresponden al desfase (*símbolos cerrados*) y a la demodulación (*símbolos abiertos*) de la emisión de fluorescencia en función de la frecuencia. *A* mediciones de tiempo de vida en presencia del nucleótido GDP a una concentración de 500 mM. *B* mediciones de tiempo de vida en presencia del nucleótido GTP a una concentración de 500 mM. Las *líneas continuas* representan el ajuste de los datos experimentales con tiempos de vida e intensidades fraccionales mostrados en las tablas 17-20. Para las mediciones se usó una concentración de proteína de 50  $\mu$ M.

Tabla 17 Análisis de los datos de tiempo vida en presencia de GDP usando tres componentes discretos.

	$\tau_1$	$\tau_2$	$\tau_3$	$f_1$	$f_2$	$f_3$	$\tau_{ave}$	$\chi^2$
	ns	ns	ns				ns	
F40W*	0,17 (0,01)	1,49 (0,12)	5,88 (0,52)	0,05 (0,04)	0,68 (0,01)	0,26 (0,01)	2,6	1,4
Y222W	0,60 (0,17)	2,92 (0,56)	6,72 (0,27)	0,02 (0,01)	0,14 (0,08)	0,84 (0,01)	6,1	0,6
F275W	0,23 (0,05)	1,74 (0,15)	5,78 (0,19)	0,08 (0,01)	0,37 (0,02)	0,54 (0,01)	3,8	0,7

Tabla 18 Análisis de los datos de tiempo vida en presencia de GTP usando tres componentes discretos.

	$\tau_1$	$\tau_2$	$\tau_3$	$f_1$	$f_2$	$f_3$	$\tau_{ave}$	$\chi^2$
	ns	ns	ns				ns	
F40W	0,18 (0,11)	1,42 (0,04)	5,91 (0,22)	0,06 (0,01)	0,67 (0,01)	0,28 (0,01)	2,6	0,7
Y222W	0,05 (0,13)	1,95 (0,26)	6,32 (0,19)	0,02 (0,06)	0,28 (0,03)	0,70 (0,01)	5,0	0,9
F275W	0,21 (0,05)	1,68 (0,14)	5,83 (0,17)	0,09 (0,02)	0,36 (0,02)	0,55 (0,51)	3,8	0,9

\*el análisis de los datos experimentales se hizo con errores estándar constantes de 0.2° para el desfase y con 0.004 para la modulación

Tabla 19 Análisis de los datos de tiempo de vida en presencia de GDP usando una distribución continua y un componente discreto

	$f_1$	centro	Ancho	$f_2$	$\tau$	$\chi^2$
		ns	ns		ns	
F40W	0,68 (0,01)	2,6 (0,1)	2,4 (0,2)	0,32 (0,02)	1,1 (0,2)	1,2
Y222W	0,96 (0,01)	6,2 (0,1)	0,8 (0,2)	0,04 (0,01)	1,5 (0,2)	0,4
F275W	0,88 (0,01)	3,3 (0,1)	3,0 (0,1)	0,12 (0,01)	0,6 (0,1)	1,3

Tabla 20 Análisis de los datos de tiempo de vida en presencia de GTP usando una distribución continua y un componente discreto

	$f_1$	centro	ancho	$f_2$	$\tau$	$\chi^2$
		ns	ns		ns	
F40W	0,65 (0,01)	2,5 (0,1)	2,3 (0,2)	0,35 (0,1)	1,0 (0,1)	1,5
Y222W	0,91 (0,03)	5,0 (0,5)	2,3 (0,2)	0,09 (0,05)	1,2 (0,2)	1,7
F275W	0,90 (0,05)	3,4 (0,1)	3,1 (0,1)	0,10 (0,01)	0,5 (0,1)	1,6

\*el análisis de los datos experimentales se hizo con errores estándar constantes de 0,2° para el desfase y con 0,004 para la modulación

En los análisis con distribuciones continuas se observaron las mismas tendencias con ambos nucleótidos. Con el fin de facilitar la visualización de estos resultados, se construyeron las representaciones gráficas mostradas en la *figura 32* que contienen la misma información mostrada en las *tablas 17-20*. En estos gráficos, las *barras grises y negras* representan los componentes discretos de las *tablas 17 y 18* y las *líneas discontinuas y continuas* representan el análisis con un componente discreto y un componente continuo de las *tablas 19 y 20*, en presencia de GDP y GTP, respectivamente. La inspección visual de estos gráficos muestra que las mayores diferencias entre los estados GDP y GTP se encontraron en la mutante Y222W mientras que las mutantes F40W y F275W no mostraron cambios significativos.

Debido a que en estos análisis se usaron modelos de componentes, sean éstos discretos o continuos, se entiende que son hipótesis y que existe la posibilidad de "forzar" los resultados hacia un modelo particular, aun cuando se hicieron análisis estadísticos de los parámetros. Hay otra forma de representar la información de tiempo de vida de una manera modelo-independiente usando la representación en gráficos polares o en inglés, en los "Phasor plots". En estas representaciones gráficas, los datos de fluorescencia resuelta en el tiempo, ya sea en el dominio del tiempo como en el dominio de la frecuencia, se grafican directamente, sin análisis, usando los productos S y G que corresponden a los componentes seno y coseno de la modulación y la fase de la fluorescencia (*figura 33*). Esto puede parecer complicado pero es simplemente poner los puntos experimentales en el gráfico usando las transformaciones mencionadas. Una descripción con las definiciones de los productos S y G se encuentra en el *apéndice A* en la sección *Fluorescencia resuelta en el tiempo*. La ventaja de estas representaciones es que permiten "ver" cualquier cambio en los tiempos de vida de la

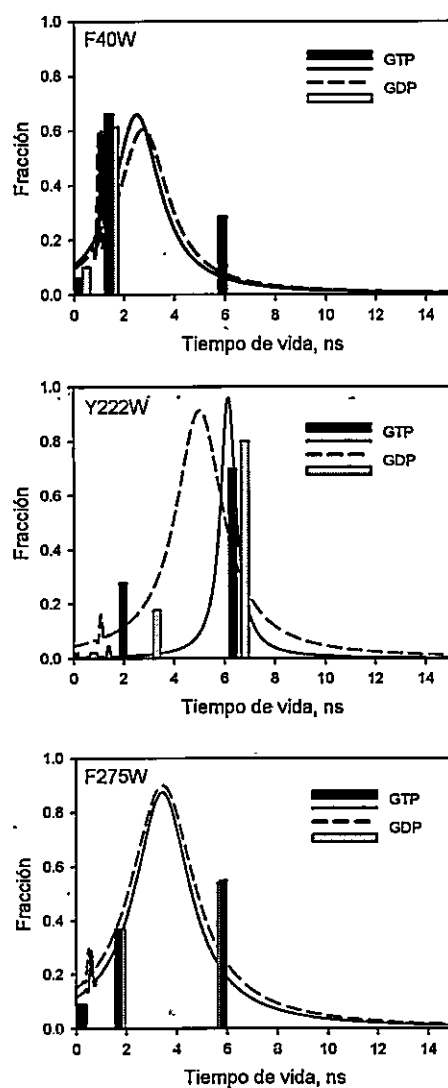


Figura 32 Representaciones gráficas de los resultados del análisis de tiempo de vida de la fluorescencia de las mutantes F40W, Y222W y F275W en presencia de GDP 500  $\mu$ M (barras grises y líneas punteadas) ó GTP 500  $\mu$ M (barras negras y líneas continuas). Las barras corresponden a los análisis de tiempo de vida usando un modelo de tres componentes discretos y las líneas representan los análisis de tiempo de vida usando una distribución continua. Los parámetros de éstos análisis se muestran en las tablas 17-20.

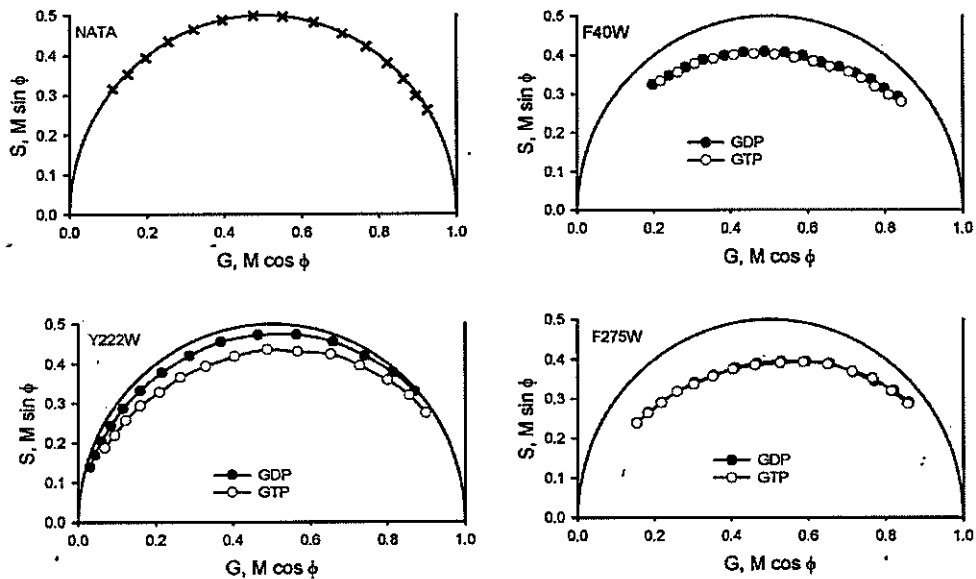


Figura 33 Representación gráfica del efecto de los nucleótidos GDP y GTP ( $500 \mu\text{M}$ ) en los datos de tiempo de vida obtenidos en el dominio de la frecuencia usando "Phasor Plots". Los *símbolos unidos por una línea* corresponden a las medidas de tiempo de vida en función de la frecuencia modulada. Si el tiempo de vida es monoexponencial (NATA), las medidas de tiempo de vida se distribuyen sobre el círculo universal (*línea continua*). Los valores "G" y "S" corresponden a la demodulación multiplicada por el coseno y el seno del desfase, respectivamente.

fluorescencia sin la necesidad de tener un conocimiento profundo de los ajustes matemáticos necesarios para extraer información de los tiempos de vida. En la *figura 33* se muestra un ejemplo común usado para calibrar los instrumentos de fluorescencia resuelta en el tiempo, nos referimos al NATA (N-acetil triptofanamida), un análogo de triptófano que emula al aminoácido en el contexto del enlace peptídico. El NATA tiene posee un decaimiento monoexponencial de la fluorescencia, es decir, tiene sólo un tiempo vida que corresponde a 3 ns. En la *figura 33*, en el "Phasor plot", se ve que todos los puntos experimentales de la fluorescencia de NATA caen sobre la línea circular continua. En el caso del triptófano en las mutantes F40W, Y222W y F275W, se ve que todos los puntos experimentales se encuentran dentro del círculo. Esta línea circular se denomina "el círculo universal" y representa a todos los tiempos de vida de tipo monoexponenciales a todas las frecuencias posibles. Estos son los dos aspectos característicos de la fluorescencia con decaimiento monoexponencial y multiexponencial que se puede ver en los "Phasor plots", es decir, si caen dentro o sobre el círculo universal. La inspección visual de los datos experimentales de la mutantes en presencia de GDP y GTP, mostrados en la *figura 33*, que son los mismos que se presentaron anteriormente en los análisis matemáticos, muestran una tendencia similar a los análisis al usar los modelos de componentes. Los mayores cambios se observaron en la mutante Y222W, en la mutante F40W se observó un pequeño desplazamiento de los puntos entre la condición unida a GDP y GTP y en la mutante F275W no se observaron cambios en la fluorescencia por efecto de la unión de los nucleótidos GDP ó GTP.

## Discusión

El trabajo desarrollado en esta tesis abordó desde un punto de vista experimental la hipótesis de que en FtsZ ocurren cambios conformacionales por el intercambio entre los nucleótidos GDP y GTP. La función de la proteína FtsZ en la división celular está íntimamente relacionada con su capacidad de polimerizar y formar protofilamentos. A su vez, la regulación de la polimerización se relaciona con la unión e hidrólisis del nucleótido GTP. En presencia de GDP, la proteína FtsZ polimeriza formando polímeros cortos y curvos a través de un mecanismo isodésmico, es decir, sin una concentración crítica. En contraste, en presencia de GTP, FtsZ polimeriza formando polímeros rectos a través de un mecanismo cooperativo con una concentración crítica aparente cercana a 1  $\mu\text{M}$ . El modelo actualmente aceptado para explicar el mecanismo cooperativo de polimerización incluye un cambio conformacional seguido de la formación de un núcleo dimérico. Sobre la base de estudios de dinámica molecular, y también de estudios experimentales, se ha propuesto que los cambios conformacionales podrían ocurrir como movimientos tipo bisagra entre los dominios N y C, y que el dominio carboxilo terminal sería la región más flexible de la proteína y tendría un rol en la formación de polímeros rectos (Chen y Erickson, 2011; Martín-Galiano y col., 2010).

Los resultados se presentaron en tres capítulos y éstos se dividieron en secciones con el fin de facilitar la descripción de los experimentos. Del mismo modo, para facilitar la discusión del trabajo ésta se dividió en secciones. En primer lugar, se describe en dos secciones la caracterización *in silico* e *in vitro* de las proteínas FtsZ silvestre y las mutantes puntuales F40W, Y222W y F275W. Esta información se usó para complementar los resultados que se obtuvieron en el estudio de los cambios



conformacionales. En segundo lugar, se describe en tres secciones el estudio fisicoquímico de la FtsZ silvestre. Los resultados de este estudio permitieron dilucidar algunos aspectos de la proteína que se tenían en entredicho en nuestro laboratorio y resultó en una publicación para el laboratorio (ver más adelante). En tercer lugar, se describe en dos secciones el estudio de la fluorescencia intrínseca de las mutantes puntuales que consideró a la información obtenida en los estudios anteriores. Por medio de este estudio se determinaron los sitios o regiones de la proteína en donde ocurren los cambios conformacionales inducidos por el ciclo de polimerización y despolimerización.

### **Secuencia y estructura tridimensional de FtsZ de *E. coli* portando a las mutaciones F40W, Y222W y F275W**

La proteína FtsZ de *Escherichia coli* carece de triptófanos en su secuencia natural de aminoácidos y en el laboratorio de Biología Estructural y Molecular se construyó una batería de mutantes donde se reemplazó residuos aromáticos por triptófanos para estudiar el desplegamiento y la función de FtsZ *in vitro* (Díaz-Espinoza y col., 2007). Se usaron dos criterios para la selección de los sitios, el primero y más importante es que el residuo original tenga una cadena lateral aromática para conservar las propiedades fisicoquímicas generales del triptófano que se introducirá. El segundo criterio de modificación es que el residuo candidato se encuentre en regiones relevantes de la estructura terciaria de FtsZ, por ejemplo, en los dominios N y C. Debido a que el objetivo principal de esta tesis es determinar los sitios donde ocurren los cambios conformacionales, se seleccionaron tres mutantes puntuales que se encuentran en las regiones relevantes de acuerdo a un criterio estructural.

El dominio N posee el sitio de unión al nucleótido GTP/GDP y la mitad inferior de la superficie de interacción longitudinal, considerando la orientación mostrada en la *figura 5*. Por estos motivos, se escogió a la mutación F40W para rastrear posibles cambios estructurales que ocurran cerca del sitio de unión del nucleótido y de la superficie de interacción longitudinal que le corresponde al dominio N. Sobre la base de estudios de flexibilidad intrínseca a partir de la secuencia y de los cristales de la proteína, se ha descrito al dominio N como una región rígida (*figura 3*). Específicamente, la mutación F40W se encuentra en la hebra S2, una de las regiones con la flexibilidad más baja de la estructura (*ver figura 3 C*). Un inconveniente que podemos prever en el uso de la mutación F40W para estudiar los cambios estructurales, es que se encuentra en el interior del dominio N, y de acuerdo al modelo, bastante oculto del solvente. Esto indica que forma parte del núcleo hidrofóbico del dominio N, por lo que la rigidez de la región donde se encuentra podría "apantallar" o disminuir los movimientos estructurales por efecto del intercambio de los nucleótidos GTP y GDP. Esta hipótesis se reafirmó por el hecho de que nuestros estudios de accesibilidad al solvente en el modelo FtsZ no mostraron cambios significativos al pasar desde el estado polimerizado (tetrámero) hasta el estado monomérico (*figura 6*). Otro aspecto que podría afectarse por la mutación es la interacción con el nucleótido debido a su cercanía al sitio de unión. No obstante, la rigidez de la región donde se encuentra podría enmascarar cualquier efecto estérico en la estructura lo que disminuye la probabilidad de efectos colaterales en la unión del nucleótido. Se identificaron las cadenas laterales que se encuentran cercanas al triptófano 40, y de las mutaciones escogidas, ésta presentó el mayor número de aminoácidos cercanos, con 9 cadenas laterales. Este resultado indica que se encuentra en una región compacta de la proteína y probablemente poco accesible al solvente.

La mutación Y222W se encuentra en la interfase de interacción entre los dominios N y C. Se escogió a la mutación Y222W para caracterizar a los cambios conformacionales puesto que ya se ha atribuido un rol a la interfase interdominio en la formación de polímeros curvos y rectos (Martín-Galiano y col., 2010). El triptófano en la posición 222 se encuentra alejado del sitio de unión del nucleótido, y por tanto, se espera que no exista una relación directa entre los efectos en la estructura local y el sitio de unión del nucleótido. La tirosina 222 se encuentra en la hebra S7 en el primer tramo del dominio C y de acuerdo al estudio de flexibilidad mostrado en la *figura 3*, este elemento de estructura secundaria, específicamente, tiene una flexibilidad moderada. No obstante, la región donde se encuentra es bastante flexible, como el lazo que se encuentra entre las hebras S7 y H9. Los altos valores de flexibilidad encontrados en esta porción de la secuencia indican una alta probabilidad de que ocurran movimientos en respuesta a los cambios en el estado de polimerización. La inspección visual del modelo (*figura 5*) sugiere un alto grado de exposición al solvente del triptófano en la posición 222, debido a que la cadena lateral del triptófano tiene una orientación que escapa hacia el exterior de la estructura de la proteína. El estudio de accesibilidad al solvente mostró que este triptófano tiene un grado de accesibilidad elevado tanto en el estado polimerizado GTP como en el estado GDP (*figura 6*). Además, se identificaron 7 cadenas laterales que rodean al aminoácido triptófano en la posición 222 y este el menor número de cadenas laterales en comparación a los triptófanos en las posiciones 40 y 275. Estos hallazgos apoyan la idea de que este triptófano se encuentra más bien expuesto al solvente. Durante el desarrollo de esta tesis, en el marco de estudios de colaboración, el grupo de Erickson, H.P., realizó un estudio experimental de cambios conformacionales en donde se incluyó a la mutación Y222W en FtsZ de *E. coli* (Chen y Erickson, 2011). En este trabajo se determinó que en la región de la proteína que

rodea a la tirosina 222, en la estructura, ocurren los mayores movimientos o cambios estructurales por efecto de pasar desde el estado despolimerizado GDP hasta el estado polimerizado en presencia de GTP. Este resultado concuerda con nuestras conclusiones de los estudios de fluorescencia resuelta en el tiempo (ver más adelante).

El dominio C posee los elementos de estructura secundaria claves para la actividad GTPásica de FtsZ. Estos son el "loop-T7" y la hélice H8 que contienen a los aminoácidos D209 y D212, entre otros, que son importantes para la actividad catalítica. Adicionalmente, el dominio C tiene la mitad inferior de la superficie de interacción longitudinal. Se escogió a la mutación F275W para estudiar a los cambios conformacionales que se inducen en el dominio C por efecto del intercambio de los nucleótidos GDP y GTP. La fenilalanina en la posición 275 de la secuencia se encuentra alejada de los aminoácidos responsables de la unión del nucleótido, que corresponden a los lazos denominados "loops T1-T7". Sin embargo, la inspección visual del modelo mostrado en la *figura 5*, revela que se encuentra muy cerca del sitio de unión del nucleótido, pero en el contexto del dímero de FtsZ, es decir, del sitio de unión de la subunidad inferior del dímero. Esto sugiere que podría modificar la unión del nucleótido por un impedimento estérico o a través de una modificación del contenido de estructura secundaria. La fenilalanina 275 se encuentra en la hélice H10, en un grupo de aminoácidos cargados y polares. La región donde reside es altamente flexible, posiblemente la porción de mayor flexibilidad de toda la estructura de FtsZ (*figura 3*). Por tanto, esta mutante es un candidato promisorio para detectar cambios conformacionales inducidos por el intercambio de los nucleótidos GDP y GTP. El análisis de accesibilidad en el modelo mostró un resultado interesante en el sentido de que no era esperado. Se encontró que el grado de accesibilidad del triptófano en la

posición 275 cambia grandemente al pasar desde el estado polimerizado hasta el estado despolimerizado (*figura 6*). En el estado monomérico, se encontró una gran accesibilidad que se enmascara completamente al establecer la interacción longitudinal. Esto sugiere que si la proteína tiene un alto grado de oligomerización, entonces el triptófano se encontrará excluido del solvente. Se detectaron 8 cadenas laterales que acompañan al aminoácido triptófano, esto sugiere que se encontraría más bien inaccesible al solvente.

### **Expresión, purificación y caracterización *in vitro* de FtsZ silvestre y las mutantes F40W, Y222W y F275W**

Para caracterizar a las proteínas *in vitro* se implementó un método de purificación de FtsZ basado en sus propiedades funcionales, que permitió purificar la proteína con alta pureza. El método de los ciclos de polimerización comienza con la expresión de FtsZ, por medio de la inducción con IPTG en la cepa BL21 (DE3) electrotransformada con el vector pET-FtsZ (*figura 7*). La proteína sobreexpresada se obtuvo desde la fracción citoplasmática con un paso de "salting out". Posteriormente, se seleccionó a la proteína funcional mediante la capacidad de FtsZ de formar filamentos y manojos en presencia de Mg-GTP, cloruro de calcio y ácido glutámico (*figura 8-10*). Se hizo una comparación de los resultados de la purificación de FtsZ entre el método funcional (usado tradicionalmente) y el método de los ciclos de polimerización. Se encontró que la pureza de las purificaciones es bastante alta en ambos casos, sin embargo, el método de los ciclos de polimerización arrojó una mayor pureza y un mayor rendimiento. Por este motivo hemos escogido a este método para purificar a todas las proteínas. Se observó que la purificación resultó en una pureza similar para FtsZ silvestre y las mutantes F40W, Y222W y F275W (*figura 11*). Se

observaron algunas diferencias en las purificaciones en cuanto al rendimiento y al contenido de nucleótido, donde FtsZ silvestre, F40W y Y222W tuvieron rendimientos y contenidos de nucleótido similares mientras que F275W arrojó un menor rendimiento y un menor contenido de nucleótido. Esto último sugiere que la afinidad por el nucleótido ha disminuido por efecto de la mutación. Una conclusión más específica acerca de las posibles causas de este resultado se discute más adelante en esta sección.

La función de FtsZ *in vivo* se ha estudiado ampliamente en la literatura y se relaciona con la capacidad de FtsZ de formar polímeros y de generar fuerza constrictora a través de la actividad GTPásica (Mukherjee y Lutkenhaus, 1999; Osawa y col., 2008). La proteína FtsZ purificada exhibe ambas actividades, que también han sido caracterizadas *in vitro*. El aspecto más significativo de la función de FtsZ *in vitro*, es la concentración crítica (Cc) para detectar ambas actividades. A su vez, la concentración crítica se relaciona con el mecanismo detrás de la activación de la actividad GTPásica y de la polimerización. El valor específico de Cc varía según el reporte. No obstante, podemos establecer con bastante seguridad que el valor de Cc para la polimerización es  $1,5 \pm 1 \mu\text{M}$ , si tomamos la información de los reportes de distintos grupos que estudian esta proteína. En nuestro caso particular, usando la información de varias purificaciones de FtsZ, por diferentes métodos, y siempre cuantificando la concentración de proteína con el método de Bradford, podemos mejorar la precisión de Cc para la polimerización a  $1 \pm 0,5 \mu\text{M}$ . Por tanto, nuestro intervalo de confianza para Cc es de  $0,5 - 1,5 \mu\text{M}$ . En el caso de la actividad GTPásica los valores de la concentración crítica son aún menos precisos, no obstante, podemos concluir que siempre se encuentran muy cercanos, o en el mismo orden de magnitud, al valor de Cc para la polimerización. Los resultados de la caracterización realizada en esta tesis

mostraron que la Cc sigue una tendencia compleja al comparar el valor de Cc para las actividades GTPásica y polimerización (*tabla 2*). En el caso de la polimerización, los valores de la Cc se encuentran en el mismo orden de magnitud para las 4 proteínas purificadas. Se observó que el valor de la Cc de las mutantes Y222W y F275W es aproximadamente dos veces el valor de Cc para FtsZ silvestre y F40W indicando un efecto de las mutaciones sobre la función *in vitro*. En el caso de la actividad GTPásica los valores de la concentración crítica estuvieron nuevamente en el mismo orden de magnitud en las mutantes y la proteína silvestre. Se observó que la Cc para FtsZ silvestre y Y222W tuvieron el mismo valor, mientras que la Cc para F40W y F275W fue aproximadamente 2 veces mayor que los casos anteriores. Esto indica un efecto de las mutaciones sobre la actividad GTPásica *in vitro*. En nuestro análisis, se observó que la única tendencia evidente es que la mutante F275W tuvo un aumento sostenido de la Cc para ambas actividades, en comparación con las otras tres proteínas, lo que apunta a que la mutación F275W fue la ocasionó los mayores efectos deletéreos sobre la función de FtsZ *in vitro*. Otro aspecto que destaca es el hecho de que la Cc para la actividad GTPásica siempre tuvo menores valores que la Cc para la polimerización, esto lo podemos atribuir a que la metodología de detección de la actividad, la liberación de fosfatos por un método colorimétrico, tiene una sensibilidad mayor que el método de detección de la polimerización (dispersión de luz), por tanto detectamos la actividad a concentraciones de proteína algo menores. Sin embargo, no hubo diferencias importantes al comparar la Cc entre ambas actividades, ambos valores de la Cc se encuentran en el mismo orden de magnitud.

Con el fin de profundizar el estudio sobre la funcionalidad de FtsZ silvestre y las mutantes puntuales F40W, Y222W y F275W, se caracterizó la actividad GTPásica de

FtsZ usando el modelo de Michaelis-Menten (*figura 13*). Se encontró que la  $K_m$  para el nucleótido no varió considerablemente (en el mismo orden de magnitud) entre FtsZ silvestre, F40W y Y222W. En contraste, la proteína F275W mostró un aumento de 15 veces en la  $K_m$  para Mg-GTP, un efecto sustantivo sobre la actividad GTPásica. Esto confirma los hallazgos anteriores, en el sentido de que la mutación indujo un cambio, probablemente estructural, que produjo este efecto sobre la constante de Michaelis para el nucleótido. Al comparar el parámetro cinético de la actividad GTPásica, la constante catalítica ( $k_{cat}$ ), se observó que los valores obtenidos con el gráfico de concentraciones críticas y los valores obtenidos con el modelo de Michaelis-Menten (*tabla 4*) son similares, es decir, todos están en el mismo orden de magnitud. Cabe hacer notar que la actividad catalítica de FtsZ, si bien tiene valores de  $K_m$  comparables a los datos de la literatura, los valores calculados de  $k_{cat}$  ( $\sim 0,5-1 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) son bastante bajos, es decir, la velocidad con que se recambia el nucleótido en el sitio activo, en estado estacionario, es baja en comparación a las enzimas consideradas "eficientes". Podemos encontrar valores de  $k_{cat} = 1 \times 10^3$  a  $1 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$ , y en estos ejemplos los valores de  $K_m$  son similares a los encontrados en este trabajo para FtsZ y las mutantes puntuales (Fersht, 1999). Estos resultados indican que las proteínas FtsZ silvestre, F40W y Y222W poseen actividades muy similares, por tanto las mutaciones no afectaron significativamente la función de FtsZ *in vitro*. En contraste, la mutación F275W sí produjo un efecto negativo sobre la afinidad aparente por Mg-GTP, pero la velocidad de hidrólisis es similar a la FtsZ silvestre. Si el valor de  $k_{cat}$  es mucho menor que  $k_{-1}$  en la ecuación de Michaelis y Menten, estos resultados podrían interpretarse como que la afinidad del nucleótido GTP es lo que ha disminuido, pero con la información que tenemos hasta este punto es difícil establecer las causas específicas



de los efectos observados. Debido a que el sitio activo de FtsZ se produce por la interacción entre dos monómeros, la actividad GTPásica depende no sólo de la unión del nucleótido sino que también de las interacciones proteína-proteína.

Para profundizar el estudio de los efectos que causaron las mutaciones sobre la actividad *in vitro*, se caracterizaron dos aspectos de la proteínas que se relacionan con las interacciones proteína-proteína, el contenido de estructura secundaria (*tabla 5*) y el perfil cromatográfico de exclusión molecular (*tabla 6*). A partir de los espectros de dicroísmo circular se obtuvieron los contenidos de estructura secundaria de las proteínas FtsZ silvestre y las mutantes puntuales F40W, Y222W y F275W. Los contenidos de estructura secundaria calculados para FtsZ, obtenidos a partir del modelo 3D, donde se excluyen unos 10 aminoácidos del N-terminal y 90 aminoácidos del C-terminal (*ver figura 4*): hélice- $\alpha$  = 38%, hebra- $\beta$  = 27% y otro tipo de estructura = 35% (Marrington y col., 2004). Los valores teóricos no concuerdan con lo obtenido en esta tesis, probablemente debido a que corresponden a los de la estructura de FtsZ de *Methanococcus jannaschii*, que si bien presenta una alta similitud de secuencia con la FtsZ de *Escherichia coli*, podría también mostrar diferencias en su estructura que no conocemos, esto último debido a que la estructura tridimensional de FtsZ de *E. coli* no ha sido resuelta sino mas bien modelada. Cabe hacer notar que la "forma" de los espectros, sí muestra una alta similitud con los datos informados en la literatura, por tanto también podríamos atribuir las diferencias en los contenidos de estructura secundaria a aspectos como la utilización del software, entre otros. No se observaron grandes diferencias en el contenido de estructura secundaria entre FtsZ silvestre y las mutantes, aunque sí se detectó una leve disminución del contenido de hélice- $\alpha$ , y un aumento del contenido hebra- $\beta$  en la mutante F275W (*tabla 5*). Este resultado apunta a

que los cambios de la estructura local en la zona de la mutación, una transición  $\alpha \rightarrow \beta$ , podría explicar los efectos observados en la caracterización funcional *in vitro*. La fenilalanina 275 se encuentra en la mitad de la hélice H10, entonces, de acuerdo a nuestros resultados, podemos especular que la mutación produjo la interrupción de la hélice y causó que pasara a formar una hebra beta, por tanto es este cambio en la estructura sería lo que afectó a las interacciones proteína-proteína, causando un aumento en la  $K_m$  (figura 13) y una disminución en la estabilidad de los polímeros (figura 12 A).

En cuanto al estado de agregación de FtsZ silvestre y las mutantes puntuales, no hay estudios en la literatura que nos permitan comparar los resultados de cromatografía de exclusión molecular de esta tesis, por tanto haremos una comparación de las mutantes entre ellas y con la FtsZ silvestre (tabla 6). En todos los casos se observó un estado predominantemente monomérico a bajas concentraciones de proteína. De acuerdo a la integración de los cromatogramas, se encontró un ligero aumento en las poblaciones de los estados dímero, tetrámero y agregado en las proteínas Y222W y F275W. Debido a que la cromatografía no es una técnica de equilibrio (Beeckmans, 1999), las proporciones de las especies podrían ser algo mayores a lo observado en esta tesis. Debido a ello, podemos concluir que tanto la mutante Y222W como la mutante F275W presentaron un aumento en el estado de agregación respecto de la FtsZ silvestre y la mutante F40W.

Hasta aquí se ha caracterizado la función y la estructura *in silico* e *in vitro* de FtsZ silvestre y las mutantes puntuales. En general, las proteínas FtsZ silvestre, F40W e Y222W poseen propiedades funcionales y estructurales bastante similares, lo que permite concluir que las mutaciones no tuvieron un efecto negativo sustantivo. En

contraste, se observó cierto efecto negativo, particularmente en los valores de  $K_m$ , sinónimo de la afinidad aparente por Mg-GTP en la mutante F275W. como ya explicamos, este efecto tendría su origen en la interrupción de la hélice H10 y su conversión en una hebra  $\beta$  que afectó las interacciones proteína-proteína. A continuación, se discutirá el estudio de las interacciones proteína-proteína en FtsZ silvestre, y su efecto sobre la estabilidad-termodinámica.

### **Los monómeros de FtsZ se auto-ensamblan espontáneamente en dímeros y tetrameros**

Estudios previos sobre la auto-asociación de FtsZ por medio de centrifugación analítica y calorimetría de titulación isotérmica (del *inglés isothermal titration calorimetry*) mostraron que los monómeros se encuentran en equilibrio con oligómeros pequeños (Caplan y Erickson, 2003; Mukherjee y col., 2001; Rivas y col., 2000; Sossong y col., 1999). En esta tesis, con el uso de cromatografía analítica de exclusión molecular, se encontró que la población de FtsZ unida a GDP se compone de monómeros, dímeros y tetrameros, dependiendo de la concentración de proteína, un resultado que coincide con los estudios mencionados. Un cambio en la concentración total de proteína desde 3 a 40  $\mu\text{M}$  incrementó la población de dímeros en 8 veces y la población de tetrameros en 12 veces. Aunque la cromatografía de exclusión molecular no es un técnica de equilibrio termodinámico, para oligómeros estables con velocidades de asociación significativamente más rápidas que los tiempos de corrida de la columna, las constantes de disociación se pueden aproximar con un precisión razonable (Phizicky y Fields, 1995; Stevens, 1989). Por tanto, los resultados presentados sugieren constantes de disociación en el rango micromolar para los dímeros y tetrameros de FtsZ. Además, se observó una disociación casi completa a 3

$\mu\text{M}$  de concentración de proteína, indicando que el estado predominante de FtsZ a concentraciones submicromolares es el monomérico.

Para determinar cuantitativamente las constantes de disociación para los dímeros y tetrámeros, la proteína FtsZ se conjugó con las sondas fluorescentes FITC y DNS. Estas sondas se seleccionaron sobre la base de sus tiempos de vida para seguir con precisión los tiempos de correlación rotacional de los monómeros, dímeros y tetrámeros (ver más abajo). La reacción de marcaje se realizó a una concentración de proteína elevada ( $\sim 150 \mu\text{M}$ ) para asegurar que las especies oligoméricas que forma FtsZ se encuentren presentes en la solución, de tal modo que las superficies de interacción entre los monómeros no se encontrarían afectadas por el marcaje. Sossong y colaboradores, reportaron constantes de disociación para los dímeros y los trímeros de 0,15 y 2,7  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Mukherjee y colaboradores, reportaron una constante de disociación para los tetrámeros de 2,5  $\mu\text{M}$ . En esta tesis, los experimentos de dilución con los conjugados FtsZ-FITC y FtsZ-DNS resultaron en constantes de disociación de los dímeros muy similares entre sí ( $\sim K_{dD} = 9 \mu\text{M}$ ), pero estos valores son 60 y 3 veces más grandes que los datos informados arriba, respectivamente. No obstante, la constante de disociación reportada aquí coincide con el valor informado por Caplan y colaboradores ( $K_D = 8 \mu\text{M}$ ), a pesar de que se usó una técnica experimental diferente. En el caso de la constante de disociación del tetrámero, los experimentos con FtsZ-FITC y FtsZ-DNS arrojaron resultados muy diferentes, pero ambos indican interacciones débiles entre los dímeros (tabla 8). Esta discrepancia entre  $K_{dT}$  no es sorpresiva, debido a que las sondas tienen tiempos de vida diferentes. FITC, una sonda de tiempo de vida corto ( $\sim 4 \text{ ns}$ ), tiende a ser más sensible al equilibrio

monómero-dímero, mientras que DNS, una sonda de tiempo de vida largo (~ 15. ns), tiende a ser más sensible al equilibrio dímero-tetrámero.

Un aspecto de los experimentos de dilución que merece atención es el pequeño cambio en la anisotropía que se observó ante la disociación; 0,011 para FITC y 0,023 para DNS. Esto se puede explicar si consideramos la relación entre el tiempo de vida y el tiempo de correlación ( $\tau/\theta$ ) (Weber, 1952). Esta razón es pequeña si el tiempo de vida de la sonda es corto (FITC) y la razón es grande si el tiempo de vida de la sonda es largo (DNS), por tanto los cambios en la anisotropía ante la disociación se espera que sean menores para FITC que para DNS. El cambio en la anisotropía ante la disociación también está influenciado por los cambios en el movimiento local de la sonda, como lo indicaron las mediciones de fluorescencia resuelta en el tiempo. Las mediciones de polarización dinámica mostraron que, en promedio, FITC y DNS arrojaron 57% y 15% de movimiento local y, por tanto, de contribución a la anisotropía observada. El movimiento local de las sondas adheridas covalentemente se atribuye a la rotación en torno al enlace, que produce un fenómeno denominado "depolarización", que tiende a disminuir la anisotropía observada. Debido a que el movimiento local observado para FITC es menor que lo observado con DNS, se espera que los cambios en la anisotropía sean menores frente ante la disociación de los oligómeros.

El modelo de disociación de tres estados desde los tetrámeros a los monómeros a través de un intermediario dimérico ajustó bien a los datos experimentales. Es más, no fue posible ajustar correctamente a los datos experimentales usando un modelo de disociación de dos estados como el de disociación de tetrámeros a monómeros o el de disociación de dímeros a monómeros (*figura 19*). En la disociación de dímeros a monómeros se espera un rango logarítmico

teórico (es decir desde 10 a 90% disociación) de 2,86 unidades mientras en la disociación de tetrámeros el rango de 1,59 unidades logarítmicas (Jameson y Seifried, 1999). En este estudio se observó un rango logarítmico de 2,66 y 2,33 unidades para los conjugados FITC y DNS, respectivamente, ambos valores entre los rangos de disociación de dímeros y tetrámeros, como se espera para las disociaciones de tres estados. Usando la ecuación de Perrin-Weber, la ecuación A5 del apéndice A (Weber, 1952), para una partícula esférica con la masa molecular de FtsZ (~40 kDa), el tiempo de correlación calculado ( $\theta_0$ ) es 17 ns, y en el caso del tetrámero el tiempo de correlación calculado es 68 ns. Los tiempos de correlación globales observados para los conjugados FtsZ-FITC y FtsZ-DNS son 38,9 ns a 31  $\mu$ M y 147 ns a 45  $\mu$ M, respectivamente, apoyando la idea de que la proteína FtsZ a altas concentraciones de proteína forma estados de oligomerización mayores al monómero. La dilución de FtsZ-FITC desde 31 a 1  $\mu$ M produjo una disminución del tiempo de correlación global desde 38,9 a 19,7 ns, un valor comparable a los monómeros de FtsZ. La comparación del tiempo de correlación del tetrámero de FtsZ con el valor experimental ( $\theta_{\text{DNS}} = 147$  ns) indica que el tetrámero tiene el comportamiento hidrodinámico de un prolato en solución. Esto es válido si se supone que el tiempo de vida de la sonda DNS permite una estimación más precisa del tiempo de correlación global para los oligómeros de alta masa molecular. Se esperaba que el tetrámero tuviera una estructura alargada debido a la interacción longitudinal entre los monómeros y dímeros (ver modelo del tetrámero en la *figura 5*).

## El desplegamiento de tres estados de FtsZ se debe a la presencia del dímero

El desplegamiento de proteínas inducido con agentes caotrópicos se ha usado para entender los cambios estructurales y la estabilidad de proteína monoméricas y oligoméricas. La energía libre del desplegamiento ( $\Delta G_T^0_{H_2O}$ ), la pendiente de la transición del desplegamiento (valores  $m$ ) y la estabilidad de la transición ( $C_{50\%}$ ) son afectados por los cambios en el grado de asociación de proteína oligoméricas (Neet y Timm, 1994; Ragone, 1999). El desplegamiento reversible de FtsZ se ha estudiado con anterioridad, pero siempre se hizo considerando a la proteína como un monómero, independiente de la concentración de proteína usada (Andreu y col., 2002; Díaz-Espinoza y col., 2007; Mukherjee y col., 2005). En este estudio se demostró que FtsZ posee un desplegamiento de tres estados debido al estado oligomérico de la proteína y que este comportamiento influye sobre su estabilidad, particularmente sobre la segunda etapa de desplegamiento. Los datos de dicroísmo circular se ajustaron a un modelo de tres estados donde la primera etapa consiste en el desplegamiento del dímero en estado nativo a un estado intermediario dimérico, seguido de la disociación y desplegamiento simultáneo del intermediario hasta los monómeros en la segunda etapa. Los ajustes globales resultaron en  $\Delta G_T^0_{H_2O} = 14,1 \pm 3,2$  y  $16,1 \pm 3,2$  kcal mol<sup>-1</sup> para urea y GdmCl, respectivamente, y ambos son similares a los valores de los ajustes individuales. Los resultados obtenidos están en acuerdo con los datos de energía libre de desplegamiento reportados para proteínas de tamaños y estados de oligoméricos similares. Por ejemplo, en el caso de proteínas diméricas que siguen una vía de desplegamiento de dos estados ( $N_2 \leftrightarrow 2U$ ), la energía libre varía entre 10 y 27 kcal mol<sup>-1</sup> (Neet y Timm, 1994; Park y Marqusee, 2004; Ragone, 1999).

Los valores valores  $m$  para las reacciones de desplegamiento inducidas con agentes desnaturantes se correlaciona con la diferencia en el área accesible al solvente ( $\Delta ASA$ ) entre los estados nativo y desnaturado (Myers y col., 1995). Se hizo una predicción del  $\Delta ASA$  para la desnaturación del dímero de FtsZ ( $\sim 44783 \text{ \AA}^2$ ) sobre la base del ASA individual de los residuos en estado nativo y desnaturado (Creamer y col., 1997), lo que permitió calcular un valor  $m$  teórico para el desplegamiento de de FtsZ de  $9,1 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$ . Los ajustes globales para los datos de desplegamiento arrojaron  $9,7 \pm 2,1$  y  $8,1 \pm 4,6 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$  para urea y GdmCl, respectivamente, para la desnaturación de los dímeros lo que concuerda con los datos teóricos. Esto significa que, en promedio para los dos agentes desnaturantes, un 60% de los cambios en  $\Delta ASA$  ocurren en la primera etapa de desplegamiento. A su vez, esto sugiere que el intermediario dimérico está altamente hidratado en comparación al dímero nativo, lo que es compatible con una expansión de los monómeros en el dímero a bajas concentraciones de los agentes desnaturantes antes de la disociación de los monómeros semi-desplegados. El modelado de las fracciones de las especies en función de la concentración de agente desnaturante, usando los parámetros informados en la tablas 11 y 12, indican que el comportamiento bifásico del desplegamiento se debe a una alta proporción del intermediario dimérico a bajas concentraciones de los agentes desnaturantes. Se observó una diferencia notable en las curvas de desplegamiento a  $1 \mu\text{M}$  FtsZ, en el caso de urea la transición tuvo un comportamiento aparente de dos estados mientras que con GdmCl tuvo un claro comportamiento de tres estados. Estas diferencias son atribuibles a las propiedades químicas de los agentes donde GdmCl tiene un carácter iónico mientras que urea es no iónico. Es conocido que el agente iónico es capaz de inducir estados intermedios



que podrían influir sobre los cálculos de estabilidad (Pace y Shaw, 2000; Povarova y col., 2010), y en nuestra experiencia, estos estados intermediarios resultan en incrementos de la señal de CD o fluorescencia. Este comportamiento lo hemos observado en estudios de estabilidad con otras proteínas similares como la  $\alpha/\beta$ -tubulina y Btub A/B (comunicación personal de César Díaz). En el caso de urea, el intermediario no es evidente con una inspección visual de la curva, no obstante se observó una disminución de la cooperatividad respecto de una transición de dos estados, es decir, la transición de desplegamiento es menos abrupta.

### **El monómero de FtsZ se despliega siguiendo una transición de dos estados**

La espectroscopía de correlación de fluorescencia entrega información sobre las propiedades hidrodinámicas de las proteínas en solución a partir de las mediciones de los coeficientes de difusión. El FCS se ha usado con anterioridad para la caracterización del desplegamiento inducido con agentes desnaturantes (Chattopadhyay y col., 2005; Sanchez y col., 2004; Sherman y col., 2008). En estos estudios siempre se observó una expansión de la cadena polipeptídica al aumentar la concentración de agente desnaturante. Se ha propuesto que la expansión de la cadena polipeptídica en proteínas globulares se debe al debilitamiento del "core" hidrofóbico por la unión de las moléculas de agente desnaturante al esqueleto peptídico y a las cadenas laterales de los aminoácidos (Bennion y Daggett, 2003). Para estudiar el desplegamiento del monómero de FtsZ, se indujo la disociación con una dilución hasta una concentración de proteína  $\sim 100$  nM. De acuerdo a las constantes de disociación calculadas en este trabajo, se estimó que la proteína sería  $>99\%$  monomérica a la concentración de proteína usada en los experimentos de FCS. Se hizo una predicción

de los valores de coeficiente de difusión y radio hidrodinámico para el monómero de FtsZ usando una rutina computacional y el modelo 3D de la estructura de FtsZ con el software HYDROPRO (García de la Torre y col., 2000), y se obtuvo  $D= 81 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$  y  $R_H = 29 \text{ \AA}$ . Los valores experimentales para coeficiente de difusión y radio hidrodinámico de FtsZ en condiciones nativas son  $D= 60 \pm 1 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$  y  $R_H = 36 \pm 1 \text{ \AA}$ , respectivamente. Estas discrepancias reflejan una asimetría en el monómero que no está representada en la estructura 3D, es decir, en solución, el comportamiento del monómero se desvía de la partícula esférica. En el caso del estado desplegado de FtsZ se calculó un radio hidrodinámico teórico de  $66 \text{ \AA}$  mientras que el valor obtenido experimentalmente fue de  $R_H = 36 \pm 1 \text{ \AA}$ , un valor que es menor a lo esperado indicando que el monómero de FtsZ se puede expandir aún más a concentraciones mayores de  $3 \text{ M}$  urea. La comparación entre los datos de FCS con los datos de desplegamiento de FtsZ  $1 \mu\text{M}$  seguido por CD (*figura 26*), muestra una sobreposición razonable, indicando que en presencia de urea la pérdida de estructura secundaria ocurre en forma simultánea con la expansión del monómero de FtsZ. En ambos casos se observó una transición similar, aparentemente de dos estados, y con una estabilidad similar entre los estados nativo y desplegado. Estos resultados indican que no hubo cambios en el grado de asociación a concentraciones bajo la concentración crítica de polimerización ( $\sim 0,5 \mu\text{M}$ ), confirmando que el comportamiento aparente de dos estados en el desplegamiento se debe al estado predominantemente monomérico de la proteína.

El estudio de las interacciones proteína-proteína para FtsZ silvestre permitió concluir que la especie dimerica tendría un rol en la polimerización y sería responsable de la aparición de una concentración crítica. Estos hallazgos apoyan el mecanismo

cooperativo de polimerización (y actividad GTPásica), donde la especie dimérica jugaría un rol central. Sin embargo, hay otro aspecto del mecanismo de polimerización cooperativo que falta por comprobar experimentalmente, y es la existencia de los cambios conformacionales. En las dos secciones que siguen se discute el estudio sobre los cambios conformacionales que ocurren por el intercambio entre los nucleótidos GDP y GTP, que emulan la formación de polímeros curvos y rectos, respectivamente.

### **Los triptófanos en las posiciones 40, 222 y 275 se encuentran ocultos del solvente.**

La fluorescencia intrínseca del triptófano en las mutantes se usó para caracterizar a los cambios conformacionales de FtsZ. El aminoácido triptófano sirvió como sonda para detectar cambios estructurales debido a que el estado excitado es sensible a los cambios físicoquímicos del ambiente que lo rodea (Eftink y Ghiron, 1975; Eftink y Ghiron, 1987; Lakowicz, 2006). En primera instancia se hizo una caracterización de la fluorescencia intrínseca en estado estacionario. Se observó que los máximos de emisión y los centros de masa de los espectros siguen la misma tendencia en cuanto a que ambos parámetros tienen el mismo orden en la energía de la emisión, desde el azul (más energético) hacia el rojo (menos energético): F275W < F40W < Y222W. Cabe hacer notar que para detectar estas diferencias a partir de los espectros, que pueden estar sujetos a variaciones por temperatura, composición del solvente y artefactos del propio instrumento con que se hizo la medición, en este trabajo, se utilizaron sólo los *espectros de emisión corregidos*. Esto quiere decir que en los espectros mostrados en la *figura 27* se sustrajo la contribución del solvente y de la dependencia de la longitud de onda de la lámpara, los monocromadores y los

detectores sobre la intensidad de fluorescencia. Por tanto, son espectros independientes del instrumento. En los estudios de fluorescencia del triptófano, tanto en solución como en las proteínas, hay una tendencia a interpretar la energía de la emisión, o la posición del máximo, con el grado de exposición al solvente de la sonda. En general, se observan emisiones "azules" para los triptófanos que se encuentran ocultos y emisiones "rojas" para los triptófanos más expuestos. De acuerdo a este correlato, en este trabajo, podemos concluir que el triptófano más expuesto es el 222 y le sigue el 40 y el menos expuesto es el 275. Sin embargo, hay suficientes excepciones a esta regla como para tomar precaución en las conclusiones sobre el grado de exposición y la polaridad donde se encuentra el aminoácido fluorescente, es decir, si está en el interior de la proteína o en la superficie (Jameson y col., 1987). Hay múltiples factores que influyen en la fluorescencia, como los detalles microscópicos del ambiente, la polaridad, la presencia de moléculas de agua y las interacciones del grupo indol del triptófano con los residuos que lo rodean.

Para obtener información más detallada, que esté a favor o en contra de las tendencias observadas se hicieron experimentos de apagamiento, que permiten evaluar en forma cuantitativa el grado de exposición a partir de los gráficos de Stern-Volmer (*figura 28*). La pendiente de las rectas en los gráficos de Stern-Volmer se relacionan con el grado de exposición, mientras mayor es la pendiente, mayor es el grado de apagamiento de la fluorescencia del triptófano. En la *tabla 14* se recopilaron las  $K_{SV}$  obtenidas para las tres mutantes. A partir de los resultados podemos concluir que el ión  $Cs^+$  no tiene un efecto apagador sobre ninguno de los triptófanos mientras que el ión  $I^-$  sólo tuvo un efecto apagador sobre el triptófano en la posición 222. Por tanto, es probable que la tirosina 222 ocupe una región de carga positiva. El análisis

del ambiente que rodea al triptófano 222, en el modelo tridimensional, revela que hay un aminoácido cercano con carga positiva a pH 7, la lisina 319, que podría ser la responsable de la atracción electrostática del ión yoduro en solución que produjo el apagamiento colisional. En la *figura 6*, también se muestra un análisis del área accesible al solvente, *in silico*, y la simulación mostró que el aminoácido más expuesto es el 275 en estado monomérico mientras que en estado tetramérico, o en el filamento, es el triptófano en la posición 222 el más expuesto. Los experimentos de apagamiento con acrilamida mostraron la tendencia  $K_{SV-222} > K_{SV-40} > K_{SV-275}$ . Por tanto los resultados de los experimentos de apagamiento colisional permiten concluir que las proteínas poseen un estado de oligomerización mayor al monomérico pues el más expuesto sería el triptófano en la posición 222 y el menos expuesto sería el triptófano en la posición 275. Entonces los experimentos de apagamiento colisional concuerdan con lo observado con los máximos de emisión, los centros de masa y con la caracterización *in silico*.

Una revisión más detallada de los factores que influyen el comportamiento de la fluorescencia del triptófano en los experimentos de apagamiento, muestra que es necesario considerar el tiempo de vida y que la verdadera exposición de un triptófano se puede calcular a partir de la constante de Stern-Volmer y del tiempo de vida de la fluorescencia para obtener la constante de apagamiento bimolecular,  $k_q$ . Si un triptófano en una proteína tiene un tiempo de vida más largo en comparación a un triptófano con un tiempo de vida más corto, tendría una "ventana de tiempo" más amplia para que el apagador colisional, como la acrilamida que es una molécula neutra y bastante pequeña, difunda y entre en contacto con el triptófano durante el tiempo de vida del estado excitado (Eftink y Ghiron, 1975). Entonces si un triptófano en un

proteína es apagado en mayor medida que otro, bien podría deberse a que posee un tiempo de vida más largo y no a que se encuentra más expuesto. Debido a esto, para comprobar las tendencias observadas con los experimentos de fluorescencia en estado estacionario, se hicieron medidas de fluorescencia resuelta en el tiempo para calcular los tiempos de vida (*tabla 15*). Efectivamente, el tiempo de vida del triptófano 222 es más largo que en los otros dos casos, de ahí que su fluorescencia es apagada en mayor medida por acrilamida. En contraste, los tiempos de vida y las constantes de Stern-Volmer no mostraron concordancia para las mutantes F40W y F275W, probablemente por las condiciones microscópicas del ambiente que rodea a los triptófanos. La constante de apagamiento bimolecular describe la eficiencia de apagamiento colisional. Por ejemplo, la constante de apagamiento bimolecular de acrilamida sobre triptófano libre en solución es  $\sim 6 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , esto indica que prácticamente cada encuentro de la acrilamida con triptófano resulta en apagamiento de la fluorescencia pues el valor de  $k_q$  es muy cercano al límite superior, controlado por la difusión en solución de  $1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (para el apagamiento por oxígeno). Tomando en cuenta estas consideraciones, y los resultados mostrados en la *tabla 15*, podemos concluir que el grado de exposición de los triptófanos introducidos en la FtsZ es: F275W > F40W > Y222W. Estos resultados se oponen a las conclusiones anteriores, donde se observó la tendencia opuesta. Si comparamos estos datos con lo informado en la literatura, podemos concluir que los triptófanos introducidos en la FtsZ se encuentran entre los más inaccesibles al solvente por sus valores de  $k_q$  (Lakowicz, 2006).

## **El intercambio de los nucleótidos GDP y GTP en FtsZ induce un cambio conformacional en la interfase interdominio**

En los estudios experimentales sobre cambios conformacionales en FtsZ se han usado mutantes cuyos efectos en la cinética de polimerización y actividad GTPásica han servido para evaluar posibles cambios estructurales. En el estudio desarrollado por el grupo de José Manuel Andreu (Martín-Galiano y col., 2010), se usó dinámica molecular para predecir regiones flexibles y móviles en la estructura de MjFtsZ (1FSZ.PDB) y se construyeron mutantes puntuales que sirvieron para definir distintas etapas en el ciclo de polimerización. Se describió que los movimientos del dominio C cerrándose hacia la hélice H7 (*pintada de color celeste en la figura 5*) son requeridos para la transición desde los polímeros curvos a rectos y también para la activación de la actividad GTPásica. El grupo de Harold P. Erickson (Chen y Erickson, 2011), siguió la polimerización *in vitro* con la fluorescencia de los triptófanos introducidos por mutación, y determinó que habrían movimientos tipo bisagra en la interfase interdominio que serían responsables de la transición de polímeros curvos a rectos. Estos trabajos sugieren que los movimientos de los dominios son responsables de la curvatura o rectitud de los polímeros. Esta transición está mediada por la actividad GTPásica, es decir, si la FtsZ tiene una molécula de GTP unida en el dominio N entonces polimeriza formando polímeros rectos. En cambio, si tiene unido el nucleótido GDP, la FtsZ polimeriza formando polímeros curvos. Para emular estas dos condiciones, en este trabajo se estudiaron los cambios conformacionales de FtsZ incubando a la proteína con los nucleótidos GDP y GTP y se midieron los tiempos de vida de la fluorescencia de los triptófanos para rastrear los cambios en la estructura.

En primera instancia se comprobó que tanto la FtsZ silvestre como las mutantes F40W, Y222W y F275W se unen a los nucleótidos GDP y GTP en el equilibrio. Para ello se hicieron experimentos de titulación con los análogos fluorescentes MANT-GDP y MANT-GTP mediante anisotropía de fluorescencia en estado estacionario. Esta metodología ya ha sido utilizada para caracterizar la interacción de FtsZ de *Methanococcus jannaschii* con los nucleótidos MANT-GDP y MANT-GTP por el grupo de José Manuel Andreu (Huecas y col., 2007). En este trabajo se usó apoMjFtsZ, es decir, se usó una preparación de proteína a la que se le removió todo el nucleótido unido mediante una técnica de desnaturalización-renaturalización. Esto es posible porque la proteína posee un plegamiento reversible (figura 3). Se encontró que las constantes de disociación de los complejos MjFtsZ-MANT-GXP varían entre 20 y 300  $\mu\text{M}$  dependiendo de las condiciones experimentales.

En esta tesis se usó a FtsZ de *Escherichia coli* con el nucleótido unido de acuerdo a lo que se informa en la tabla 1. Esto significa que en nuestro trabajo se midió el intercambio de los nucleótidos MANT-GDP y MANT-GTP con el nucleótido unido que la proteína trae de la purificación. La unión de estos nucleótidos a las proteínas produce un aumento de la emisión de fluorescencia que no es idéntico para las 4 proteínas que se estudiaron (figura 29). Estas diferencias se atribuyeron a los diferentes ambientes en que se encuentran los nucleótidos en las 4 proteínas. Por ejemplo, el caso más distintivo de los diferentes ambientes es el de la mutante F275W donde se encontró un aumento de la fluorescencia bastante menor en comparación a la FtsZ silvestre, F40W e Y222W. Esto indica que la mutación produjo el mayor efecto estructural en la proteína. Específicamente, se encontró una transición estructural del tipo  $\alpha \rightarrow \beta$  que causó un efecto sobre la afinidad aparente por Mg-GTP de acuerdo a



los experimentos de actividad GTPásica. Esto puede explicar las diferencias observadas en la fluorescencia de los nucleótidos MANT unidos a la proteína. Para determinar cuantitativamente los cambios en las propiedades fluorescentes de los nucleótidos se hicieron mediciones de tiempo vida y se encontró que el tiempo vida mostró cambios muy similares en los 4 casos, independientemente del aumento de la emisión de fluorescencia. Esto se comprobó en los estudios de anisotropía, donde se observó que el rango de cambios en la anisotropía es similar para las 4 proteínas (*figura 30*). Los ajustes globales de los datos experimentales de anisotropía permitieron calcular las constantes de disociación de los complejos nucleótido-proteína. Los valores de las constantes de disociación para ambos nucleótidos ( $K_d = 10 - 64 \mu\text{M}$ ) concuerdan con los datos de la constante de disociación reportados para MjFtsZ (Huecas y col., 2007). A partir de esta información se calculó la fracción de proteína unida a los nucleótidos a una concentración saturante de los mismos (*tabla 16*). En promedio, se determinó que a una concentración de  $500 \mu\text{M}$  de los nucleótidos GDP y GTP, las proteínas alcanzan 93% de saturación. Se observó que la afinidad por GTP es mayor que la afinidad por GDP. Además, se observó que la proteína F275W tuvo una afinidad por GDP algo menor que las otras tres proteínas, lo que podría explicar el hallazgo de un menor contenido de nucleótido como resultado de la purificación.

Con esta información se midieron los tiempos de vida de los triptófanos en las tres mutantes puntuales, en presencia de los nucleótidos GDP y GTP, y los datos experimentales se analizaron mediante ajustes matemáticos para obtener los valores de los tiempos de vida y sus intensidades fraccionarias. Los resultados de estos análisis (*tablas 17-20*) se representaron gráficamente en la *figura 32*. Si los datos de tiempos de vida de los triptófanos en proteínas se analizan con componentes discretos

(barrasen la figura 32) se necesitan tres componentes que generalmente son ~0,5 ns; ~3 ns y ~6 ns. El origen de estos tiempos de vida, necesarios para explicar los datos experimentales, se ha discutido ampliamente en la literatura (Beechem y Brand, 1985; Eftink, 1991; Ross y Jameson, 2008). Aunque no hay un acuerdo sobre cuáles y cuantos tiempos de vida tiene el triptófano en las proteínas, se acepta que serían 2 ó 3 componentes, pero en ningún caso 1 tiempo de vida, y que éstos se originan por la existencia de isómeros conformacionales del grupo indol al rotar en torno al enlace covalente que une  $C_{\alpha}$ - $C_{\beta}$ . Además, las contribuciones de estos componentes dependen del pH, y por lo tanto de los detalles microscópicos del ambiente que rodea al triptófano. Los datos de tiempo de vida también se pueden analizar desde un punto de vista continuo, es decir con distribuciones continuas de tiempos de vida (*líneas continuas en figura 32*). Estos análisis se basan en la suposición de que hay heterogeneidad conformacional de los triptófanos en el estado basal, lo que causaría una heterogeneidad del estado excitado (Alcala y col., 1987; Alcala y col., 1987; Alcala y col., 1987). Con ambos análisis, se observó que el intercambio de los nucleótidos GDP y GTP no tuvo un efecto considerable sobre las distribuciones de tiempo de vida (sean éstas discretas o continuas) en las mutantes F40W y F275W. Por tanto, se concluyó que no hay cambios conformacionales a nivel de los dominios N y C en la proteína FtsZ al forma polímeros curvos ó rectos. En contraste, en la mutante Y222W se observó un cambio significativo en los tiempos de vida de la fluorescencia, por tanto los cambios conformacionales en la molécula de FtsZ ocurren en la interfase interdominio al pasar desde los polímeros rectos a curvos. Este resultado confirma los hallazgos de los dos grupos que han estudiado a los cambios conformacionales de FtsZ.

Para llegar a estas conclusiones, por medio de los ajustes matemáticos de los datos experimentales de tiempo de vida, es necesario un conocimiento profundo de las características del decaimiento de la fluorescencia, junto al manejo del instrumento y del software asociado (ver Materiales y Métodos). No obstante, de acuerdo a la teoría descrita en el apéndice A, las medidas de fluorescencia resuelta en el tiempo en el dominio de la frecuencia o en el dominio del tiempo, se pueden representar gráficamente sin la necesidad de un análisis cuantitativo. Así se pueden representar usando los "Phasor Plots" (Buscaglia y col., 2012; James y col., 2011; Stefl y col., 2011). Los Phasor Plots tienen algunas propiedades que sirven de "atajos conceptuales" para el análisis de la información del decaimiento del estado excitado. Básicamente, si un fluoróforo tiene un decaimiento monoexponencial del estado excitado, es decir un único tiempo de vida (como el NATA en la figura 33), entonces los puntos Phasor se ubicarán sobre el círculo universal. Ahora si el fluoróforo tiene un decaimiento de la fluorescencia multiexponencial, como los triptófanos en las proteínas F40W, Y222W y F275W, entonces los puntos Phasor se ubicarán dentro del círculo universal. Si tomamos el análogo de triptófano NATA, vemos diferentes puntos Phasor sobre el círculo universal, esto se debe a que las lecturas experimentales se hacen a varias frecuencias para mejorar la calidad de los ajustes matemáticos discutidos más arriba. Sin embargo, todos los puntos contienen la misma información sólo que a diferentes frecuencias. El aspecto más importante aquí, es que esta representación ocupa sólo las transformaciones trigonométricas y no ajustes matemáticos complejos, y muestran resultados muy similares a los obtenidos con los ajustes. Aunque los mayores cambios al incubar a FtsZ en presencia de GDP ó GTP se producen en los tiempos de vida del triptófano ubicado en la mutante Y222W, es decir en la interfase entre los dominios N y C, cabe hacer notar que también se observó

un pequeño cambio en el decaimiento de la fluorescencia de F40W, pues los puntos Phasor se desplazaron levemente hacia la derecha al pasar desde GDP a GTP. En cambio en la mutante F275W no se detectó ningún cambio en el decaimiento de la fluorescencia. Esto sugiere que el dominio N también ocurre algún cambio estructural presenta algún cambio estructural durante el ciclo de polimerización, que no es de extrañar dado que en este dominio es donde se produce la hidrólisis del GTP en el sitio de unión del nucleótido vecino a la mutación.

## Conclusiones

En base a los resultados de esta investigación se llegó a las siguientes conclusiones sobre la función de FtsZ

1. Los monómeros de FtsZ, independiente del estado de fosforilación del nucleótido (GDP/GTP) se auto-ensamblan espontáneamente en dímeros y tetrámeros.
2. El desplegamiento de tres estados de FtsZ se debe a la presencia del dímero en solución.
3. El monómero de FtsZ se despliega siguiendo una transición aparente de dos estados.
4. Los triptófanos introducidos en las posiciones 40, 222 y 275 de la secuencia de FtsZ se encuentran ocultos del solvente.
5. El intercambio de los nucleótidos GDP y GTP en el sitio de unión del nucleótido de FtsZ induce un cambio conformacional en la interfase interdominio.

La figura 34 esquematiza las etapas de la polimerización de FtsZ *in vitro*. En solución, FtsZ-GDP presenta un equilibrio de auto-asociación entre los estados monómero, dímero y tetramero. Si hay GTP en la solución, éste se intercambia en el sitio activo de FtsZ y se inicia la polimerización a través de un cambio conformacional en el monómero que permite la formación de un dímero activo que permite la formación de los polímeros rectos. La hidrólisis del nucleótido en los polímeros genera la despolimerización de la proteína. El cambio conformacional de FtsZ se debe a un movimiento tipo bisagra de la interfase interdominio (figura 35). En estado GTP, la proteína tiene a sus dominios más estrechamente asociados que en estado GDP, lo que ocasiona la transición desde los polímeros rectos a curvos, respectivamente.

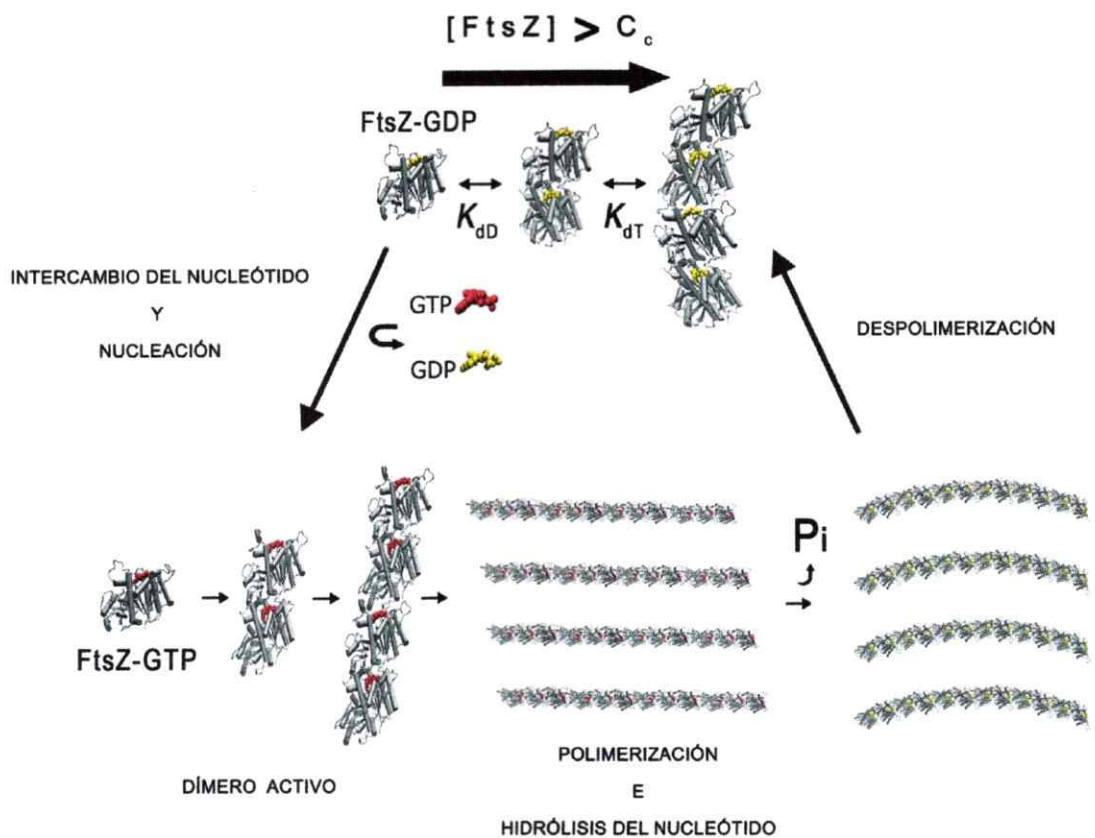


Figura 34 Esquema de las etapas de la polimerización de FtsZ *in vitro*. La proteína FtsZ unida al nucleótido GDP (amarillo) establece un equilibrio de auto-asociación en solución cuando se encuentra sobre la concentración crítica ( $\sim 0,5\mu\text{M}$ ). Si se agrega el nucleótido GTP (rojo) a la solución, éste se intercambia en el sitio activo y se inicia una reacción de polimerización irreversible. La primera etapa consiste en la nucleación de los monómeros para formar un dímero activo que polimeriza en filamentos rectos. La hidrólisis del GTP en el filamento induce la curvatura de los filamentos debido a un cambio conformacional en el monómero de FtsZ que debilita la interacción longitudinal y produce la despolimerización de los filamentos para volver al estado original de auto-asociación en solución.

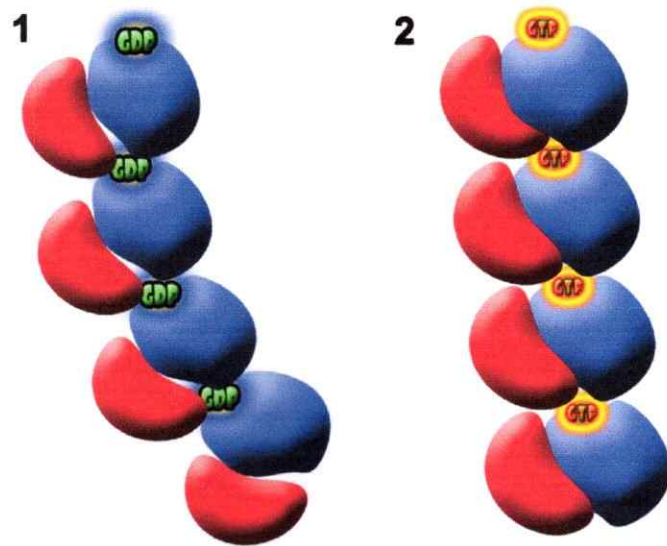


Figura 35 Esquema de las dos conformaciones de FtsZ inducidas por el intercambio de los nucleótidos GDP y GTP. La proteína FtsZ posee dos conformaciones dependiendo de si tiene a los nucleótidos GDP o GTP unidos en el sitio activo, en la conformación GDP hay una separación espacial entre los dominios N (azul) y C (rojo), en cambio en la conformación GTP los dominios N y C se encuentran estrechamente asociados. En el estado GDP la proteína FtsZ polimeriza formando polímeros curvos (1) y en estado GTP polimeriza formando polímeros rectos (2).

## Apéndices

### Apéndice A Espectroscopía de fluorescencia como herramienta para estudiar a las proteínas en solución.

El presente apéndice condensa algunos aspectos teóricos y prácticos de la espectroscopía de fluorescencia que son de interés para la interpretación de los resultados de la tesis. La espectroscopía de fluorescencia es una metodología que proporciona información de útil para las ciencias físicas, químicas, biológicas y médicas. Entre los aspectos a destacar de la espectroscopía de fluorescencia podemos mencionar: (i) la sensibilidad del instrumental que *permite estudiar sistemas biológicos en todo el rango de concentraciones encontradas en los sistemas vivos* ( $10^{-12}$  –  $10^{-3}$  M), (ii) el fenómeno de la fluorescencia ocurre en una escala de tiempo que *sirve como un cronómetro para medir eventos moleculares* en el rango de interés para los procesos biológicos ( $10^{-12}$  –  $10^{-6}$  s) y (iii) la fluorescencia *permite estudiar a las moléculas biológicas en equilibrio químico*, es decir, sin la necesidad de separar los componentes del sistema.

Las aplicaciones bioquímicas de la fluorescencia se pueden dividir en dos grupos dependiendo del tipo de fluoróforo que se utilice. Si el fluoróforo es parte integral de la macromolécula en estudio hablamos de fluorescencia intrínseca. Si el fluoróforo se adhiere en forma artificial a la macromolécula en estudio hablamos de fluorescencia extrínseca. La fluorescencia intrínseca en proteínas se debe principalmente a la presencia de tres aminoácidos aromáticos de baja abundancia relativa. Estos son la fenilalanina, la tirosina y el triptófano que presentan bandas de absorción en el UV lejano (200-300 nm) y emisión en el UV cercano (250-400 nm). La fenilalanina y la tirosina poseen un bajo rendimiento cuántico (número de fotones emitidos dividido por el número de fotones absorbidos) debido a esto el triptófano es el fluoróforo preferido para los estudios de fluorescencia intrínseca. Una característica útil de los triptófanos es que su fluorescencia es sensible al ambiente, lo que permite rastrear cambios en la conformación, disociación, unión de ligandos y desnaturación de las proteínas. En algunos casos, como en la proteína FtsZ de *Escherichia coli*, no se encuentran triptófanos en la secuencia natural. En estos casos lo mejor es usar una fuente de fluorescencia extrínseca, que puede ser covalente (enlace con cadenas laterales de aminoácidos) o no-covalente (unión en bolsillos hidrofóbicos). Los fluoróforos covalentes poseen grupos reactivos que se adhieren a los grupos funcionales de las cadenas laterales de los aminoácidos. Entre los más utilizados para estudiar a las proteínas en soluciones acuosas podemos mencionar el isotiocianato de fluoresceína (*del inglés*, 3',6'-dihydroxy-6-isothiocyanate-3H-spiro[2-benzofuran-1,9'-xanthene]-3-one) y el cloruro de dansilo (*del inglés*, 5-(dimethylamine) naphthalene-1-sulfonyl chloride). La fluoresceína posee propiedades fluorescentes que no son sensibles a los cambios en su ambiente cercano, en cambio, el dansilo sí tiene una fluorescencia sensible al ambiente de manera similar al triptófano. Los fluoróforos no-covalentes, como el DAPI (*del inglés*, 4',6-diamidino-2-phenylindole), se unen a los



bolsillos hidrofóbicos que se encuentran en la superficie accesible al solvente de las proteínas. Las sondas no-covalentes presentan una fluorescencia débil cuando están en soluciones acuosas pero al unirse a las proteínas ocurre un aumento importante de su fluorescencia. El uso de la fluorescencia extrínseca tiene la desventaja que puede alterar la estructura o funcionalidad de la proteína introduciendo mayor complejidad en la interpretación de los resultados. Finalmente, la mutagénesis sitio-dirigida permite introducir triptófanos en sitios específicos de manera de usar fluorescencia intrínseca para proteínas sin triptófanos o una combinación de fluorescencia intrínseca y extrínseca.

### **Aspectos básicos del fenómeno de fluorescencia**

Fluorescencia es la emisión de luz por una molécula que ha absorbido una forma de radiación. La absorción de energía produce la excitación de los electrones desde el estado basal  $S_0$  al estado excitado  $S_1$ . Parte de la energía absorbida se disipa mediante la emisión de un fotón. La energía absorbida restante se disipa en forma radiativa sin la emisión de fotones (*Fig. A1*). El diagrama de Jablonski muestra que (i) *el espectro de emisión está desplazado a menores energías (corrimiento de Stokes)*, (ii) *normalmente el espectro de emisión de fluorescencia es independiente de la longitud de onda de excitación*, y (iii) *el espectro de emisión debería ser una imagen espectral de la banda de absorción de menor energía*. Si bien estas reglas se deducen del análisis del diagrama de Jablonski, existen numerosos casos en donde (ii) y (iii) no se cumplen básicamente por las características de fluoróforo.

El tiempo que transcurre entre la absorción y la emisión del fotón de fluorescencia se denomina el tiempo de vida del estado excitado o tiempo de vida de la fluorescencia. Durante el tiempo de vida del estado excitado se producen interacciones con las moléculas vecinas generando diversos efectos en la emisión de fluorescencia lo que nos entrega información sobre el ambiente del fluoróforo. Por ejemplo, las moléculas del solvente colisionan al fluoróforo excitado apagando su emisión de fluorescencia, asimismo el fluoróforo puede rotar o cambiar la orientación del dipolo excitado lo que produce cambios en la polarización. En relación a la metodología que se emplee para medir la fluorescencia podemos hablar de dos ramas de la espectroscopía: *la fluorescencia en estado estacionario (medición de espectros de emisión y polarización/anisotropía)* y *la fluorescencia resuelta en el tiempo (tiempos de vida y tiempos de correlación)*. La información que se obtiene con ambas metodologías es diferente pero complementaria. Los fundamentos y aspectos teóricos de la fluorescencia en estado estacionario y resuelto en el tiempo se describen a continuación.

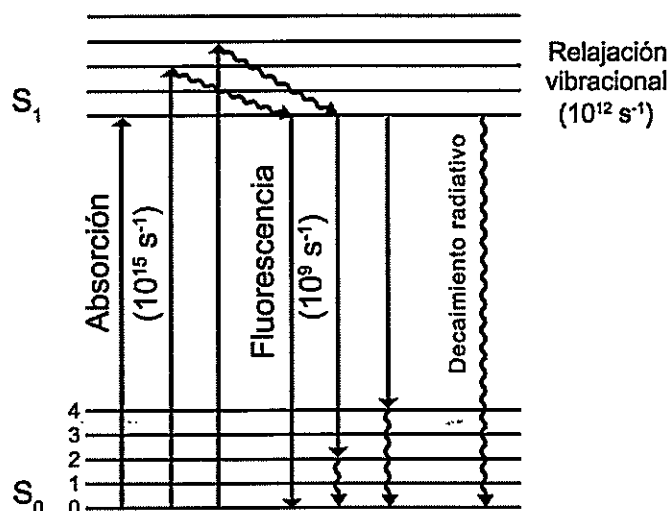


Figura A1. Diagrama de Jablonski mostrando los estados y transiciones electrónicas que originan el fenómeno de fluorescencia y las escalas de tiempo de los eventos. La excitación del fluoróforo ocurre con la absorción de un fotón (*flecha recta*) desde el estado energético basal  $S_0$  hasta cualquier estado energético superior  $S_1$ ,  $S_2$ , etc. El principio de Franck-Condon establece que los electrones en estados vibracionales superiores se relajan rápidamente hasta el estado vibracional de menor energía (*flechas curvas*), por tanto, la emisión de fluorescencia ocurre siempre desde el estado vibracional de menor energía del primer estado excitado  $S_1$ . La relajación de electrones desde el estado excitado  $S_1$  también puede ocurrir sin emisión a través del decaimiento radiativo en forma equivalente a la relajación vibracional.

### Fluorescencia en estado estacionario

Las mediciones de fluorescencia en estado estacionario se hacen con una fuente de iluminación constante y observación simultáneas. Debido a la duración de nanosegundos del estado excitado la fluorescencia alcanza el estado estacionario inmediatamente al incidir el haz de luz sobre la muestra. Los espectros de emisión se obtienen iluminando la muestra y registrando la intensidad de fluorescencia en función de la longitud de onda. En la *figura A2-A* se muestra una simulación del espectro de emisión de fluorescencia intrínseca para una proteína en estado nativo (*línea continua*) y en estado desplegado (*línea discontinua*). En general se observa que para un triptófano que se encuentre en el interior de la estructura de la proteína la emisión es de gran intensidad y se desplaza a menores longitudes de onda (mayor energía) respecto de un triptófano que se encuentre accesible al solvente como cuando la proteína está desplegada. En estos casos, la elevada polaridad del medio acuoso produce una disminución de la fluorescencia y un desplazamiento de los máximos de emisión a mayores longitudes de onda, es decir, a menores energías.

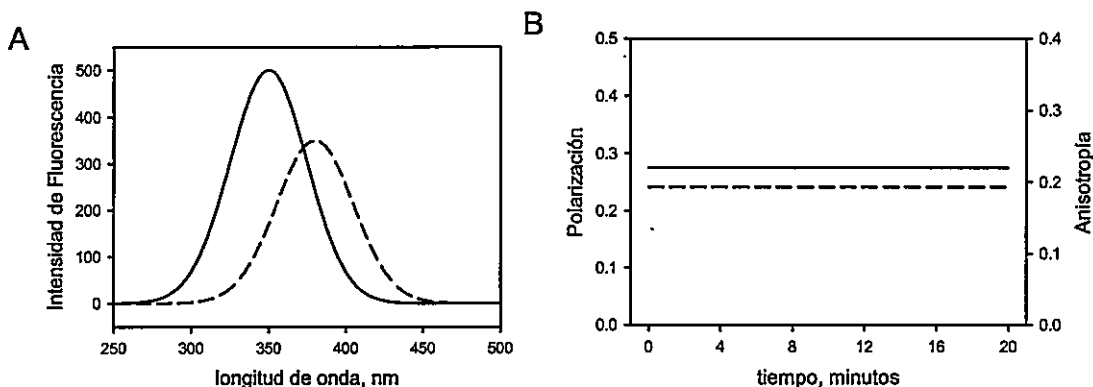


Figura A2. Simulación de mediciones de fluorescencia en estado estacionario. El gráfico A muestra los espectros de emisión de fluorescencia intrínseca de una proteína en estado nativo (línea continua  $\lambda_{max}=350$  nm) y en estado desplegado (línea discontinua  $\lambda_{max}=380$  nm). El gráfico B muestra la polarización (línea continua) y anisotropía (línea discontinua) esperadas para una proteína de 12 kDa usando  $r_0=0.38$ ,  $\tau=4$  ns y  $\rho=10$  ns calculado a partir de la ecuación A5. El tiempo de correlación rotacional se calculó usando la ecuación A6.

La *emisión polarizada de fluorescencia* se debe a la rotación del fluoróforo durante el tiempo de vida del estado excitado. En términos cuantitativos, la polarización de fluorescencia se define como:

$$P = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}} \quad (\text{ec.A1})$$

Donde  $I_{\parallel}$  y  $I_{\perp}$  representan la emisión de fluorescencia polarizada en forma paralela y perpendicular, respectivamente. En forma similar a la polarización, *la anisotropía de fluorescencia* se define como:

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \quad (\text{ec.A2})$$

La polarización y anisotropía de fluorescencia entregan información equivalente, sin embargo, sus valores poseen escalas diferentes. Mientras la polarización puede variar entre  $-0,3$  y  $0,5$  la anisotropía varía entre  $-0,2$  y  $0,4$ . Es posible calcular la anisotropía a partir del valor de polarización usando la siguiente expresión:

$$r = \frac{2P}{3 - P} \quad (\text{ec.A3})$$

La definición de anisotropía presenta una ventaja matemática respecto de la definición de polarización, en cuanto a su valor promedio o el valor en estado estacionario. La anisotropía promedio es:

$$\bar{r} = \sum_i f_i r_i \quad (\text{ec.A4})$$

Donde  $r_i$  es la anisotropía de las especies presentes en la solución y  $f_i$  es la intensidad fraccionaria de cada especie respecto del total. La relación entre la anisotropía de fluorescencia, el tiempo de vida del estado excitado y el tiempo de relajación rotacional del fluoróforo está descrita por la ecuación de Perrin-Weber:

$$r = \frac{r_0}{1 + (3\tau/\rho)} \quad (\text{ec.A5})$$

Donde  $r_0$  es la anisotropía límite del fluoróforo,  $\tau$  es el tiempo de vida de la fluorescencia y  $\rho$  es el tiempo de relajación rotacional del fluoróforo. Para una macromolécula esférica, el tiempo de relajación rotacional está dado por:

$$\rho_0 = \frac{3\eta M(\nu + h)}{RT} \quad (\text{ec.A6})$$

Donde  $\eta$  es la viscosidad de la solución,  $M$  es la masa molar,  $\nu$  es el volumen parcial específico,  $h$  es la hidratación,  $R$  es la constante de los gases ideales y  $T$  es la temperatura absoluta. Usando la ecuación de Perrin, es posible calcular los valores de polarización/anisotropía esperados, por ejemplo, para una proteína en solución (*Figura A2-B*). En general se observa que un cambio en cualquiera de los parámetros de la fluorescencia,  $r_0$ ,  $\tau$  y  $\rho$ , resultará en cambios en la anisotropía promedio observada. El tiempo de vida es sensible al ambiente que rodea al fluoróforo, el tiempo de relajación rotacional cambiará siguiendo los cambios en el tamaño de la especie en rotación y cambios en la anisotropía límite no son esperados a menos que ocurra transferencia de energía resonante.

#### **Apagamiento colisional de la fluorescencia**

El apagamiento de la fluorescencia se refiere a cualquier proceso que disminuye la intensidad de fluorescencia observada en una muestra. Este apartado describe el apagamiento de tipo colisional, es decir, el proceso en que la especie apagadora difunde y entra en contacto con la molécula fluorescente durante el tiempo de vida del estado excitado. Cuantitativamente, el apagamiento de la fluorescencia está descrito por la ecuación de Stern-Volmer:

$$\frac{F}{F_0} = 1 + K_{SV}[Q] = 1 + k_q \tau_0 [Q] \quad (\text{ec. A7})$$

Donde  $F$  y  $F_0$  representan la intensidad de fluorescencia en presencia y ausencia del apagador  $Q$ , respectivamente. Para el apagamiento colisional, la constante de Stern-Volmer se define como  $K_{SV} = k_q \tau_0$ , donde  $k_q$  es la constante de apagamiento bimolecular y  $\tau_0$  es el tiempo de vida de la fluorescencia en ausencia del apagador. Específicamente, la constante de apagamiento bimolecular refleja la eficiencia de apagamiento y, por tanto, la accesibilidad del fluoróforo al apagador.

Los datos de un experimento de apagamiento se representan como gráficos de  $F/F_0$  versus  $[Q]$ . En la figura A3 se muestran los datos simulados de un experimento de apagamiento. La observación de una línea recta en el gráfico de Stern-Volmer es indicativo de la presencia de una única clase de fluoróforos igualmente accesibles al solvente. A partir de la medición independiente del tiempo de vida promedio del fluoróforo en ausencia del apagador,  $\tau_0$ , se puede calcular la constante de apagamiento bimolecular donde  $K_{SV}/\tau_0 = k_q$ .

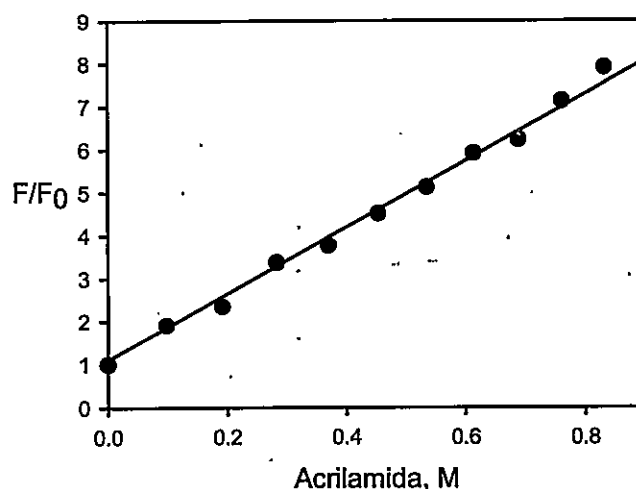


Figura A3. Gráfico de Stern-Volmer para la simulación del apagamiento colisional de un fluoróforo en solución (círculos negros). Los datos experimentales se ajustaron con la ecuación A7 (línea continua) y a partir de la pendiente de la recta se obtuvo la constante de Stern-Volmer ajustada,  $K_{SV} = 7.7 \text{ M}^{-1}$ . El ajuste de los datos se hizo con el software SigmaPlot v.11 (SYSTAT).

## Fluorescencia resuelta en el tiempo

La espectroscopía de fluorescencia resuelta en el tiempo permite estudiar eventos que ocurren durante el tiempo de vida del estado excitado. La escala de tiempo de estos procesos varía entre los picosegundos y los nanosegundos. Entre los procesos biológicos que ocurren en este rango de tiempos podemos mencionar la rotación de las proteínas en la solución, los movimientos de subdominios de proteínas y los movimientos de cadenas laterales de aminoácidos. El tiempo de vida del estado excitado se obtiene a partir de mediciones del decaimiento de la intensidad de fluorescencia en función del tiempo. A su vez, los tiempos de relajación rotacional de la fluorescencia se obtienen midiendo el decaimiento de la polarización o anisotropía en función del tiempo. Los métodos de medición del tiempo de vida se pueden dividir en dos grupos según la instrumentación utilizada: 1) el "método del pulso" (en el dominio del tiempo) y 2) el "método del armónico" (en el dominio de la frecuencia). Los experimentos de fluorescencia resuelta en el tiempo de presentados en esta tesis se hicieron con el método del armónico y por tanto se discutirá en mayor detalle que el método del pulso. Sin embargo, una comparación de ambos métodos se presenta a continuación.

En el "método del pulso" la muestra se ilumina con un pulso de alta intensidad por un corto período de tiempo. El decaimiento de la fluorescencia se obtiene con un fotomultiplicador que posee una resolución temporal adecuada (*figura A4 izquierda*). En el "método del armónico" la muestra se ilumina con una fuente de luz cuya intensidad está modulada sinusoidalmente a frecuencias en el rango de los megahertz. Debido a la persistencia del estado excitado la emisión de fluorescencia también está modulada sinusoidalmente pero con un desfase y una atenuación respecto de la onda de excitación, decimos que la onda está demodulada (*figura A4 derecha*). La medición del desfase y la demodulación de la fluorescencia a una frecuencia particular es la base para la obtención del tiempo de vida en el método del armónico. Los instrumentos actuales utilizan sintonizadores de multifrecuencias que controlan a la lámpara y al fotomultiplicador en forma simultánea permitiendo la medición de los tiempos de vida a diferentes frecuencias en un solo experimento. Para tiempos de vida entre 1 y 100 ns se puede calcular que las frecuencias necesarias para obtener medidas de precisión varía entre 1 y 250 MHz.

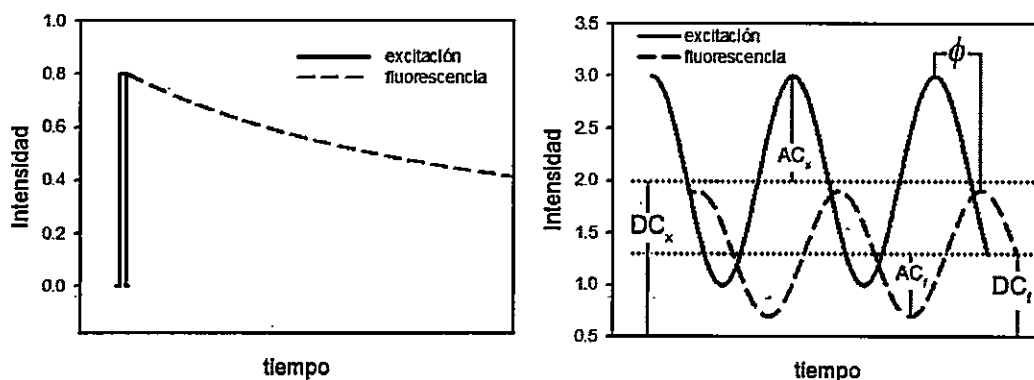


Figura A4. Diagrama del curso temporal de la excitación y la emisión de fluorescencia en las dos metodologías usadas para medir tiempos de vida. A la izquierda se esquematiza el "método del pulso" y a la derecha el "método del armónico". En ambos esquemas el haz de excitación es la línea continua y la fluorescencia es la línea discontinua. En el diagrama de la derecha AC y DC indican los componentes alterno y constante de las ondas de excitación "x" y de la fluorescencia "f", respectivamente,  $\phi$  es el desfase entre la onda de excitación y la fluorescencia.

### Tiempo de vida de la fluorescencia

El esquema presentado en la figura A4 derecha, muestra el curso temporal de la fluorescencia que se puede representar matemáticamente como sigue:

$$F(t) = F_0 [1 + M_f \text{sen}(\omega t + \phi)] \quad (\text{ec. A8})$$

Donde  $F(t)$  y  $F_0$  son las intensidades de fluorescencia al tiempo  $t$  y al tiempo cero, respectivamente,  $\phi$  es el desfase entre las ondas de excitación y emisión, y  $\omega$  es la frecuencia angular de modulación, igual a  $2\pi f$ , donde  $f$  es la frecuencia de modulación.  $M_f$  es la modulación de la fluorescencia, definida como sigue (ver figura A4):

$$M_f = \frac{AC_f}{DC_f} \quad (\text{ec. A9})$$

A su vez, la demodulación de la señal de fluorescencia respecto de la señal de excitación es:

$$M = \frac{M_f}{M_x} \quad (\text{ec. A10})$$

Donde  $M_x$  y  $M_f$  corresponden a la modulación de la onda de excitación y de la fluorescencia, respectivamente. La ecuación A8 permite deducir que la fase y la modulación contienen la información del tiempo de vida en forma independiente. El tiempo de vida de la fluorescencia se puede calcular para cada frecuencia a partir del desfase ( $\tau_f$ ) y de la demodulación ( $\tau_M$ ) de acuerdo a:

$$\begin{aligned} \tan \phi &= \omega \tau_f \\ M &= \cos \phi = \frac{1}{\sqrt{1 + (\omega \tau_M)^2}} \end{aligned} \quad (\text{ec. A11})$$

Entonces, para una única especie que emite fluorescencia en la muestra, los tiempos de vida de la fase y de la modulación son teóricamente idénticos. Sin embargo, en muestras heterogéneas donde hay más de una especie fluorescente los tiempos de vida de la fase y de la modulación son diferentes. Para resolver las amplitudes y valores de tiempos de vida de los componentes es conveniente usar mediciones en varias frecuencias lo que incrementa la precisión de la estimación. Para una frecuencia, definimos la onda de fluorescencia de una mezcla de componentes ( $M_x$ ):

$$\begin{aligned} \phi_{M_x} &= \tan^{-1}(S/G) \\ M_{M_x} &= \sqrt{S^2 + G^2} \end{aligned} \quad (\text{ec. A12})$$

Donde S y G están definidas como sigue:

$$\begin{aligned} S &= \sum_i f_i M_i \sin \phi_i \\ G &= \sum_i f_i M_i \cos \phi_i \end{aligned} \quad (\text{ec. A13})$$

Los valores  $\phi_i$  y  $M_i$  para cada componente se definen de acuerdo a la ecuación A11,  $f_i$  es la intensidad fraccionaria del componente  $i$ -ésimo donde  $\sum f_i = 1$ . La equivalencia matemática entre los métodos de medición de tiempos de vida, el "método del pulso" y el "método del armónico", ambos descritos más arriba, queda establecida por las siguientes relaciones:

$$\begin{aligned} S &= \frac{\int_0^{\infty} I(t) \sin(\omega t) dt}{\int_0^{\infty} I(t) dt} \\ G &= \frac{\int_0^{\infty} I(t) \cos(\omega t) dt}{\int_0^{\infty} I(t) dt} \end{aligned} \quad (\text{ec. A14})$$



Donde  $I(t)$  representa el decaimiento de la señal de fluorescencia después del pulso de excitación según aparece en la *figura A4 izquierda*.

### Tiempos de relajación rotacional de la fluorescencia

En forma análoga a lo descrito para los espectros de emisión de fluorescencia y la polarización/anisotropía de fluorescencia que corresponden a mediciones en estado estacionario (o en equilibrio), en la fluorescencia resuelta en el tiempo se miden ambos aspectos de la fluorescencia en función del tiempo. Para la obtención del parámetro rotacional de la fluorescencia si el método usado es en el dominio del tiempo la técnica se llama "decaimiento de la anisotropía" y si el método es en el dominio de la frecuencia la técnica se llama "polarización dinámica". Nuevamente, existe una equivalencia matemática por tanto la información obtenida por ambos métodos es idéntica. Técnicamente, el decaimiento de la anisotropía se obtiene registrando el decaimiento en función del tiempo de la fluorescencia polarizada vertical y perpendicular usando polarizadores. A su vez, en el método de polarización dinámica se mide el desfase y la demodulación entre los componentes paralelo y perpendicular de la fluorescencia a cada frecuencia de modulación. Los cambios de fase y modulación se deben a la rotación del fluoróforo durante el tiempo de vida del estado excitado, que cambia la orientación del dipolo de emisión.

Para una única especie rotatoria esférica, los parámetros de rotación se relacionan con el desfase y la demodulación de la fluorescencia de acuerdo a:

$$\Delta\phi = \tan^{-1} \left[ \frac{18\omega r_0 R}{(k2 + \omega^2)(1 + r_0 - 2r_0^2) + (6R(6R + 2k + 2r_0))} \right] \quad (\text{ec. A15})$$

$$Y^2 = \frac{[(1 - r_0) + 6R]^2 + (1 - r_0)^2 \omega^2}{[(1 + 2R)k + 6R]^2 + (1 + 2r_0)^2 \omega^2}$$

Donde  $\Delta\phi$  es el desfase entre los componentes paralelo y perpendicular de la fluorescencia,  $Y$  es la razón entre la modulación de los componentes AC paralelo y perpendicular,  $\omega$  es la modulación de frecuencia angular,  $r_0$  es la anisotropía límite (que es la anisotropía observada para el fluoróforo en ausencia de rotación),  $k$  es la constante de decaimiento radiativo ( $1/t$ ), y  $R$  es el coeficiente de difusión rotacional ( $2/\rho$ ). La polarización dinámica permite la obtención de componentes rotacionales de la misma manera con que se obtienen componentes de tiempos de vida en mediciones de decaimiento de la fluorescencia.

### Modelado de datos para los experimentos de fluorescencia resuelta en tiempo

Los datos experimentales de tiempo de vida y polarización dinámica se ajustaron con los modelos presentados en las ecuaciones A11 y A15 usando el software GLOBALS. Resultados experimentales simulados para tiempo de vida y polarización dinámica se muestran en la *figura A5* donde el desfase corresponde a los *círculos llenos* y la modulación a los *círculos vacíos*. Para encontrar a los parámetros que mejor describen a los datos experimentales (*líneas continuas*) el software utiliza

una rutina de minimización de los datos de la fase y la modulación para calcular los tiempos de vida y los tiempos de relajación rotacional. El valor de Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) de los residuales se usó para comparar entre los modelos analizados de acuerdo a:

$$\chi^2 = \frac{[(P_c - P_m)/\sigma_P]^2 + [(M_c - M_m)/\sigma_M]^2}{(2n - f - 1)} \quad (\text{ec. A16})$$

Donde  $P$  y  $M$  se representan el desfase y la demodulación, respectivamente, los subíndices  $c$  y  $m$  se refieren a los valores calculados y medidos, y  $\sigma_P$  y  $\sigma_M$  son las desviaciones estándar de las mediciones de fase y modulación, respectivamente.  $n$  es el número de frecuencias de modulación y  $f$  es el número de parámetros a ajustar.

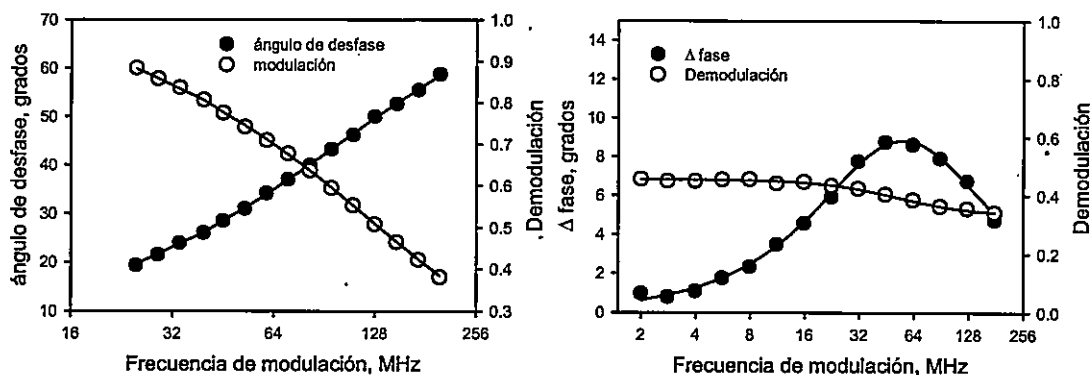


Figura A5. Simulación de mediciones de tiempo de vida y de polarización dinámica con el método del armónico. A la izquierda, en las mediciones de tiempo de vida, se muestra el ángulo de desfase (círculos llenos) y la demodulación (círculos vacíos) de la fluorescencia en función de la frecuencia de modulación. A la derecha, en las mediciones de polarización dinámica se muestra el ángulo de desfase (círculos llenos) y la demodulación (círculos vacíos) entre los componentes paralelo y perpendicular de la fluorescencia. Las líneas continuas que se superponen a los puntos experimentales corresponden a los mejores ajustes de los datos simulados. Los datos se simularon con un error estándar fijo de  $0.2^\circ$  para la fase y  $0.004$  para la demodulación. El ajuste del experimento de tiempo de vida es  $\tau_1 = 4$  ns,  $f_1 = 0.99$ ,  $\chi^2 = 0.92$ . El ajuste de los datos de polarización dinámica para un único rotor es:  $\tau_1 = 10$  ns,  $r_0 = 0.4$ ,  $\chi^2 = 1.01$ . Los ajustes se hicieron con el software GLOBALS (<http://www.lfd.uci.edu/globals/>).

### Representación de los tiempos de vida usando los Phasor plots

La primera descripción de los Phasor plots para representar la información de tiempo de vida de la fluorescencia se usó simplemente para representar los componentes de muestras con comportamientos heterogéneos (Jameson y col., 1984). La figura A6 muestra los conceptos básicos de los Phasor plots, donde el vector tiene

un largo igual a la modulación (M) y hace un ángulo ( $\phi$ ) con el eje de las abscisas. Las coordenadas x e y de este vector derivan de las ecuaciones A12 y A13 y usando la notación:

$$\begin{aligned} x &= G = M \cos \phi \\ y &= S = M \sin \phi \end{aligned} \quad (\text{ec. A17})$$

Para el decaimiento monoexponencial, este vector describe un semicírculo de radio 0,5 y con centro en (0,5; 0) debido a la ecuación A11. Por tanto, un fluoróforo caracterizado por un único tiempo de vida siempre originará un punto Phasor que caerá en este semicírculo, denominado el círculo universal (figura A6 A). Los puntos Phasor de fluoróforos con decaimientos multiexponenciales caerán dentro del círculo universal de acuerdo a lo descrito por la ecuación A17 (figura A6 B). La localización del punto Phasor para sistemas con emisiones heterogéneas multiexponenciales, o con mezclas de fluoróforos con decaimiento monoexponencial, es el promedio ponderado de los componentes individuales de acuerdo a la ecuación A13. Hasta este punto se ha descrito la teoría de los Phasor plots y de la fluorescencia resuelta en el tiempo en el dominio de la frecuencia. No obstante, esta teoría es verdadera también para los datos en el dominio del tiempo, de acuerdo a lo descrito por la ecuación A14.

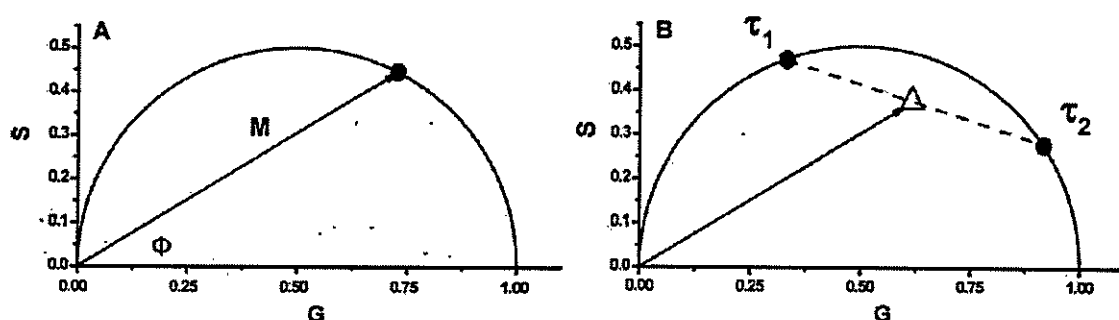


Figura A6. Representación esquemática de los conceptos básicos de los gráficos de "Phasor plots". A Phasor plot mostrando el tiempo de vida de un fluoróforo con decaimiento monoexponencial (*círculo negro*). B Dos fluoróforos diferentes con tiempos de vida  $\tau_1$  y  $\tau_2$  (*círculos negros*), donde  $\tau_1 > \tau_2$ , y una mezcla hipotética de ambos fluoróforos en una proporción de 50:50 (*triángulo*). La *línea discontinua* representa todas las mezclas posibles de ambos fluoróforos. La *línea continua*, el semicírculo, representa el vector con modulación M y con fase  $\phi$ , de acuerdo a la ecuación A11. Nótese que el movimiento del vector a lo largo del semicírculo produce cambios en los valores de la modulación y la fase. Imagen reproducida de (Jameson y col., 1984)

### Espectroscopía de correlación de fluorescencia (FCS)

En un experimento de FCS, *in vitro* o *in vivo*, la muestra se ilumina con una fuente de luz enfocada en un volumen muy pequeño, en el orden de 1 femtolitro (fL). La fluorescencia que se origina por las moléculas del fluoróforo que difunden dentro y fuera del volumen de excitación se registra en función de un tiempo determinado (Figura A7). La intensidad de fluorescencia promedio  $\langle F(t) \rangle$  en el tiempo  $t$  está representada por la línea discontinua mientras que  $\delta F(t)$  representa las fluctuaciones de la fluorescencia en el tiempo  $(t + \tau)$ . En el análisis de autocorrelación se compara la señal en los distintos tiempos para determinar la similitud consigo misma (autosimilitud), todo esto normalizado por la intensidad promedio. Matemáticamente, la curva de autocorrelación se puede representar como sigue:

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \delta F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} \quad (\text{ec. A18})$$

Si se conoce la forma y el tamaño del volumen de excitación, entonces se puede relacionar la curva de autocorrelación  $G(\tau)$  con el coeficiente de difusión traslacional de la molécula en estudio. Para un perfil de iluminación tridimensional de tipo "Gaussian-Lorentzian", la función toma la siguiente forma:

$$G(\tau) = \frac{\gamma}{N} \left( 1 + \frac{\tau}{\tau_D} \right)^{-1} \left( 1 + S^2 \frac{\tau}{\tau_D} \right)^{-\frac{1}{2}} \quad (\text{ec. A19})$$

Donde  $\gamma = 3/(4\pi^2)$  es el factor de proporcionalidad para la excitación por un laser de doble fotón,  $N$  es el número promedio de partículas,  $S = \omega/z$  es la razón entre las dimensiones axial y radial del volumen de observación, respectivamente.  $\tau_D$  es el tiempo de difusión que está relacionado con el coeficiente de difusión,  $D$ , por  $\tau_D = \omega^2/4D$ . La ecuación de Stokes-Einstein relaciona las dimensiones de la molécula con el coeficiente de difusión:

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta r_H} \quad (\text{ec. A20})$$

Donde  $k$  es la constante de Boltzmann,  $T$  es la temperatura absoluta,  $\eta$  es la viscosidad del solvente y  $r_H$  es el radio de Stokes de la particular. Los datos experimentales de FCS se simularon y ajustaron usando el software SimFCS (<http://www.lfd.uci.edu/globals/>)

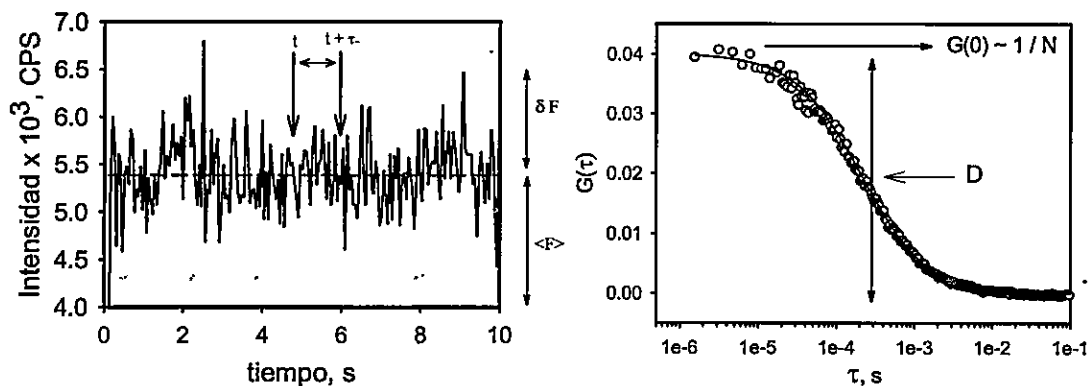


Figura A7. Simulación de un experimento de FCS. En el *panel izquierdo* se muestra el curso temporal de la fluorescencia (*línea continua*) registrado por el instrumento. La difusión de las moléculas fluorescentes dentro y fuera del volumen de excitación produce una fluctuación,  $\delta F$ , de la señal de fluorescencia respecto del promedio,  $\langle F \rangle$  (*línea discontinua*). La comparación de la señal entre el tiempo  $t$  y  $(t + \tau)$  es la bases del análisis de autocorrelación. En el *panel derecho* se muestra el análisis de autocorrelación,  $G(\tau)$ , de los datos experimentales de FCS (*círculos*) y la *línea continua* muestra el ajuste de los datos de autocorrelación. La extrapolación de la curva de autocorrelación hasta cero indica el número de moléculas ( $N$ ) presentes en el volumen de observación y el valor de  $G(\tau)_{50\%}$  es proporcional al coeficiente de difusión  $D$ .

## Apéndice B Teoría del equilibrio de auto-asociación de FtsZ

El equilibrio de asociación-disociación de FtsZ modificada con una sonda fluorescente se estudió midiendo la anisotropía de fluorescencia de los conjugados en función de la concentración total de proteína. La relación entre la anisotropía observada  $\langle r_{obs} \rangle$  y la fracción de las especies individuales en la mezcla de reacción es:

$$\langle r_{obs} \rangle = \frac{\sum f_i r_i}{\sum f_i = 1} \quad (\text{ec. B1})$$

Donde  $r_i$  representa la anisotropía de los distintos estados de asociación del monómero y  $f_i$  a la contribución fraccionaria de cada especie a la intensidad de fluorescencia total detectada por el instrumento. Por definición, la suma de las fracciones de todas las especies presentes en la mezcla es igual a 1. Si suponemos que no hay cambios en el rendimiento cuántico de la sonda fluorescente entre los estados asociado y libre,

entonces las intensidades fraccionales,  $f_i$ , corresponden a las fracciones molares del monómero en los oligómeros de acuerdo a lo siguiente:

$$f_i = \frac{M_i}{M_T} \equiv \alpha_i \quad (\text{ec. B2})$$

$$\sum \alpha_i = 1$$

Donde  $M_i$  es la concentración del oligómero con  $i$  subunidades del monómero y  $M_T$  es la concentración total proteína de la mezcla en unidades del monómero. El término  $\alpha_i$  es la fracción molar del monómero en la especie oligomérica compuesta de  $i$  monómeros.

### Equilibrio de asociación Monómero-Dímero $2M \leftrightarrow D$

El caso de asociación de dos monómeros para formar un dímero, en una reacción de dos estados, está descrito por la constante de equilibrio  $K_{aD}$  de acuerdo a:

$$K_{aD} = \frac{[D]}{[M]^2} \quad (\text{ec. B3})$$

Donde  $[M]$  y  $[D]$  son las concentraciones del monómero y del dímero, respectivamente. La anisotropía de fluorescencia observada,  $r_{obs}$ , a una concentración de proteína dada es:

$$r_{obs} = \alpha_M r_M + \alpha_D r_D \quad (\text{ec. B4})$$

Donde  $r_M$  y  $r_D$  son las anisotropías del monómero y del dímero, respectivamente. Los coeficientes  $\alpha_M$  y  $\alpha_D$  son las fracciones molares del monómero y del dímero en la mezcla. La constante de equilibrio para la asociación de dos monómeros en un dímero,  $K_{aD}$ , está relacionada con las fracciones molares,  $\alpha_M$  y  $\alpha_D$ , y la concentración total de proteína,  $M$ , de acuerdo a lo siguiente:

$$1 = \alpha_M + \alpha_D$$

$$\alpha_M = \frac{1}{1 + 2K_{aD}M} \quad (\text{ec. B5})$$

$$\alpha_D = \frac{2K_{aD}M}{1 + 2K_{aD}M}$$

Los parámetros a ajustar son las anisotropías del monómero y del dímero,  $r_M$  y  $r_D$ , y la constante de equilibrio de asociación del dímero,  $K_{aD}$ .

### Equilibrio de asociación Monómero-Tetrámero $4M \leftrightarrow T$

El caso de asociación de cuatro monómeros para formar un tetrámero en una reacción de dos estados está descrita por la constante de equilibrio  $K_{aT}$  de acuerdo a:

$$K_{aT} = \frac{[T]}{[M]^4} \quad (\text{ec. B6})$$

Donde  $[M]$  y  $[T]$  son las concentraciones del monómero y del tetrámero, respectivamente. La anisotropía observada,  $r_{obs}$ , a una concentración de proteína dada es:

$$r_{obs} = \alpha_M r_M + \alpha_T r_T \quad (\text{ec. B7})$$

Donde  $r_M$  y  $r_T$  son las anisotropías del monómero y del tetrámero, respectivamente. Los coeficientes  $\alpha_M$  y  $\alpha_T$  son las fracciones molares del monómero y del tetrámero en la mezcla. La constante de equilibrio para la asociación de cuatro monómeros en un tetrámero está relacionada con las fracciones molares,  $\alpha_i$ , y con la concentración de proteína,  $M$ , de acuerdo a lo siguiente:

$$\begin{aligned} 1 &= \alpha_M + \alpha_T \\ \alpha_M &= \frac{1}{1 + 4K_{aT}M^3} \\ \alpha_T &= \frac{4K_{aT}M^3}{1 + 4K_{aT}M^3} \end{aligned} \quad (\text{ec. B8})$$

Los parámetros a ajustar son las anisotropías del monómero y del tetrámero,  $r_M$  and  $r_T$ , y la constante de equilibrio,  $K_{aT}$ , respectivamente.

### Equilibrio de asociación Monómero-Dímero-Tetrámero $2M \leftrightarrow D + 2D \leftrightarrow T$

El caso más general de auto-asociación, donde dos monómeros se asocian en un dímero y luego dos dímeros en un tetrámero, en una reacción de dos etapas, donde no hay asociación de monómeros en tetrámeros ni disociación de tetrámeros en monómeros, puede describirse con dos constantes de equilibrio de asociación,  $K_{aD}$  y  $K_{aT}$ , de acuerdo a lo siguiente:

$$K_{aD} = \frac{[D]}{[M]^2}, K_{aT} = \frac{[T]}{[D]^2} \quad (\text{ec. B9})$$

Donde  $[M]$ ,  $[D]$  y  $[T]$  son las concentraciones del monómero, del dímero y del tetrámero, respectivamente. La anisotropía de fluorescencia,  $r_{obs}$ , a una concentración de proteína dada es:

$$r_{obs} = \alpha_M r_M + \alpha_D r_D + \alpha_T r_T \quad (\text{ec. B10})$$

Donde  $r_M$ ,  $r_D$  y  $r_T$  son las anisotropías del monómero, del dímero y del tetrámero. Los coeficientes  $\alpha_M$ ,  $\alpha_D$  and  $\alpha_T$  son las fracciones molares del monómero, del dímero y del tetrámero en la solución. Las constantes de equilibrio para la asociación de dos monómeros en un dímero y luego en un tetrámero, se relacionan con las fracciones molares,  $\alpha_i$ , y con la concentración total de proteína,  $M$ , de acuerdo a lo siguiente:

$$1 = \alpha_M + \alpha_D + \alpha_T$$

$$\alpha_M = \frac{1}{1 + 2MK_{ad} + 4M^3K_{ad}^2K_{aT}}$$

$$\alpha_D = \frac{2MK_{ad}}{1 + 2MK_{ad} + 4M^3K_{ad}^2K_{aT}} \quad (\text{ec. B11})$$

$$\alpha_T = \frac{4M^3K_{ad}^2K_{aT}}{1 + 2MK_{ad} + 4M^3K_{ad}^2K_{aT}}$$

Los parámetros a ajustar son las anisotropías del monómero, del dímero y del tetrámero,  $r_M$ ,  $r_D$  and  $r_T$ , y las constantes de equilibrio de asociación,  $K_{ad}$  and  $K_{aT}$ , respectivamente.

### Modelado de datos para los experimentos de disociación

Los datos experimentales de anisotropía se ajustaron a los modelos de equilibrio de auto-asociación usando la ecuación B1. Esto conlleva la suposición de que la contribución fraccional de cada especie,  $f_i$ , a la intensidad de fluorescencia total corresponde a la fracción molar,  $\alpha_i$ , de cada especie presente en la solución. En la figura B1 se muestra un ejemplo de la disociación por dilución (ver materiales y métodos) de una proteína dimérica marcada con una sonda fluorescente (*círculos cerrados*). Para encontrar a los parámetros que mejor describen a los datos experimentales se usó una rutina de regresión no-lineal con el software SigmaPlot v.11 (SYSTAT), usando como modelo de equilibrio la asociación de dos monómeros en un dímero ( $2M - D$ ). El resultado de la rutina de regresión corresponde a la *línea continua* que pasa sobre los puntos experimentales en la figura B1. Para medir la calidad del ajuste se usaron las herramientas del software. El mejor ajuste se calificó de acuerdo a los valores del coeficiente de determinación  $R^2$  y el error estándar de los parámetros ajustados. El valor de Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) de los residuales se usó para comparar entre los modelos analizados.



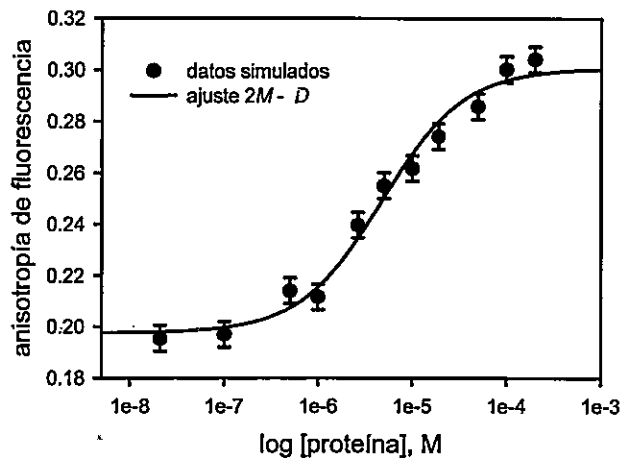


Figura B1. Simulación de la disociación de una proteína modificada con una sonda fluorescente desde el estado dimérico hasta el estado monomérico seguido por la anisotropía de los conjugados (*círculos cerrados*). Las barras de error muestran una desviación estándar simulada de 0,005. Los datos experimentales se ajustaron con las ecuaciones A4 y A5 (*línea continua*) y se obtuvieron las anisotropías del monómero y del dímero,  $r_M$  y  $r_D$  y la constante de equilibrio de asociación  $K_{aD}$ . Los parámetros obtenidos con el ajuste:  $r_M = 0,198 \pm 0,004$ ;  $r_D = 0,301 \pm 0,004$  y  $K_{aD} = 1.1 \pm 0.2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ .

El ajuste de los datos experimentales presentado en la figura A1 arrojó  $R^2 = 0,983$  y  $\chi^2 = 0,7$ . Con el fin de comparar los diferentes modelos propuestos, se simularon las curvas de asociación correspondientes en la Figura B2. Los datos de anisotropía se normalizaron usando la definición de la fracción molar del monómero,  $\alpha_M$ :

$$\alpha_M = 1 - \left( \frac{r_i - r_M}{r_A - r_M} \right) \quad (\text{ec. B12})$$

Donde  $r_i$  es la anisotropía observada a una concentración de proteína dada y  $r_M$  y  $r_A$  son las anisotropías del monómero y de la especie oligomérica correspondiente al modelo de asociación escogido, respectivamente.

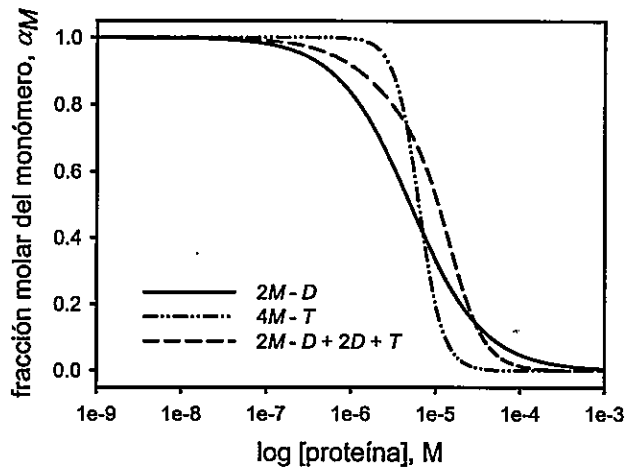


Figura B2. Simulación de las fracciones molares de monómero,  $\alpha_M$ , en función de la concentración de proteína para los tres modelos de asociación propuestos. Para el modelo  $2M-D$  se usó  $K_{aD} = 1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ; para el modelo  $4M-T$  se usó  $K_{aT} = 1 \times 10^{15} \text{ M}^{-3}$  y para el modelo  $2M-D + 2D + T$  se usaron  $K_{aD} = 1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  y  $K_{aT} = 1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ , respectivamente.

Para analizar la información que entrega la constante de equilibrio de asociación,  $K_a$ , se usó el valor recíproco o la constante de disociación,  $K_d$ , debido a que posee una mayor simpleza conceptual:

$$K_d = \frac{1}{K_a} \text{ M} \quad (\text{ec. B13})$$

Donde  $K_d$  es simplemente la concentración molar de proteína que produce un 50% de disociación o asociación. A partir de la constante de disociación, se calculó la energía libre de disociación,  $\Delta G_d^0$ :

$$\Delta G_d^0 = -RT \ln K_d \quad (\text{ec. B14})$$

Donde  $R$  es la constante de los gases ideales y  $T$  es la temperatura absoluta.

## Apéndice C Teoría del desplegamiento en el equilibrio de FtsZ

El desplegamiento de FtsZ se caracterizó con espectroscopía de dicroísmo circular (estructura secundaria) y con espectroscopía de fluorescencia (estructura terciaria). Si el estado de desplegamiento de la proteína se registra mediante la señal espectroscópica  $s$  en función de la concentración de agente desnaturante, entonces el valor promedio de la señal está dado por:

$$\langle s \rangle = \frac{\sum f_i s_i}{\sum f_i = 1} \quad (\text{ec. C1})$$

Donde  $f_i$  y  $s_i$  son la fracción molar y la señal espectroscópica del estado  $i$ , respectivamente. Por definición la suma de las fracciones es igual a 1. El método de extrapolación lineal supone que la *energía libre de desplegamiento de la proteína varía linealmente con la concentración de agente desnaturante* de acuerdo a:

$$\Delta G_{desp}^0 = \Delta G_{desp-H_2O}^0 - m[D] = -RT \ln K_U \quad (\text{ec. C2})$$

Donde  $\Delta G_{desp}^0$  es la energía libre para la transición de nativo a desplegado y  $\Delta G_{desp-H_2O}^0$  es la energía libre de desplegamiento en ausencia del agente desnaturante. El valor  $m$  es la medida experimental de la dependencia de la energía libre con la concentración de desnaturante (en ocasiones llamado el coeficiente de cooperatividad),  $K_U$  es la constante de equilibrio de desplegamiento,  $R$  es la constante de los gases ideales y  $T$  es la temperatura absoluta.

### Modelo de desplegamiento de dos estados para un monómero $N \leftrightarrow U$

El caso de desplegamiento de una proteína en estado monomérico a través de una reacción de dos estados, está definido por la constante de equilibrio  $K_{NU}$  de acuerdo a:

$$K_{NU} = \frac{[U]}{[N]} \quad (\text{ec. C3})$$

Donde  $[U]$  y  $[N]$  son las concentraciones de monómero en estado desplegado y nativo, respectivamente. La señal espectroscópica observada,  $s_o$ , a cualquier concentración de agente desnaturante está dada por:

$$s_o = f_N s_N + f_U s_U \quad (\text{ec. C4})$$

donde  $s_N$  y  $s_U$  son la señal espectroscópica de los estados nativo y desplegado, respectivamente.  $f_N$  y  $f_U$  son las fracciones molares en el equilibrio de la proteína en el estado nativo y desplegado, respectivamente. La constante de equilibrio de desplegamiento está relacionada con las fracciones molares de la proteína en los estados nativo y desplegado de acuerdo a:

$$1 = f_N + f_U$$

$$f_N = \frac{1}{1 + K_{NU}} \quad (\text{ec. C5})$$

$$f_U = \frac{K_U}{1 + K_{NU}}$$

Los parámetros a ajustar son la energía libre de desplegamiento en ausencia de agente desnaturante,  $\Delta G^0_{H2O-NU}$  y el valor  $m$ .

### Modelo de desplegamiento de dos estados para un dímero $N_2 \leftrightarrow 2U$

El desplegamiento y disociación simultánea de una proteína dimérica, a través de una reacción de dos estados, está descrito por la constante de equilibrio  $K_{N_2U}$  entre los estados nativo y desplegado de acuerdo a:

$$K_{N_2U} = \frac{[U]^2}{[N_2]} \quad (\text{ec. C6})$$

Donde  $[U]$  y  $[N_2]$  son las concentraciones molares de monómero en estado desplegado y de dímero en estado nativo, respectivamente. A todas las concentraciones de agente desnaturante, la señal espectroscópica observada está dada por:

$$s_o = f_{N_2} s_{N_2} + f_U s_U \quad (\text{ec. C7})$$

Donde  $s_{N_2}$  y  $s_U$  son las señales experimentales de dímero en estado nativo y de monómero en estado desplegado, respectivamente. En equilibrio termodinámico, las fracciones molares de los estados nativo y desplegado,  $f_{N_2}$  y  $f_U$ , respectivamente, están relacionadas con la concentración de proteína,  $P$ , y la constante de equilibrio,  $K_{N_2U}$ , de acuerdo a:

$$1 = f_N + f_U$$

$$f_N = \frac{(4P + K_{N_2U}) - (K_{N_2U}^2 + 8PK_{N_2U})^{1/2}}{4P} \quad (\text{ec. C8})$$

$$f_U = \frac{(K_{N_2U}^2 + 8PK_{N_2U})^{1/2} - K_{N_2U}}{4P}$$

Los parámetros a ajustar son la energía libre en ausencia de agente desnaturante,  $\Delta G^0_{H2O-N_2U}$  y el valor  $m_{N_2U}$  para una concentración de proteína determinada.

### Modelo de desplegamiento de tres estados para un monómero $N \leftrightarrow I \leftrightarrow U$

La presencia de un intermediario detectable en el desplegamiento de una proteína monomérica requiere un modelo de tres estados, es decir, que considere el estado intermediario entre los estados nativo y desplegado. Las constantes de equilibrio que describen el desplegamiento desde el estado nativo al estado intermediario,  $K_{NI}$ , y desde el estado intermediario al estado desplegado,  $K_{IU}$ , son:

$$K_{NI} = \frac{[I]}{[N]}, K_{IU} = \frac{[U]}{[I]} \quad (\text{ec. C9})$$

Donde  $[N]$ ,  $[I]$  y  $[U]$  son las concentraciones molares de monómero en los estados nativo, intermediario y desplegado, respectivamente. La señal espectroscópica observada,  $s_o$ , a cualquier concentración de agente desnaturante está dada por:

$$s_o = f_N s_N + f_I s_I + f_U s_U \quad (\text{ec. C10})$$

Donde  $s_N$ ,  $s_I$  y  $s_U$  son las señales experimentales de los estados nativo, intermediario y desplegado, respectivamente.  $f_N$ ,  $f_I$  y  $f_U$  son las fracciones molares en el equilibrio de la proteína en los estados nativo, intermediario y desplegado, respectivamente. Las constantes de equilibrio para el desplegamiento de tres estados de una proteína monomérica están relacionadas con las fracciones molares del monómero de acuerdo a:

$$\begin{aligned} 1 &= f_N + f_I + f_U \\ f_N &= \frac{1}{1 + K_{NI} + K_{NI}K_{IU}} \\ f_I &= \frac{K_{NI}}{1 + K_{NI} + K_{NI}K_{IU}} \\ f_U &= \frac{K_{NI}K_{IU}}{1 + K_{NI} + K_{NI}K_{IU}} \end{aligned} \quad (\text{ec. C11})$$

Los parámetros a ajustar son las energías libres de desplegamiento en ausencia de agente desnaturante de nativo a intermediario,  $\Delta G^0_{H2O-NI}$ , y de intermediario a desplegado,  $\Delta G^0_{H2O-IU}$ , y los valores  $m_{NI}$  y  $m_{IU}$  respectivos.

### Modelo de desplegamiento de tres estados para un dímero con un intermediario dimérico $N_2 \leftrightarrow I_2 \leftrightarrow 2U$

La presencia de un intermediario dimérico en el desplegamiento de un dímero está representado por el modelo de tres estados con intermediario dimérico. Las constantes de equilibrio que describen el desplegamiento desde el estado nativo

dimérico al estado parcialmente desplegado dimérico,  $K_{N_2I_2}$ , seguido del desplegamiento completo del intermediario dimérico al estado monomérico desplegado,  $K_{I_2U}$ , son:

$$K_{N_2I_2} = \frac{[I_2]}{[N_2]}, \quad K_{I_2U} = \frac{[U]^2}{[I_2]} \quad (\text{ec. C12})$$

Donde  $[N_2]$ ,  $[I_2]$  and  $[U]$  son las concentraciones molares de la proteína en los estados nativo dimérico, intermediario dimérico y desplegado monomérico, respectivamente. La señal espectroscópica observada,  $s_o$ , a cualquier concentración de agente desnaturante está dada por:

$$s_o = f_{N_2}s_{N_2} + f_{I_2}s_{I_2} + f_U s_U \quad (\text{ec. C13})$$

Donde  $s_{N_2}$ ,  $s_{I_2}$  y  $s_U$  son las señales experimentales de los estados nativo dimérico, intermediario dimérico y desplegado monomérico, respectivamente.  $f_{N_2}$ ,  $f_{I_2}$  and  $f_U$  son las fracciones molares en el equilibrio de la proteína en los estados nativo dimérico, intermediario dimérico y desplegado monomérico, respectivamente. Las constantes de equilibrio para el desplegamiento de una proteína dimérica a través de un intermediario parcialmente desplegado están relacionadas con las fracciones molares de la proteína y con la concentración total,  $P$ , de acuerdo a:

$$1 = f_{N_2} + f_{I_2} + f_U$$

$$[U] = \frac{-K_{N_2I_2}K_{I_2U} + \sqrt{(K_{N_2I_2}K_{I_2U})^2 + 8P(K_{N_2I_2}K_{I_2U})(1 + K_{N_2I_2})}}{4(1 + K_{N_2I_2})}$$

$$f_{N_2} = \frac{[U]}{[U] + [U]K_{N_2I_2} + K_{N_2I_2}K_{I_2U}} \quad (\text{ec. C14})$$

$$f_{I_2} = \frac{[U]K_{N_2I_2}}{[U] + [U]K_{N_2I_2} + K_{N_2I_2}K_{I_2U}}$$

$$f_U = \frac{K_{N_2I_2}K_{I_2U}}{[U] + [U]K_{N_2I_2} + K_{N_2I_2}K_{I_2U}}$$

Los parámetros a ajustar son las energías libres en ausencia de agente desnaturante para el desplegamiento de nativo dimérico a intermediario dimérico,  $\Delta G^0_{H_2O, N_2I_2}$ , de intermediario dimérico a desplegado monomérico,  $\Delta G^0_{H_2O, I_2U}$  y los valores  $m_{N_2I_2}$  y  $m_{I_2U}$  respectivos.

### Modelo de desplegamiento de tres estados para un dímero con un intermediario monomérico $N_2 \leftrightarrow 2I \leftrightarrow 2U$

La presencia de un monómero parcialmente desplegado en el desplegamiento de un dímero nativo está representado por el modelo de tres estados con intermediario monomérico. Las constantes de equilibrio que describen el desplegamiento desde el estado nativo dimérico al estado parcialmente desplegado monomérico,  $K_{N_2I}$ , seguido del desplegamiento completo desde el estado intermediario al estado desplegado,  $K_{IU}$ , son:

$$K_{N_2I} = \frac{[I]^2}{[N_2]}, \quad K_{IU} = \frac{[U]^2}{[I]^2} \quad (\text{ec. C15})$$

Donde  $[N_2]$ ,  $[I]$  and  $[U]$  son las concentraciones de la proteína en los estados nativo dimérico, parcialmente desplegado monomérico y desplegado monomérico, respectivamente. La señal espectroscópica observada,  $s_o$ , a cualquier concentración de agente desnaturante está dada por:

$$s_o = f_{N_2}s_{N_2} + f_I s_I + f_U s_U \quad (\text{ec. C16})$$

Donde  $s_{N_2}$ ,  $s_I$  and  $s_U$  son las señales experimentales de los estados nativo dimérico, intermediario monomérico y desplegado monomérico, respectivamente.  $f_{N_2}$ ,  $f_I$  y  $f_U$  son las fracciones molares en el equilibrio de la proteína en los estados nativo dimérico, intermediario monomérico y desplegado monomérico, respectivamente. Las constantes de equilibrio para el desplegamiento de tres estados de un dímero con un intermediario monomérico están relacionadas con las fracciones molares y la concentración total de proteína,  $P$ , de acuerdo a:

$$1 = f_{N_2} + f_I + f_U$$

$$[I] = \frac{-(K_{N_2I} + K_{N_2I}\sqrt{K_{IU}}) + \sqrt{(K_{N_2I} + K_{N_2I}\sqrt{K_{IU}})^2 + 8PK_{N_2I}}}{4} \quad (\text{ec. C17})$$

$$f_{N_2} = \frac{[I]}{[I] + K_{N_2I} + K_{N_2I}\sqrt{K_{IU}}}$$

$$f_I = \frac{K_{N_2I}}{[I] + K_{N_2I} + K_{N_2I}\sqrt{K_{IU}}}$$

$$f_U = \frac{K_{N_2I}\sqrt{K_{IU}}}{[I] + K_{N_2I} + K_{N_2I}\sqrt{K_{IU}}}$$

Los parámetros a ajustar son las energías libres en ausencia de agente desnaturante para el desplegamiento de nativo dimérico a intermediario monomérico,  $\Delta G^0_{H_2O-N_2I}$ , y de intermediario monomérico a desplegado monomérico,  $\Delta G^0_{H_2O-IU}$ , y los correspondientes valores  $m_{N_2I}$  y  $m_{IU}$ .

### Modelado de datos para los experimentos de desplegamiento

Los datos experimentales de desplegamiento se ajustaron a los modelos propuestos usando la ecuación C1. Para ello se supuso que la señal observada  $s_i$  corresponde a la contribución fraccional de las especies en estado nativo, en estado intermediario (si corresponde) y en estado desplegado. La figura C1 muestra un ejemplo del desplegamiento (ver Materiales y Métodos) de una proteína monomérica inducido por agente desnaturalante en condiciones de equilibrio (*círculos cerrados*). Para encontrar a los parámetros que mejor describen a los datos simulados se usó una rutina de regresión no-lineal con el software SigmaPlot v.11 (SYSTAT), usando los modelos de dos y tres estados, respectivamente. El resultado de la rutina de regresión corresponde a la *línea continua* que pasa sobre los puntos experimentales en la figura C1. Para medir la calidad del ajuste se usaron las herramientas estadísticas del software. El mejor ajuste se calificó de acuerdo a los valores del coeficiente de determinación  $R^2$  y el error estándar de los parámetros ajustados. El valor de Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) de los residuales se usó para comparar entre los modelos analizados.

El desplegamiento de proteínas oligoméricas presenta una dependencia con la concentración de proteína y este efecto se manifiesta con cambios en la estabilidad y en la trayectoria de la reacción de desplegamiento. La relación entre la concentración de proteína y el desplegamiento de dos y tres estados se simuló en la figura C2. Los datos de desplegamiento se normalizaron usando la definición de la fracción desplegada  $f_U$  de acuerdo a:

$$f_U = \frac{s_i - s_U}{s_N - s_U} \quad (\text{ec. C18})$$

Donde  $s_i$  es la señal espectroscópica observada a una concentración de agente desnaturalante y  $s_N$  y  $s_U$  son las señales observadas del estado nativo y desplegado, respectivamente. Para cuantificar los cambios observados en estabilidad se calculó el parámetro  $[D]_{50\%}$  que es la concentración de agente desnaturalante que produce un 50% de desplegamiento, en unidades de concentración molar. Para proteínas monoméricas el desplegamiento es independiente de la concentración y la estabilidad es:

$$[D]_{50\%} = \frac{\Delta G^0_{H2O}}{m} \quad (\text{ec. C19})$$

Para proteínas oligoméricas el desplegamiento depende de la concentración de proteína y la estabilidad es:

$$[D]_{50\%} = \frac{RT \ln P + \Delta G^0_{H2O}}{m} \quad (\text{ec. C20})$$



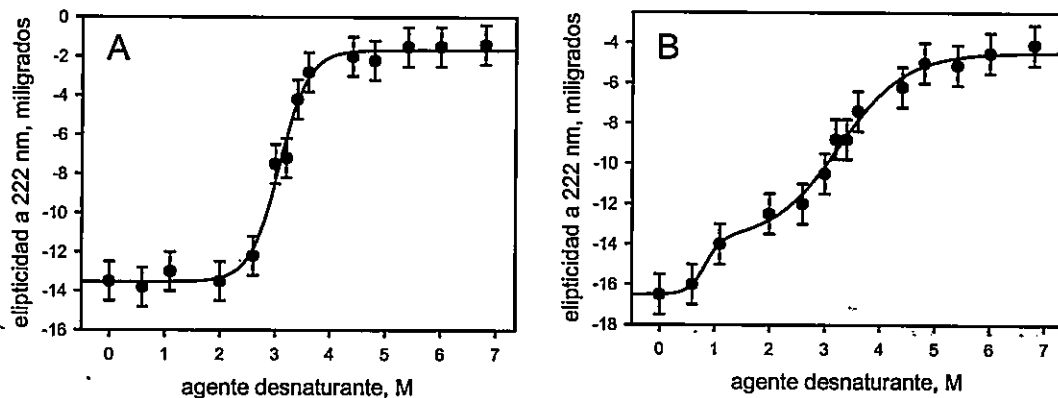


Figura C1. Simulación del desplegamiento de una proteína monomérica inducido por el agente desnaturalante. El desplegamiento se simuló con el dicroísmo circular a 222 nm (*círculos cerrados*). Los paneles A y B muestran el desplegamiento a través de una reacción de dos estados ( $N-U$ ) y de tres estados ( $N-I-U$ ), respectivamente. Las barras de error muestran una desviación estándar simulada de 1 miligrado. Los datos experimentales se ajustaron (*línea continua*) con las ecuaciones C4 y C5 para el modelo de dos estados y con las ecuaciones C10 y C11 para el modelo de tres estados, respectivamente. Los parámetros ajustados con el modelo de dos estados son:  $\Delta G^0_{H_2O-UN} = 6,7 \pm 0,2 \text{ kcal mol}^{-1}$  y  $m_{NU} = 2,2 \pm 0,1 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$ . Los parámetros ajustados con el modelo de tres estados son:  $\Delta G^0_{H_2O-NI} = 3,2 \pm 2 \text{ kcal mol}^{-1}$  y  $m_{NI} = 3,8 \pm 3 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$  y  $\Delta G^0_{H_2O-IU} = 3,1 \pm 0,2 \text{ kcal mol}^{-1}$  y  $m_{IU} = 0,9 \pm 0,2 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$ .

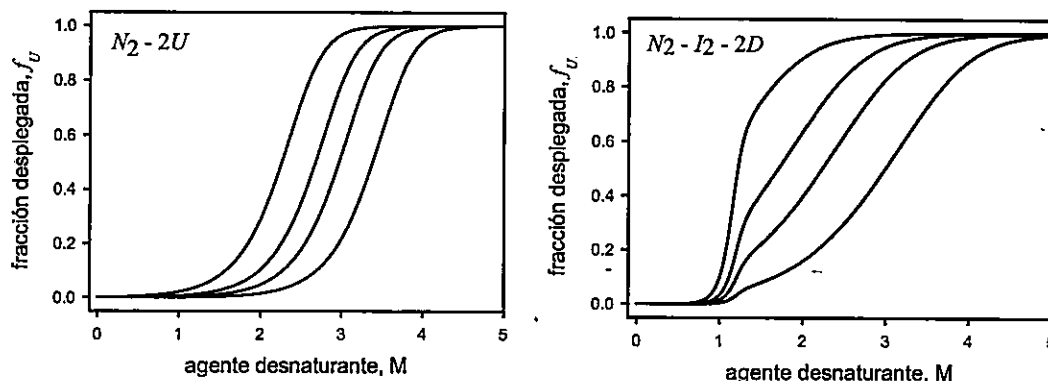
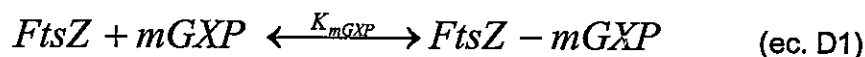


Figura C2. Simulación del desplegamiento de una proteína dimérica a través de una reacción de dos estados ( $N_2-2U$ ) y de tres estados ( $N_2-I_2-2U$ ). Las simulaciones (*líneas continuas*) se hicieron a cuatro concentraciones de proteína (*de izquierda a derecha*) 0,1; 1; 5 y 50  $\mu\text{M}$  para demostrar el cambio en la estabilidad y trayectoria de desplegamiento por efecto de los cambios en el grado de asociación. El modelo de desplegamiento de dos estados dimérico se simuló con  $\Delta G_{H_2O-N_2U}^0 = 17 \text{ kcal mol}^{-1}$  y  $m_{N_2U} = 3,3 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$ . El modelo de tres estados con intermediario dimérico se simuló con  $\Delta G_{H_2O-N_2I_2}^0 = 2.5 \text{ kcal mol}^{-1}$  y  $m_{N_2I_2} = 10.7 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$  y  $\Delta G_{H_2O-I_2U}^0 = 10.1 \text{ kcal mol}^{-1}$  y  $m_{I_2U} = 1,8 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$ .

### Apéndice D Teoría de la interacción de FtsZ con los nucleótidos fluorescentes MANT-GDP y MANT-GTP

La interacción de FtsZ con los nucleótidos fluorescentes MANT-GDP y MANT-GTP, en condiciones de equilibrio, se estudió midiendo la anisotropía de fluorescencia de los nucleótidos en función de la concentración de proteína. La reacción de asociación y disociación de FtsZ con los nucleótidos fluorescentes se presume reversible y puede describirse como sigue:



Donde  $FtsZ$  representa a un monómero de proteína,  $mGXP$  representa a los nucleótidos MANT-GDP ó MANT-GTP y  $FtsZ-mGXP$  representa a un monómero de FtsZ con una molécula de nucleótido fluorescente unido. La constante de equilibrio,  $K_{mGXP}$ , que describe a la reacción de asociación es:

$$K_{mGXP} = \frac{[FtsZ - mGXP]}{[FtsZ][mGXP]} \quad (\text{ec. D2})$$

Donde  $[FtsZ-mGXP]$ ,  $[FtsZ]$  y  $[mGXP]$  son las concentraciones molares en el equilibrio del complejo proteína-nucleótido, del monómero de proteína y del nucleótido libre en solución, respectivamente. La concentración de nucleótido libre en la mezcla de reacción es  $[mGXP]_{libre} = [mGXP]_T - [FtsZ-mGXP]$  y la concentración de proteína libre en la mezcla es  $[FtsZ]_{libre} = [FtsZ]_T - [FtsZ-mGXP]$ . La anisotropía de fluorescencia observada,  $r_{obs}$ , a una concentración de proteína dada es:

$$1 = f_{mGXP} + f_{FtsZ-mGXP} \\ r_{obs} = f_{mGXP} r_{mGXP} + f_{FtsZ-mGXP} r_{FtsZ-mGXP} \quad (\text{ec. D3})$$

Donde  $r_{mGXP}$  y  $r_{FtsZ-mGXP}$  son las anisotropías del nucleótido libre en solución y del complejo proteína-nucleótido, respectivamente.  $f_{mGXP}$  y  $f_{FtsZ-mGXP}$  corresponden a la fracción molar en el equilibrio del nucleótido libre y del complejo proteína-nucleótido, respectivamente. Por definición, la suma de las fracciones es 1. En el caso más simple de una sonda fluorescente que no cambia su rendimiento cuántico ni su tiempo de vida desde el estado libre al estado unido, la fracción unida  $f_{FtsZ-mGXP}$  coincide con la fracción de fluorescencia correspondiente al complejo proteína-nucleótido. Usando las ecuaciones D2, D3 y D4 se deduce que la anisotropía observada,  $r_{obs}$ , se relaciona con la constante de equilibrio de asociación del complejo proteína-nucleótido,  $K_{mGXP}$ , con la concentración total de proteína  $[FtsZ]_T$  y con las anisotropías del nucleótido en estado libre y formando el complejo proteína-nucleótido de acuerdo a:

$$r_{obs} = \frac{r_{mGXP} + [FtsZ]_T K_{mGXP} r_{FtsZ-mGXP}}{1 + [FtsZ]_T K_{mGXP}} \quad (\text{ec. D4})$$

En el caso en que la sonda cambia su rendimiento cuántico y/o su tiempo de vida desde el estado libre al estado unido, la fracción unida,  $f_{FtsZ-mGXP}$ , no coincide con la fracción de fluorescencia correspondiente al complejo proteína-nucleótido. Por tanto, se define el factor de corrección  $R_c$  tal que:

$$R_c = \frac{F_{unido}}{F_{libre}} \quad (\text{ec. D5})$$

Donde  $F_{unido}$  y  $F_{libre}$  representan la propiedad fluorescente de la sonda en el estado unido y libre, respectivamente. El cambio en las propiedades fluorescentes de la sonda se puede representar indirectamente midiendo la intensidad de fluorescencia a una longitud de onda determinada,  $I_\lambda$ , o directamente midiendo el tiempo de vida de la sonda,  $\tau$ . Introduciendo el factor de corrección  $R_c$  en la ecuación D4, la constante de equilibrio de asociación del complejo proteína-nucleótido,  $K_{mGXP}$ , se puede calcular considerando el cambio en las propiedades fluorescentes de acuerdo a:

$$r_{obs} = \frac{r_{mGXP} + [FtsZ]_T K_{mGXP} R_c r_{FtsZ-mGXP}}{1 + [FtsZ]_T K_{mGXP} R_c} \quad (\text{ec. D6})$$

Los parámetros a ajustar son las anisotropías del nucleótido libre y formando el complejo proteína-nucleótido  $r_{mGXP}$  y  $r_{FtsZ-mGXP}$  y la constante de equilibrio de asociación,  $K_{mGXP}$ .

### Modelado de datos para los experimentos de unión de los nucleótidos MANT-GDP y MANT-GTP.

Los datos experimentales de anisotropía para los experimentos de unión de MANT-GXP se ajustaron a los modelos propuestos usando la ecuación D3. Se supuso que la anisotropía observada,  $r_{obs}$ , corresponde a la suma de las contribuciones fraccionales de las anisotropías del nucleótido libre y del complejo proteína-nucleótido. La figura D1 muestra un ejemplo de la unión de un ligando fluorescente por parte de una proteína en condiciones de equilibrio (*círculos cerrados*). Para encontrar a los parámetros que describen a los datos experimentales simulados; se usó una rutina de regresión no-lineal con el software SigmaPlot v.11 (SYSTAT) usando el modelo presentado anteriormente. El resultado de la rutina de regresión corresponde a la *línea continua* que pasa sobre los puntos experimentales en la figura D1. Para medir la calidad del ajuste se usaron las herramientas estadísticas del software.

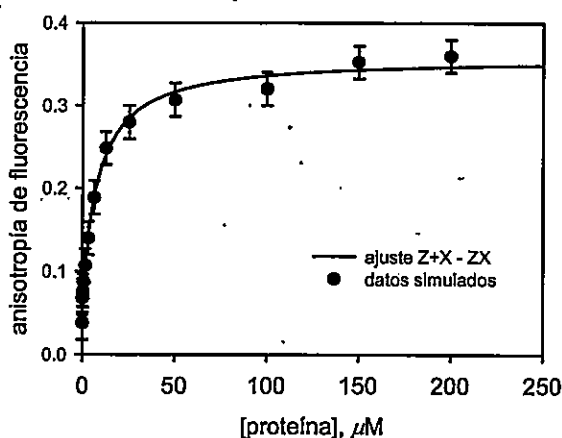


Figura D1. Simulación de la unión de un ligando fluorescente por una proteína en solución. La titulación del ligando se simuló con la anisotropía de fluorescencia (*círculos cerrados*). Las barras de error muestran una desviación estándar simulada de 0,02 unidades. Los datos experimentales se ajustaron (*línea continua*) con las ecuaciones D3; D6 y D7 suponiendo un factor de corrección  $R_c = 2$ . Los parámetros ajustados son:  $r_{mGXP} = 0,057 \pm 0,005$  y  $r_{FtsZ-mGXP} = 0,358 \pm 0,007$  y la constante de equilibrio de asociación,  $K_{mGXP} = 6,2 \pm 0,2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$

La fracción de nucleótido unido a la proteína se relaciona con la anisotropía de la mezcla de acuerdo a:

$$f_{FtsZ-mGXP} = \frac{(r_i - r_{mGXP})}{(r_{FtsZ-mGXP} - r_{mGXP})} \quad (\text{ec. D7})$$

Donde  $r_i$  es la anisotropía observada a una concentración de proteína dada y  $r_{mGXP}$  y  $r_{FtsZ-mGXP}$  son las anisotropías del nucleótido libre en solución y del complejo proteína-nucleótido, respectivamente. Para analizar la información que entrega la constante de equilibrio de asociación,  $K_a$ , se usó el valor recíproco o la constante de disociación,  $K_d$ , debido a que posee una mayor simpleza conceptual:

$$K_d = \frac{1}{K_a} \text{ M} \quad (\text{ec. D8})$$

Donde  $K_d$  es simplemente la concentración molar de proteína que produce un 50% de disociación o asociación. A partir de la constante de disociación, se calculó la energía libre de disociación,  $\Delta G_d^0$ :

$$\Delta G_d^0 = -RT \ln K_d \quad (\text{ec. D9})$$

Donde  $R$  es la constante de los gases ideales y  $T$  es la temperatura absoluta. Se puede demostrar que la fracción unida o el grado de ocupación del sitio de unión está definido a partir de la concentración total del ligando en la mezcla,  $[L]$  y de la constante de disociación,  $K_d$ , de acuerdo a:

$$f_{FtsZ-mGXP} = \text{fracción unida} = \frac{[L]}{[L] + K_d} \quad (\text{ec. D10})$$

En la figura D2 se simularon los datos de la fracción unida y grado de ocupación de acuerdo a la constante de disociación calculada a partir de los datos simulados en la figura D1.

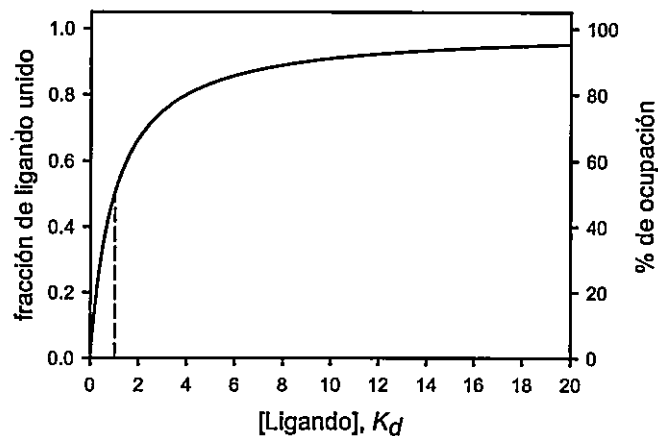


Figura D2. Simulación de la fracción de ligando unido (*eje izquierdo*) y del grado de ocupación (*eje derecho*) en función de la concentración de ligando. La concentración del ligando se representó en unidades de concentración equivalentes a la constante de disociación. Cuando la concentración de ligando es igual a una vez  $K_d$  (*indicado por la línea vertical discontinua*) la fracción de ligando unido es 0,5 y el grado de ocupación es 50%. Para la simulación se usó  $K_d = 16 \mu M$ .

## Referencias

- Addinall, S. G. y J. Lutkenhaus (1996). "FtsZ-spirals and -arcs determine the shape of the invaginating septa in some mutants of *Escherichia coli*." Mol Microbiol**22**(2): 231-237.
- Alcala, J. R., E. Gratton y F. G. Prendergast (1987). "Fluorescence lifetime distributions in proteins." Biophys J**51**(4): 597-604.
- Alcala, J. R., E. Gratton y F. G. Prendergast (1987). "Interpretation of fluorescence decays in proteins using continuous lifetime distributions." Biophys J**51**(6): 925-936.
- Alcala, J. R., E. Gratton y F. G. Prendergast (1987). "Resolvability of fluorescence lifetime distributions using phase fluorometry." Biophys J**51**(4): 587-596.
- Andreu, J. M., M. A. Oliva y O. Monasterio (2002). "Reversible Unfolding of FtsZ Cell Division Proteins from Archaea and Bacteria." The Journal of Biological Chemistry**277**(45): 43262-43270.
- Beeckmans, S. (1999). "Chromatographic methods to study protein-protein interactions." Methods**19**(2): 278-305.
- Beechem, J. M. y L. Brand (1985). "Time-resolved fluorescence of proteins." Annu Rev Biochem**54**: 43-71.
- Bennion, B. J. y V. Daggett (2003). "The molecular basis for the chemical denaturation of proteins by urea." PNAS**100**(9): 5142-5147.
- Bertrand, S., I. Barthelemy, M. A. Oliva, J. L. Carrascosa, J. M. Andreu y J. M. Valpuesta (2005). "Folding, Stability and Polymerization Properties of FtsZ Chimera with Inserted Tubulin Loops Involved in the Interaction with the Cytosolic Chaperonin CCT and in Microtubule Formation." Journal of Molecular Biology**346**: 319-330.
- Bettati, S., C. Viappiani y A. Mozzarelli (2009). "Hemoglobin, an "evergreen" red protein." Biochim Biophys Acta**1794**(9): 1317-1324.
- Beuria, T. K., S. S. Krishnakumar, S. Sahar, N. Singh, K. Gupta, M. Meshram y D. Panda (2003). "Glutamate-induced assembly of bacterial cell division protein FtsZ." J Biol Chem**278**(6): 3735-3741.
- Bramhill, D. y C. M. Thompson (1994). "GTP-dependent polymerization of *Escherichia coli* FtsZ protein to form tubules." Proc Natl Acad Sci U S A**91**(13): 5813-5817.
- Buscaglia, R., D. M. Jameson y J. B. Chaires (2012). "G-quadruplex structure and stability illuminated by 2-aminopurine phasor plots." Nucleic Acids Res**40**(9): 4203-4215.
- Caplan, M. R. y H. P. Erickson (2003). "Apparent cooperative assembly of the bacterial cell division protein FtsZ demonstrated by isothermal titration calorimetry." J Biol Chem**278**(16): 13784-13788.
- Cozzini, P., G. E. Kellogg, F. Spyralis, D. J. Abraham, G. Costantino, A. Emerson, F. Fanelli, H. Gohlke, L. A. Kuhn, G. M. Morris, M. Orozco, T. A. Pertinhez, M. Rizzi y C. A. Sotriffer (2008). "Target flexibility: an emerging consideration in drug discovery and design." J Med Chem**51**(20): 6237-6255.
- Creamer, T. P., R. Srinivasan y G. D. Rose (1997). "Modeling Unfolding States of Proteins and Peptides. II. Backbone Solvent Accessibility." Biochemistry**36**: 2832-2835.
- Chattopadhyay, K., S. Saffarian, E. L. Elson y C. Frieden (2005). "Measuring unfolding of proteins in the presence of denaturant using fluorescence correlation spectroscopy." Biophysical Journal**88**: 1413-1422.

- Chen, Y., K. Bjornson, S. D. Redick y H. P. Erickson (2005). "A rapid fluorescence assay for FtsZ assembly indicates cooperative assembly with a dimer nucleus." Biophys J88(1): 505-514.
- Chen, Y. y H. P. Erickson (2011). "Conformational changes of FtsZ reported by tryptophan mutants." Biochemistry50(21): 4675-4684.
- Dai, K. y J. Lutkenhaus (1991). "ftsZ is an essential cell division gene in Escherichia coli." J Bacteriol173(11): 3500-3506.
- de Pereda, J. M., D. Leynadier, J. A. Evangelio, P. Chacon y J. M. Andreu (1996). "Tubulin secondary structure analysis, limited proteolysis sites, and homology to FtsZ." Biochemistry35(45): 14203-14215.
- Díaz-Espinoza, R., A. P. Garcés, J. J. Arbildua, F. Montecinos, J. E. Brunet, R. Lagos y O. Monasterio (2007). "Domain folding and flexibility of Escherichia coli FtsZ determined by tryptophan site-directed mutagenesis." Protein Science16: 1543-1556.
- Eftink, M. R. (1991). "Fluorescence techniques for studying protein structure." Methods Biochem Anal35: 127-205.
- Eftink, M. R. y C. A. Ghiron (1975). "Dynamics of a protein matrix revealed by fluorescence quenching." Proc Natl Acad Sci U S A72(9): 3290-3294.
- Eftink, M. R. y C. A. Ghiron (1987). "Does the fluorescence quencher acrylamide bind to proteins?" Biochim Biophys Acta916(3): 343-349.
- Erickson, H. P. (1998). "Atomic structures of tubulin and FtsZ." Trends Cell Biol8(4): 133-137.
- Erickson, H. P., D. E. Anderson y M. Osawa (2010). "FtsZ in bacterial cytokinesis: cytoskeleton and force generator all in one." Microbiol Mol Biol Rev74(4): 504-528.
- Erickson, H. P. y M. Osawa (2010). "Cell division without FtsZ--a variety of redundant mechanisms." Mol Microbiol78(2): 267-270.
- Erickson, H. P., D. W. Taylor, K. A. Taylor y D. Bramhill (1996). "Bacterial cell division protein FtsZ assembles into protofilament sheets and minirings, structural homologs of tubulin polymers." Proc Natl Acad Sci U S A93(1): 519-523.
- Errington, J., R. A. Daniel y D. J. Scheffers (2003). "Cytokinesis in bacteria." Microbiol Mol Biol Rev67(1): 52-65, table of contents.
- Fersht, A. (1999). Structure and Mechanism in Protein Science (Second Edition). New York, W.H. Freeman and Company.
- Fu, G., T. Huang, J. Buss, C. Coltharp, Z. Hensel y J. Xiao (2010). "In vivo structure of the E. coli FtsZ-ring revealed by photoactivated localization microscopy (PALM)." PLoS One5(9): e12682.
- García de la Torre, J., M. L. Huertas y B. Carrasco (2000). "Calculation of hydrodynamics properties of globular proteins from their atomic-level structure." Biophysical Journal78: 719-730.
- Graumann, P. L. (2007). "Cytoskeletal elements in bacteria." Annu Rev Microbiol61: 589-618.
- Huecas, S. y J. M. Andreu (2004). "Polymerization of nucleotide-free, GDP- and GTP-bound cell division protein FtsZ: GDP makes the difference." FEBS Lett569(1-3): 43-48.
- Huecas, S., O. Llorca, J. Boskovic, J. Martin-Benito, J. M. Valpuesta y J. M. Andreu (2008). "Energetics and geometry of FtsZ polymers: nucleated self-assembly of single protofilaments." Biophys J94(5): 1796-1806.
- Huecas, S., C. Schaffner-Barbero, W. Garcia, H. Yebenes, J. M. Palacios, J. F. Diaz, M. Menendez y J. M. Andreu (2007). "The interactions of cell division protein FtsZ with guanine nucleotides." J Biol Chem282(52): 37515-37528.



- Humphrey, W., A. Dalke y K. Schulten (1996). "VMD: visual molecular dynamics." J Mol Graph14(1): 33-38, 27-38.
- James, N. G., J. A. Ross, M. Stefl y D. M. Jameson (2011). "Applications of phasor plots to in vitro protein studies." Anal Biochem410(1): 70-76.
- Jameson, D., E. Gratton y R. Hall (1984). "The Measurement and Analysis of Heterogeneous Emissions by Multifrequency Phase and Modulation Fluorometry." Applied Spectroscopy Reviews20(1): 51.
- Jameson, D. M., E. Gratton y J. F. Eccleston (1987). "Intrinsic fluorescence of elongation factor Tu in its complexes with GDP and elongation factor Ts." Biochemistry26(13): 3894-3901.
- Jameson, D. M., J. A. Ross y J. P. Albanesi (2009). "Fluorescence fluctuation spectroscopy: ushering in a new age of enlightenment for cellular dynamics." Biophys Rev1(3): 105-118.
- Jameson, D. M. y S. E. Seifried (1999). "Quantification of protein-protein interactions using fluorescence polarization." Methods19(2): 222-233.
- Kawahara, K. y C. Tanford (1966). "Viscosity and density of aqueous solutions of urea and guanidine hydrochloride." J Biol Chem241(13): 3228-3232.
- Lakowicz, J. R. (2006). Principles of Fluorescence Spectroscopy (Third Edition). Baltimore, MA, Springer
- Lanzetta, P. A., L. J. Alvarez, P. S. Reinach y O. A. Candia (1979). "An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate." Anal Biochem100(1): 95-97.
- Li, Z., M. J. Trimble, Y. V. Brun y G. J. Jensen (2007). "The structure of FtsZ filaments in vivo suggests a force-generating role in cell division." EMBO J26(22): 4694-4708.
- Löwe, J. y L. Amos (1998). "Crystal structure of the bacterial cell-division protein FtsZ." Nature391(8): 203-206.
- Lutkenhaus, J. F., H. Wolf-Watz y W. D. Donachie (1980). "Organization of genes in the ftsA-envA region of the Escherichia coli genetic map and identification of a new fts locus (ftsZ)." J Bacteriol142(2): 615-620.
- Llorca, O., J. Martín-Benito, J. Grantham, M. Ritco-Vonsovici, K. R. Willison, J. L. Carrascosa y J. M. Valpuesta (2001). "The 'sequential allosteric ring' mechanism in the eukaryotic chaperonin-assisted folding of actin and tubulin." EMBO J20(15): 4065-4075.
- Marrington, R., E. Small, A. Rodger, T. R. Dafforn y S. G. Addinall (2004). "FtsZ fiber bundling is triggered by a conformational change in bound GTP." J Biol Chem279(47): 48821-48829.
- Martín-Galiano, A. J., R. M. Buey, M. Cabezas y J. M. Andreu (2010). "Mapping Flexibility and the Assembly Switch of Cell Division Protein FtsZ by Computational and Mutational Approaches." The Journal of Biological Chemistry285(29): 22554-22565.
- Martos, A., C. Alfonso, P. Lopez-Navajas, R. Ahijado-Guzmán, J. Mingorance, A. P. Minton y G. Rivas (2010). "Characterization of self-association and heteroassociation of bacterial cell division proteins FtsZ and ZipA in solution by composition gradient-static light scattering." Biochemistry49(51): 10780-10787.
- Michie, K. A. y J. Lowe (2006). "Dynamic filaments of the bacterial cytoskeleton." Annu Rev Biochem75: 467-492.
- Miraldi, E. R., P. J. Thomas y L. Romberg (2008). "Allosteric Models for Cooperative Polymerization of Linear Polymers." Biophysical Journal95: 2470-2486.

- Montecinos, F. (2004). Estudio de la funcionalidad de mutantes de FtsZ de *E. coli*. Departamento de Biología. Santiago, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile. **Unidad de Investigación: 11.**
- Montecinos, F. (2010). Caracterización Bioquímica y Microbiológica de la función de los dominios amino y carboxilo terminales de FtsZ de *Escherichia coli*. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias. Santiago, Chile, Universidad de Chile. **Tesis de Ingeniería en Biotecnología Molecular: 120.**
- Montecinos, F., L. Concha, F. Villanelo, R. Lagos y O. Monasterio (2010). Análisis de la flexibilidad de FtsZ de *E. coli* por medio de la fluorescencia resuelta en el tiempo del triptófano en las mutantes F40W, Y222W y F275W LIII Reunion Anual de la Sociedad de Biología de Chile, Santa Cruz, VI Región, Chile Biological Research.
- Mukherjee, A., K. Dai y J. Lutkenhaus (1993). "Escherichia coli cell division protein FtsZ is a guanine nucleotide binding protein." Proc Natl Acad Sci U S A90(3): 1053-1057.
- Mukherjee, A. y J. Lutkenhaus (1998). "Dynamic assembly of FtsZ regulated by GTP hydrolysis." EMBO J17(2): 462-469.
- Mukherjee, A. y J. Lutkenhaus (1999). "Analysis of FtsZ Assembly by Light Scattering and Determination of the Role of Divalent Metal Cations." Journal of Bacteriology181(3): 823-832.
- Mukherjee, A., C. Saez y J. Lutkenhaus (2001). "Assembly of an FtsZ Mutant Deficient in GTPase Activity Has Implications for FtsZ Assembly and the Role of the Z ring in Cell Division." Journal of Bacteriology183(24): 7190-7197.
- Mukherjee, A., M. K. Santra, T. K. Beuria y D. Panda (2005). "A natural osmolyte trimethylamine N-oxide promotes assembly and bundling of the bacterial cell division protein, FtsZ and counteracts the denaturing effects of urea." The FEBS Journal272(2760-2772).
- Myers, J. K., C. N. Pace y J. M. Scholtz (1995). "Denaturant *m* values and heat capacity changes: Relation to changes in accessible surface areas of protein unfolding." Protein Science4(2138-2148).
- Neet, K. E. y D. E. Timm (1994). "Conformational stability of dimeric proteins: Quantitative studies by equilibrium denaturation." Protein Science3(2167-2174).
- Nogales, E., K. Downing, L. Amos y J. Löwe (1998). "Tubulin and FtsZ form a distinct family of GTPases." Nature5(6): 451-458.
- Nova, E., F. Montecinos, J. E. Brunet, R. Lagos y O. Monasterio (2007). "4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) induces bundling of Escherichia coli FtsZ polymers inhibiting the GTPase activity." Arch Biochem Biophys465(2): 315-319.
- Oliva, M. A., S. C. Cordell y J. Löwe (2004). "Structural insights into FtsZ protofilament formation." Nature Structural & Molecular Biology11(12): 1243-1250.
- Oliva, M. A., S. Huecas, J. M. Palacios, J. Martín-Benito, J. M. Valpuesta y J. M. Andreu (2003). "Assembly of Archaeal Cell Division Protein FtsZ and a GTPase-inactive Mutant into Double-stranded Filaments." The Journal of Biological Chemistry278(35): 33562-33570.
- Oliva, M. A., D. Trambaiolo y J. Lowe (2007). "Structural insights into the conformational variability of FtsZ." J Mol Biol373(5): 1229-1242.
- Osawa, M., D. E. Anderson y H. P. Erickson (2008). "Reconstitution of contractile FtsZ rings in liposomes." Science320(5877): 792-794.
- Osawa, M. y H. P. Erickson (2005). "Probing the domain structure of FtsZ by random truncation and insertion of GFP." Microbiology151(Pt 12): 4033-4043.

- Pace, C. N. y K. L. Shaw (2000). "Linear extrapolation method of analyzing solvent denaturation curves." Proteins Suppl 4: 1-7.
- Park, C. y S. Marqusee (2004). "Analysis of the stability of multimeric proteins by effective  $\Delta G$  and effective  $m$ -values." Protein Science 13: 2553-2558.
- Phizicky, E. M. y S. Fields (1995). "Protein-Protein Interactions: Methods for Detection and Analysis." Microbiological Reviews 59(1): 94-123.
- Pla, J., M. Sanchez, P. Palacios, M. Vicente y M. Aldea (1991). "Preferential cytoplasmic location of FtsZ, a protein essential for Escherichia coli septation." Mol Microbiol 5(7): 1681-1686.
- Pogliano, J. (2008). "The bacterial cytoskeleton." Curr Opin Cell Biol 20(1): 19-27.
- Povarova, O. I., I. M. Kuznetsova y K. K. Turoverov (2010). "Differences in the pathways of proteins unfolding induced by urea and guanidine hydrochloride: molten globule state and aggregates." PLoS One 5(11): e15035.
- Ragone, R. (1999). "How the protein concentration affects unfolding curves of oligomers." Biopolymers 53: 221-225.
- RayChaudhuri, D. y J. T. Park (1992). "Escherichia coli cell-division gene ftsZ encodes a novel GTP-binding protein." Nature 359(6392): 251-254.
- Rivas, G., A. Lopez, J. Mingorance, M. J. Ferrandiz, S. Zorrilla, A. P. Minton, M. Vicente y J. M. Andreu (2000). "Magnesium-induced linear self-association of the FtsZ bacterial cell division protein monomer. The primary steps for FtsZ assembly." J Biol Chem 275(16): 11740-11749.
- Romberg, L., M. Simon y H. Erickson (2001). "Polymerization of FtsZ, a Bacterial Homolog of Tubulin Is Assembly Cooperative." The Journal of Biological Chemistry 276(15): 11743-11753.
- Ross, J. A. y D. M. Jameson (2008). "Time-resolved methods in biophysics. 8. Frequency domain fluorometry: applications to intrinsic protein fluorescence." Photochem Photobiol Sci 7(11): 1301-1312.
- Sambrook, J. y D. Russell (2012). Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Fourth Edition), Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanchez, S. A., J. E. Brunet, D. M. Jameson, R. Lagos y O. Monasterio (2004). "Tubulin equilibrium unfolding followed by time-resolved fluorescence and fluorescence correlation spectroscopy." Protein Sci 13(1): 81-88.
- Santra, M. K. y D. Panda (2003). "Detection of an Intermediate during Unfolding of Bacterial Cell Division Protein FtsZ." The Journal of Biological Chemistry 278(24): 21336-21343.
- Scheffers, D.-J., J. G. de Wit, T. den Blaauwen y A. J. Driessen (2002). "GTP Hydrolysis of Cell Division Protein FtsZ: Evidence that the Active Site Is Formed by the Association of Monomers." Biochemistry 41: 521-529.
- Sherman, E., A. Itkin, Y. Y. Kuttner, E. Rhoades, D. Amir, E. Haas y G. Haran (2008). "Using fluorescence correlation spectroscopy to study conformational changes in denatured proteins." Biophysical Journal 94: 4819-4827.
- Skjaerven, L., N. Reuter y A. Martinez (2011). "Dynamics, flexibility and ligand-induced conformational changes in biological macromolecules: a computational approach." Future Med Chem 3(16): 2079-2100.
- Skowronek, K. J., E. Kocik y A. A. Kasprzak (2007). "Subunits interactions in kinesin motors." Eur J Cell Biol 86(9): 559-568.

- Sossong, T. M., M. R. Brigham-Burke, P. Hensley y K. H. Pearce (1999). "Self-Activation of Guanosine Triphosphate Activity by Oligomerization of the Bacterial Cell Division Protein FtsZ." Biochemistry**38**(45): 14843-14850.
- Stefl, M., N. G. James, J. A. Ross y D. M. Jameson (2011). "Applications of phasors to in vitro time-resolved fluorescence measurements." Anal Biochem**410**(1): 62-69.
- Stevens, F. J. (1989). "Analysis of protein-protein interactions by simulation of small-zone size exclusion chromatography." Biophysical Journal**55**: 1155-1167.
- Stricker, J., P. Maddox, E. D. Salmon y H. P. Erickson (2002). "Rapid assembly dynamics of the Escherichia coli FtsZ-ring demonstrated by fluorescence recovery after photobleaching." Proc Natl Acad Sci U S A**99**(5): 3171-3175.
- Sun, Q. y W. Margolin (1998). "FtsZ dynamics during the division cycle of live Escherichia coli cells." J Bacteriol**180**(8): 2050-2056.
- Vaughan, S., B. Wickstead, K. Gull y S. G. Addinall (2004). "Molecular evolution of FtsZ protein sequences encoded within the genomes of archaea, bacteria, and eukaryota." J Mol Evol**58**(1): 19-29.
- Vicente, M., A. I. Rico, R. Martinez-Arteaga y J. Mingorance (2006). "Septum enlightenment: assembly of bacterial division proteins." J Bacteriol**188**(1): 19-27.
- Vogel, P. D. (2005). "Nature's design of nanomotors." Eur J Pharm Biopharm**60**(2): 267-277.
- Weber, G. (1952). "Polarization of the fluorescence of macromolecules. I. Theory and experimental method." Biochem J**51**(2): 145-155.
- Weber, G. (1952). "Polarization of the fluorescence of macromolecules. II. Fluorescent conjugates of ovalbumin and bovine serum albumin." Biochem J**51**(2): 155-167.
- Yuan, Z., T. L. Bailey y R. D. Teasdale (2005). "Prediction of protein B-factor profiles." Proteins**58**(4): 905-912.