

UCH-Fc
Biotecnología
M687
C.1

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

**DISEÑO, CONSTRUCCIÓN Y CARACTERIZACION ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL
DE LAS MUTANTES DE FtsZ DE *Escherichia coli* Q194K Y N328R: RESIDUOS
QUE FORMAN REDES DE PUENTES SALINOS EN FtsZ DE *Methanococcus
jannaschii*.**

Memoria de Título

Entregada a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al Título de

Ingeniero en Biotecnología Molecular

por

Juan Carlos Mobarec Lubies

Mayo, 2005
Santiago – Chile

Director de Tesis: Dr. Octavio Monasterio O.



**“DISEÑO, CONSTRUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN
ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE LAS MUTANTES DE FtsZ DE
Escherichia coli Q194K Y N328R: RESIDUOS QUE FORMAN
REDES DE PUENTES SALINOS EN FtsZ de *Methanococcus
jannaschii*”**

Memoria de Título entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

JUAN CARLOS MOBAREC LUBIES

Firma manuscrita de Juan Carlos Mobarec Lubies.

Dr. Octavio Monasterio Opazo
Tutor Memoria de Título

Comisión de Evaluación de la Memoria de Título

Carlos Jerez Guevara
Presidente Comisión

Firma manuscrita de Carlos Jerez Guevara.

Dr. Herman Silva Ascencio
Corrector

Firma manuscrita de Herman Silva Ascencio.

Santiago de Chile, 4 de Mayo 2005



«From thought to finish »
E&Y

«Mutatis mutandis et ceteris paribus»
NSD

*«Nuestro tiempo es el precio que debemos pagar por todo,
lo importante es saber invertirlo»*
JCML

DEDICATORIA

* >

*Dedico este trabajo a toda mi Familia, en especial a mis padres Beatriz y Juan Carlos,
por su comprensión y paciencia durante el desarrollo de esta tesis.*

A mi amada Nancy con quien me encontré en este camino.

A los que estuvieron antes, y a los que estarán después.

AGRADECIMIENTOS

Una compleja red de personas me ha ayudado en esta búsqueda, le agradezco a todas y cada una de ellas, empezando por mi tutor el Dr. Octavio Monasterio por la libertad intelectual en la concepción y desarrollo de ésta tesis, por su ocurrencia por nuevos experimentos, y su ayuda en la exhaustiva corrección y redacción de este documento. Al profesor Carlos Medina por las conversaciones acerca de la dimensión evolutiva y la estabilidad térmica, a José Jaime "Jota" Arbildúa por su desinteresada ayuda en los desafíos bioinformáticos y asuntos computacionales, a la Dra. Rosalba Lagos por su guía y consejos en muchos experimentos, a Esteban Nova por su ayuda en el uso de los instrumentos del Centro de Equipamiento Mayor, por sus protocolos intangibles, y por no convertir el laboratorio en $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$, a Jae Yen por sus protocolos tangibles y ayuda, a David Weinstein por su ayuda en los preparativos de varios experimentos, a Daniel Pérez por sus astutos cometarios al proyecto de tesis, la ayuda con el HPLC y las partidas de GO. A la Dra. Nancy Olea por la ayuda técnica en la toma de las fotografías de microscopía electrónica, a Erwin Strasburger por su ayuda en lo que sea y las partidas de ajedrez, a Gino Corsini por su buena onda, a las secretarías del CEM Mirtha, Ilse y Macarena, a Maribel López, a Víctor Santander, a José Antonio Castillo, a Los Rodrigues², al César, a la Roselyn por los litros y litros de medio de cultivo y placas con antibióticos que gentilmente preparó, al encargado de la Biblioteca de la Facultad de Ciencias, Juan Carlos Machuca por su ayuda en la ubicación de "papers" y libros en las bibliotecas de todo Chile, a Ana Norambuena por la pintura en tela en que immortalizo al Laboratorio (BEM-CEM) y que olvidó firmar. Al Dr. Carlos Jerez y al Dr. Herman Silva por la exhaustiva revisión de este documento y a todos los que de alguna manera ayudaron en la realización de esta tesis. También agradezco el financiamiento del proyecto fondecyt 1010848, y por supuesto el de mis padres.

Después de exponerme, sistemáticamente, a rayos UV, radiactividad, ácidos, agentes mutagénicos y teratogénicos, virus y bacterias con el solo fin de convencer a la naturaleza para que me susurre algunos de sus secretos..... les contaré en las páginas siguientes un fragmento de nuestro diálogo.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Página.
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Índice de contenido	v
Índice de tablas	vi
Índice de figuras	vii
Lista de abreviaturas	x
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xiv
INTRODUCCIÓN	1
MATERIALES Y MÉTODOS	12
RESULTADOS	26
DISCUSIÓN	49
CONCLUSIONES	62
BIBLIOGRAFÍA	64
ANEXO	68

ÍNDICE DE TABLAS

		Página.
Tabla I.	Comparación de la composición de aminoácidos cargados en EcFtsZ y MjFtsZ	29
Tabla II.	Poblaciones de protofilamentos según su ancho promedio para EcFtsZ silvestre y sus mutantes	44
Tabla III	Constantes catalíticas aparentes a 30° y 40°C para la actividad GTPása de EcFtsZ wt, Q194K y N328R	46
Tabla IV	Resumen de las propiedades analizadas de las mutantes Q194K y N328R respecto a las mismas propiedades de EcFtsZ silvestre	61

ÍNDICE DE FIGURAS

		Página.
Figura 1	Estructura tridimensional de MjFtsZ en modo "cartoon"	2
Figura 2	Definición de puente salino, par iónico y sus redes	7
Figura 3	Diagrama de flujo de la mutagénesis sitio-dirigida	14
Figura 4	Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de FtsZ de <i>E. coli</i> (EcFtsZ) y <i>M. janaschii</i> (MjFtsZ)	27
Figura 5	Comparación de la estructura tridimensional de MjFtsZ y EcFtsZ	28
Figura 6	Número de pares iónicos en el rango de distancia indicada, en la estructura de MjFtsZ y EcFtsZ	31
Figura 7	Matriz de puentes y pares iónicos para MjFtsZ, EcFtsZ y EcFtsZ con mutaciones	32
Figura 8	Comparación de las redes de puentes salinos en MjFtsZ, con la misma región en EcFtsZ, y las mutaciones puntuales que recrean las redes de MjFtsZ en EcFtsZ	33
Figura 9	Cromatograma de purificación de EcFtsZ WT	35
Figura 10	Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE de las proteínas provenientes de las diferentes etapas de purificación de EcFtsZ	35
Figura 11	Espectro de dicroísmo circular para EcFtsZ de tipo silvestre y de las mutantes Q194K y N328R	37
Figura 12	Porcentaje de estructura secundaria para FtsZ de tipo silvestre y las mutantes Q194K y N328R	38

Figura 13	Polimerización y despolimerización de EcFtsZ de tipo silvestre y las mutantes Q194K y N328R seguidas por dispersión de luz	38
Figura 14	Diferencia máxima de dispersión de luz a 350 nm de EcFtsZ polimerizada a diferentes concentraciones de proteína	40
Figura 15	Desnaturación con GdmCl de EcFtsZ silvestre y las mutantes Q94K y N328R	41
Figura 16	Microscopía electrónica de los filamentos de EcFtsZ de tipo silvestre y sus mutantes Q194K y N328R	42
Figura 17	Distribución de la frecuencia del ancho de los polímeros de EcFtsZ y sus mutantes Q194K y N328R	44
Figura 18	Hidrólisis de GTP por EcFtsZ de tipo silvestre y las mutantes Q194K y N328R a 40°C durante los primeros ocho minutos de reacción	46
Figura 19	Capacidad de polimerización máxima con GTP a 25°C, de FtsZ wt y las mutantes Q194K Y N328R, previamente tratadas con un "shock" térmico a la temperatura indicada en la abscisa	47
Figura 20	Porcentajes de sobrevida de las cepas VIP2(DE3) complementada con plasmidios que expresan EcFtsZ de tipo silvestre y las mutantes Q194K y N328R	48
Figura 21	Modelo de interacción longitudinal de dos moléculas de EcFtsZ basado en la localización de tubulina en el microtúbulo	51
Figura 22	Dímero y modelo de polimerización longitudinal y lateral de EcFtsZ que forma "Thick filaments" paralelos y anti-paralelos	

	basado en el modelo de MjFtsZ	52
Figura 23	Dímero y modelo de polimerización longitudinal y espiral de EcFtsZ basado en MtbFtsZ	53

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA	Albúmina de suero de bovino
dNTP	Desoxi-nucleótido tri-fosfato
EDTA	Etilen diamino tetra acético
EcFtsZ	FtsZ de <i>Escherichia coli</i>
FtsZ	" <u>F</u> ilamentous <u>t</u> emperature <u>s</u> ensitive <u>Z</u> "
GDP	Guanosina-5'-difosfato
GdmCl	Cloruro de guanidinio
GTP	Guanosina-5'-trifosfato
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
ID	Identidad de secuencia
IPTG	Isopropil β-D-tiogalactopiranosido
LB	Medio Luria-betrianí
MES	Ácido 4-morfolinoetanosulfónico
MjFtsZ	FtsZ de <i>Methanococcus janaschii</i>
MtbFtsZ	FtsZ de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
N328R	Mutante de EcFtsZ, en la que se reemplazó el aminoácido asparragina número 328 por una arginina.
PaFtsZ	FtsZ de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida
PI	Par iónico
PS	Puente salino
Q194K	Mutante de EcFtsZ, en el que se reemplazó el aminoácido glutamina número 194 por lisina

SDS	Dodecil sulfato de sodio
TEN	Tampón que contiene Tris 50 mM pH 8,0, EDTA 1mM, NaCl 100 mM
TRIS	Tris (hidróximetil) aminometano
Wt	"Wild type", tipo silvestre
X-Gal	5-Bromo-4-cloro-3-indol- β -D-galactósido

RESUMEN

FtsZ (Filamentous temperature sensitive Z), es una proteína esencial para la división celular, pues sin ella la célula es incapaz de dividirse. En la última etapa del ciclo celular, la primera proteína que se localiza en el sitio de septación es FtsZ, donde forma el anillo Z. FtsZ une GTP y presenta actividad GTPasa cuando polimeriza *in vitro* para formar filamentos dobles. Poco se sabe acerca de la estabilidad térmica de FtsZ y de la relación con su estructura tridimensional. En general, se han propuesto muchos factores estructurales para explicar la estabilidad térmica en las proteínas, sin embargo ninguno de ellos parece ser un factor exclusivo. Entre estos factores se destacan la mayor formación de puentes salinos y puentes de hidrógeno en las proteínas termófilas. Las interacciones electrostáticas son importantes porque la fuerza de su interacción no disminuye a altas temperaturas, a diferencia de las interacciones hidrofóbicas y los puentes de hidrógeno que disminuyen cuando la temperatura se aumenta.

Al comparar *in silico* la estructura tridimensional de FtsZ del hipertermófilo *Methanococcus jannaschii* (MjFtsZ) con la FtsZ del mesófilo *Escherichia coli* (EcFtsZ) se encontró que la principal diferencia fue un mayor número y extensión de redes de puentes salinos en la superficie de la proteína termófila. Para demostrar la relación entre este hallazgo y su efecto sobre la estabilidad térmica, se diseñaron y construyeron las mutantes de EcFtsZ: Q194K y N328R donde se incluyeron residuos cargados, que forman redes de puentes salinos en MjFtsZ.

La EcFtsZ de la cepa silvestre y de las mutantes se purificaron y se caracterizaron *in vitro* la estabilidad térmica, la polimerización, la actividad GTPásica, la

estructura secundaria y la morfología de los filamentos formados. También se caracterizó la capacidad de complementar su función *in vivo*.

Los resultados mostraron que la estabilidad térmica de EcFtsZ silvestre, y las mutantes Q194K y N328R son mayores en su forma polimerizada, que en su estado no polimerizado. La estabilidad estructural de ambas mutantes no se afectó, pues la concentración de cloruro de guanidino necesaria para alcanzar un 50% de desnaturación ($GdmCl_{50\%}$) fue similar a la de la proteína silvestre. La mutación Q194K no afectó mayormente la estabilidad térmica de EcFtsZ, pero sí afectó sus propiedades funcionales. Así, respecto a EcFtsZ silvestre, disminuyó su actividad GTPásica, aumentó la concentración crítica y en la polimerización probablemente aumentó el largo de los polímeros, pues aumentó el tiempo de despolimerización y no se afectó el ancho de los filamentos. No hubo complementación de la función *in vivo*, en *E.coli*. En comparación con la EcFtsZ wt, la mutación N328R disminuyó su estabilidad térmica, aumentó su actividad GTPásica, su concentración crítica fue similar y la velocidad de despolimerización fue mayor. Se postula que la cara interna de EcFtsZ, donde está ubicada la mutación Q194R, es una región clave para su funcionamiento y es apta para el diseño racional de inhibidores de la división bacteriana. Se concluye que los puentes salinos y las redes agregadas a EcFtsZ no son suficientes para aumentar significativamente su estabilidad térmica. El efecto sobre sus propiedades funcionales, puede ser interpretado como una probable disminución de la flexibilidad de la molécula. Así, la red formada por la mutación Q194K es capaz de restringir el movimiento entre las hélices H5 y H1 y con esto provoca la disminución de la actividad GTPásica y afecta la polimerización. Por lo tanto, para lograr un efecto considerable sobre la estabilidad térmica de EcFtsZ se requiere de un análisis sistemático del efecto de todos los puentes salinos en forma individual o colectiva.

ABSTRACT

FtsZ (Filamentous temperature sensitive Z) is an essential protein for cell division because without this protein the cell cannot divide. In the last step of the cell cycle, the first protein to locate at the septation site is FtsZ where it forms the Z-ring. FtsZ binds GTP and polymerizes *in vitro* to form double filaments. Little is known about the thermal stability of FtsZ, and its relationship with the tridimensional structure. In general, many structural factors have been proposed to explain the thermal stability of proteins, however none of them seems to be an exclusive factor. Among these factors the principal are the high number of salt-bridges and hydrogen bonds in thermophilic proteins. Electrostatic interactions like salt bridges are important because the force of its interaction does not decrease at high temperatures in contrast with hydrophobic interactions and hydrogen bonds that decrease when temperature increases.

In silico comparisons of the three-dimensional structure of the hyperthermophile *Methanococcus jannaschii* FtsZ (MjFtsZ) with that of *Escherichia coli* mesophile FtsZ (EcFtsZ) showed that the main difference is a bigger number and extension of salt bridge networks at the surface of thermophilic protein. To demonstrate the relationship between this discovery and its effect over the thermal stability of FtsZ, the EcFtsZ mutants: Q194K and N328R were designed and constructed. These mutants contained the charged residues that form salt bridges networks in MjFtsZ.

Wild type and mutants EcFtsZ were purified, and their thermal stability, GTPase activity, *in vitro* polymerization, secondary structure, filaments shape and *in vivo* function complementation were characterized.

The results showed that the polymers of wild type and the mutants of EcFtsZ had higher thermal stability than the protein in depolymerized state. Structural stability of

both EcFtsZ mutants was not affected, because the guanidinium chloride concentration necessary to reach 50% of denaturation ($GdmCl_{50\%}$), was similar to that for wild type EcFtsZ. The mutant EcFtsZ Q194K showed that its functional properties were affected but not its thermal stability. Thus, with respect to FtsZ wt, the GTPase activity diminished, the critical concentration and probably the length of the polymers increased because the depolymerization time increased and the width of the polymers was not affected. *In vivo* there was no functional complementation in *E.coli*. In comparison with EcFtsZ wt, the mutant EcFtsZ N328R showed decreased thermal stability and an increased GTPase activity, the critical concentration was similar and depolymerization was faster. We postulate that EcFtsZ inner face, where Q194K mutation was located is a key region for the EcFtsZ function, and is a good target for the rational design of cell division inhibitors. It is concluded that the salt-bridges and networks introduced at the surface of EcFtsZ are not enough to enhance significantly its thermal stability. The effect over the functional properties of EcFtsZ can be interpreted as a decrease in the molecule flexibility. Thus the network formed by Q194K mutation restricts the movement between α -helix H5 and H1, and in consequence decreased GTPase activity and affected polymerization. Therefore, in order to enhance significantly the EcFtsZ thermal stability, a systematic analysis of all salt-bridges, in a isolated or in a collective form, is required.

INTRODUCCIÓN

FtsZ es parte de un conjunto de genes (cluster DCW) involucrados en el crecimiento y división celular. FtsZ es una proteína citosólica y globular de 40.3 kDa de masa molecular (383 aa), que en presencia de GTP se polimeriza dinámicamente y forma filamentos, los que se despolimerizan a medida que el GTP es hidrolizado. Durante la división celular, esta proteína se localiza en el sitio de septación y forma en la mitad de la célula un anillo que aparece unido al perímetro transversal interno de la membrana citoplasmática de la célula, cuya contracción da origen a la citoquinesis.

Su secuencia primaria es altamente conservada entre bacterias y arqueas, con aproximadamente 35-45% de identidad de aminoácidos entre proteínas de organismos altamente divergentes. Incluso tienen similitud con la de cloroplastos de eucariontes fotosintéticos, plantas, algas y mitocondrias de eucariontes unicelulares primitivos, el alga chromophyta *Mallomonas splendens* y el protista *Dictyostelium discoideum* (Margolin, 2000; Osteryoung y col., 2001; Wilson, 2003; Miyagishima y col., 2003).

Se ha determinado la estructura tridimensional para FtsZ del organismo metanógeno hipertermofílico *Methanococcus jannaschii* (MjFtsZ) (Löwe y Amos, 1998) y para el mesófilo *Pseudomonas aeruginosa* (PaFtsZ) (Cordell y col., 2003). Ambas estructuras se determinaron por cristalografía de rayos-X a una resolución de 2,8 y 2,1 Å, respectivamente. Adicionalmente, se han obtenido cristales de FtsZ del patógeno mesófilo *Mycobacterium tuberculosis* MtbFtsZ (Leung y col., 2000), y recientemente se determinó su estructura tridimensional (Leung y col., 2004).

El modelo tridimensional de la estructura de FtsZ de *M. jannaschii* que se muestra en la Figura 1 contiene los residuos 23 hasta 356, 116 moléculas de agua y una molécula de GDP. MjFtsZ posee dos regiones: una de unión del nucleótido y responsable de la actividad GTPasa (residuos 38-227), que consiste de una hoja-β de

seis hebras (topología 321456) que se encuentra rodeada por dos hélices- α (H1 y H5) en un lado y tres hélices- α (H2, H3 y H4) por el otro lado, adquiriendo un empaquetamiento de tipo Rossmann, que se superpone muy bien con el de la

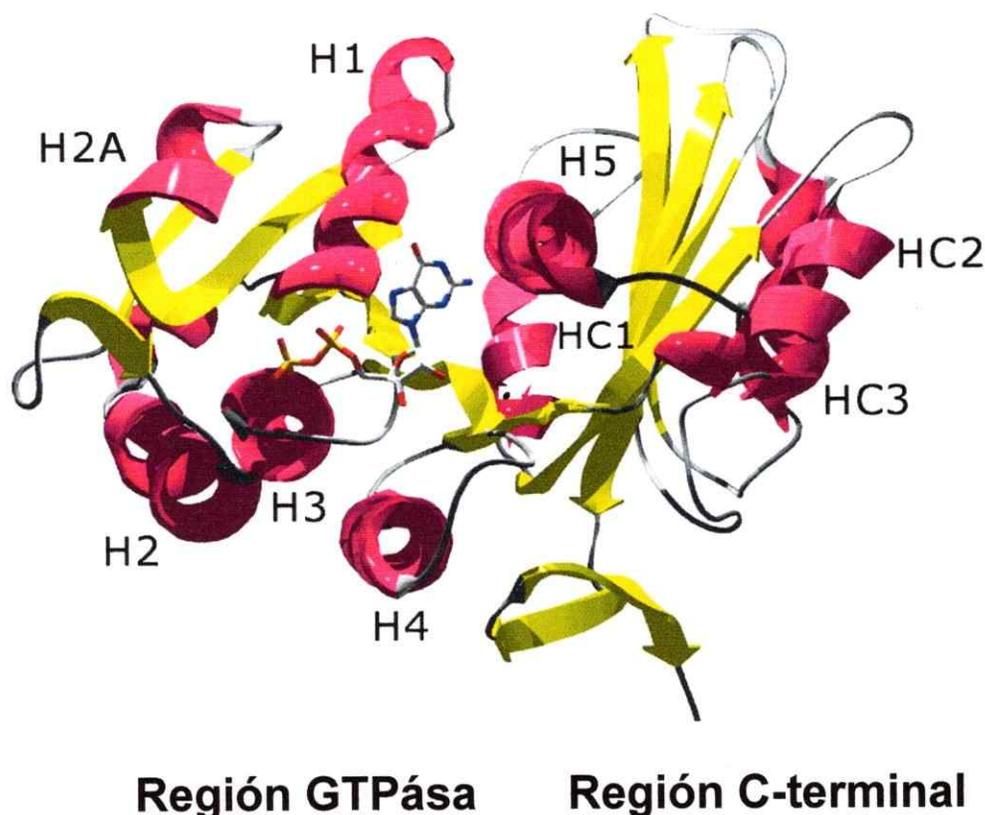


Figura 1. Estructura tridimensional de MjFtsZ en modo "cartoon". Las hélices- α se muestran en rosado, mientras que las hojas- β en color amarillo. Las hélices- α que corresponden a dominio GTPasa están indicadas como H más un número, mientras que las hélices- α del dominio carboxilo terminal están indicadas como HC más el número de orden correlativo desde la primera en el extremo N-terminal. Se muestra el GDP en modelo de alambre, con coloración CPK.

proteína p21^{ras} y con el factor de elongación EF-Tu (Löwe y Amos, 1998). La región carboxilo terminal (residuos 228-356), cuya función es desconocida, es una hoja- β de cuatro hebras (topología 1423, con la hebra 4 anti-paralela) soportada por dos hélices- α a cada lado (HC1, H5 y HC2, HC3). Esta hoja- β está orientada 90° con respecto a la hoja- β del dominio GTP-asa. Ambas regiones están ordenadas alrededor de una

hélice- α central de 23 residuos de largo llamada H5. Al comparar la estructura tridimensional de FtsZ con la de otras proteínas de similar estructura terciaria, se encuentra que la hélice- α H2A es única en FtsZ.

Si bien las estructuras de FtsZ de los organismos antes mencionados contribuyen al conocimiento de esta proteína, la mayoría de los experimentos *in vitro* se han realizado con la FtsZ del mesófilo *Escherichia coli*. Por lo tanto, conocer la estructura de EcFtsZ es de máxima utilidad para relacionar las propiedades de su estructura con su función. Lo que constituye uno de los objetivos de este trabajo de tesis.

A nuestro conocimiento no se ha probado la estabilidad térmica de EcFtsZ y en forma habitual los experimentos se han hecho *in vitro* a temperaturas entre 25 y 30°C. La MjFtsZ recombinante sólo es funcional *in vitro* a 70°C y 2 M de KCl, pues a estas altas temperaturas muestra actividad GTPásica y polimerizante (E. Nova, resultados no publicados; Andreu y col., 2002). De esto podríamos decir que la FtsZ de *M. jannaschii* es una proteína termoestable respecto a la de *E. coli* en términos de su actividad GTPásica. Sin embargo para hacer esta aseveración es necesario conocer la estabilidad térmica estructural de EcFtsZ, lo que constituye otro de los objetivos de esta tesis.

Cuando hablamos de estabilidad térmica surge una pregunta central:

¿Qué fuerzas estabilizan la estructura de una proteína frente al aumento o disminución de la temperatura?

Elementos estructurales responsables de la estabilidad térmica.

La funcionalidad de una proteína depende del correcto balance entre rigidez y flexibilidad de su estructura tridimensional (Závodszky y col., 1998). La estructura a su vez, es mantenida por una serie de fuerzas covalentes y no covalentes que son influenciadas por las condiciones fisicoquímicas del medio en que se encuentra la proteína. Entonces para una secuencia peptídica determinada, un cambio del medio puede afectar las fuerzas que mantienen su estructura tridimensional, alterando su estructura, y por ende su función. Tendremos una proteína térmicamente estable en un rango determinado de temperatura, cuando un cambio de la temperatura dentro de este rango, no afecte mayormente a las interacciones no covalentes que mantienen el correcto balance entre rigidez y flexibilidad estructural que le permiten su funcionalidad (Vieille y col., 2001).

Las interacciones no covalentes que mantienen la estructura tridimensional de las proteínas son de tipo electrostáticas, hidrofóbicas, fuerzas de van der Waals, de London, puentes de hidrógeno y puentes salinos. Mientras que las covalentes son sólo los puentes disulfuro, pues el enlace peptídico es común a todas las proteínas y no constituye un elemento diferenciador en su estabilidad, excepto cuando adopta una determinada conformación. Estas fuerzas están presentes en todas las proteínas, pero en distinta proporción para las distintas estructuras, entonces ¿Qué elementos estructurales hacen termoestable a las proteínas de organismos termófilos e hipertermófilos?

En general, estudios comparativos de la estabilidad de las proteínas mesófilas y termófilas han tenido como objetivo principal llegar a entender las propiedades moleculares responsables de la estabilidad térmica de estas proteínas, sin embargo en ningún estudio se ha llegado a un resultado definitivo donde una sola propiedad sea

exclusivamente la responsable de la estabilidad térmica (Gromiha y col., 1999; Haney y col., 1999a; Kumar y col., 2000; Szilágyi y Závodszky 2000; Vieille y col., 2001). Al parecer esto se debe a que las proteínas emplean diferentes combinaciones de elementos que contribuyen a su adaptación funcional a altas temperaturas.

Entre los elementos responsables de la estabilidad térmica se han mencionado:

1. Una mayor hidrofobicidad
2. Un mejor empaquetamiento, con acortamiento o eliminación de "loops"
3. Menos y menores cavidades
4. Aumento de la superficie oculta después de la oligomerización
5. Aumento del contenido helicoidal
6. Aumento de la superficie polar
7. Aumento de los puentes de hidrógeno
8. Aumento de los puentes salinos (PS)

Se han comparado estadísticamente las propiedades antes numeradas, entre distintas familias de proteínas de organismos mesófilos y termófilos, y sólo se encontró una correlación de la estabilidad térmica con la formación de nuevos puentes salinos y puentes de hidrogeno entre los residuos de aminoácidos (Kumar y col., 2000; Szilágyi y Závodszky, 2000). Haney y colaboradores (1999b) compararon estadísticamente las secuencias peptídicas de organismos mesófilos y termófilos del género *Methanococcus* y encontraron que las propiedades con mejor correlación para explicar la estabilidad térmica en los organismos termófilos eran un aumento del contenido de residuos con mayor volumen, aumento del contenido de residuos hidrofóbicos, más aminoácidos cargados, especialmente Glu, Arg y Lys, menos residuos polares no cargados y una disminución de los residuos termolábiles como Asn y Gln (Haney y col., 1999b). Estos estudios indican que los residuos cargados y los potenciales puentes salinos tendrían

una participación importante en la estabilidad de las proteínas a elevadas temperaturas.

Los puentes salinos son definidos como la interacción entre aminoácidos de carga opuesta a una distancia menor o igual a 5 Å (Figura 2, A), y desde el punto de vista fisicoquímico es comprensible su contribución a la estabilidad térmica pues la fuerza de la mayoría de las interacciones no covalentes que estabilizan a las proteínas como las interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno disminuyen con la temperatura, sin embargo la fuerza de los puentes salinos no disminuye a temperaturas extremadamente altas (Vetriani y col., 1998). Esto se debe a que las interacciones iónicas son las únicas interacciones no covalentes que actúan a larga distancia, y que a elevadas temperaturas la constante dieléctrica del agua disminuye aumentando con esto la fuerza o la energía de interacción iónica.

En la superficie de las proteínas hipertermófilas se encuentra una mayor cantidad de puentes salinos que en las mismas proteínas de origen mesófilo, sin embargo la participación de estos puentes en la estabilidad térmica aún no se encuentra totalmente dilucidada. Un alcance experimental que ha sido aplicado para conocer la participación de los puentes salinos en la estabilidad térmica ha sido la mutagénesis sitio dirigida. Desafortunadamente, se han encontrado resultados contradictorios cuando se han agregado residuos cargados para formar puentes salinos, pues en algunos casos el puente salino ha sido estabilizante (Waldburger y col., 1995), mientras que en otros casos ha resultado desestabilizante. (Hendsch y Tidor, 1994; Marqusee y Sauer, 1994; Xu y col., 1997). Uno de los problemas que tiene la mutagénesis sitio dirigida es la elección del residuo a mutar debido a que éstos se escogen a partir de estructuras cristalográficas rígidas que representan en general un estado conformacional de la proteína y a su vez la distancia atómica está influenciada

por la resolución de la estructura. Se sabe que las proteínas en solución presentan un movimiento estructural que ha sido determinado por estudios de NMR. Esto demuestra que las proteínas en solución son dinámicas y flexibles, en consecuencia la distancia entre los residuos de carga opuesta fluctúa, y con esto cambia su energía, lo que puede estabilizar y desestabilizar enlaces. (Kumar y Nussinov, 2001). Por lo tanto la estabilidad térmica dependería de la población de conformeros que presenten una mayor formación de enlaces a determinada temperatura.

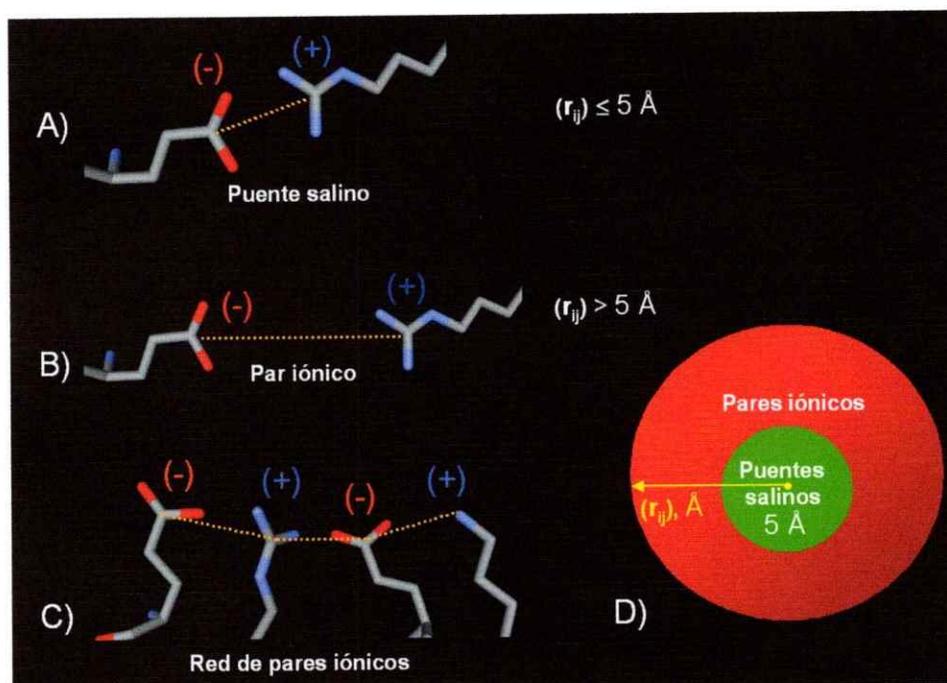


Figura 2. Definición de puente salino, par iónico y sus redes. En A se observa un puente salino, que es definido como la interacción entre aminoácidos de carga opuesta a una distancia menor o igual a 5 Å. En B se observa un par iónico, que es definido como la misma interacción que en A, pero con distancia variables, en este caso a distancias mayores que 5 Å. En C se observa una red de pares iónicos o de puentes salinos, que se forma cuando uno o más residuos cargados se ubican cerca de un par iónico, dando lugar a pares iónicos que comparten residuos en común. En D se esquematiza la relación entre la definición de puentes salinos y de pares iónicos como un diagrama de conjuntos, donde el conjunto de los puentes salinos (en verde) es un subconjunto del conjunto de los pares iónicos (en rojo).

Lo anterior implica que la distancia entre dos residuos cargados es muy importante para una interacción electrostática, de acuerdo a la ley de Coulomb. Con respecto a la distancia que debe haber entre un par de residuos de carga opuesta para ser considerados un puente salino, se han publicado valores desde 4 Å (Barlow y Thornton, 1983) hasta 6 Å (Takano y col., 2000). Si bien, de acuerdo con la ecuación de Coulomb, mientras más cercanas estén las cargas, mayor es la energía de interacción, la pregunta es ¿Cual es la distancia máxima que podemos aceptar para que un puente salino sea estabilizante?. Un estudio sistemático (Kumar y Nussinov, 2002) concluyó que la mayoría de los puentes salinos son estabilizantes si la distancia entre sus cadenas laterales es menor o igual a 5 Å, por lo tanto esta distancia es un buen criterio para definir a un puente salino (Figura 2, A).

El último elemento de la estructura proteica al que se ha adjudicado un papel en el aumento de la estabilidad térmica son las redes de puentes salinos. Estas se forman cuando uno o más residuos cargados se ubican cerca de un puente salino, dando lugar a puentes salinos que comparten residuos en común (Figura 2, C). A partir de la estructura tridimensional de la proteína no es trivial su visualización *in silico*, y a pesar de la gran cantidad de programas bioinformáticos disponibles, no existen programas que permitan una fácil visualización. Las propiedades de las redes se han estudiado experimentalmente en algunas proteínas (Pappenberger y col., 1997), y los resultados muestran que éstas se pueden formar dentro de la misma cadena polipeptídica (intramoleculares) o con otras cadenas (intermoleculares). En la D-gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa de *Thermotoga maritima* (hipertermófilo), la mutación de un residuo de una red intramolecular aceleró la desnaturación térmica respecto a la proteína nativa (Pappenberger y col., 1997). Este resultado muestra la

importancia de un residuo de una red en la mantención en el tiempo de la estabilidad térmica de esta proteína.

La importancia de la formación de las redes superficiales de puentes salinos se entiende desde un punto de vista termodinámico, por la ventaja energética que ésta presenta al disminuir a la mitad el costo de desolvatación de cada puente salino que se agrega a un puente salino ya formado. Este ahorro no es menor si consideramos que la formación de un puente salino se puede homologar a la desolvatación que se produce cuando se traslada la carga desde el solvente acuoso a un ambiente no polar, cuyo costo energético está entre 10 y 16 Kcal/mol (Honig y Hubell, 1984).

El objetivo de esta tesis es identificar las redes de puentes salinos que contribuyen a la estabilidad térmica de MjFtsZ y con este conocimiento, construir mutantes de EcFtsZ que posean los puentes salinos encontrados en la proteína termófila para probar su estabilidad térmica. Un hecho importante es que FtsZ no contiene puentes disulfuro que puedan enmascarar el efecto de los puentes salinos. Por otro lado la identidad de secuencia entre ambas proteínas es de un 47% lo que permitirá obtener la estructura tridimensional de EcFtsZ a partir de la de MjFtsZ que se determinó por difracción de Rayos X. Como ya se mencionó, también se conoce la estructura tridimensional de PaFtsZ de *P. aeuroginosa*, un organismo mesófilo que permitirá comparar su estructura con la del modelo que obtengamos para EcFtsZ mesófila.

La proposición del estudio de las estructuras tridimensionales tiene una ventaja comparativa respecto a la comparación de secuencias primarias, las cuales no han sido útiles para encontrar regiones de secuencia que sean responsables de la estabilidad térmica, pues podremos comparar regiones de la superficie de la proteína

que contengan puentes y redes de puentes salinos responsables de la estabilidad térmica. En consecuencia formulamos la siguiente hipótesis de trabajo:

“La formación de redes de puentes salinos, presentes en MjFtsZ, sobre la superficie de EcFtsZ debiera aumentar su estabilidad térmica”

Objetivos Generales

- 1) Determinar las diferencias entre los residuos cargados y las redes de puentes salinos en la estructura de FtsZ de *Methanococcus jannashii* y FtsZ de *Escherichia coli*.
- 2) Introducir residuos cargados presentes en las redes de MjFtsZ en EcFtsZ y determinar experimentalmente el efecto de estas sobre las propiedades estructurales de EcFtsZ y su estabilidad térmica.

Objetivos específicos

- 1) Modelar por su homología estructural con MjFtsZ la estructura tridimensional de EcFtsZ
- 2) Comparar en las estructuras tridimensionales de MjFtsZ y EcFtsZ, los residuos cargados, los pares iónicos, los puentes salinos y sus redes.
- 3) Diseñar *in silico* las mutantes sitio específicas en EcFtsZ donde se aumente la cantidad de residuos cargados que participen en la formación de redes de puentes salinos.
- 4) Construir las mutantes con herramientas de biología molecular.
- 5) Purificar EcFtsZ de tipo silvestre y sus mutantes.

6) Determinar el porcentaje de estructura secundaria, la polimerización, la actividad GTPásica, la estabilidad térmica, y la forma de los filamentos en EcFtsZ silvestre y sus mutantes.

7) Determinar la complementación *in vivo* de EcFtsZ silvestre y sus mutantes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Modelaje comparativo. Se construyeron 20 modelos de EcFtsZ con el programa MODELLER (Sali y col., 2000). Se utilizó como templado la estructura de MjFtsZ (PDB ID: 1FSZ), determinada por cristalografía de rayos X, a una resolución de 2,8 Å (Löwe y Amos, 1998). Todos los modelos se evaluaron con el programa Verify-3D (Lüthy y col., 1992) y se eligió el modelo de mayor puntuación para las comparaciones y mediciones.

Localización de los pares iónicos y puentes salinos en EcFtsZ y MjFtsZ. Se define como par iónico a dos residuos de carga neta opuesta (aspartato ó glutamato versus arginina, lisina ó histidina). Se define como puente salino (PS) a la interacción en un espacio esférico de radio menor o igual a 5 Å entre un átomo de oxígeno de un grupo carbonilo de un residuo de aspartato o glutamato con un átomo de nitrógeno de un residuo de lisina, arginina o histidina. Para encontrar estos puentes salinos se creó un 'script' o programa que funciona bajo el programa Swiss-PDBV (Guex y Peitsch, 1997). El algoritmo utilizado fue básicamente el siguiente: 1) Se determinaron las coordenadas de todos los residuos cargados. 2) Se determinaron las distancias entre todos y cada una de las coordenadas obtenidas 3) Se seleccionaron sólo las parejas de pares iónicos que se encontraban a una distancia menor a 8 Å, desde donde se seleccionaron los puentes salinos. Los pares iónicos obtenidos se clasificaron según su distancia (menores que 4 Å, entre 4 y 5 Å, entre 5 y 6 Å y entre 6 y 7 Å).

Mutagénesis sitio-dirigida. Se utilizó el "kit" QuickChange de Stratagene (USA). En resumen: se diseñaron partidores complementarios para la zona que contenía el sitio de la mutación (Ver Anexo). En este sitio se cambiaron los nucleótidos necesarios para

realizar la mutación puntual. Con estos partidores y el plasmidio pMFV57 que contiene al gen *ftsZ* de *E. coli* (ver Anexo) se realizaron veinte ciclos de PCR. El producto de la reacción se digirió con la enzima Dnp I, y luego se electroporó en la cepa XL10 de *E. coli*. Las cepas se sembraron en placas con sus antibióticos respectivos y se seleccionaron las colonias que crecieron (Ver figura 3). A estas colonias se les extrajo el DNA plasmidial, el cual se digirió con varias enzimas para asegurar que el plasmidio tuviera el tamaño esperado (resultados no mostrados). Los plasmidios de tamaño esperado se electroporaron en la cepa C41, con el fin de expresar la proteína FtsZ. Su expresión se comprobó mediante un ensayo de sobre-expresión después de inducirla con IPTG, como se explica más adelante en la sección "Ensayo de la expresión de proteínas". A las colonias que cumplían con los requisitos anteriores se les extrajo su DNA plasmidial con el "kit" E.Z.N.A. (Omega Bio-tek) y se envió a secuenciar.

Purificación del DNA plasmidial. Para purificar el DNA plasmidial se creció un cultivo bacteriano con el plasmidio a 37°C, por 12 a 16 h o por toda la noche con agitación en 3 ml de medio LB suplementado con 75 µg/ml de ampicilina. 1,5 ml del cultivo celular se centrifugaron a máxima velocidad en tubos Eppendorf durante 1 min en una microcentrífuga Labnet Modelo Spectrafuge 16M. Se eliminó el sobrenadante y al precipitado se le agregaron 1,5 ml de cultivo que se volvieron a centrifugar. El precipitado de bacterias se suspendió por agitación en 200 µl de amortiguador que contenían: 50 mM de glucosa, 25 mM de Tris-HCl, pH 8,0 y 10 mM de EDTA y se dejó en reposo por 5 min a temperatura ambiente y se

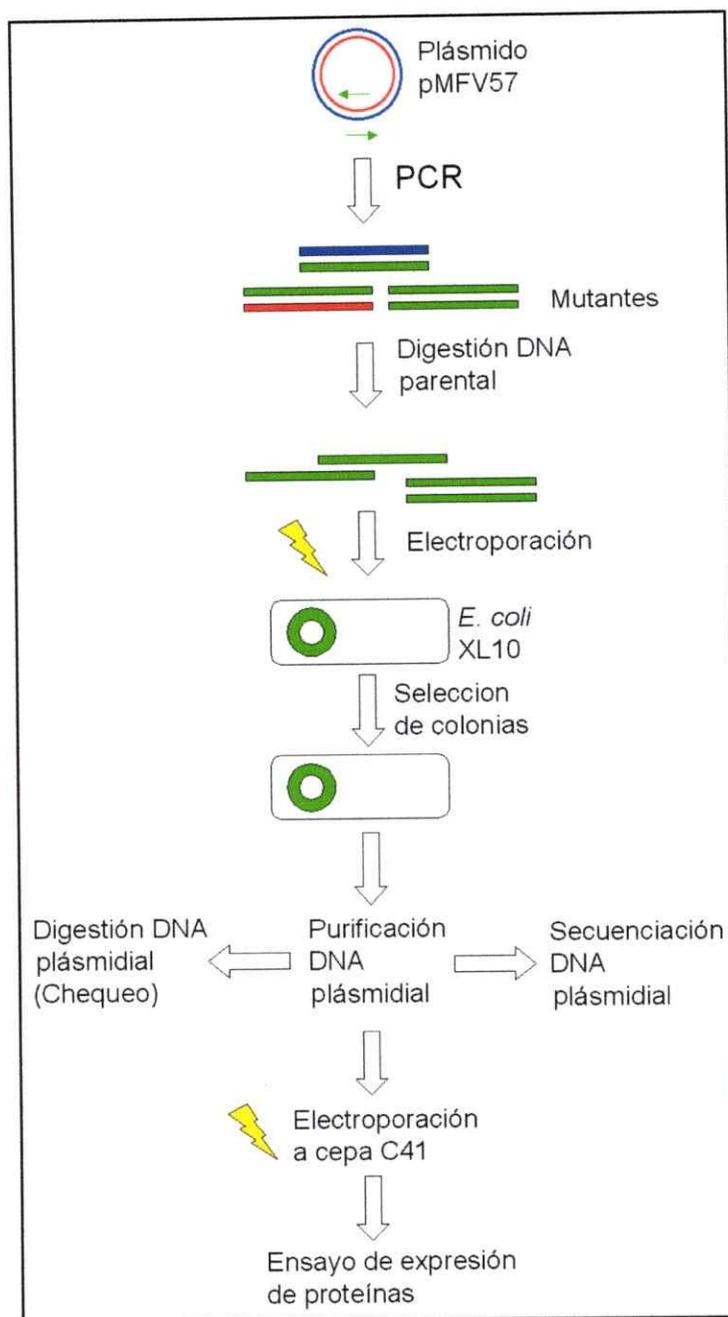


Figura 3. Diagrama de flujo de la mutagénesis sitio-dirigida. En la figura se muestran los pasos realizados para la obtención de los mutantes puntuales. La secuenciación se realizó sólo cuando la digestión de chequeo y el ensayo de expresión de proteínas dieron resultados positivos. Las flechas verdes son los partidores.

agregaron 400 μ l de solución formada con 1 ml de 10% SDS, 0,2 ml de 10 M NaOH y 8,8 ml de agua nanopura y la solución se mezcló invirtiendo los tubos 10 veces. Se dejó en hielo por 5 min y se observó si la solución estaba clara y viscosa, en caso contrario se esperó más tiempo. La solución se centrifugó a 13.000 rpm por 10 min en la micro centrífuga. Se extrajo el sobrenadante y se puso en un tubo Eppendorf previamente rotulado. Al tubo se le agregaron 250 μ l de una solución de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico en proporciones de 25:24:1, la solución se agitó con un "vórtex" por 10 s y centrifugó por 5 min en la micro centrífuga. Se extrajo la fase acuosa y se colocó en un tubo Eppendorf al que posteriormente se le agregaron 250 μ l de una solución de cloroformo:alcohol isoamílico en proporción 24:1, se agitó mediante "vórtex" y se centrifugó por 5 min en la micro centrífuga. Se extrajo la fase superior o fase acuosa que contiene el DNA y se depositó en un tubo Eppendorf, al que se agregaron 0,6 volúmenes de isopropanol (aproximadamente 500 μ l), se homogenizó y se dejó a -20°C por 10 min para precipitar el DNA. La mezcla se centrifugó a 4°C en una micro centrífuga a 13.000 rpm durante 30 min. El sobrenadante se removió mediante aspiración al vacío, y después el DNA se lavó suspendiéndolo en 200 μ l de etanol frío al 70% y se centrifugó por 5 min a 13.000 rpm. Se removió el sobrenadante por aspiración al vacío y se dejaron los tubos invertidos sobre papel filtro durante 15 min a temperatura ambiente. Se disolvió el precipitado de DNA en 100 μ l de agua nanopura destilada y se agregaron 5 μ l de RNAsa (10 mg/ml) previamente hervida y la mezcla se incubó por 20 min a 37°C antes de almacenarlo a -20°C .

Optimización de la reacción de PCR para la mutagénesis sitio-dirigida. La optimización de la reacción se hizo en un termociclador marca Perkin Elmer, modelo

GeneAmp PCR system 9600. Se probaron diferentes condiciones para la reacción de la mutante Q185K y se encontraron las siguientes condiciones óptimas: 2,5 μ l de amortiguador con $MgCl_2$ para la polimerasa Pfu; 0,5 μ l de 10 mM dNTPs; 1 μ l de cada uno de los dos partidores (50 μ M); 1 μ l del DNA plasmidial pMFV57 (20ng/ μ l); 18,5 μ l de agua nanopura; 0,5 μ l de polimerasa Pfu turbo (2,5 U/ μ l) (volumen total de reacción 25 μ l). El programa del termociclador fue: 5 min a 95°C más 20 ciclos de: 1 min a 95°C, 1 min a 55°C y 20 min a 68°C. Una vez finalizados los 20 ciclos se dejó 7 min adicionales a 72°C.

Para la proteína mutante N328R las condiciones óptimas fueron: 2,5 μ l de amortiguador con $MgCl_2$ para la polimerasa Pfu; 0,5 μ l de 10 mM dNTPs; 0,5 μ l de cada uno de los dos partidores (50 μ M); 2 μ l del DNA plasmidial pMFV57 (20 ng/ μ l); 19 μ l de agua nanopura; 0,5 μ l de polimerasa Pfu turbo (2,5 U/ μ l) (volumen total de reacción 25 μ l). El programa del termociclador fue: 5 min a 95°C más 20 ciclos de: 1,5 min a 95°C, 1 min a 65°C y 20 min a 68°C. Una vez finalizados los 20 ciclos se dejó 7 min adicionales a 72°C.

Digestión del DNA plasmidial. Para verificar el DNA plasmidial purificado se digirió con las enzimas Sal I, EcoR V, Hind III. Con este propósito, se agregaron 2 μ l del DNA plasmidial a un tubo Eppendorf y se completó la mezcla de reacción con: 6,5 μ l de agua nanopura, 1 μ l del tampón 10X de la enzima respectiva, y 0,5 μ l de la enzima de restricción a utilizar. La mezcla se incubó por 2 h a 37°C. La digestión se comprobó en un gel de agarosa al 1%.

Secuenciación del DNA. El gen *ftsZ* de las mutantes se secuenció en su totalidad en el laboratorio de genética de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile donde se utilizó un secuenciador marca Avant Genetic Analyser, modelo 3100 de Applied Biosystems. Las secuencias se muestran en el Anexo.

Ensayo de expresión de las proteínas. El procedimiento para comprobar la expresión de las proteínas se hizo de la siguiente forma:

Se picó una colonia y se creció a 37°C, con agitación, en 5 ml de medio LB suplementado con ampicilina a una concentración final de 0,1 mg/ml, hasta alcanzar una D.O.₆₀₀ de 0,7. Al medio de cultivo se le agregó IPTG para alcanzar una concentración final de 0.6 mM y se dejó crecer las bacterias por 4 h. Se sacó 1,3 ml del medio de cultivo y se puso en un tubo Eppendorf y se centrifugó a 14.000 rpm por 1 min y se descartó el sobrenadante. Se agregaron otros 1,3 ml de cultivo al mismo tubo Eppendorf, y se centrifugaron a 14.000 rpm por 1 min y se volvió a descartar el sobrenadante. El precipitado se suspendió en 1ml de tampón PEM y se centrifugó por 1 min a 14.000 rpm y se descartó el sobrenadante. Esta operación se repitió una vez mas y el precipitado se suspendió en 100 µl de tampón PEM. Se tomaron 20 µl de esta solución y se mezclaron con 5 µl de tampón de carga 4x, se agitó y se hirvió por 10 min y se centrifugó por 15 min a 14.000 rpm. Se tomaron 10 µl del sobrenadante, se aplicaron en un gel SDS-PAGE al 10% y las proteínas se separaron por electroforesis con un voltaje constante de 90 V y la corriente se ajustó automáticamente. Las proteínas en el gel se revelaron con azul de Coomasie.

Purificación de EcFtsZ. Para la purificación de EcFtsZ se siguió el protocolo descrito por Rivas y col. (2000) que se basa en la formación de hojas de polímeros de la proteína con 20 mM CaCl₂, que se separan por centrifugación. Las etapas de este procedimiento fueron las siguientes:

- 1) Se inoculó 1 litro de medio LB con la cepa C41 que contiene el plasmidio pMFV57.
- 2) Se creció el cultivo a 37°C con agitación, hasta alcanzar una D.O.₆₀₀ = 0,7
- 3) Se agregó IPTG hasta una concentración final de 0,2 mM y se dejó a 37°C con agitación por 3 h y se centrifugó el cultivo a 4.800 rpm en una centrifuga Sorvall RC-3B, a 4°C por 30 min.
- 4) Se desechó el sobrenadante, y se suspendió el precipitado en tampón PEM, en una proporción de 20 ml por litro de cultivo y se transvasó la solución a un vaso de precipitado de vidrio en hielo.
- 5) Las bacterias se rompieron por sonicación en un sonicador Misonix Sonicator 3000 con una sonda de media pulgada de diámetro que se introdujo en la solución evitando que quedara en contacto con las paredes o con el fondo del vaso. El vaso se mantuvo en hielo para evitar el calentamiento de la solución. Se realizaron 5 pulsos de 20 s con una pausa de 1 min a una potencia de 5 en la escala del instrumento.
- 6) El producto de la lisis bacteriana se centrifugó a 28.000 rpm por 90 min a 4°C en una ultra centrifuga Beckman, modelo L5-75B, con un rotor tipo 30. El sobrenadante se transfirió a un tubo Falcon estéril de 50 ml, a temperatura ambiente.

- 7) A la solución se le agregó GTP a una concentración final de 1 mM y CaCl_2 a una concentración final de 20 mM. Habitualmente la solución se incubó a 30°C durante 15 min para obtener el máximo de precipitado. En caso contrario se esperó 5 ó 10 min más para que la solución estuviera lo suficientemente turbia y densa.
- 8) Se transfirió la solución a 2 tubos Pyrex de 15 ml y se centrifugaron en una centrifuga Beckman Avanti 30 con un rotor F0650 durante 15 min a 10.000 x g. Se desechó el sobrenadante y cada precipitado se suspendió en 10 ml de tampón PEM frío para tener una proporción de 20 ml tampón PEM por litro de cultivo.
- 9) Las soluciones se centrifugaron por 15 min a 10.000 x g a 4°C. Se transfirió el sobrenadante a un tubo Falcon estéril de 50 ml y se descartó el precipitado. Se repitieron las etapas 7 y 8, excepto que cada precipitado de la etapa 8 se suspendió en 5 ml de tampón PEM frío utilizando una pipeta Pasteur.
- 10) La solución se centrifugó por 15 min a 10.000 x g a 4°C. Los sobrenadantes se transfirieron a un tubo Falcon estéril y se desechó el precipitado.
- 11) El sobrenadante se cargó en un "loop" de 5 ml del equipo de HPLC Beckman System Gold a una velocidad de 1 ml por min que se mantuvo durante todas las etapas de la cromatografía. La muestra se transfirió a una columna de intercambio aniónico Hi-Trao Q-Sepharose, conectada en línea, que se lavó y equilibró previamente en tampón A (5 mM de MgCl_2 , 0,1 mM de EDTA, 10% de glicerol y 50 mM de tampón Tris pH 8,0). La proteína se eluyó con un gradiente lineal de tampón B (1 M KCl, 5 mM de MgCl_2 , 0,1 mM de EDTA, 10% de glicerol y 50 mM de tampón Tris pH 8,0) que aumentó de 10 a 70% en

cuatro volúmenes de columna y se colectaron fracciones de 2 ml. Se juntaron las fracciones que contenían FtsZ y se dializaron a 4°C, contra 100 volúmenes de tampón C (10% de glicerol y 50 mM de tampón Tris pH 8,0) por al menos 4 h o durante la noche con 2-3 cambios de tampón C.

12) La proteína se concentró al centrifugarla a 3800 rpm en un Centriprep C-30 por 15 min a 4°C. Esta centrifugación se repitió luego de agregar aproximadamente 2 ml de filtrado para lavar las paredes del Centriprep. La proteína concentrada a un volumen de 1 ml se guardó en alícuotas de 100 µl en un Freezer a -80°C, luego de congelarlas rápidamente en metanol a -80°C.

Cuantificación de EcFtsZ. La proteína desnaturada en GdmCl 6 M en tampón fosfato de sodio pH 6,5, se cuantificó a 280 nm en un espectrofotómetro Hewlett Packard modelo 8452A y con un coeficiente de extinción molar de 12.000 L moles⁻¹ cm⁻¹. El coeficiente de extinción molar de la proteína, que contiene GDP, se calculó como la suma del coeficiente de extinción molar de la proteína, 3840 L moles⁻¹ cm⁻¹, determinado a partir del contenido de aminoácidos aromáticos, más el coeficiente de extinción molar de GDP 8100 L moles⁻¹ cm⁻¹ (Rivas y col., 2000). También se utilizó el método de Bradford de acuerdo a las instrucciones dadas por el fabricante Bio-Rad. BSA se utilizó como proteína estándar para construir una curva de calibración que se comparó con la de FtsZ. La relación entre ambas pendientes se comparó con los valores publicados por el laboratorio de Erickson (Erickson y col., 1998).

Polimerización de EcFtsZ. La polimerización de EcFtsZ se siguió por la dispersión de la luz que producen los polímeros a una longitud de onda de 350 nm. El medio de

ensayo de la polimerización contenía: Tampón MES 50 mM, pH 6,5, 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 0,4 mg/ml de EcFtsZ, en un volumen final de 0,5 ml. Para iniciar la polimerización se agregó GTP a una concentración final de 1 mM. Los ensayos de dispersión de luz ó "scattering" a 90° se realizaron en un espectrómetro de luminiscencia Perkin Elmer LS-50. La longitud de onda de excitación y de emisión fue de 350 nm. El ancho de banda fue de 10 nm para la excitación y 5 nm para la emisión. El porta cubetas se mantuvo a 25°C con un baño de agua circulante termoregulado.

Concentración crítica. La concentración crítica se determinó al graficar los valores máximos promedio de dispersión de luz que se alcanzaron una vez que la polimerización se estabilizó, luego de agregar el GTP, versus las diferentes concentraciones de proteína utilizadas. Los experimentos de polimerización se hicieron en las condiciones experimentales descritas en el párrafo anterior y la concentración de proteína se varió desde 0,1 a 0,5 mg/ml. Para iniciar la polimerización se agregó GTP a una concentración final de 1 mM.

Dicroísmo circular. Las mediciones se hicieron en un espectropolarímetro JASCO J-600 en la región del UV cercano entre 190 y 250 nm en una celda de cuarzo de 1 mm de paso de luz a temperatura ambiente. Los espectros resultaron de un promedio de 4 mediciones. Los parámetros del instrumento fueron: ancho de banda 1 nm, ancho de ranura (SW) automático, tiempo de respuesta del instrumento 2 s y velocidad de barrido 20 nm/min. La concentración de EcFtsZ silvestre y de las mutantes fue 0,36 mg/ml, en tampón Tris-HCl 50 mM pH 8,0 y 50 mM de KCl. Se utilizó el tampón como blanco. A partir de los espectros se calcularon los porcentajes de estructura secundaria de la proteína con el programa CONTIN (Provencher y Glackner, 1981).

Estabilidad térmica. La estabilidad térmica de EcFtsZ y las mutantes se determinó a partir de las curvas de polimerización. La proteína en ausencia GTP se incubó por cinco minutos a una determinada temperatura (shock térmico), luego fue puesta rápidamente en hielo donde permaneció aproximadamente 10 min y se dejó a temperatura ambiente hasta que alcanzó el equilibrio térmico, el cual se verificó por medio de una termocupla, antes de iniciar los experimentos de polimerización. El efecto del "shock" térmico sobre la estabilidad de la proteína se calculó a partir de la razón entre los valores máximos de polimerización de la proteína sometida a "shock" térmico y el de control no sometido a shock térmico, que se dejó en hielo y se expresó como porcentaje. Este porcentaje se graficó en función de la temperatura del "shock" térmico.

Desnaturación con cloruro de guanidinio. La proteína, 0,4 mg/ml concentración final, se desnaturalizó en tampón Hepes 50 mM, pH 7,5 con concentraciones crecientes de GdmCl hasta llegar a 6 M, en un volumen final de 0,5 ml. La mezcla se incubó una hora a temperatura ambiente antes de la medición de fluorescencia. La longitud de onda de excitación fue 280 nm y se registró su espectro de emisión de fluorescencia entre 300 y 400 nm. Los anchos de banda de excitación y emisión fueron 10 y 5 nm, respectivamente. La solución madre de 8 M GdmCl se preparó por gravimetría, y su concentración final se determinó por refractometría en un refractómetro Galileo de acuerdo a la relación:

$$[M] = 57,127 \times \Delta N + 38,68 \times \Delta N^2 - 91,60 \times \Delta N^3$$

Donde ΔN es la diferencia entre el índice de refracción entre la solución de GdmCl y el agua en la línea de sodio (Creighton, 1997).

Complementación *in vivo*. La complementación de la función de EcFtsZ se determinó en la cepa VIP2(DE3) de *E. coli* donde el gen cromosomal *ftsZ* está interrumpido con un gen de resistencia a kanamicina y además posee una copia del gen *ftsZ* en un plasmidio cuyo origen de replicación es termosensible. Para complementar la función de FtsZ se electroporó el plasmidio pMFV57 que contiene el gen *ftsZ* silvestre en la cepa VIP2(DE3). Las bacterias se sembraron a distintas diluciones en dos placas de agar sólido con medio LB suplementado con kanamicina más ampicilina. Una placa se incubó a 30°C y la otra a 42°C. Debido a la termosensibilidad del origen de replicación del plasmidio, éste se perdió a 42°C y sólo crecen las bacterias que tienen el plasmidio pMFV57 que porta el gen de EcFtsZ que no es termosensible. Se contaron las colonias en cada placa, se aproximó el número de unidades formadoras de colonias por ml y se calculó el porcentaje de supervivencia a 42°C con relación al de 30°C que sirve como control de viabilidad. Se usó también como control las células sin electroporar que da el límite de no viabilidad.

Microscopía electrónica. La polimerización de EcFtsZ se hizo en las mismas condiciones experimentales ya descritas. Se tomó una muestra de 20 µl después de 3 min de iniciada la polimerización que se depositó en una grilla de 300 "mesh" cubierta con un film de resina de FORMVAR (Pelco) y carbón. Se esperó 30 s y con el vértice de un papel filtro se retiró el exceso de líquido. La grilla se tiñó sumergiéndola en forma seriada en seis gotas de acetato de uranilo al 2 % que se habían depositado sobre un parafilm. En la última gota se esperó dos minutos y el exceso de colorante se secó con el vértice de un papel filtro. Las grillas se observaron en un microscopio electrónico CARL ZEISS EM 109 con un aumento de 50.000 x.

Actividad GTPásica. La velocidad de la reacción de hidrólisis del fosfato gama del GTP se determinó por dos métodos, uno radiactivo con $\text{GTP}\gamma^{32}\text{P}$ y el otro colorimétrico con verde de malaquita. En el primero, a una solución que contenía en un volumen final de 1,5 ml: MES 50 mM, pH 6,5, 50 mM KCl, 10 mM MgCl_2 y 0,4 mg/ml de EcFtsZ se le agregó, en promedio, 22370 CPM de $[\gamma^{32}\text{P}]\text{GTP}$, se incubó a 30 o 40°C a distintos tiempos como se indica en resultados. La reacción se detuvo agregando un volumen de una suspensión de carbono activado en KCl 2 M a pH 1,8 (100 mg/ml). El carbón se removió por centrifugación a 15.000 rpm, por 6 min en una microfuga BHG, modelo HERMLE Z229 y se determinó la radiactividad del fosfato radiactivo libre en el sobrenadante en una mezcla de centelleo líquido que contenía Arcotol (300 ml de Arcopal más 600 ml de líquido de centelleo, el que a su vez está formado por 4 l de tolueno más 16 g de PPO más 200 mg de POPOP). La radiactividad de las muestras se expresó en CPM y éstas se contaron en un contador de centelleo líquido Packard modelo 1600P.

En el segundo método se siguió el protocolo de Lanzetta (Lanzetta y col., 1979) en el que 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 4 N de HCl (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 Triton 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 a un tubo Eppendorf, y se le agregó ácido perclórico a una concentración final de 10% y se dejó en reposo por cinco min a temperatura ambiente. De esta solución se tomaron 50 μl y se transfirieron a un tubo Eppendorf al que se

agregó 800 μl de la solución VM-MA-TX y se mezcló vigorosamente en "vórtex" por un minuto y se agregaron 100 μl de tampón citrato al 34%. Se esperó 20 min antes de medir la DO a 660 nm en el espectrofotómetro. La curva de calibración se hizo con fosfato mono potásico en un rango de 0 a 10 nanomoles de fosfato.

RESULTADOS

Los resultados se presentarán en dos partes, una teórica donde se analizará *in silico* la superficie de la proteína mesófila EcFtsZ, para encontrar la mejor ubicación de las mutaciones puntuales a realizar y así reemplazar algunos aminoácidos que en la proteína hipertermófila, MjFtsZ, forman puentes salinos, los que serían responsables de su estabilidad térmica y una segunda parte, experimental, donde se mostrará el efecto de estas mutaciones sobre la estructura secundaria, la funcionalidad y la estabilidad térmica de las mutantes.

I. PARTE TEORICA *IN SILICO*

Modelaje comparativo. El modelaje comparativo requiere de una identidad de secuencia mínima (> 30%) entre la proteína que se modela y su templado (Sánchez y Sali, 1997). El alineamiento de la secuencia del templado (MjFtsZ) y la del modelo (EcFtsZ) presentó un 47% de identidad (Figura 4) lo que fue suficiente para obtener un modelo de calidad. La estructura tridimensional de MjFtsZ se obtuvo a partir de difracción de Rayos X donde los extremos amino y carboxilo terminal no mostraron una estructura ordenada (Löwe y Amos, 1998). Por esto la estructura tridimensional resuelta de MjFtsZ corresponde a los residuos 23 a 356, que cubren un 92% de la secuencia del gen. De allí que la estructura tridimensional modelada de EcFtsZ abarca los residuos 10 a 330, que corresponden al 84% de los aminoácidos codificados en el gen de *ftsZ*.

En la figura 5 se observa la estructura del templado (MjFtsZ) y el modelo (EcFtsZ). Ambas estructuras fueron superpuestas y presentan un RMSD igual a 0,27 Å, lo que significa una desviación entre ambas estructuras menor que la distancia interatómica de cualquier enlace de la proteína. Con este modelo podemos determinar

de manera confiable el número de puentes salinos que existen en EcFtsZ y compararlo con los del termófilo MjFtsZ.

Número de residuos cargados en EcFtsZ y MjFtsZ. En la tabla 1 se muestra el número y el tipo de residuos cargados que se encuentran en la secuencia del templado (MjFtsZ) y del modelo de EcFtsZ. En ésta tabla se observa que en la estructura de MjFtsZ, del hipertermófilo *M. janaschii*, hay un mayor número de residuos cargados totales que en la estructura del mesófilo EcFtsZ de *E. coli*. Esta diferencia se debe principalmente a la mayor cantidad de residuos lisina presentes en MjFtsZ.

```

EcFtsZ -----MFEPMLTNDAVIKVIGVGGGGNAVEHMRERIEGVFFAVNTDAQALRKTAVGQTIQIGSGITKGLGAGANP
MjFtsZ SPEDKELLEYLQQT-KAKITVVGCGGAGNNTITRLKMEGIEGAKTVAINNTDAQQLIRTKADKKILIGKKLTRGLGAGGNP
ruler 1.....10.....20.....30.....40.....50.....60.....70.....80

EcFtsZ EVGRNAADEDRDALRAALEGADMVFIAGMGGGTGTGAAPVVAEVAKDLGILTVAVVTKPFNFEGKKRMAFAEQGITELS
MjFtsZ KIGEEAAKESAEIKAAIQDSDMVFITCGLGGGTGTGSAPVVAEISKKIGALTVAVVTLFPVMEGKVRMKNAMGLERLK
ruler .....90.....100.....110.....120.....130.....140.....150.....160

EcFtsZ KHVNSLITIPNDKLLKVLGRGISLDDAFGAANDVLKGAQQGIAELITRPGMLMNVDFADVRTVMSEMHGAMMGGSVASGED
MjFtsZ QHTDTLVVIPNEKLFKIVPN-MPLKLAFKVADEVLINAVKGLVELITKDGLINVDADVRAVMNNGGLAMIGIGESDSEK
ruler .....170.....180.....190.....200.....210.....220.....230.....240

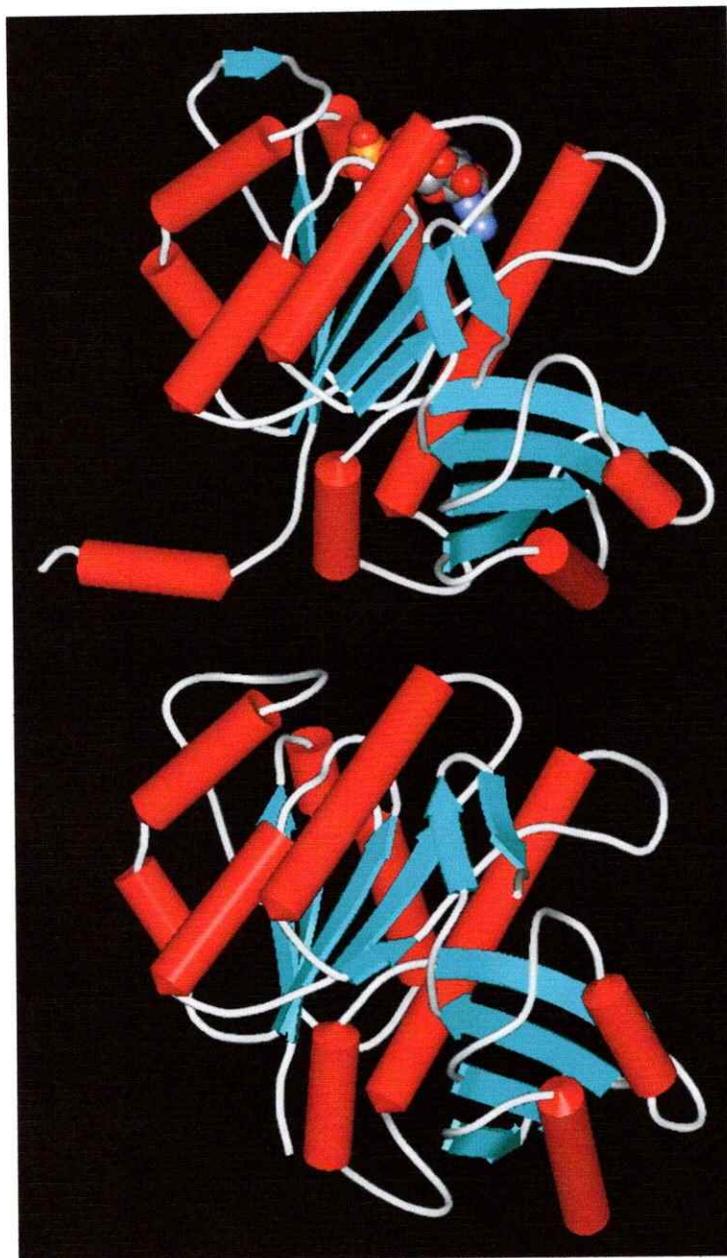
EcFtsZ RAEEAAEMAISPLLEDIDLSGARGVLVNIAGFDLRLDEFETVGNTRAFASDNATVVIGTSLDPMNDELRTVVATG
MjFtsZ RAKEAVSMALNSPLLD-VDIDGATGALIHVMGPEDLTLEAREVAVTVSSRLDPNATIIWGATIDENLENTVRLVLTIG
ruler .....250.....260.....270.....280.....290.....300.....310.....320

EcFtsZ IGMDKRPEITLVTKQ- 330
MjFtsZ VQSRIEFTDTGLKRKLL 334
ruler .....330.....

```

Figura 4. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de FtsZ de *E. coli* (EcFtsZ) y *M. janaschii* (MjFtsZ). Los residuos de carga positiva se encuentran destacados con fondo celeste, y los de carga negativa con fondo rojo. Los residuos idénticos están indicados con un asterisco, y los de similar propiedad fisicoquímica con dos puntos. Las secuencias tienen un 47% de Identidad y un 67% de similitud.

MjFtsZ



EcFtsZ

Figura 5. Comparación de la estructura tridimensional de MjFtsZ, y EcFtsZ. En ambas proteínas se muestran en color rojo las α -hélices y en celeste las hebras- β , el resto de la proteína esta en color gris. Una molécula de GDP se muestra en modo "spacefill" y coloreado por CPK. Los carbonos α de ambas estructuras se superpusieron y el RMSD fue de 0,27 Å.

Tabla 1. Comparación de la composición de aminoácidos cargados en EcFtsZ y MjFtsZ.

Proteína	Número de aminoácidos cargados ^a					Totales
	D	E	K	R	H	
EcFtsZ	22	23	13	16	2	76
MjFtsZ	28	18	29	11	2	88

^a Código de aminoácidos de una letra: E, glutamato; D, aspartato; K, lisina; R, arginina y H, histidina. En color rojo se muestran los residuos con carga negativa y en azul los de carga positiva. El número en azul destaca el mayor número de residuos K.

Número de pares iónicos y puentes salinos. El número de puentes salinos (distancia entre las cargas ≤ 5 Å) y de pares iónicos (distancia entre las cargas entre 5 y 8 Å) determinados a partir de la estructura de MjFtsZ y de EcFtsZ se muestra en la figura 6. Se observa que MjFtsZ posee 28 puentes salinos y EcFtsZ 18. La misma tendencia se observa para los pares iónicos en el rango de distancias de 5-6 Å donde hay 14 para MjFtsZ y 3 para EcFtsZ. Esta tendencia se invierte a mayores distancias, así, en el rango de 6-7 y de 7-8 Å hay 12 y 15 para EcFtsZ y 1 y 3 para MjFtsZ, respectivamente. Por lo tanto en la proteína termófila hay una mayor cantidad de puentes salinos y una mayor capacidad para formarlos en el rango de 5 a 6 Å. En la proteína mesófila esta capacidad se ve disminuida por la mayor distancia a que se encuentran los grupos, entre 6 y 8 Å, aunque haya una mayor cantidad de pares iónicos. Los puentes salinos no solo se pueden formar entre dos cargas opuestas

adyacentes, sino que también pueden participar otras cargas cercanas, dando origen a redes de puentes salinos.

Redes de puentes salinos. En la figura 7 se muestran las redes de puentes salinos presentes en la superficie de ambas proteínas. Se observa que MjFtsZ puede formar 4 redes con una mayor cantidad de residuos que participan en la red, la más extensa involucra 10 residuos y participan residuos de los extremos N-terminal y C-terminal. EcFtsZ puede formar tres redes y la más extensa involucra a 5 residuos y esta ubicada en el extremo C-terminal.

Diseño de nuevas redes de puentes salinos por mutaciones puntuales. Para determinar la importancia de los puentes salinos y sus redes en la estabilidad térmica, se diseñaron mutantes de EcFtsZ para formar redes semejantes a las de MjFtsZ. Con este propósito se localizaron y compararon aquellas zonas de redes del organismo termófilo con las del mesófilo y se seleccionaron aquellas donde, a través de una mutación puntual en EcFtsZ, se indujera la formación de una red. Se encontraron dos mutaciones que cumplen con el criterio anterior: Q194R y N328R que en la figura 7C se destacan en color amarillo. Así, la mutación Q194K es capaz de generar dos nuevos puentes salinos en el modelo de EcFtsZ (figura 8B silvestre y C, mutada), que dan origen a una red que se conecta con una red pre-existente y forma una red más extensa, que es equivalente a la red más extensa de MjFtsZ (figura 8A). La mutación N328R induce en el modelo de EcFtsZ la formación de dos nuevos puentes salinos, los que forman una nueva red (figuras 8E, silvestre y F, mutada), la que es equivalente a una red de MjFtsZ (figura 8D)

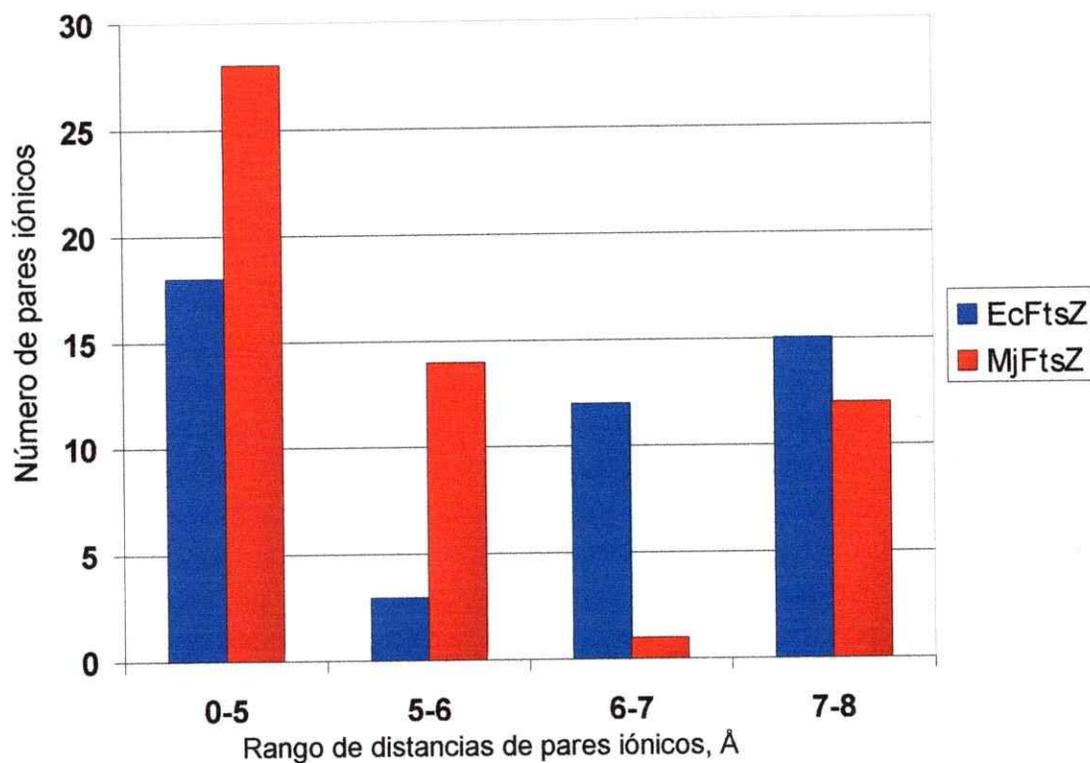


Figura 6. Número de pares iónicos en el rango de distancia indicada, en la estructura de MjFtsZ y EcFtsZ. Un par iónico es, como se definió en Materiales y Métodos, cualquier par de residuos de carga opuesta, en forma independiente de la distancia a la que se encuentran. Mientras que los puentes salinos son los pares iónicos a una distancia menor o igual a 5 Å. Por lo tanto, la pareja de columnas que indica el rango de distancias de pares iónicos entre 0 y 5 Å, corresponde al número de puentes salinos en la estructura de EcFtsZ, en azul y MjFtsZ (roja). En las parejas de columnas mayores a 5 Å se muestra el número de pares iónicos que se encuentran hasta los 8 Å. Estos pares se seleccionaron en intervalos de 1 Å, en ambas estructuras. La selección de pares iónicos mayores de 5 Å se hizo para determinar los posibles puentes salinos que se podrían formar por el movimiento de las cadenas laterales en solución, dado que la estructura de las proteínas no es rígida en solución.

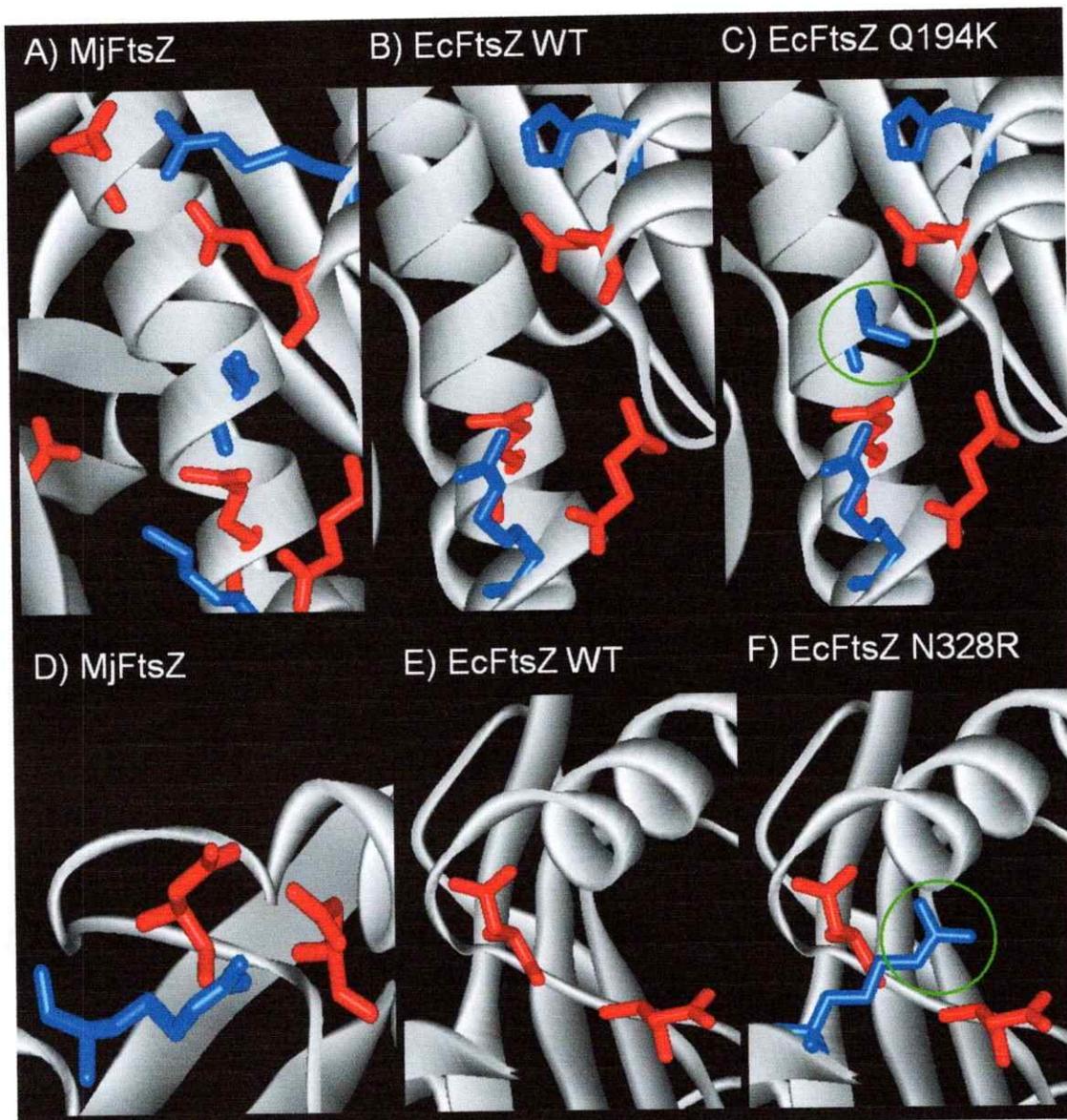


Figura 8. Comparación de las redes de puentes salinos en MjFtsZ (primera columna), con la misma región en EcFtsZ (segunda columna), y las mutaciones puntuales que recrean las redes de MjFtsZ en EcFtsZ (tercera columna). En la región cercana a las mutaciones se muestra la estructura de la cadena peptídica en modo de cinta de color gris de las proteínas silvestre MjFtsZ, A y D, EcFtsZ, B y E y las mutantes, C y F. Los residuos cargados involucrados en los puentes salinos se muestran en modo de "palito", donde los residuos positivos están en color azul y los de carga negativa en color rojo. Dentro del círculo verde se destacan los residuos mutados.

II. PARTE EXPERIMENTAL

Construcción, secuenciación y expresión de las mutantes Q194K y N328R. Para la construcción de las mutantes se siguió el protocolo experimental que se describió en Materiales y Métodos. Las colonias XL10 transformantes que contenían las mutaciones sitio-dirigidas se guardaron en glicerol a -80°C . Las colonias expresaron las proteínas mutantes. Con el fin de comprobar la localización de las mutaciones, se extrajo el DNA y se hicieron ensayos de digestión con enzimas de restricción y los patrones identificaron el DNA de *ftsZ*. Para identificar las mutaciones y su localización, los DNA correspondientes al gen de *ftsZ*, mutantes Q194K y N328R fueron secuenciados. La secuencia de la región correspondiente confirmó la mutación esperada. Para asegurar la presencia de sólo una mutación se secuenció el gen completo, y la secuencia mostró solo una mutación. La mutante Q194K mostró solo el cambio de la glutamina 194 por lisina, y la mutante N328R el cambio de la asparragina 328 por arginina. Las secuencias de las mutantes se muestran en el anexo.

Purificación de EcFtsZ de tipo silvestre y de las mutantes Q194K y N328R. Las proteínas de EcFtsZ silvestre y las mutantes Q194K y N328R se purificaron de acuerdo al método descrito en Materiales y Métodos. En la figura 9 se muestra el cromatograma de la última etapa de purificación de EcFtsZ wt en una columna Hi Trap Q-Sepharose. Se observan dos picos principales donde el primero corresponde a la absorbancia del nucleótido de guanina y el segundo a EcFtsZ. En la figura 10 se muestra el perfil de proteínas en un gel de poliacrilamida SDS-PAGE de las diferentes etapas de purificación. Se observa que la proteína que eluye de la última etapa presenta una pureza $> 95\%$. Las mutantes presentaron el mismo patrón que la silvestre en las diferentes etapas de purificación (resultados no mostrados).

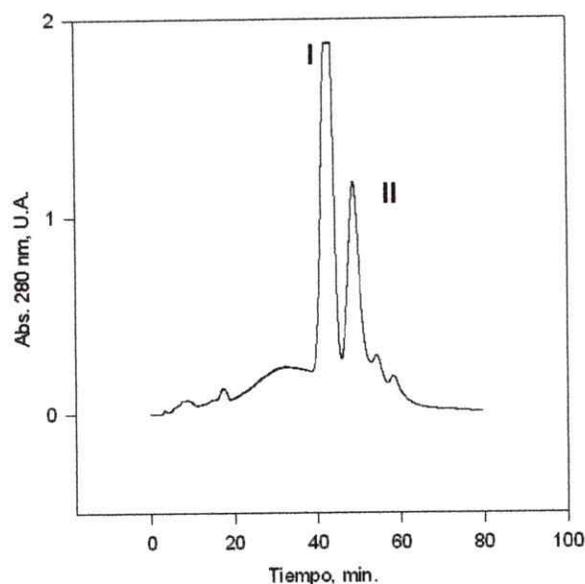


Figura 9. Cromatograma de purificación de EcFtsZ wt. Se muestra la absorbancia a 280 nm de la elución de proteínas desde la columna Hi Trap Q-Sepharose. El pico I contiene principalmente GTP y el pico II EcFtsZ, de acuerdo al resultado del gel de SDS-PAGE que se muestra en la figura 10.

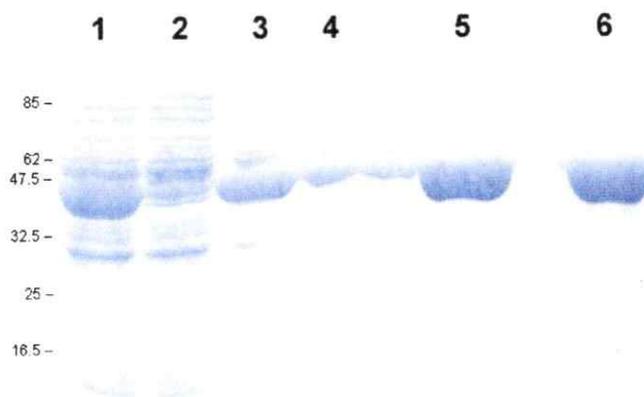


Figura 10. Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE de las proteínas provenientes de las diferentes etapas de purificación de EcFtsZ. Carril 1: 20 μ l del sobrenadante de la sonicación; Carril 2: 20 μ l del sobrenadante de la primera precipitación con calcio; Carril 3: 20 μ l del solubilizado del segundo precipitado con calcio, antes de pasar por la columna; Carril 4: 20 μ l del pico I del cromatograma de purificación (figura 9); Carril 5: 20 μ l del pico II del cromatograma de purificación; Carril 6: Control, 5 μ l de EcFtsZ previamente purificada.

Cuantificación de FtsZ de tipo silvestre y sus mutantes. La cuantificación de la proteína EcFtsZ ha presentado problemas al utilizar el método de Bradford y el estándar habitual BSA. También se ha descrito que la determinación de su concentración en GdmCl 6M, por medio del coeficiente de absorción para los aminoácidos aromáticos, no es directa, pues depende de la presencia de las cantidades variables de nucleótidos de guanina que posee la proteína y que absorben a 280 nm (Rivas y col., 2000). Las rectas para EcFtsZ y BSA difirieron en sus pendientes al utilizar el método de Bradford para su cuantificación (resultados no mostrados). La concentración de ambas proteínas se determinó a 280 nm por medio de sus respectivos coeficientes de absorción molar como se indicó en Materiales y Métodos. Debido a la diferencia en las pendientes para cuantificar EcFtsZ con BSA como estándar se calculó la razón entre estas pendientes y este valor se utilizó como factor de corrección para EcFtsZ. La razón entre ambas pendientes resultó ser muy parecida a la encontrada por Erickson y col., (1998). EcFtsZ y las mutantes mostraron los mismos valores de concentración cuando se cuantificaron a 280 nm y por el método de Bradford.

Determinación del porcentaje de estructura secundaria de FtsZ de tipo silvestre y sus mutantes por dicroísmo circular. Con el objeto de determinar si las mutaciones producían algún cambio estructural de la proteína se determinó el contenido de estructura secundaria de EcFtsZ wt y de las mutantes. En la figura 11 se muestran los espectros de dicroísmo circular de estas proteínas en la región del UV lejano. Se observan espectros típicos de proteínas α/β donde los espectros de EcFtsZ wt y de la mutante N328R son similares dentro del error experimental y la mutante Q194K presenta un leve aumento del contenido de estructura. La deconvolución de los

espectros de dicroísmo circular con el programa CONTIN, mostró que las proteínas mutantes poseen prácticamente el mismo porcentaje de estructura secundaria que EcFtsZ silvestre dentro del error experimental (figura 12), esto es 31% de hélice- α , 26% de hoja- β , 22% de vuelta β y 20% de estructura secundaria indefinida o al azar.

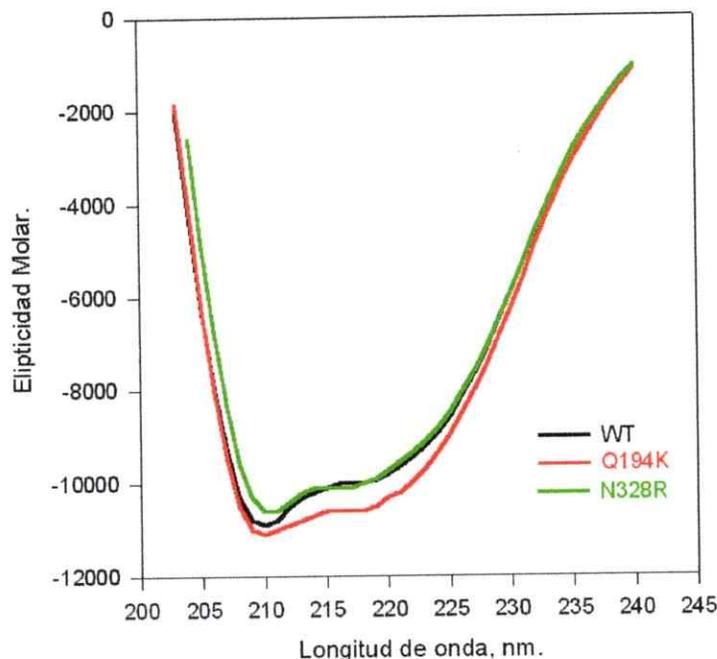


Figura 11. Espectro de dicroísmo circular de EcFtsZ de tipo silvestre y las mutantes Q194K y N328R. La concentración de las proteínas fue 0,36 mg/ml en un medio que contenía amortiguador Tris-HCl, 50 mM, pH 8,0 y KCl 50 mM. La temperatura fue de 25°C. Los espectros, un promedio de cuatro mediciones, fueron corregidos por la absorbancia del amortiguador.

Polimerización de EcFtsZ y sus mutantes determinada por dispersión de la luz.

La dispersión de la luz nos permite seguir la polimerización y despolimerización de EcFtsZ a través del tiempo. En la figura 13 se observa que la polimerización, al agregar GTP, es muy rápida y no se puede calcular su velocidad con este método. Se observa que el máximo de polimerización sigue el siguiente orden Q194K > Silvestre > N328R. Una vez alcanzado el máximo de polimerización las proteínas WT y Q194K muestran

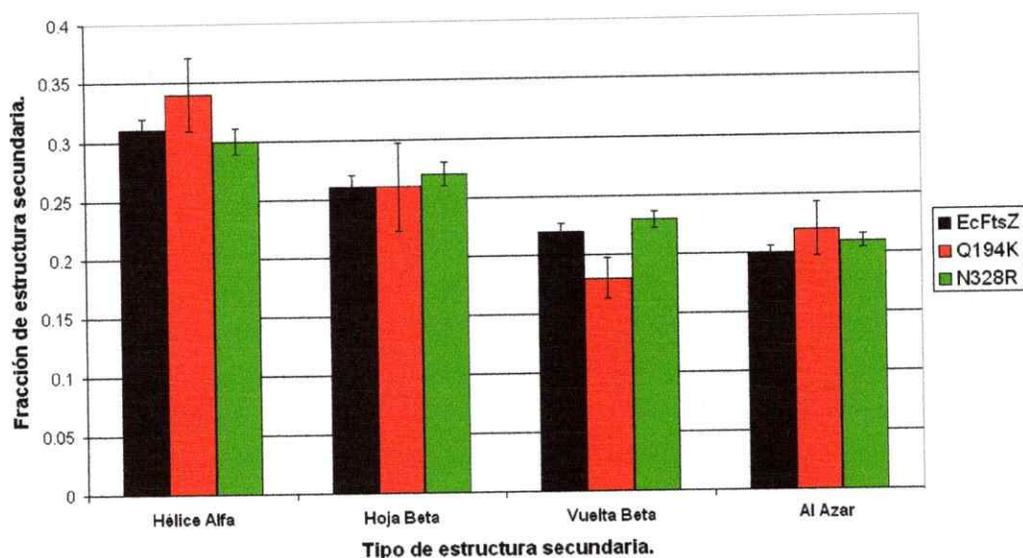


Figura 12. Porcentaje de estructura secundaria para EcFtsZ de tipo silvestre (negro) y las mutantes Q194K (rojo) y N328R (verde). Los porcentajes se calcularon utilizando el programa CONTIN como se describió en Materiales y Métodos. Las barras de error corresponden al error del ajuste que entrega el programa CONTIN.

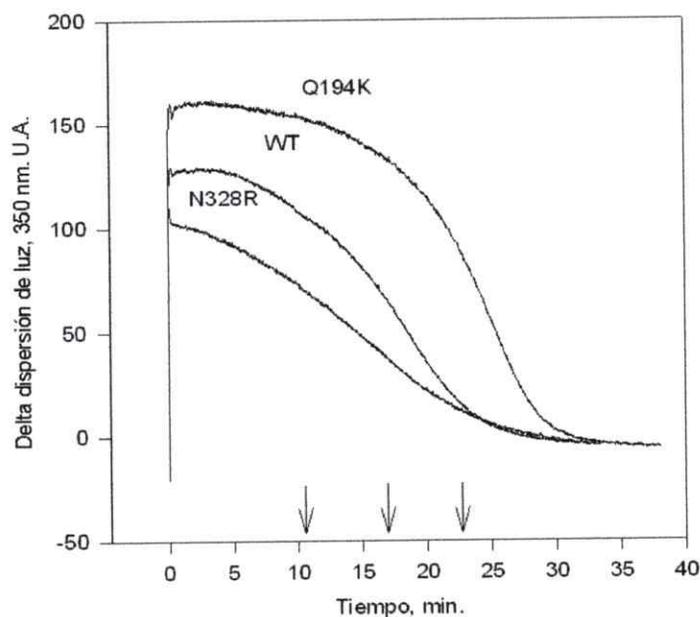


Figura 13. Polimerización y despolimerización de EcFtsZ de tipo silvestre y las mutantes Q194K y N328R seguidas por dispersión de luz. La solución contenía: MES 50 mM, pH 6,5, $MgCl_2$ 10 mM, KCl 50 mM y proteína 0,4 mg/ml. Al tiempo cero se agregó GTP a una concentración final de 1 mM. Las flechas indican el tiempo en que la dispersión de luz alcanza el 50% después de la despolimerización, para FtsZ N328R, WT y Q194K, respectivamente.

un pequeño plató de aproximadamente 5 min y la mutante N328R empieza a despolimerizar inmediatamente. La velocidad de despolimerización sigue un orden inverso al del máximo de polimerización, es decir $N328R > EcFtsZ \text{ wt} > Q194K$, esto indica que los filamentos de Q194K, son más estables que los de EcFtsZ wt y N328R. La despolimerización de FtsZ es proporcional a la velocidad de hidrólisis de GTP, por lo tanto, podemos predecir que la velocidad de hidrólisis de GTP tendría el siguiente orden: $N328R > EcFtsZ \text{ silvestre} > Q194K$.

Concentración crítica de FtsZ y de las mutantes N328R y Q194K. La concentración crítica, es la mínima concentración de EcFtsZ para iniciar la polimerización. El valor de la concentración crítica se determina al extrapolar al eje X la línea recta que se obtiene al graficar la diferencia máxima de polimerización en función de la concentración de proteína. La diferencia máxima de polimerización se calcula al restar el valor inicial de dispersión de luz del valor máximo de polimerización en presencia de GTP. En la figura 14 se muestran los resultados para EcFtsZ wt y las mutantes N328R y Q194K. Se observa que las rectas difieren en sus pendientes lo que puede reflejar diferentes formas de polímeros, pues la dispersión de luz depende de la forma y tamaño de los polímeros. Al extrapolar las rectas al eje X, los valores para las concentraciones críticas de EcFtsZ WT, N328R y Q194K son 16,2 $\mu\text{g/ml}$, 7,1 $\mu\text{g/ml}$ y 45 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente.

Desnaturación con GdmCl de EcFtsZ y las mutantes Q194K y N328R. Con el objeto de comparar las estabildades relativas de las EcFtsZ mutantes respecto a EcFtsZ silvestre se determinó el efecto del aumento de concentración de GdmCl sobre

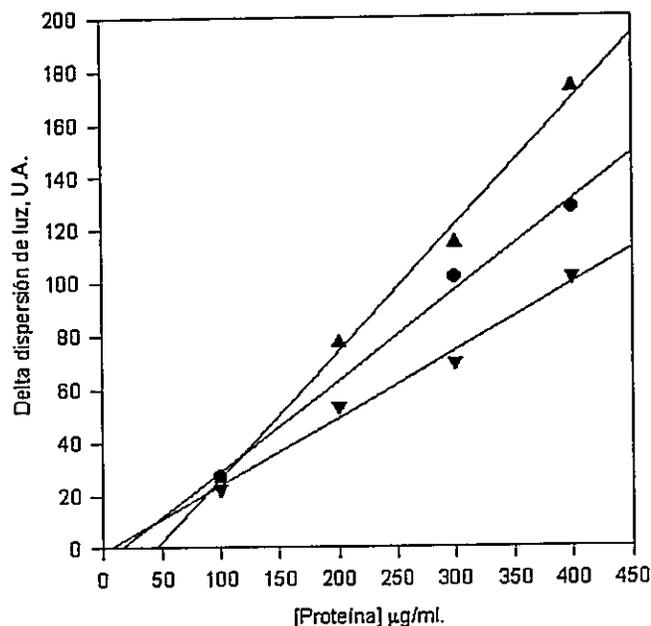


Figura 14. Diferencia máxima de dispersión de luz a 350 nm de EcFtsZ polimerizada a diferentes concentraciones de proteína. Las condiciones de polimerización son idénticas a las mostradas en la figura 13. La extrapolación de las líneas al eje X muestra que la concentración crítica para EcFtsZ del tipo silvestre es 16,2 µg/ml (círculos), para Q194K es 45 µg/ml (triángulos) y para N328R es 7,1 µg/ml (triángulos invertidos).

la desnaturación de las proteínas. En la figura 15 se muestran los resultados de la desnaturación por dilución rápida de EcFtsZ y las mutantes de EcFtsZ Q194K y N328R con este agente caotrópico. En la figura 15 se observa que la emisión de fluorescencia de las tirosinas disminuye con el aumento de la concentración de GdmCl en un proceso que muestra una baja cooperatividad. El 50% de desnaturación para las tres proteínas se alcanza a una concentración de aproximadamente 1M del agente caotrópico. A esta concentración de GdmCl se ha observado que ocurre la liberación del nucleótido de guanosina y cambios en la estructura terciaria y secundaria de la proteína (Andreu y col., 2002).

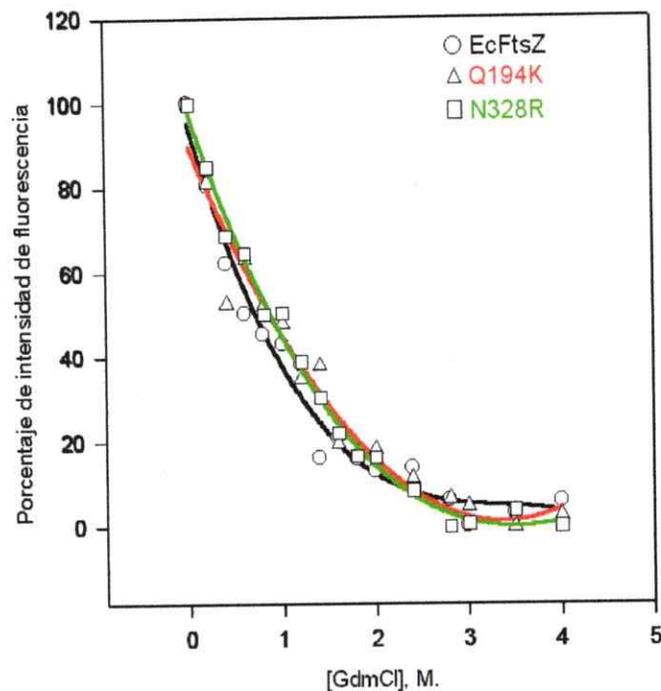


Figura 15. Desnaturalación con GdmCl de EcFtsZ silvestre y las mutantes Q194K y N328R. La desnaturalación de EcFtsZ silvestre (círculos, línea de regresión color negro) y las mutantes Q194K (triángulos, línea de regresión color rojo) y N328R (cuadrados, línea de regresión color verde) se hizo por dilución rápida en una solución de Hepes 50 mM, pH 7,5 a la concentración final de GdmCl que se indica en la figura. La concentración final de proteína fue 0,4 mg/ml. La emisión de fluorescencia fue medida a 305 nm y la longitud de onda de excitación se mantuvo fija en 280 nm. El ancho de banda fue de 10 y 5 nm para la excitación y emisión, respectivamente. La temperatura fue de 25 °C.

Microscopía electrónica de EcFtsZ y las mutantes Q194K y N328R. Para caracterizar los productos de la polimerización de EcFtsZ, inducidos por GTP, se utilizó microscopía electrónica. En la figura 16 se observan las microfotografías electrónicas representativas, tomadas con el mismo aumento, de los productos de polimerización de EcFtsZ silvestre y las mutantes Q194K y N328R. En la Figura 17 se muestra la distribución de los anchos de los filamentos para las EcFtsZ y sus mutantes, mientras que en la tabla 2 se muestra el ancho promedio de las poblaciones encontradas. Se

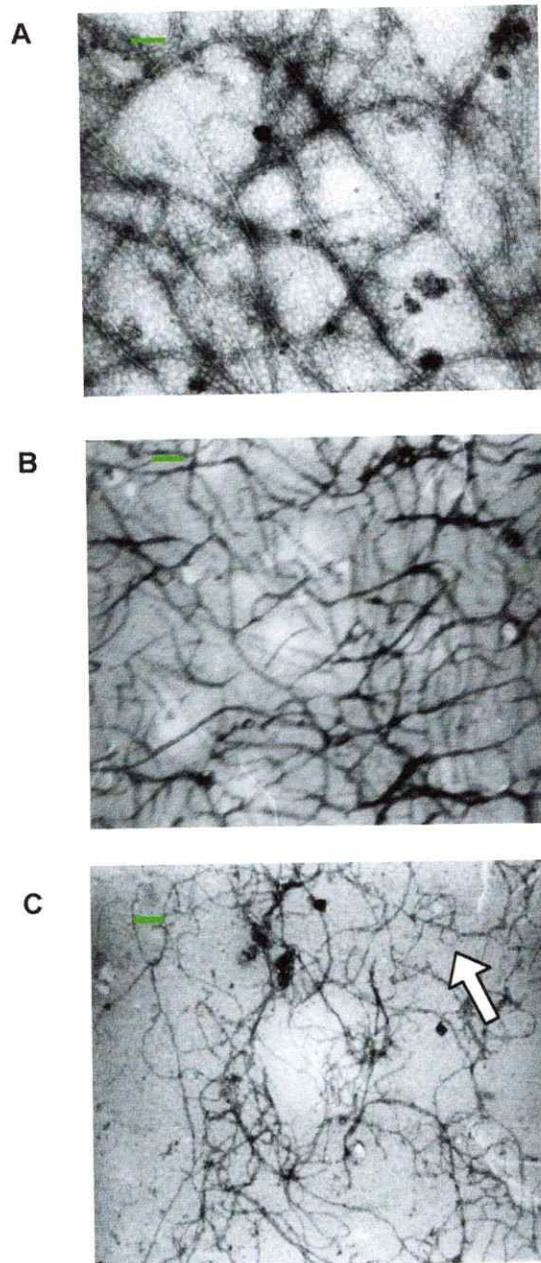


Figura 16. Microscopía electrónica de los filamentos de EcFtsZ de tipo silvestre (A) y sus mutantes Q194K (B) y N328R (C). La solución del ensayo de polimerización contenía: 50 mM de amortiguador Mes pH 6,5, 50 mM de KCl, 5 mM de $MgCl_2$, 1 mM de GTP, y 0,5 mg/ml de proteína. La tinción y las condiciones de la microscopía electrónica se hicieron como se describe en Materiales y Métodos. La barra corresponde a 100 nm. El aumento fue 59.000X. La flecha blanca indica un anillo.

observa que EcFtsZ silvestre (Figura 16, A) forma estructuras filamentosas, que tienen dos poblaciones de ancho de sus filamentos. Una mayoritaria, con un promedio de aproximado de 7 nm (Figura 17), llamado "Thick filament" o filamentos dobles paralelos (Löwe y Amos, 1999). Esta distribución muestra que la población de protofilamentos es la más abundante, pues el ancho de este correspondería a las dimensiones de un dímero, pues es el doble del monómero de MjFtsZ cristalizada (Löwe y Amos, 1998) y del monómero de EcFtsZ modelada. También se observa una población secundaria de ancho promedio de 13 nm (Tabla 2) que podría contener 3 filamentos. En la microfotografía de los productos de polimerización de la proteína mutante Q194K se observa una mayor densidad de filamentos más curvos que para la proteína silvestre (Figura 16, B). Al medir el ancho de estos polímeros se observaron también dos poblaciones, una mayoritaria con un ancho promedio de 7,14 nm que corresponde a "Thick filaments", y otra secundaria de ancho promedio aproximado de 15 nm (Figura 17 color rojo). La mutante N328R forma filamentos más curvos que los observados para el mutante Q194K (Figura 16, C), la curvatura llega a ser tan pronunciada que se forman anillos como el que se indica con una flecha en el ángulo superior derecho de la fotografía. La distribución del ancho de los polímeros se podría agrupar en dos poblaciones, una de aproximadamente 10 nm, que es la mayoritaria. Y otra minoritaria de aproximadamente 18 nm de ancho (Tabla 2). Si clasificamos EcFtsZ silvestre y sus mutantes de acuerdo a su curvatura tenemos el siguiente orden: N328R > Q194K > WT y de acuerdo a su ancho el orden es: N328R > WT \cong Q194K. Este orden será analizado en la discusión.

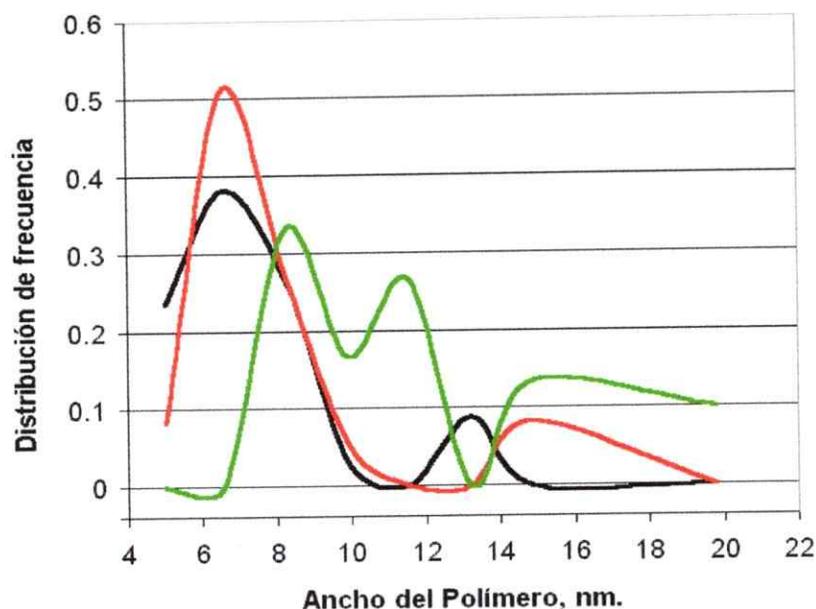


Figura 17. Distribución de la frecuencia del ancho de los polímeros de EcFtsZ y sus mutantes Q194K y N328R. Polímeros de EcFtsZ: Silvestre (negro), Q194K (rojo) y N328R (verde). La distribución se expresó como la frecuencia respecto al total de polímeros analizados para una proteína. Los polímeros se midieron con una lupa graduada en décimas de milímetro desde las microfotografías que se muestran en la figura 16 y calculadas considerando los aumentos respectivos.

Tabla 2. Poblaciones de protofilamentos según su ancho promedio para EcFtsZ silvestre y sus mutantes

Población	Ancho promedio, nm \pm D.E.
EcFtsZ WT1	6,78 \pm 1,36
EcFtsZ WT2	13,22 \pm 0,00
Q194K 1	7,14 \pm 1,20
Q194K 2	14,87 \pm 0,00
N328R 1	9,77 \pm 1,49
N328R 2	16,98 \pm 2,64

D. E. = Desviación estándar.

Constante catalítica aparente de FtsZ y sus mutantes para la hidrólisis de GTP a 30 y 40°C. Las curvas de progreso para la hidrólisis de GTP catalizada por FtsZ y sus mutantes mostraron que la velocidad inicial de la reacción se mantenía constante hasta los 8 min de reacción, a 30 o 40°C (Figura 18). Esto indica que a la temperatura de 30 o 40°C, EcFtsZ es estable en el polímero inducido por la presencia de GTP. Para cuantificar el efecto de las mutaciones Q194K y N328R sobre las propiedades catalíticas de EcFtsZ en la hidrólisis de GTP del polímero, se determinaron sus constantes catalíticas aparentes a 30°C y a 40°C. En la tabla 3 se muestran los valores de estas constantes, a 30 y 40°C, para las tres proteínas estudiadas. Se observa que la constante catalítica aparente para N328R a ambas temperaturas es similar a la de la silvestre, y que el valor de k_{cat} para la mutante Q194K es menor a ambas temperaturas. La razón entre las constantes catalíticas a 30 y 40°C mostró un valor de 1,53, 1,51 y 1,21 para la proteína silvestre y las mutantes Q194K y N328R respectivamente. Los valores de las constantes catalíticas a 30°C confirman las predicciones realizadas para las tres proteínas, a partir de los resultados de polimerización y despolimerización seguidos por dispersión de luz a 30°C.

Estabilidad térmica de FtsZ y sus mutantes determinada por su capacidad de polimerización. Para conocer la estabilidad térmica de EcFtsZ y las mutantes Q194K y N328R en estado no polimerizado, las proteínas se sometieron a un "shock" térmico por 5 min y después de 10 min a la temperatura del hielo fundente, se dejaron por 10 min a temperatura ambiente y se determinó su capacidad de polimerización al agregar GTP a la cubeta de polimerización a 25°C. La polimerización se determinó por dispersión de luz a 350 nm. La capacidad de polimerización se calculó como la diferencia máxima de dispersión de luz respecto al valor de la línea base para cada

Tabla 3. Constantes catalíticas aparentes a 30° y 40°C para la actividad GTPása de EcFtsZ wt, Q194K y N328R. Se muestra la razón entre los valores de k_{cat} a 40 y 30°C.

Proteína	$k_{cat} \text{ min}^{-1}$ (30°C)	$k_{cat} \text{ min}^{-1}$ (40°C)	40°C / 30°C
EcFtsZ WT	$3,4 \pm 0,15^a$	$5,2 \pm 0,45^a$	$1,53 \pm 0,13$
Q194K	$2,1 \pm 0,22^a$	$3,2 \pm 0,59^a$	$1,51 \pm 0,29$
N328R	$3,7 \pm 0,12^b$	$4,5 \pm 0,84^b$	$1,21 \pm 0,21$

^a Errores estándar calculados a partir de tres medidas independientes.

^b Errores estándar calculados a partir de dos medidas independientes.

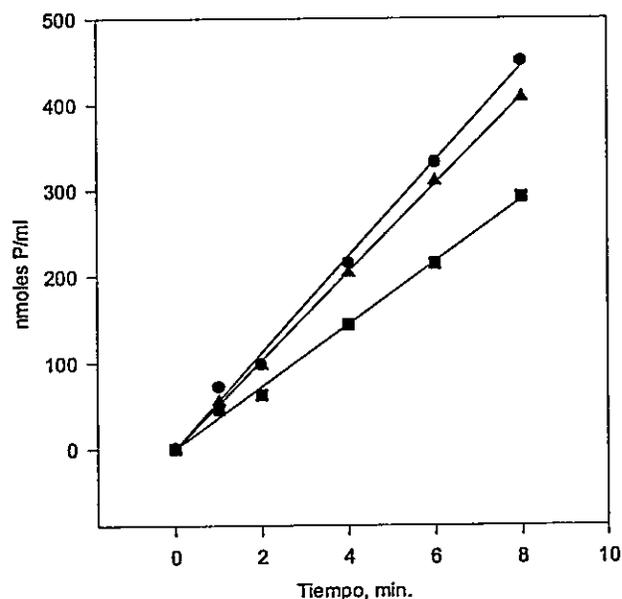


Figura 18. Hidrólisis de GTP por EcFtsZ de tipo silvestre y las mutantes Q194K y N328R a 40°C durante los primeros ocho minutos de reacción. EcFtsZ de tipo silvestre se muestra en círculos, las mutantes Q194K y N328R se muestran en cuadrados y triángulos, respectivamente. La rectitud de las pendientes indican que los filamentos de estas proteínas son estables a esta temperatura.

una de las temperaturas utilizadas en el shock térmico y se graficó este valor en función de la temperatura del "shock" térmico. Los resultados de la figura 19 muestran que la temperatura de "shock" térmico donde se alcanza un 50% de polimerización de la proteína silvestre y de la mutante Q194K fue de 42°C y la de la mutante N328R fue de 38°C. La menor estabilidad de la mutante N328R, en estado despolimerizado, se contrasta con la rectitud de la pendiente de hidrólisis de GTP a 40°C (figura 18), y evidencia el efecto protector del estado polimerizado sobre la estabilidad térmica, a pesar de la desestabilización de los monómeros frente a la temperatura.

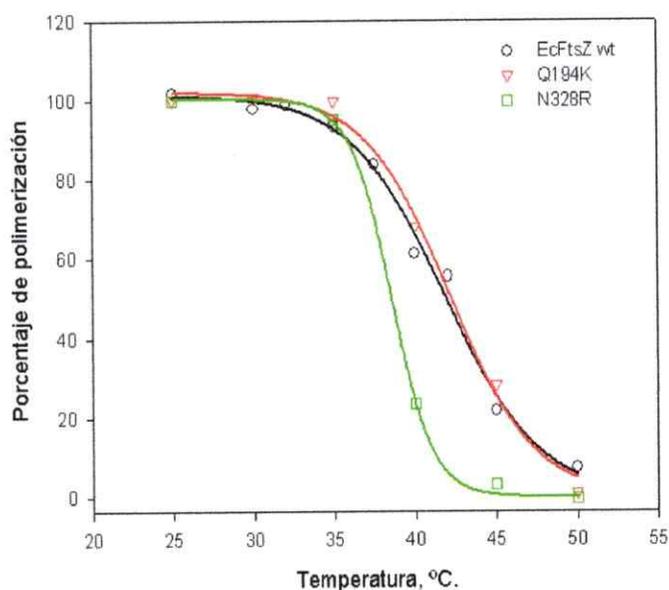


Figura 19 Capacidad de polimerización máxima con GTP a 25°C, de FtsZ wt y las mutantes Q194K y N328, previamente tratadas con un "shock" térmico a la temperatura indicada en la abscisa. EcFtsZ de tipo silvestre (círculos negros), Q194K (triángulos rojos) y N328R (cuadrados verdes). Las condiciones del ensayo se indican en Materiales y Métodos. La temperatura para alcanzar un 50% de polimerización fue 42°C para EcFtsZ de tipo silvestre y Q194K y de 38°C para N328R.

Viabilidad de las células de *E. coli* VIP2(DE3) al complementarlas con plasmidios de FtsZ silvestre y sus mutantes. El ensayo de complementación se hizo como se indica en Materiales y Métodos. En la figura 20 se muestra el porcentaje de sobrevivencia de las células de *E. coli* VIP2(DE3) al complementar con los plasmidios de FtsZ silvestre y las mutantes a esta cepa carente de FtsZ a 42°C. Se tomó como un 100% la complementación con el plasmidio que expresa EcFtsZ silvestre. En la figura se observa que el plasmidio para la mutante Q194K complementa parcialmente en solo un 23% mientras que el de la mutante N328R mejora la viabilidad de las células, pues presenta un 158% de complementación. El control sin plásmido muestra un 0,0055% de sobrevivencia de las células.

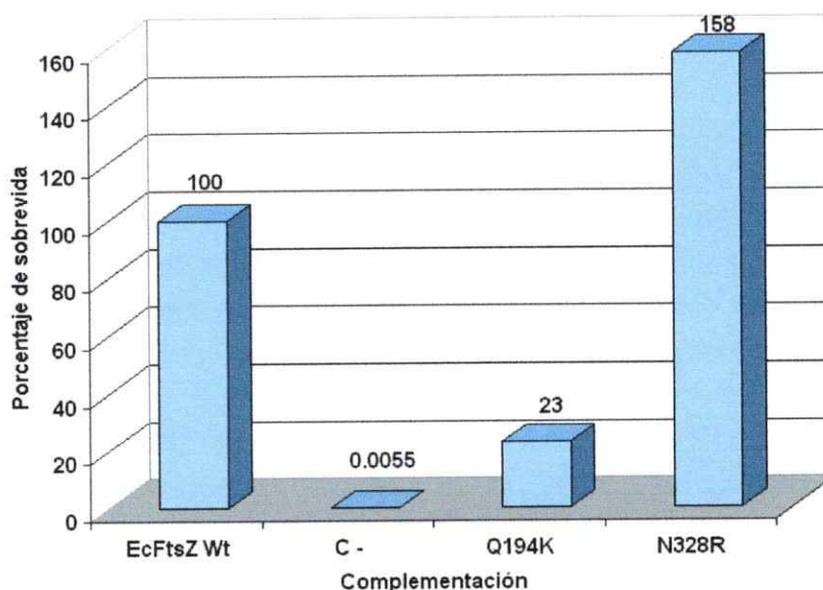


Figura 20. Porcentajes de sobrevivencia de la cepa VIP2(DE3) complementada con plasmidios que expresan EcFtsZ de tipo silvestre y las mutantes Q194K y N328R. Los números que aparecen sobre las columnas indican el porcentaje de sobrevivencia. A EcFtsZ de tipo silvestre se le asignó un 100% de sobrevivencia. Como control negativo se utilizó la cepa VIP2(DE3) sin transformar (C-).

DISCUSIÓN

El análisis bioinformático de la superficie de la proteína FtsZ mostró que la MjFtsZ, proteína termófila de *M. jannashii* posee más puentes salinos que la EcFtsZ, proteína mesófila de *E. coli*. Resultados que confirman que en general las proteínas termófilas poseen en su superficie más puentes salinos que las mesófilas (Haney y col, 1999a; Chakravarty y Varadarajan, 2002). También se encontró que en la superficie de la MjFtsZ se formaban redes de estos puentes, y para comprobar su efecto sobre un posible aumento de la estabilidad térmica de EcFtsZ se construyeron mutantes donde se le agregó una carga en una posición equivalente a la de la proteína termófila para que se formaran redes de puentes salinos. Los resultados mostraron que la mutante Q194K no se modifica, y la mutante N328R se hace 4°C menos estable. Estos resultados sugieren que la termo-estabilización a través de la formación de pares iónicos *de novo* y redes es compleja. Así, la formación de un par o red de puentes salinos en particular no sería responsable de una parte de la estabilidad térmica de modo que al sumarlas dieran cuenta de un aumento gradual de ésta, sino más bien podría haber una cooperatividad entre puentes y redes conformadas por varios grupos cargados. Otro resultado interesante mostró que EcFtsZ y sus mutantes, como parte de un polímero, eran más termoestables que en su forma no polimerizada. Curiosamente las mutaciones Q194K y N328R que se encuentran lejos del sitio de unión de GTP, alteraron la actividad GTPasa. Para explicar este resultado, y discutir el efecto de las mutaciones sobre las propiedades de EcFtsZ, es necesario analizar la ubicación de las mutaciones en los modelos de polimerización y de interacción entre filamentos de EcFtsZ *in vitro*. Las mutaciones pudieron afectar la interacción longitudinal entre dos moléculas de FtsZ, pues cualquier mutación que afecte esta

interacción afectará la actividad GTPasa (Shin, 2003). Como también pudieron afectar la interacción lateral entre dos protofilamentos de EcFtsZ.

Modelo de interacción longitudinal basado en la tubulina. Debido a que no se conoce la estructura de los polímeros de FtsZ a alta resolución, el microtúbulo ha sido usado como un buen modelo para los polímeros de EcFtsZ, pues ambas proteínas presentan una alta similitud estructural. Así, si superponemos las estructuras tridimensionales de FtsZ y tubulina localizada en el microtúbulo (Lu, y col., 2001), encontramos que la mutación Q194K está ubicada en la cara interna, mientras que la mutación N328R está ubicada al lado externo del microtúbulo; por lo tanto ambas mutaciones están lejos de los sitios de interacción longitudinal (Figura 21), y no debieran afectarla.

Dímero y modelo de polimerización longitudinal e interacción lateral. Recientemente se ha señalado que el modelo del microtúbulo no es el mejor modelo para los polímeros de EcFtsZ (Leung y col., 2004). Por esta razón se ha propuesto como un mejor modelo de los polímeros de EcFtsZ, la estructura de los formados por MjFtsZ, donde un par de protofilamentos paralelos, o "thick filament" se asocian de manera anti-paralela para formar una sabana bidimensional (Lowe y Amos, 1999). En este modelo hay dos tipos de interacciones laterales. Una entre "thick filaments" antiparalelos, en que participa la región C-terminal de FtsZ, y otra entre las regiones amino terminal de los protofilamentos paralelos del "thick filament" de mayor contacto, donde participa la hebra S3 del dominio GTPasa de cada MjFtsZ (Figura 22). Un tipo similar de orientación de filamentos se ha encontrado en EcFtsZ, y se propone que el

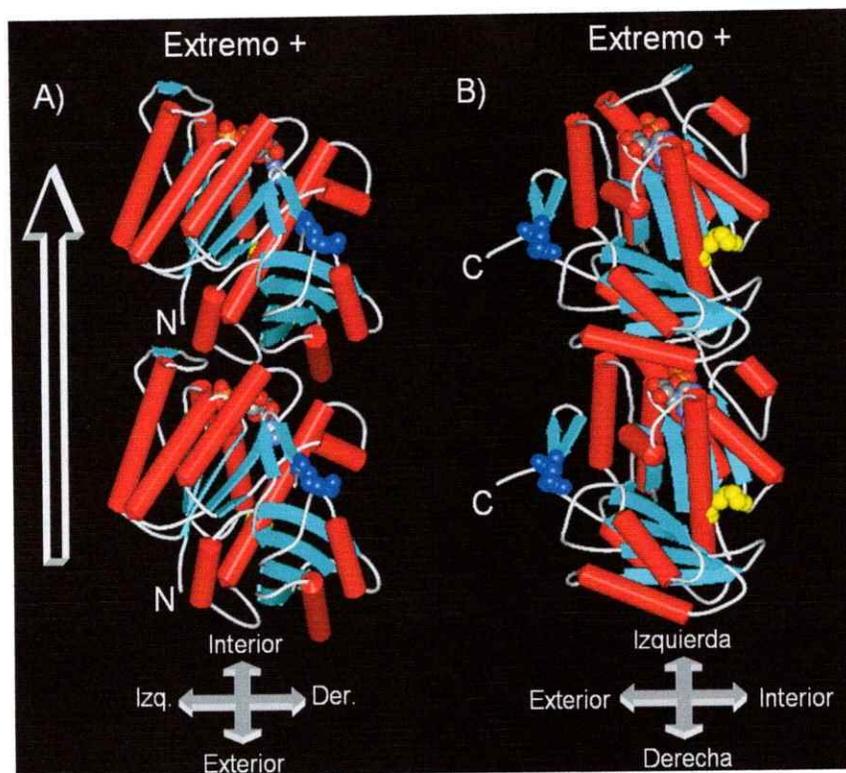


Figura 21. Modelo de interacción longitudinal de dos moléculas de EcFtsZ basado en la localización de tubulina en el microtúbulo. En A se observa el dímero de un protofilamento desde el exterior del microtúbulo, mientras que en B se observa desde el costado derecho. La proteína se muestra en modelo esquemático, con las hélices- α en cilindros rojos, y las hebras- β en cintas de color celeste. El GDP se muestra en modo "spacefill" y coloreado según el código CPK. Los residuos mutados se muestran en modo "spacefill", en color amarillo para Q194K y en azul para N328R. La flecha indica el sentido del protofilamento hacia el extremo + del microtúbulo.

principal producto de la polimerización de FtsZ es el "thick filament", polímero de dos protofilamentos paralelos (Oliva y col, 2003). En este modelo de polimerización la mutación Q194K estaría lejana de las dos interfaces de interacción de FtsZ, tanto de la que participa en el "thick filament" como la que participa en la interacción antiparalela entre ellos, responsable de la formación de las hojas. La mutación N328R está ubicada en el extremo carboxilo terminal de EcFtsZ, que es la cara opuesta respecto a la cara de interacción de los protofilamentos en el "thick filament", por lo tanto no afectaría la estabilidad de estos y solo tendría efecto en la interacción entre los "thick filaments".

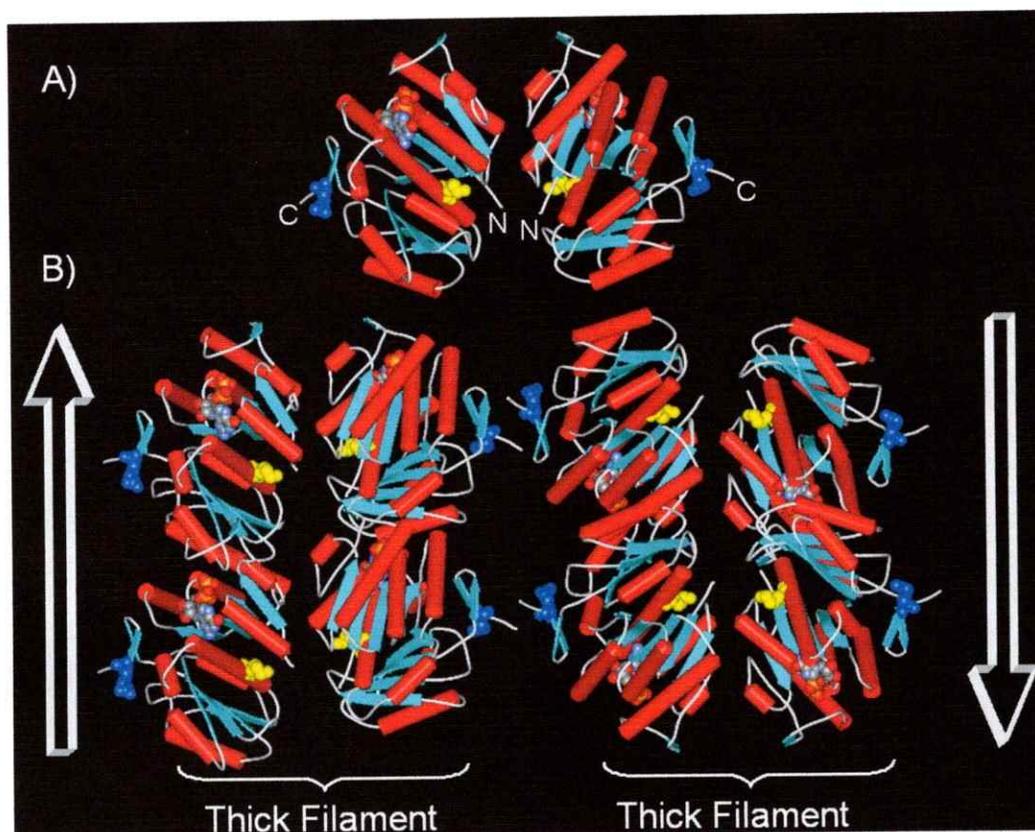


Figura 22. Dímero y modelo de polimerización longitudinal y lateral de EcFtsZ que forma "Thick filaments" paralelos y anti-paralelos basado en el modelo de MjFtsZ. En A se observa que un dímero de EcFtsZ de un filamento doble o "thick filament" presenta simetría al interactuar lateralmente por su lado amino. En B se observa una sabana formada por la interacción anti-paralela entre dos "thick filaments". También se aprecia en esta figura la interacción paralela entre dos protofilamentos que forman el "thick filament". El código esquemático y de colores es el mismo de la figura 21. La flecha indica el sentido de los filamentos.

Modelo de polimerización longitudinal y espiral de EcFtsZ basado en MtbFtsZ.

Recientemente se ha publicado la estructura de los dímeros de FtsZ del patógeno mesófilo *Mycobacterium tuberculosis*, abreviada MtbFtsZ (Leung y col., 2004). Esta estructura tiene un par de particularidades. Por un lado muestra las primeras estructuras de FtsZ cristalizadas con los ligandos GTP- γ S y GDP, que tienen diferentes conformaciones y por lo tanto se puede inferir el cambio conformacional que ocurriría con la hidrólisis de GTP y explicar su influencia sobre la estabilidad de los polímeros.

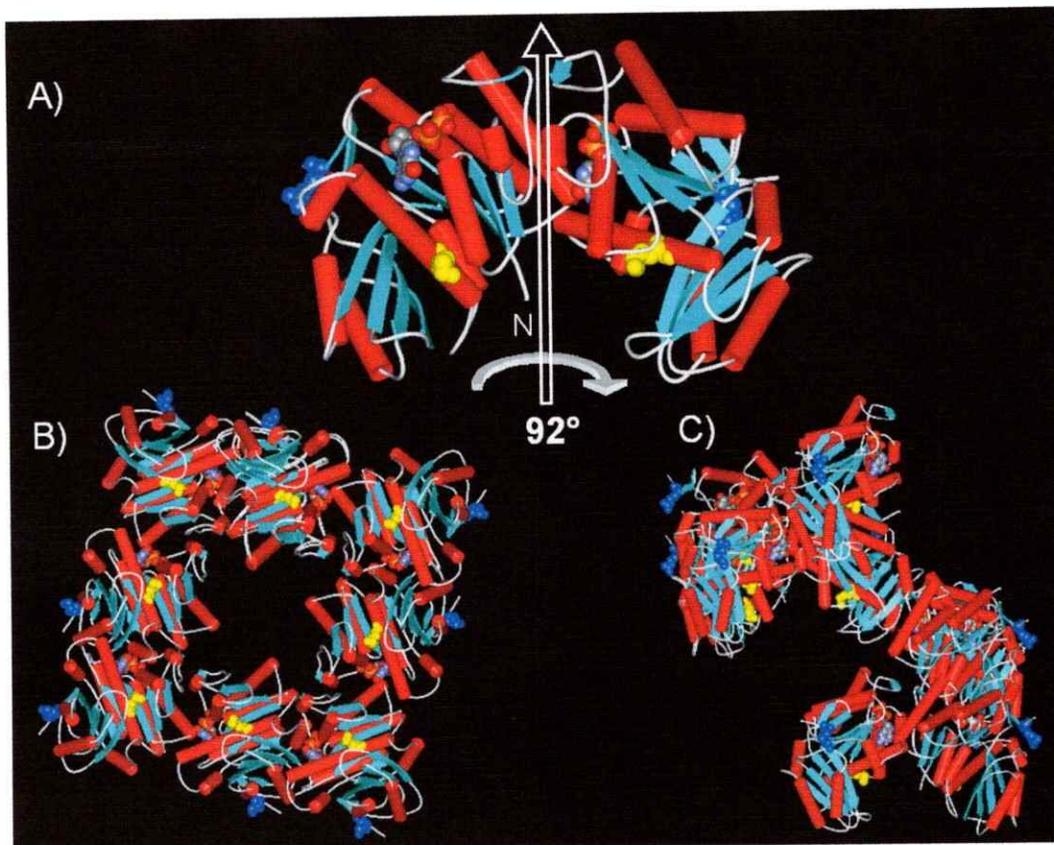


Figura 23. Dímero y modelo de polimerización longitudinal y espiral de EcFtsZ basado en MtbFtsZ. En A se observa la interacción lateral del dímero de EcFtsZ modelada a partir del dímero de MtbFtsZ, donde los monómeros están orientados en un ángulo de 92° alrededor del eje de simetría (flecha blanca). En B se observa una vuelta del espiral visto desde arriba, y en C se observa la misma vuelta desde un lado. El código esquemático y de colores es el mismo que la figura anterior.

Por otro lado, se propone un modelo de polimerización distinto al hasta ahora aceptado, es decir, al modelo de polimerización longitudinal, homólogo al de tubulina. En este nuevo modelo de polimerización, la unidad básica de polimerización sería un dímero, en el cual los monómeros están orientados de forma asimétrica en un ángulo de 92° uno respecto del otro al orientarlos en un eje de simetría similar al del modelo de polimerización longitudinal. La polimerización longitudinal de este dímero daría origen a un filamento con forma de espiral dextro rotatorio en el que nueve monómeros de EcFtsZ son necesarios para formar una vuelta del espiral de aproximadamente 80

nm de altura y entre 110 y 135 Å de ancho (Leung y Col. 2004). La EcFtsZ al polimerizar *in vitro* también muestra algunos polímeros en forma de espiral. En la figura 23 se observa un modelo de estas estructuras basado en los dímeros de MbFtsZ, donde la mutación Q194K mostrada en amarillo se encuentra alejada de la interfase de interacción, mientras que en el espiral se ubica en la cara interna de éste (Figura 23, B). La mutación N328R se ubicaría en la cara externa del dímero, por lo tanto no afectaría este tipo de interacción, mientras que en el espiral se ubica en su cara externa (Figura 23, B), por lo que no afectaría la formación del espiral, pero sí podría afectar las interacciones entre espirales.

En base a la localización de las mutaciones en los modelos discutidos, es claro que solo la mutación N328R podría afectar la interacción entre filamentos, y de esta forma explicar su efecto sobre la actividad GTPasa. Ya que la mutante Q194K no afecta las interacciones laterales o longitudinales en los modelos de polimerización, su efecto sobre la actividad GTPasa puede lograrse a través de un efecto de largo alcance de las interacciones electrostáticas, en la cual la mutación afecta a los residuos vecinos, y a su vez los vecinos afectan a sus vecinos, como en un "efecto dominó" propagándose a regiones distantes del sitio de la mutación (Lee y col., 2002).

A continuación se analizarán los resultados siguiendo el mismo orden en que fueron presentados. En primer lugar analizaremos las nuevas herramientas creadas para el diseño de redes de puentes salinos, seguido de la comparación entre las propiedades de la proteína silvestre y las mutantes. Después analizaremos el efecto que producen las mutaciones sobre la estabilidad térmica de la proteína no polimerizada y luego discutiremos cómo las interacciones proteína-proteína son responsables de un aumento de la estabilidad térmica de los polímeros de EcFtsZ.

Diseño de redes de puentes salinos. Para identificar y visualizar los puentes salinos y sus redes en la superficie de las proteínas ha sido necesario diseñar programas computacionales específicos para esta tarea, pues las herramientas computacionales existentes no son capaces de identificar estas estructuras en la superficie de las proteínas de estructura tridimensional conocida. La ausencia de la estructura tridimensional de EcFtsZ nos llevó a construir un modelo tridimensional de la proteína basado en su homología de secuencia con MjFtsZ cuya estructura tridimensional se conoce. La comparación de puentes y redes salinas presentes en la superficie de diferentes proteínas, por ejemplo mesófilas con termófilas, es aún una tarea más compleja. Por esto, para determinar la importancia de los residuos cargados en las proteínas mesófilas y termófilas fue necesario construir un programa que permitiera identificar los puentes salinos, y para identificar las redes se ideó un nuevo concepto, que fue la matriz de pares iónicos, que nos permitió analizar un problema tridimensional desde un punto de vista bidimensional, donde la identificación de las redes se pudo realizar más fácilmente en forma visual. Esta herramienta permitió identificar y comparar las redes de MjFtsZ con las de EcFtsZ para identificar la región de EcFtsZ donde se pudiera realizar una mutación puntual, para crear las redes presentes en MjFtsZ.

Solo se consideró aquellas mutaciones capaces de formar el mayor número de puentes salinos con solo una mutación puntual, como se muestra en la figura 7. En general en los trabajos publicados no se mencionan los criterios empleados en la selección de las redes de pares iónicos a mutar (Lebbink y col., 1999), mas bien se considera el efecto de la remoción o adición de una carga presente o ausente en un organismo termófilo o mesófilo, respectivamente (Serrano y col., 1990). Las ventajas del método aquí empleado radican en su globalidad, es decir, que se pueden identificar

todas las redes de pares iónicos presentes en ambas proteínas, y no se trabaja con redes locales, aunque el sistema no entregue una relación entre las redes y la estabilidad térmica. Por esto, el criterio empleado fue producir el mínimo de cambios para emular la red seleccionada del termófilo. Como mencionamos anteriormente, si el efecto de las redes es cooperativo, pudiese existir un punto de transición, es decir, un número mínimo de redes necesarias para la estabilidad térmica de las proteínas. Esta hipótesis es sustentada por experimentos donde se realizan varias mutaciones puntuales, donde cada una en forma individual produce un cambio leve o adverso en la estabilidad térmica, pero que juntos producen un gran cambio de ella (Lebbink y col., 1999; Lebbink y col., 2002).

En otras palabras nuestra contribución a la ingeniería de estabilidad térmica de proteínas a través de una aproximación racional-comparativa fue demostrar que una mutación que forme una red no es suficiente para emular un efecto aditivo de la estabilidad térmica. Por esto planteamos la necesidad de analizar un conjunto de redes de pares iónicos, para establecer un criterio de selección de las redes que participan en el evento cooperativo. Al hacer la selección debe tenerse en cuenta que las redes de residuos cargados, formadas *de novo*, pueden afectar el plegamiento de la proteína, como en el caso de la doble mutante de EcFtsZ Q194K/N328R, que al ser sobre expresada en *E.coli*, no se repliega adecuadamente y da origen a cuerpos de inclusión (D. Weinstein, resultados no mostrados).

Polimerización de EcFtsZ y sus mutantes. La intensidad de la luz dispersada durante la polimerización de EcFtsZ es directamente proporcional a la concentración de proteína y a la longitud de los filamentos en solución (Gaskin y col., 1974). La proporcionalidad entre la intensidad de dispersión de luz y el número de polímeros se

corroboró al graficar el cambio de intensidad versus la concentración de proteína, desde donde se obtuvo la concentración crítica para la polimerización de EcFtsZ. La EcFtsZ silvestre y las mutantes presentaron distintas intensidades máximas a igual concentración de proteína, resultado que puede ser explicado por un cambio de largo y forma de los filamentos, inducidos por las mutaciones. Las fotografías de microscopía electrónica no permiten medir el largo total de los filamentos, pues éstos abarcan un espacio superior al campo visual de las muestras analizadas, pero sí permiten observar diferencias en el ancho de los filamentos. Los resultados de la tabla 2 indican que tanto EcFtsZ silvestre como la mutante Q195K poseen poblaciones de filamentos con un ancho similar. Ambas proteínas presentan una distribución de filamentos cuya población mayoritaria, presenta un ancho promedio centrado aproximadamente en los 7 nm, y una población secundaria de ancho promedio centrado aproximadamente 14 nm. La mutante N328R tienen poblaciones de filamentos de mayor ancho que la EcFtsZ wt. La población mayoritaria es amplia, y su ancho promedio está centrado aproximadamente en los 10 nm, mientras que la población secundaria, tiene su promedio en los 17 nm de ancho. Como la mutante N328R posee protofilamentos más gruesos en comparación con las otras proteínas estudiadas, se espera que estos dispersen una menor cantidad de luz (Gaskin y col., 1974). Este es precisamente el efecto observado en los resultados de dispersión de luz de filamentos de N328R.

La molécula de FtsZ mide aproximadamente 4 nm de ancho. Por lo tanto las poblaciones mayoritarias de EcFtsZ silvestre y de la mutante Q194K pueden corresponder a protofilamentos dobles o "thick filament". Mientras que las poblaciones secundarias podrían corresponder a hojas con cuatro protofilamentos o con dos "thick filaments". La similitud entre el ancho de las poblaciones de EcFtsZ silvestre y la mutante Q194K concuerda con la ubicación de esta mutación en la estructura

tridimensional de EcFtsZ, ya que el residuo mutado está alejado de los sitios de interacción entre los protofilamentos, según los modelos de polimerización propuestos.

El ancho promedio de la población mayoritaria de la mutante N328R indica que podrían ser protofilamentos triples. Mientras que la población secundaria puede contener hojas con cuatro protofilamentos ó más. Este resultado también concuerda con la ubicación de esta mutación en la estructura tridimensional de EcFtsZ, ya que el residuo mutado está cerca de la región donde interactúan protofilamentos vecinos según los modelos de polimerización propuestos, y podría favorecer esta interacción.

Despolimerización de los polímeros de EcFtsZ y sus mutantes. La velocidad de despolimerización observada, sigue el siguiente orden: N328R > EcFtsZ WT > Q194K. Se ha demostrado que la despolimerización de EcFtsZ está ligada a la hidrólisis del nucleótido de GTP, por lo tanto sugiere que Q194K tendría una menor velocidad de hidrólisis de GTP, y que N328R tendría una mayor velocidad en comparación con EcFtsZ silvestre. Esto concuerda con los resultados obtenidos para la velocidad de hidrólisis de GTP (Ver sección Resultados) en las tres proteínas. En resumen, los resultados indican que: 1) los filamentos de la mutante Q194K son los más estables, pues tardan más en despolimerizar, y tienen una menor velocidad de hidrólisis de GTP. Además poseen un ancho de los polímeros similar a los de EcFtsZ silvestre. 2) Los filamentos de la mutante N328R son los menos estables, pues tardan menos en despolimerizar, y tienen una mayor velocidad de hidrólisis de GTP. Además presentan un ancho de los filamentos mayor al de EcFtsZ silvestre y la mutante Q194K.

Estabilidad térmica y actividad de las proteínas. Cabe destacar que se ha descrito una relación inversa entre la actividad catalítica de las proteínas y su estabilidad

térmica, es decir, las mutaciones termo-estabilizantes tienden a desactivar la actividad catalítica de las proteínas, mientras que las mutaciones que aumentan la actividad de las proteínas, tienden a desestabilizarlas (Arnold, 1998). Esto se explica porque las enzimas necesitan un correcto balance entre flexibilidad conformacional y estabilidad para cumplir su función (Závodszy y col., 1998). La estabilidad es necesaria para que la enzima adquiera la conformación requerida para el reconocimiento del ligando, y la flexibilidad permite los ajustes estructurales necesarios durante la unión y liberación de los sustratos o productos (Wrba y col., 1990). Las mutaciones que aumentan la estabilidad térmica suelen rigidizar la estructura de las proteínas, disminuyendo la probabilidad de penetración de solvente al interior (Gershenson y col., 2000). Por consiguiente, estas mutaciones disminuyen la flexibilidad conformacional, y con esto la actividad catalítica de las enzimas, sugiriendo el siguiente orden de estabilidad térmica para EcFtsZ y sus mutantes: Q194K > EcFtsZ WT > N328R.

Estabilidad térmica de FtsZ no polimerizada y polimerizada. De acuerdo con los resultados de shock térmico, la inactivación térmica de EcFtsZ es irreversible, probablemente debido a la desnaturación de la proteína. Este comportamiento es frecuente en proteínas que no poseen puentes disulfuro y no son pequeñas. Al incubar cinco minutos la proteína a diferentes temperaturas en condiciones no polimerizantes EcFtsZ silvestre y la mutantes Q194K presentan una T_m similar cercana a los 42°C, mientras que la T_m de la mutante N328R disminuye en 4°C. Por lo tanto el orden de estabilidad térmica en estado no polimerizado es Q194K \cong EcFtsZ silvestre > N328R.

Para probar el efecto sobre la estabilidad térmica de las interacciones longitudinales y laterales de EcFtsZ silvestre y las mutantes Q194K y N328R en los

polímeros, estas proteínas se incubaron en condiciones de polimerización y se determinó la actividad GTPásica a 30 y 40°C. Se observó que la velocidad inicial de la reacción se mantuvo constante hasta los 8 min de reacción. Esto indica que a 40°C se mantiene estable la proteína en condiciones de polimerización respecto a las proteínas sin polimerizar y por lo tanto la formación de puentes salinos pierde importancia respecto a las interacciones proteína-proteína en los polímeros, como agente que aumenta la estabilidad térmica. Este es un hecho conocido en la estabilidad de proteínas, por ejemplo, la tubulina es más estable como microtúbulo. Estos resultados en su conjunto sugieren que la estabilidad térmica de la estructura terciaria y secundaria de una proteína es reforzada cuando se produce la estructura cuaternaria.

Relación de la funcionalidad *in vitro* versus *in vivo* de EcFtsZ silvestre y sus mutantes. La mutación Q194K mantiene por más tiempo el estado estacionario de los polímeros *in vitro*, respecto a la proteína silvestre, pero no complementa su funcionalidad *in vivo*. Mientras que la mutación N328R disminuye la estabilidad térmica y acorta el estado estacionario de los polímeros y complementa su funcionalidad *in vivo*. Estos resultados muestran una relación inversa entre la estabilidad de los polímeros y su funcionalidad *in vivo*, y muestra que la inestabilidad de los polímeros es esencial para la división celular.

La única diferencia entre las dos proteínas mutantes y la EcFtsZ silvestre es la adición de un residuo cargado. La tabla 4 muestra que al mutar sólo un residuo de aminoácido de superficie para agregar una carga respecto a la proteína silvestre, el efecto de cada mutación sobre las propiedades de EcFtsZ analizadas en este trabajo, es opuesto cuando la mutación se hace en las caras opuestas de la proteína y este efecto se invierte cuando se analiza la estabilidad térmica. Así la ubicación de las

mutaciones en la superficie de EcFtsZ, en cada una de las caras opuestas del modelo de polimerización longitudinal aparece como responsable de estas propiedades de la proteína. Este resultado nos lleva a postular que la rigidez de la superficie de la cara interna de FtsZ (modelo de polimerización longitudinal) produce una estabilización del polímero que disminuye la actividad catalítica de EcFtsZ que, según los resultados obtenidos, conllevan a una baja en la sobrevivencia celular, convirtiendo al sitio donde esta ubicada la mutación Q194K en un blanco adecuado para el diseño de fármacos que eviten la división bacteriana.

Tabla 4. Resumen de las propiedades analizadas de las mutantes Q194K y N328R respecto a las mismas propiedades de EcFtsZ silvestre.

Propiedad	Menor	Similar	Mayor
Velocidad de despolimerización	Q194K		N328R
Actividad catalítica	Q194K		N328R
Ancho de filamentos		Q194K	N328R
Porcentaje de sobrevivencia	Q194K		N328R
Estabilidad térmica	N328R	Q194K	

La presencia de rigidez en la mutante Q194K es apoyada por estudios bioinformáticos realizados en el laboratorio, donde al analizar los movimientos correlacionados de la estructura terciaria de EcFtsZ, podemos sugerir que la mutación Q194K restringe el movimiento de la hélice H1 respecto a la hélice H5 en la región interdominio de EcFtsZ y probablemente esto sería la causa de la disminución de la actividad GTPásica y su efecto sobre la polimerización.

CONCLUSIONES

1. La estructura tridimensional de la proteína termófila MjFtsZ posee un mayor número de residuos cargados, de puentes salinos y de redes de puentes salinos que su ortólogo mesófilo EcFtsZ.
2. La construcción de una matriz de pares iónicos, es una herramienta útil para el diseño de nuevos puentes salinos y sus redes.
3. Cada una de las mutaciones Q194K y N328R, diseñadas para formar redes de puentes, afectan la estabilidad y otras propiedades funcionales de EcFtsZ.
4. La estabilidad térmica de EcFtsZ silvestre, y las mutantes Q194K y N328R es mayor cuando estas proteínas forman parte del polímero.
5. Las mutaciones Q194K y N328R se encuentran, físicamente, en lados opuestos del monómero de EcFtsZ y afectan de manera inversa la actividad GTPásica, la polimerización y la cinética de despolimerización y la complementación *in vivo* de estas mutaciones. Q194K tuvo un efecto menor sobre la estabilidad térmica y N328R desestabilizó la proteína.
7. Se encontró una relación inversa entre la estabilidad dinámica del polímero de EcFtsZ y su viabilidad celular.
8. A partir del análisis de movimientos correlacionados en EcFtsZ podemos sugerir que la mutación Q194K restringe el movimiento de la hélice H1 respecto a la hélice H5 en la región inter-dominio de EcFtsZ y probablemente esto sería la causa de la disminución de la actividad GTPásica y su efecto sobre la polimerización.

PROYECCIONES

1. Para entender a cabalidad la estabilización térmica de proteínas a través del diseño *de novo* de redes de puentes salinos se requiere de un análisis sistemático del efecto de todos los puentes salinos en forma individual y colectiva.
2. Para diseñar drogas que afecten la división celular se puede escoger la región donde se encuentra la mutación Q194K, pues la mutación afecta la estabilidad dinámica de los polímeros EcFtsZ.

BIBLIOGRAFÍA

1. Andreu, J. M.; Oliva, M.A. and Monasterio, O. 2002. Reversible unfolding of FtsZ cell division proteins from archea and bacteria. *J. Biol. Chem.* **277**: 43262-43270.
2. Arnold, F. 1998. Design by directed evolution. *Acc. Chem. Res.* **31**: 125-131.
3. Barlow, D. J. and Thornton, J.M. 1983. Ion-pairs in proteins. *J. Mol. Biol.* **168**: 867-885.
4. Chakravarty, S. and Varadarajan, R. 2002. Elucidation of factors responsible for enhanced thermal stability of proteins: a structural genomics based study. *Biochemistry.* **41**: 8152-8161.
5. Erickson, H. P. ; Lu, C. and Stricker, J. 1998. FtsZ from *Escherichia coli*, *Azotobacter vinelandii*, and *Thermotoga maritima*- Quantitation, GTP hydrolysis, and assembly. *Cell Mot. Cyt.* **40**: 71-86.
6. Cordell S.C.; Robinson, E. J. and Lowe, J. 2003. The crystal structure of the SOS cell division inhibitor Sula and in complex with FtsZ. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **100**: 7889-7894.
7. Creighton, T. E. 1997. *Proteins: structures and molecular properties*. Second ed. Freeman & Company, New York.
8. Gaskin, F.; Cantor, C. and Shelanski, M. 1974. Turbidimetric studies of the *in vitro* assembly and disassembly of porcine neurotubules. *J. Mol. Biol.* **89**: 737-758.
9. Gershenson, A.; Schauerte, J.; Giver, L. and Arnold, F. 2000. Tryptophan phosphorescence study of enzyme flexibility and unfolding in laboratory-evolved thermostable esterases. *Biochemistry.* **39**: 4658-4665
10. Gromiha, M. M.; Oobatake, M. and Sarai, A. 1999. Important amino acid properties for enhanced thermoestability from mesophilic to thermophilic proteins. *Biophy. Chem.* **82**: 51-67.
11. Guex, N. and Peitsch, M.C. 1997. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modelling. *Electrophoresis.* **18**: 2714-2723.
12. Haney, P. J.; Stees, M. and Konisky, J. 1999a. Analysis of thermal stabilizing interactions in mesophilic and thermophilic adenylate kinases from the genus *methanococcus*. *J. Biol. Chem.* **274**: 28453-28458.
13. Haney, P.J., Badger, J.H., Buldak, G.L., Reich, C.I., Woese, C.R. and Olsen, G.J. 1999b. Thermal adaptation analyzed by comparison of protein sequences from mesophilic and extremely thermophilic *Methanococcus* species. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **96**: 3578-3583.

14. Hendsch, Z. and Tidor, B. 1994. Do salt bridges stabilize proteins? A continuum electrostatic analysis. *Prot. Sci.* **3**: 211-226.
15. Honig, B. H. and Hubbell, W. L. 1984. Stability of "salt bridges" in membrane proteins. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **81**: 5412-5416.
16. Kumar, S., Tsai, C.J. and Nussinov, R. 2000. Factors enhancing protein thermostability. *Prot. Eng.* **13**: 179-191.
17. Kumar, S. and Nussinov, R. 2001. Fluctuation in ion pairs and their stabilities in proteins. *Proteins.* **43**: 433-454.
18. Kumar, S. and Nussinov, R. 2002. Relationship between ion pair geometries and electrostatic strengths in proteins. *Biophys. J.* **83**: 1595-1612.
19. Lanzetta, P. A.; Alvarez, L. J.; Reinach, P. S. and Candia, O. 1979. An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate. *Anal. Biochem.* **100**: 95-97.
20. Lebbink, J.; Knapp, S.; Oost, J.; Rice, D.; Ladenstein, R. and Vos, W. 1999. Engineering activity and stability of *thermotoga maritima* glutamate dehydrogenase II : Construction of a 16-residue ion-pair network at the subunit interface. *J. Mol. Biol.* **289**: 357-369.
21. Lebbink, J.; Consalvi, H.; Chiaraluce, V.; Berndt, R. and Ladenstein R. 2002. Structural and thermodynamic studies on a salt-bridge triad in the NADP-binding domain of glutamate dehydrogenase from *Thermotoga maritima*: cooperativity and electrostatic contribution to stability. *Biochemistry.* **41**: 15524-15535.
22. Lee, K.; Fitch, C. and Garcia-Moreno, B. 2002. Distance dependence and salt sensitivity of pairwise coulombic interactions in a protein. *Prot. Sci.* **11**: 1004-1016.
23. Leung A.; White, L.; Ross, L. and Borhani, J. 2000. Crystallization of the *Mycobacterium tuberculosis* cell-division protein FtsZ. *Acta Cryst.* **56**: 16634-16637.
24. Leung, A.; White, L.; Ross, L.; Reynolds, R.; DeVito, J. and Borhani, D. 2004. Structure of *Mycobacterium tuberculosis* FtsZ reveals unexpected, G protein-like conformational switches. *J. Mol. Biol.* **342**: 953-970.
25. Lowe, J. and Amos, L.A. 1998. Crystal structure of the bacterial cell-division protein FtsZ. *Nature.* **391**: 203-206.
26. Lowe, J. and Amos, L.A. 1999. Tubulin-like protofilaments in Ca^{2+} induced FtsZ sheets. *EMBO J.* **18**: 2364-2371.
27. Lu, Ch.; Stricker, J. and Erickson, H. 2001. Site-specific mutations of FtsZ -effects on GTP ase and in vitro assembly. *BMC Microbiology.* **1**: 7.
<http://www.biomedcentral.com/1471-2180/1/7>.

28. Lüthy, R., Bowie, J.U. and Eisenberg, D. 1992. Assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Nature*. **356**: 83-85.
29. Margolin W. 2000. Organelle division: Self-assembling GTPases caught in the middle. *Curr. Biol.* **10**: 328-330.
30. Marqusee, S. and Sauer, R. 1994. Contributions of a hydrogen bond/salt bridge network to the stability of secondary and tertiary structure in λ repressor. *Prot. Sci.* **3**: 2217-2225 .
31. Miyagishima, S. Y.; Nishida, K. and Kuroiwa, T. 2003. An evolutionary puzzle: chloroplast and mitochondrial division rings. *Trends Plant. Sci.* **8**: 432-438.
32. Oliva, M.A.; Huecas, S.; Palacios, J.; Martín-Benito, J.; Valpuesta, J. and Andreu J.M. 2003. Assembly of archeal cell division protein FtsZ and a GTPase-inactive mutant into double-stranded filaments. *J. Biol. Chem.* **278**: 33562-33570.
33. Osteryoung K. W. and McAndrew R. 2001. The plastid division machine. *Annu. Rev. Plant. Mol. Biol.* **52**: 315-333.
34. Pappenberger, G.; Schurig, H. and Jaenicke, R. 1997. Disruption of an ionic network leads to accelerated thermal denaturation of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *J. Mol. Biol.* **274**: 676-683.
35. Provencher, S. W. and Glöckner, J. 1981. Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism. *Biochemistry.* **20**: 33-37.
36. Rivas, G.; López, A.; Mingorance, J.; Ferrándia, M. J.; Zorrilla, S.; Minton, A. P.; Vicente, M. and Andreu, J. M. 2000. Magnesium-induced linear self-association of the FtsZ bacterial cell division protein monomer. *J. Biol. Chem.* **275**: 11740-11749.
37. Sali, A.; Stuart, A.; Fiser, A.; Sánchez, R.; Melo, F. and Martí-Renom, M.A. 2000. Comparative protein structure modelling of genes and genomes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **29**: 291-325.
38. Sánchez, R. and Sali, A. 1997. Advances in comparative protein-structure modelling. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **7**: 206-214.
39. Serrano, L.; Horovitz, A.; Avron, B.; Bycroft, M. and Fersht, A. 1990. Estimating the contribution of engineered surface electrostatics interactions to protein stability by using double-mutant cycles. *Biochemistry.* **29**: 9343-9352.
40. Szilágyi, A. and Závodszky, P. 2000. Structural differences between mesophilic, moderately thermophilic and extremely thermophilic subunits: results of a comprehensive survey. *Structure.* **8**: 493-504.

41. Takano, K.; Tsuchimori, K.; Yamagata, Y. and Yutani, K. 2000. Contribution of salt bridges near the surface of a protein to the conformational stability. *Biochemistry*. **39**: 12375-12381.
42. Vetriani, C.; Maeder, D.L.; Tolliday, N.; Yip, K.S.; Stillman, T.J.; Britton, K.L.; Rice, D.W.; Klump, H.H. and Robb, F.T. 1998. Protein thermostability above 100°C: a key role for ionic interactions. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. **95**: 12300-12305.
43. Vieille, C. and Zeikus, G.J. 2001. Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms from thermostability. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**: 1-43.
44. Waldburger, C.D., Schildbach J.F. and Sauer, R. T. 1995. Are buried salt bridges important for protein stability and conformational specificity?. *Nat. Struct. Biol.* **2**: 122-128.
45. Wilson, R., J. 2003. Spotlight: re-evaluating replicating organelles. *Protist*. **154**: 3-4.
46. Wrba, A.; Schweiger, A.; Shultes, V.; Jaenicke, R. and Závodszky, P. 1990. Extremely thermostable D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from the eubacterium *Thermotoga maritima*. *Biochemistry*. **29**: 7584-7592.
47. Xu, D.; Tsai, C. J. and Nussinov, R. 1997. Protein binding versus protein folding: The role of hydrophilic bridges in protein associations. *J. Mol. Biol.* **265**: 68-84.
48. Shin, J. Y. 2003. Tesis de Magíster en Biología Celular, Universidad de Chile.
49. Zavadzky, P.; Kardos, J.; Svingor, A. and Petsko, G. A. 1998. Adjustment of conformational flexibility is a key event in the thermal adaptation of proteins. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. **95**: 7406-7411.

ANEXO

Partidores utilizados en la mutagénesis sitio-dirigida

Nombre del partidor :Q194K1

Secuencia (5' a 3'): CTG AAA GGC GCT GTG AAA GGT ATC GCT GAA C

Nombre del partidor :Q194K2

Secuencia (5' a 3'): GTT CAG CGA TAC CTT TCA CAG CGC CTT TCAG

Nombre del partidor :N328R1

Secuencia (5' a 3'): CAC TCT GGT GAC CAG GAA GCA GGT TCA GCA G

Nombre del partidor :N328R2

Secuencia (5' a 3'): CTG CTG AAC CTG CTT CCT GGT CAC CAG AGT G

Secuencia nucleotídica de las mutantes

La secuencia obtenida para la mutante Q194K fue la siguiente:

ATGTTTGAACCAATGGAACCTTACCAATGACGCGGTGATTAAAGTCATCGGCGTCCGCGGC
 GCGCGCGGTAATGCTGTTGAACACATGGTGCAGCGCATTGAAGGTGTTGAATTCCTC
 GCGGTAAATACCGATGCACAAGCGCTGCGTAAACAGCGGTTGGACAGACGATTCAAATC
 GGTAGCGGTATCACCAAGGACTGGGCGCTGGCGCTAATCCAGAAGTTGGCCGCAATGCG
 GCTGATGAGGATCGCGATGCATTGCGTGCAGCGCTGGAAGGTGCAGACATGGTCTTTATT
 GCTGCGGGTATGGGTGGTGGTACCGGTACAGGTGCAGCACCAGTCGTGCTGAAAGTGGCA
 AAAGATTTGGGTATCCTGACCGTTGCTGTCGTCACTAAGCCTTTCACTTTGAAGGCAAG
 AAGCGTATGGCATTGCGGAGCAGGGGATCACTGAACTGTCCAAGCATGTGGACTCTCTG
 ATCACTATCCCGAACGACAACTGCTGAAAGTTCTGGGCCGCGGTATCTCCCTGCTGGAT
 GCGTTTGGCGCAGCGAACGATGTACTGAAAGGCGCTGTGAAGGTATCGCTGAACTGATT
 ACTCGTCCGGGTTTGATGAACGTGGACTTTGCAGACGTACGCACCGTAATGTCTGAGATG
 GGCTACGCAATGATGGGTTCTGGCGTGGCGAGCGGTGAAGACCGTGCAGGAAGAAGCTGCT
 GAAATGGCTATCTCTTCTCCGCTGCTGGAAGATATCGACCTGTCTGGCGCGCGCGCGCTG
 CTGGTTAACATCACGGCGGGCTTCGACCTGCGTCTGGATGAGTTCGAAACGGTAGGTAAC
 ACCATCCGTGCATTTGCTTCCGACAACGCGACTGTGGTTATCGGTACTTCTCTTGACCCG
 GATATGAATGACGAGCTGCGCGTAACCGTTGTTGCGACAGGTATCGGCATGGACAAACGT
 CCTGAAATCACTCTGGTGACCAATAAGCAGGTTGAGCAGCCAGTGATGGATCGCTACCAG
 CAGCATGGGATGGCTCCGCTGACCCAGGAGCAGAAGCCGGTTGCTAAAGTCGTGAATGAC
 AATGCGCCGCAAACCTGCGAAAGAGCCGGATTATCTGGATATCCAGCATTCTGCGTAAG
 CAAGCTGATTAA

Esta secuencia es idéntica a la del gen de EcFtsZ excepto en que el nucleótido número 580 es una adenina (A), mientras que en el gen silvestre es una citosina (C). Este cambio hace que en esta mutante el aminoácido número 194 sea una lisina (K) en vez de una glutamina (Q). En la secuencia, este nucleótido se destaca con fondo negro.

La secuencia obtenida para la mutante N328R fue la siguiente:

```

ATGTTTGAACCAATGGAACCTTACCAATGACGCGGTGATTAAAGTCATCGGCGTCGGCGGC
GGCGGCGGTAATGCTGTTGAACACATGGTGC GCGAGCGCATTGAAGGTGTTGAATTCTTC
GCGGTAAATACCGATGCACAAGCGCTGCGTAAAACAGCGGTTGGACAGACGATTCAAATC
GGTAGCGGTATCACCAAGGACTGGGCGCTGGCGCTAATCCAGAAGTTGGCCGCAATGCG
GCTGATGAGGATCGCGATGCATTGCGTGC GCGCTGGAAGGTGCAGACATGGTCTTTATT
GCTGCGGGTATGGGTGGTGGTACCGGTACAGGTGCAGCACCAGTCGTCGCTGAAGTGGCA
AAAGATTTGGGTATCCTGACCGTTGCTGTGCTCACTAAGCCTTTCAACTTTGAAGGCAAG
AAGCGTATGGCATTGCGGAGCAGGGGATCACTGAACTGTCCAAGCATGTGGACTCTCTG
ATCACTATCCCGAACGACAAACTGCTGAAAGTTCTGGGCCGCGGTATCTCCCTGCTGGAT
GCGTTTGGCGCAGCGAACGATGTACTGAAAGGCGCTGTGCAAGGTATCGCTGAACTGATT
ACTCGTCCGGGTTTGATGAACGTGGACTTTGCAGACGTACGCACCGTAATGTCTGAGATG
GGCTACGCAATGATGGGTTCTGGCGTGGCGAGCGGTGAAGACCGTGCGGAAGAAGCTGCT
GAAATGGCTATCTCTTCTCCGCTGCTGGAAGATATCGACCTGTCTGGCGCGCGCGGCGTG
CTGGTTAACATCACGGCGGGCTTCGACCTGCGTCTGGATGAGTTCGAAACGGTAGGTAAC
ACCATCCGTGCATTTGCTTCCGACAACGCGACTGTGGTTATCGGTACTTCTCTTGACCCG
GATATGAATGACGAGCTGCGCGTAAACCGTTGTTGCGACAGGTATCGGCATGGACAAACGT
CCTGAAATCACTCTGGTGACCAAGGAGCAGGTTGAGCAGCCAGTGATGGATCGCTACCAG
CAGCATGGGATGGCTCCGCTGACCCAGGAGCAGAAGCCGGTTGCTAAAGTCGTGAATGAC
AATGCGCCGCAAACCTGCGAAAGAGCCGGATTATCTGGATATCCAGCATTCTGCGTAAG
CAAGCTGATTAA
  
```

Esta secuencia es idéntica a la del gen de EcFtsZ excepto en los nucleótidos número 983 y 984 son guanina (G), mientras que en el gen silvestre son una adenina (A) y una timina (T) respectivamente. Este cambio hace que en este mutante el aminoácido número 328 sea una Arginina (R) en vez de una asparagina (N). En la secuencia, estos nucleótidos se destacan con fondo negro.

Plásmidos utilizados

pMFV57: Tamaño :8102 pb

Contiene un gen de resistencia a ampicilina

Contiene el gen *ftsZ* de *E.coli* de tipo silvestre bajo el promotor T7

Cepas utilizadas

C41(DE3): Cepa derivada de *E.coli* BL21, especial para sobre-expresar proteínas. Contiene en el cromosoma el gen de la RNA polimerasa del fago T7 bajo el promotor LAC.

VIP2(DE3): Contiene en el cromosoma: el gen de *ftsZ* interrumpido por un gen de resistencia a kanamicina, y además el gen de la RNA polimerasa del fago T7 bajo el promotor LAC. Además contiene el plásmido pLAR9, que tiene un origen de replicación termosensible, el gen *ftsZ* de *E.coli* de tipo silvestre y un gen de resistencia a cloranfenicol.