

UCH-FC  
Biotecnología

G 215  
C.1

ESCUELA DE PREGRADO - FACULTAD DE CIENCIAS - UNIVERSIDAD DE CHILE



## “PREDICCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS SUPERFICIES DE INTERACCIÓN INTRAMOLECULAR E INTERMOLECULAR DE LA PROTEÍNA FTSZ DE *ESCHERICHIA COLI*”

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

**ANDREA DEL PILAR GARCÉS FERNÁNDEZ**

Dr. Octavio Monasterio Opazo  
Director Seminario de Título

Firma manuscrita en azul de Octavio Monasterio Opazo, sobre una línea horizontal.

**Comisión de Evaluación Seminario de Título**

Dr. Osvaldo Alvarez Araya  
Presidente Comisión

Firma manuscrita en azul de Osvaldo Alvarez Araya, sobre una línea horizontal.



Dr. Danilo González Nilo  
Corrector

Firma manuscrita en azul de Danilo González Nilo, sobre una línea horizontal.

Santiago de Chile, Enero 2007.



*Dedicado a mis padres y mi hermana...*



## Agradecimientos

A mi familia, por hacerme sentir que estaban cerca a pesar de la distancia y por darme todo ese amor que se necesita para seguir adelante cuando las metas parecen inalcanzables.

A Rodrigo Díaz, por ser mi gran soporte emocional dentro y fuera del laboratorio, por enseñarme que el amor sincero todo lo puede, sin importar la distancia ni los obstáculos en el camino.

Al Dr. Octavio Monasterio y a la Dra. Rosalba Lagos, por su acogida en el laboratorio y por la valiosa formación profesional que me brindaron. De manera especial agradezco a José Jaime Arbildúa, el guía crítico y paciente de mi trabajo en esta tesis y compañero de proyectos.

A todos mis compañeros en el BEM: Dr. Mario Tello, Jae Yen, Roselyn, Alexis, Felipe, Macarena, Ma. Jesús, Gabriela, Cesar, David, a los que se quedan y a los que partieron, por escuchar y respetar mis opiniones... de la vida y del trabajo, y por hacer que cada día en el lab tuviera un color distinto.

Estos años en la U, no habrían sido lo mismo sin la amistad incondicional de Mirna Cruz y Marlene Rozas, quienes estuvieron siempre cerca de mi, en los buenos y malos momentos. También gracias a las "niñas", Dani F., Dani U., Bertsy y Mariela con quienes pasé vacaciones inolvidables en La Balsa y en Las Cruces, y que ya estoy extrañando.

Y a quien estaré siempre agradecida, es a Dios, pues puso en mi vida todos estos preciosos tesoros que guardaré en mi corazón dondequiera que vaya.



*Es verdad, no es un cuento;  
hay un Ángel Guardián  
que te toma y te lleva como el viento  
y con los niños va por donde van.*

Tiene cabellos suaves  
que van en la venteada,  
ojos dulces y graves  
que te sosiegan con una mirada  
y matan miedos dando claridad.  
(No es un cuento, es verdad.)

Él tiene cuerpo, manos y pies de alas  
y las seis alas vuelan o resbalan,  
las seis te llevan de su aire batido  
y lo mismo te llevan de dormido.

Hace más dulce la pulpa madura  
que entre tus labios golosos estrujas;  
rompe a la nuez su taimada envoltura  
y es quien te libra de gnomos y brujas.

Es quien te ayuda a que cortes las rosas,  
que están sentadas en trampas de espinas,  
el que te pasa las aguas mañosas  
y el que te sube las cuestas más pinas.

Y aunque camine contigo apareado,  
como la guinda y la guinda bermeja,  
cuando su seña te pone el pecado  
recoge tu alma y el cuerpo te deja.

*Es verdad, no es un cuento:  
hay un Ángel Guardián  
que te toma y te lleva como el viento  
y con los niños va por donde van.*



*Gabriela Mistral*

**FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE**



**PREDICCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS SUPERFICIES DE  
INTERACCIÓN INTRAMOLECULAR E INTERMOLECULAR DE  
LA PROTEÍNA FTSZ DE *ESCHERICHIA COLI***

por

**Andrea del Pilar Garcés Fernández**

Enero, 2007

Santiago-Chile

Director de Tesis: Dr. Octavio Monasterio Opazo

## Índice de contenidos



INTRODUCCIÓN.....	1
HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS.....	9
MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
RESULTADOS.....	24
<b>Predicción de la estructura 3D de EcFtsZ en sus diferentes estados conformacionales.....</b>	24
Construcción del modelo 3D del monómero de EcFtsZ unido a GDP y GTP... 24	
Construcción de los modelos diméricos de EcFtsZ .....	27
Evaluación de los modelos de dímeros.....	28
Modelado explícito de lazos .....	31
<b>Caracterización estructural de la interfase de interacción longitudinal de EcFtsZ .....</b>	33
Predicción computacional de la superficie de interacción lateral entre polímeros de EcFtsZ-EcFtsZ .....	37
Acoplamiento proteína-proteína .....	38
Predicción de sitios de interacción proteína-proteína usando información evolutiva .....	40
Análisis de mutaciones correlacionadas .....	41
<i>Evolutionary tracing</i> .....	41
Análisis <i>in silico</i> de la dependencia de la interacción lateral N-C, N-N y C-C del estado de fosforilación del nucleótido .....	46
Evaluación de complementariedad geométrica de los tipos de interacción lateral de EcFtsZ .....	47
Exploración por mutagénesis computacional de alaninas .....	51

<b>Caracterización estructural de las interfases sugeridas para la interacción lateral de EcFtsZ</b> .....	53
Análisis de la interfase inter-dominio de FtsZ .....	61
<b>Flexibilidad en FtsZ</b> .....	65
Análisis de movimientos correlacionados .....	65
Análisis de la flexibilidad intrínseca de FtsZ.....	67
<b>DISCUSIÓN</b> .....	69
Modelo de la estructura tridimensional de EcFtsZ.....	69
Superficies de interacción longitudinal en dímeros de EcFtsZ .....	74
Superficies de interacción lateral entre polímeros de EcFtsZ .....	76
<b>CONCLUSIONES</b> .....	84
<b>Presentaciones a congresos nacionales</b> .....	85
<b>REFERENCIAS</b> .....	86

### Índice de tablas

Tabla 1. "Evaluación de los moldes y modelos de dímero" .....	29
Tabla 2. "Segmentos de la secuencia de los dímeros de FtsZ de mayor variabilidad" .....	31
Tabla 3. "Caracterización de la interfase longitudinal del polímero de FtsZ y del heterodímero de $\alpha\beta$ -tubulina" .....	33
Tabla 4. "Caracterización de la interacción longitudinal de los dímeros EcFtsZ-GTP/EcFtsZ-GDP, EcFtsZ-GTP/EcFtsZ-GTP y EcFtsZ-GDP/EcFtsZ-GDP" .....	36
Tabla 5. "Pares de aminoácidos de superficie de EcFtsZ que mutan en forma simultánea" .....	42
Tabla 6. "Exploración por mutagénesis computacional de alaninas" .....	52

Tabla 7. "Residuos de mayor contribución energética de las caras de interacción lateral y sus respectivos valores de $\Delta\Delta G$ de unión" .....	55
Tabla 8. "Caracterización de los tipos de interacción sugeridos para la polimerización lateral de EcFtsZ" .....	59
Tabla 9. "Caracterización de los tipos de interacción inter-dominio de FtsZ" .....	62

### Índice de figuras

Figura 1. "Esquema resumen de los alineamientos utilizados para la construcción de EcFtsZ monomérica unida a GDP" .....	10
Figura 2. "Esquema resumen de los alineamientos utilizados para la construcción de EcFtsZ monomérica unida a GTP" .....	11
Figura 3. "Alineamientos utilizados para la construcción de modelos 3D de FtsZ en estado dimérico unidos a GTP y GDP" .....	13
Figura 4. "Esquema resumen de los alineamientos utilizados para la construcción del dímero longitudinal de EcFtsZ unido a GTP y GDP" .....	14
Figura 5. "Esquema resumen de los alineamientos utilizados para la construcción del dímero longitudinal de EcFtsZ unido a GDP en ambas subunidades" .....	15
Figura 6. "Esquema de los alineamientos utilizados para la construcción del dímero longitudinal de EcFtsZ, con GTP unido a ambas subunidades". .....	16
Figura 7. "Representación esquemática de la estrategia utilizada para la construcción de los complejos tetraméricos de EcFtsZ" .....	39
Figura 8. "Estructuras tridimensionales de MjFtsZ, PaFtsZ y $\alpha\beta$ -tubulina, y de los modelos de EcFtsZ-GTP/GDP" .....	25
Figura 9. "Topología de los elementos estructurales del modelo 3D de EcFtsZ-GTP" .....	26
Figura 10. "Modelos 3D de EcFtsZ en estado dimérico" .....	28
Figura 11. "Perfil de energía combinada de los modelos de EcFtsZ en estado dimérico obtenido por ProsaII" .....	30
Figura 12. "Correlación RMSD vs Energía como indicativo de seguridad del lazo modelado" .....	32

Figura 13. "Localización estructural de los aminoácidos de los clusters carboxilo (C) y amino (N) en EcFtsZ" .....	44
Figura 14. "Análisis de la dependencia de la interacción lateral N-C, N-N y C-C del estado de fosforilación del nucleótido" .....	46
Figura 15. "Evaluación <i>in silico</i> de la complementariedad geométrica de los tipos de interacción lateral de EcFtsZ" .....	48
Figura 16. "Tetrámeros con sus interfases de interacción lateral en EcFtsZ" .....	50
Figura 17. "Potencial electrostático e identificación de los aminoácidos claves en las interfases de interacción lateral de EcFtsZ" .....	54
Figura 18. "Contribución energética de los residuos claves en las interacciones laterales de EcFtsZ" .....	57
Figura 19. "Modelo de la estructura 3D de EcFtsZ con GDP" .....	64
Figura 20. "Análisis de movimientos correlacionados de FtsZ" .....	67
Figura 21. "Análisis de la flexibilidad intrínseca de FtsZ" .....	68
Figura 22. "Análisis del patrón de conservación de cambios conformacionales relacionados con la unión de un ligando (LRCC)" .....	71
Figura 23. "Cambios conformacionales relacionados a la hidrólisis del GTP de FtsZ" ..	73

### Abreviaturas

ASA:	Área de accesibilidad al solvente
EcFtsZ:	Proteína FtsZ de <i>Escherichia coli</i>
FtsZ:	<i>Filament Thermosensitive Z</i> protein
GDP:	Guanosin Di-fosfato
GTP:	Guanosin Tri-fosfato
LRCC:	Ligand related conformational change
MjFtsZ:	Proteína FtsZ de <i>Methanococcus jannashii</i>
MtbFtsZ:	Proteína FtsZ de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
PaFtsZ:	Proteína FtsZ de <i>Pseudomonas auroginosa</i>
PDB:	<i>Protein Data Bank</i>
RMSD:	Desviación promedio de la raíz de los cuadrados
3D:	Tridimensional
Å:	Ångström



## RESUMEN

FtsZ de *E. coli* (EcFtsZ) es una proteína de la división celular bacteriana, polimeriza para formar el anillo Z en el sitio de septación y es capaz de unir e hidrolizar GTP. Su polimerización *in vitro* da origen a protofilamentos que interactúan y forman dobles filamentos, que se piensa son la unidad básica para la inducción de hojas por  $Ca^{+2}$  y otros policationes. Existe abundante información experimental que aborda los aspectos funcionales de EcFtsZ, sin embargo, debido a la ausencia de una estructura tridimensional de EcFtsZ de alta resolución, no es posible hacer la correlación directa estructura-función que ayudaría a comprender a nivel molecular el mecanismo de división bacteriana. Las interacciones de EcFtsZ en el protofilamento solo se han analizado desde estructuras a baja resolución, es por esto que se desconocen las superficies involucradas y sus características fisicoquímicas. Como objetivo de este trabajo se generó mediante herramientas bioinformáticas un modelo de alta resolución que permitió conocer las características de los aminoácidos que participan en las interacciones longitudinales de EcFtsZ, predecir las superficies de interacción lateral en el polímero y evaluar el efecto de la presencia del fosfato *gamma* en el sitio de unión del nucleótido en las interacciones establecidas en el proceso de polimerización.

Por modelado molecular se construyó modelos para las diferentes conformaciones tridimensionales que el monómero de EcFtsZ adopta dependiendo del estado de fosforilación del GTP. Se usó como estructuras modelo las determinadas por difracción de rayos X de cristales de FtsZ de *M. jannaschii* (MjFtsZ) y de *P. aureginosa* (PaFtsZ) y la determinada por difracción electrónica de  $\alpha$ -tubulina. El modelo 3D de EcFtsZ mostró un dominio amino y otro carboxilo que se encuentran relacionados por

una superficie inter-dominio de características similares a las encontradas en complejos de tipo permanente. Análisis de flexibilidad intrínseca (*B-factor*) y de movimientos correlacionados sobre el monómero de EcFtsZ mostraron que ambos dominios se relacionan estrechamente, permitiendo la transmisión de cambios conformacionales asociados a la actividad GTPásica de EcFtsZ entre el sitio de unión de GTP (dominio amino) y regiones alejadas en el dominio carboxilo.

La superficie de interacción longitudinal de los monómeros de EcFtsZ en las diferentes conformaciones se determinó mediante modelado comparativo a partir de la estructura del heterodímero de  $\alpha\beta$ -tubulina. La caracterización de estas interfases indicó que el dímero de EcFtsZ pertenece a un tipo de complejo intermedio entre los clasificados como permanentes y no permanentes, es decir, la conformación dimérica se favorece respecto de su estado monomérico. Sin embargo, la conformación dimérica en que ambos monómeros están unidos a GTP mostró una menor estabilidad relativa al resto de las conformaciones analizadas.

La predicción de las superficies de interacción lateral entre protofilamentos de EcFtsZ se hizo mediante acoplamiento proteína-proteína con los dímeros modelados. Se generaron filtros biológicos basados en la conservación de secuencias para proponer una región de interacción y discriminar entre los complejos construidos por el programa de acoplamiento, así, se hizo un análisis de mutaciones correlacionadas a partir de un alineamiento múltiple de 470 secuencias de FtsZ y se encontró que pares de residuos distantes mutaban simultáneamente. Se seleccionaron residuos contiguos y conservados en un 50% con "*evolutionary tracing*" y se encontró una muy buena correlación entre el efecto de las mutaciones puntuales en EcFtsZ y las interfases predichas por bioinformática. El carácter no permanente de la interacción lateral de FtsZ se estableció por la participación de dos grupos de residuos, en su mayoría

cargados, relacionados evolutivamente y ubicados uno en el dominio amino (N) y otro en el dominio carboxilo (C). Los tetrámeros en conformación GTP mostraron interacciones laterales preferentes del tipo paralela N-N ( $\Delta\Delta G_{\text{unión}} = 8,2$  kcal/mol) y anti-paralela N-C ( $\Delta\Delta G_{\text{unión}} = 6,7$  kcal/mol) y en conformación GDP interacciones del tipo paralela N-C ( $\Delta\Delta G_{\text{unión}} = 15,7$  kcal/mol). Se identificó los aminoácidos que más contribuyen a la energía de unión de los complejos mediante una exploración por mutagénesis computacional de alaninas, así, la H156 y E152 aportan a la interacción paralela N-N con 2,46 kcal/mol y 5,29 kcal/mol, respectivamente, la S245 contribuye con 4,13 kcal/mol a la interacción paralela N-C y la K167 contribuye con 3,79 kcal/mol a la interacción anti-paralela N-C. Estos aminoácidos son posibles sitios de mutación puntual para determinar la importancia de las interacciones laterales y entender a nivel molecular el mecanismo de polimerización de EcFtsZ y su rol en la división celular.

## Abstract

The *E. coli* cell division protein FtsZ (EcFtsZ) polymerizes to form the Z ring at the septation site and is able to bind and hydrolyze GTP. In the *in vitro* polymerization process, proto-filaments interact to form double-filaments. These structures are thought to be the basic unit required for  $\text{Ca}^{+2}$ - and other polycations -induced sheet formation. Although a vast amount of experimental data related to FtsZ function can be found in the literature, the lack of an elucidated high resolution 3D structure makes very difficult to establish a correlation between structure and function which would help to understand the bacterial cell division mechanism at the molecular level. In this regard, the interactions of FtsZ monomers within the protofilament have been analyzed by using low resolution structures which imposes a limit for the understanding of physical-chemical properties of the process and the specific surfaces involved. As an aim in this work, a high resolution model was generated by applying bioinformatics tools. With this model it was possible to know first the properties of the residues forming part of longitudinal interactions of EcFtsZ, predict lateral interaction surfaces within the polymer and finally evaluate the effect of the *gamma* phosphate on the interactions involved in the polymerization process at the nucleotide binding site.

The different three-dimensional conformations adopted by the monomeric FtsZ depending upon the phosphorylation state of GTP were obtained by comparative modeling using the crystal structures of FtsZ from *M. jannaschii* (MjFtsZ), *P. aureginosa* (PaFtsZ) and the electronic diffraction of  $\alpha$ -tubulin. The EcFtsZ 3D model showed two domains: amino and carboxyl. Each domain is connected to each other by an inter-domain surface which shares similar features to those found in permanent complexes.

Intrinsic flexibility (*B-factor*) and correlated motions analysis on the EcFtsZ monomer showed a highly close relationship between both domains that allows the GTP-associated conformational changes in EcFtsZ between the nucleotide binding site (amine domain) and far regions in the carboxyl domain to be transmitted.

The longitudinal interaction surface of EcFtsZ monomers in different conformations was determined through comparative modeling using the structure of the  $\alpha\beta$ -tubulin heterodimer. The characterization of these surfaces indicated that EcFtsZ classified into a mid-way category between permanent and non-permanent complexes, e.g., the dimeric conformation is favored respect to the monomeric form. However, when GTP is bound to both monomers in the dimeric conformation the stability of the dimer is lower than those of other conformations analyzed.

The prediction of lateral interaction surfaces among EcFtsZ protofilaments was performed through protein-protein docking using the previously generated models. It was necessary to create reliable biological filters in order to propose an interacting region and at the same time to discriminate among the complexes generated by the docking software. To do so, a correlated mutation analysis was conducted from a multiple alignment among 470 FtsZ sequences, evidencing that distant residue pairs indeed mutate simultaneously. By evolutionary tracing, adjacent and related residues which are 50% conserved were selected. A high correlation was found among the effect of point mutations in EcFtsZ on the computationally predicted interfaces. The non-permanent aspect of FtsZ lateral interaction was determined to be caused by two groups of residues, most of which are charged, evolutionary related and located in the amino domain (cluster N) and the carboxyl domain (cluster C). The tetramers in the GTP conformation showed preferably N-N parallel lateral interactions ( $\Delta\Delta G_{\text{unión}} = 8,2$  kcal/mol), N-C anti-parallel lateral interactions ( $\Delta\Delta G_{\text{unión}} = 6,7$  kcal/mol) and N-C parallel

interactions in the GDP conformation ( $\Delta\Delta G_{\text{unión}} = 15,7$  kcal/mol). Those residues that contributed most to the interaction energy were identified through a computational alanine scanning. H156 and E152 were found to contribute to the N-N parallel interaction with 2,46 kcal/mol and 5,29 kcal/mol, respectively; S245 contribute with 4,13 kcal/mol to the N-C parallel interaction and K167 with 3,79 kcal/mol to the N-C anti-parallel interaction. These amino acids might be therefore a target for point mutations in order to determine the relevance of lateral interactions and understand the polymerization mechanism of EcFtsZ along with its role in cell division.

## INTRODUCCIÓN

La división celular bacteriana es controlada por una compleja maquinaria de proteínas que interactúan desencadenando los eventos necesarios para originar las células hijas, ya sea inhibiendo o promoviendo la formación del divisoma. Existen al menos 15 proteínas involucradas, cada una de las cuales ha desarrollado un cierto grado de especialización funcional dentro de las diferentes etapas que, hasta hoy, se conocen en este proceso (Errington y col., 2003; Vicente y col., 2006).

La más abundante es FtsZ, una GTPasa que posee un rol clave en el proceso de división celular, pues es responsable de la formación del anillo Z, que se ancla a la membrana interna por medio de ZipA y FtsA, y recluta al resto de las proteínas responsables de la síntesis de mureína y finalmente de la citoquinesis. Sin embargo, poco se sabe sobre el proceso de ensamblaje de este anillo, de su regulación y de su participación en la constricción de las membranas para la división celular (Nogales y Wang 2006). Ensayos *in vitro* han demostrado que FtsZ de *Escherichia coli* (EcFtsZ) a través de interacciones longitudinales polimeriza para formar protofilamentos, similares a los descritos en los microtúbulos de tubulina en eucariontes y estos se asocian para formar dobles filamentos que se piensa serían polímeros estables (Oliva y col., 2003). El calcio y DEAE-dextrano inducen la formación láminas y manojos por la asociación lateral de dobles filamentos y este tipo de polimerización operaría *in vivo* en la formación del anillo Z (Bramhill y Thompson 1994; Lowe y Amos 1999; Lu y col., 2000). Las mutaciones puntuales D86K, D96A, S245F, D158A, D187A, D299A, E250A, E238A, R174D, L68W y la doble mutante D166K/F268V afectaron la formación de láminas y manojos de EcFtsZ, pues por microscopía electrónica mostraron mayormente

protofilamentos simples (Lu y col., 2001). Se sabe que la estabilidad del polímero depende de la presencia del fosfato *gamma* de GTP en el sitio de unión del nucleótido. Una vez liberado el fosfato después de la hidrólisis de GTP se produce la despolimerización y se ha postulado que la EcFtsZ pasa de una conformación recta en el polímero a una conformación curva, en estado GDP propia de los monómeros en solución. Sin embargo, las formas rectas y curvas de EcFtsZ no se han encontrado (Huecas y Andreu 2004; Buey y col., 2006). Es por esta razón es que muchos trabajos recientes abordan este problema desde un punto de vista estructural y con mutagénesis sitio-dirigida. Ambas estrategias tienen limitaciones, pues la cristalización de una proteína fija una conformación y la mutagénesis sitio-dirigida puede afectar la estructura tridimensional de la proteína lejos del punto de la mutación. Por este motivo, es complementaria una aproximación global bioinformática que incorpore toda la información disponible y la haga compatible con la función de EcFtsZ.

Es indudable que el conocimiento de la estructura cristalográfica de una proteína o un modelo de su estructura tridimensional, ayuda a entender los mecanismos moleculares que la hacen funcional. La estructura de FtsZ del organismo hipertermófilo *Methanococcus jannaschii* (MjFtsZ) ingresada al PDB (*Protein Data Bank*) como 1fsz.pdb, se obtuvo en presencia de GDP por difracción de rayos X a 2,8 Å de resolución (Lowe 1998). A partir de esta estructura se observa que MjFtsZ posee dos dominios, uno amino con un motivo de plegamiento tipo Rossmann propio del sitio de unión del GTP y el dominio carboxilo con plegamiento similar al de la corismato mutasa, que interactúa con el dominio amino de otro monómero induciendo la actividad GTPásica y con otras proteínas como ZipA y SulA involucradas en la división celular (Romberg y Levin 2003). Posterior a la cristalización de MjFtsZ, se obtuvo la estructura de FtsZ de *P. aeruginosa* (PaFtsZ) en presencia de GDP y acomplejada con SulA, un

inhibidor de la división celular, la interfase entre ellos esta dada por el lazo T7 de FtsZ opuesto al sitio de unión del nucleótido, por lo que se postula que es este el mecanismo de bloqueo de la polimerización, el complejo se obtuvo por difracción de rayos X a 2,1 Å de resolución y se ingresó al PDB como 1öfu.pdb (Cordell y col., 2003).

Con el fin de visualizar el cambio estructural entre la conformación GDP y GTP de MjFtsZ el cristal del dímero sin nucleótido se embebió en una solución con GTP y se determinaron sus coordenadas (1w5a.pdb) y FtsZ de *Mycobacterium tuberculosis* (MtbFtsZ) se cristalizó en las conformaciones GTP y GDP (1rlu.pdb, 1rq7.pdb) (Leung y col., 2004). El análisis de estas estructuras reveló que los cambios estructurales se restringían a pequeñas zonas (Buey y col., 2006). El plegamiento de FtsZ no requiere de chaperonas (Andreu y col., 2002), por lo tanto para definir la relación entre el dominio amino y el carboxilo con la actividad GTPásica, ambos dominios de FtsZ de *Thermotoga maritima* (TmFtsZ) se expresaron por separado. Al agregar GTP al dominio amino, no se detectó actividad GTPásica y solo se recuperó al juntar ambos dominios (Oliva y col., 2004). Este antecedente sugiere que la interacción de ambos dominios a través de su interfase favorece la estructura funcional de la proteína.

La estructura de los polímeros de MjFtsZ ha sido resuelta a baja resolución y se encontró que los dobles filamentos interactuaban lateralmente a través de los dominios amino (Oliva y col., 2003). La interacción lateral entre dobles filamentos se hizo ajustando la estructura tridimensional de MjFtsZ al patrón de difracción electrónica a baja resolución de una lámina (Lowe y Amos 1999). Se concluyó que las interacciones laterales entre los dobles filamentos era anti-paralela y a través de los dominios carboxilos. Este último resultado no permite afirmar en forma concluyente que la interacción lateral entre dobles protofilamentos se produce a través del extremo carboxilo.

La estructura tridimensional de EcFtsZ no se ha obtenido por métodos experimentales, por estas razones se construyó un modelo a partir de las estructuras conocidas. Para su predicción se utilizó el modelado comparativo que usa como molde (templado) las estructuras de proteínas homólogas determinadas experimentalmente para generar un modelo tridimensional de la proteína de interés. Sus mayores limitaciones son errores en el alineamiento entre el molde y la secuencia a modelar y en la predicción de regiones correspondientes a lazos. Por otro lado, el contar con información estructural de más de un homólogo hace posible obtener un mejor alineamiento de secuencias y complementar regiones de la proteína que queremos modelar que no estuvieran presentes en alguno de los moldes (Sali y col., 1995; Fiser y col., 2000). Para modelar la estructura de EcFtsZ, disponemos de una serie de estructuras determinadas experimentalmente y gracias a las cuales se construyó modelos tridimensionales de EcFtsZ en sus diferentes conformaciones, unida a GTP, GDP y como filamento simple y doble. Con los modelos estructurales de EcFtsZ es posible hacer acoplamiento proteína-proteína para predecir la interfase de interacción lateral entre protofilamentos de FtsZ y estudiar el efecto del estado de fosforilación del nucleótido en la interacción.

En esta memoria se utilizará una estrategia bioinformática para correlacionar la estructura tridimensional de EcFtsZ con las interacciones longitudinales y laterales responsables de la formación de sus polímeros. Por este motivo se hará una breve introducción de las herramientas bioinformáticas, *evolutionary tracing* (ET), mutaciones correlacionadas y exploración por mutagénesis computacional de alaninas.

*Evolutionary tracing* (ET). Es aconsejable antes de hacer una mutación tener en consideración los efectos que esta producirá sobre la estructura y la función de la proteína. Es habitual comparar la actividad de la proteína silvestre con la mutada para

identificar un residuo o región esencial para su función. Esta estrategia utilizada para determinar superficies de interacción proteína-proteína, se puede enriquecer reconociendo que la mayor conservación de los residuos de una interfase respecto del resto de la superficie de la proteína, permite hacer una predicción del sitio de interacción proteína-proteína con un 80% de certeza (Halperin y col., 2004). El método de "evolutionary tracing", investiga las mutaciones y cambios funcionales que han ocurrido producto de la evolución, tanto a la proteína como a la familia a la que pertenece, de manera que se le coloca en un contexto más amplio. El análisis ET sostiene que los residuos que definen la arquitectura de una proteína son, en su mayoría, invariantes, a diferencia de los residuos que participan directamente en la función específica de la proteína, que al ser sustituidos producen variaciones funcionales. ET clasifica los aminoácidos de una secuencia según su importancia evolutiva, y demuestra que los residuos mejor evaluados forman grupos estructurales que coinciden con los sitios funcionales (Lichtarge y col., 2003).

*Análisis de Mutaciones Correlacionadas.* Las proteínas implicadas en la formación de complejos macromoleculares presentan especificidad de interacción, de manera que existen redes de contactos inter-residuos responsables de mantener esta especificidad y consecuentemente, la función de la proteína. Durante un proceso de adaptación evolutiva la secuencia de aminoácidos que participa en la interfase de interacción proteína-proteína del complejo debe reflejar estos cambios, es decir, mutaciones en una proteína deben ser compensadas con mutaciones en la otra proteína, sin afectar la función del complejo (Olmea y Valencia 1997; Pazos y col., 1997). Por ejemplo, si existe cierta complementación en los volúmenes de un par de residuos que se encuentran interactuando, la sustitución del residuo de menor volumen por otro de mayor volumen, podría provocar una desestabilización estructural que

afectaría la complementariedad de la superficie de interacción, sin embargo, si a la vez, es sustituido el residuo hasta ahora intacto, por otro de menor tamaño, el impedimento estérico generado por la primera mutación desaparecería recuperando la funcionalidad de la proteína.

Un buen ejemplo de la aplicación del análisis de mutaciones correlacionadas es la determinación de la interfase de interacción en el homodímero FtsA-FtsA. Esta superficie de interacción se determinó al comparar la capacidad de unión de FtsA con una biblioteca de péptidos, provenientes de su estructura. El segmento identificado como importante en la interacción FtsA-FtsA coincidió con el resultado de mutaciones correlacionadas, y sirvió para la construcción de un modelo 3D del homodímero de FtsA (Carettoni y col., 2003).

Exploración computacional de alaninas. Esta estrategia se basa en una exploración de alaninas en la que se mutan uno a uno los residuos por alanina de manera experimental, se utiliza como una herramienta efectiva para analizar las interacciones en las interfases proteína-proteína (Huo y col., 2002). Sin embargo, el método experimental es demoroso, pues requiere de la construcción de mutantes por cada residuo analizado y esta dificultad no se presenta en el método computacional. En ambos métodos, las sustituciones individuales de los aminoácidos involucrados en la interfase de interacción permitieron distinguir los aminoácidos esenciales. Así, se denominó residuos clave a los residuos energéticamente más importantes ( $\Delta\Delta G_{\text{unión}} > 1$  kcal/mol) en la unión de la hormona del crecimiento y su receptor, donde solo una pequeña parte de los residuos pertenecientes a la interfase contribuyen mayormente a la energía de unión de las proteínas del complejo (Clackson y Wells 1995). Trabajos posteriores sugirieron que la presencia de residuos clave en una fracción de la superficie de interacción es una propiedad de la mayoría de los complejos proteína-

proteína (Bogan y Thorn 1998), de manera que se han creado bases de datos de mutaciones por exploración de alanina de complejos conocidos y su efecto sobre la constante de afinidad (Thorn y Bogan 2001) y a la vez, se han diseñado modelos computacionales que simulan estas sustituciones y son capaces de predecir los cambios de energía libre de unión determinados experimentalmente (Kortemme y col., 2004).

Para determinar las características de las superficies de las interacciones dominio-dominio, longitudinales en un protofilamento y laterales en una sábana se analizaron sus propiedades estructurales en los cristales y en los modelos construidos en esta memoria. Con este propósito, se siguió la estrategia empleada para caracterizar la interacción proteína-proteína a partir de complejos cristalizados. A partir de los aminoácidos responsables de la interacción entre las proteínas se definió la formación de puentes de hidrógeno inter-proteína, porcentaje de aminoácidos hidrófobos, complementariedad geométrica y el área involucrada en la interacción. Dependiendo de los valores encontrados se clasificaron los complejos en permanentes (donde las proteínas solo se pueden separar por desnaturación) y no permanentes (Jones y Thornton 1996; Henrick y Thornton 1998; Nooren y Thornton 2003).

A partir de la estructura de los polímeros de EcFtsZ, se distinguen 3 tipos de interacción fundamentales para su funcionalidad. Estas interacciones se pueden ordenar de acuerdo a su afinidad relativa, así, en orden jerárquico tenemos la interacción inter-dominio, la interacción longitudinal entre monómeros de FtsZ y la interacción lateral entre protofilamentos. La estrategia para caracterizar las superficies de las dos primeras interacciones y para predecir las regiones de interacción laterales en FtsZ, consistió en la generación de modelos estructurales a través de modelado

comparativo en los distintos estados de polimerización y en las diferentes conformaciones inducidas por el estado de hidrólisis de GTP.

Para abordar desde un punto de vista estructural la importancia de la actividad GTPásica en el mecanismo de polimerización de FtsZ, se determinó las regiones de la estructura de FtsZ que participan en esta actividad. En general, al considerar el parámetro de flexibilidad estructural es posible identificar como regiones rígidas a aquellas zonas que están más bien relacionadas con su estabilidad estructural y como regiones flexibles a aquellas relacionadas con la funcionalidad, de manera que una mutación en zonas flexibles de una proteína no afectaría su estabilidad estructural, pero si afectaría su función (Hilser y col., 1998; Freire 1999). Un factor estructural considerado en esta memoria para evaluar la flexibilidad intrínseca de FtsZ en estado cristalino es el factor termal o *B-factor*, el cual se relaciona linealmente con el movimiento térmico de cada átomo y es obtenido a partir de los datos experimentales de la cristalización (Yuan y col., 2003). *In silico*, una simulación de dinámica molecular sobre la estructura de FtsZ permitirá establecer la existencia de movimientos correlacionados entre el lazo T3, directamente implicado en la hidrólisis del GTP (Díaz y col., 2001), y elementos estructurales distantes entre si, localizados tanto en el dominio amino, el cual posee el bolsillo de unión del nucleótido y en el dominio carboxilo de la misma molécula.

## **Objetivo General**

Predecir y caracterizar las interfases inter-dominio, de interacción longitudinal y lateral de FtsZ y determinar el efecto de la hidrólisis del GTP sobre estas interacciones.

## **Hipótesis**

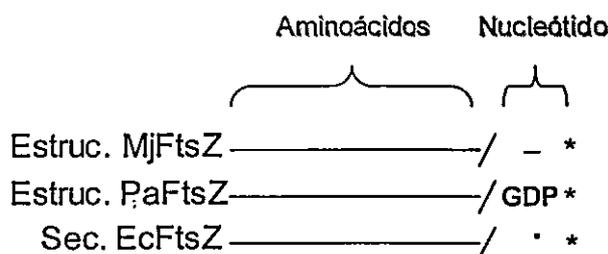
“Las propiedades de las superficies de interacción longitudinal y lateral de EcFtsZ permitirán predecir que la interacción lateral es entre los dominios amino y depende de la presencia del fosfato *gamma* de GTP en el sitio del nucleótido”.

## **Objetivos Específicos**

1. Construir los modelos tridimensionales de EcFtsZ, como monómero y dímero mediante modelado comparativo.
2. Acoplamiento proteína-proteína para la construcción de tetrámeros de FtsZ y aplicación de filtros biológicos para su selección.
3. Caracterizar las superficies de interacción de las interfases inter-dominio, y de las interacciones longitudinales y laterales de FtsZ.
4. Análisis de la flexibilidad intrínseca de FtsZ y de los movimientos correlacionados de su estructura asociados a la actividad GTPásica.

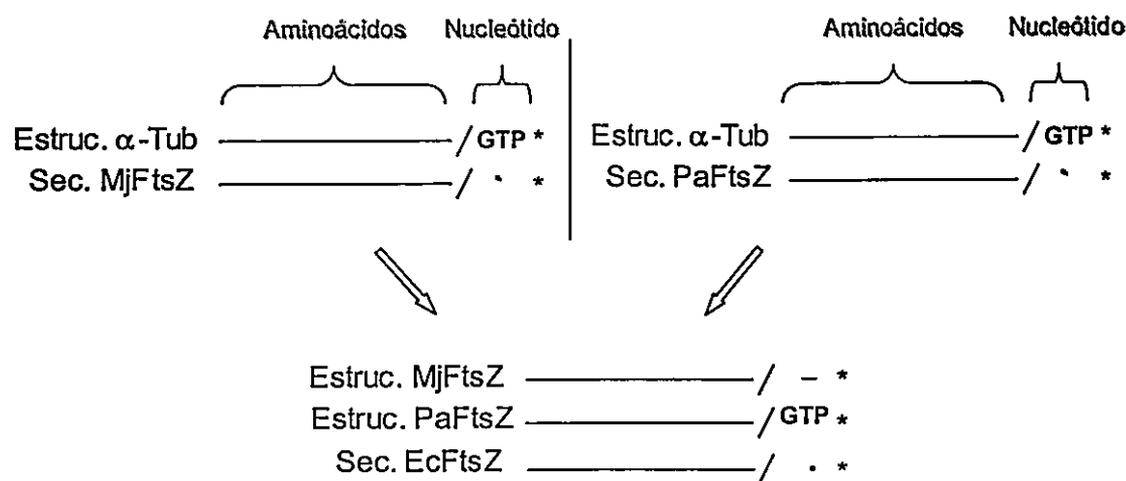
## MATERIALES Y MÉTODOS

**Construcción del modelo 3D del monómero de EcFtsZ unido a GDP y GTP mediante modelado comparativo de proteínas.** Las estructuras cristalizadas de MjFtsZ (1fsz.pdb) y de PaFtsZ (1ofu.pdb) (Lowe 1998; Cordell y col., 2003), disponibles desde el *Protein Data Bank*, se utilizaron como moldes para la construcción del modelo tridimensional de la estructura de EcFtsZ unida a GDP. Estas proteínas presentan un 40 y un 58% de identidad de secuencias con EcFtsZ, respectivamente. Se alineó estructuralmente la cadena A de 1ofu.pdb con 1fsz.pdb usando el algoritmo CE (Shindyalov y Bourne 2001). A este alineamiento se agregó la secuencia de EcFtsZ usando la subrutina de alineamientos en bloque (align\_block.top) disponible en Modeller v6.2 (Sali y col., 1995). El alineamiento final se usó para construir el modelo del monómero de EcFtsZ-GDP con el programa Modeller v6.2. En la figura 1 se esquematiza el alineamiento generado.



**Figura 1. Esquema resumen de los alineamientos utilizados para la construcción de EcFtsZ monomérica unida a GDP.** Se representa el alineamiento utilizado para la construcción del modelo 3D de EcFtsZ en estado monomérico unido a GDP a partir de las estructuras de MjFtsZ (1fsz.pdb) y PaFtsZ (1ofu\_A.pdb) unidas a GDP. Simbología: (/) indica el final de la secuencia aminoacídica, (-) indica un *gap* en el alineamiento, (.) indica heteroátomo y (\*) el final del modelo.

Para la construcción del modelo 3D de EcFtsZ unida a GTP se hizo un alineamiento estructural con el algoritmo CE entre 1fsz.pdb y la subunidad  $\alpha$  de la estructura de tubulina que se encuentra unida a GTP (1jff.pdb) (Nogales y col., 1998), así, este alineamiento se utilizó para construir el modelo 3D de MjFtsZ unida a GTP. De la misma forma se diseñó el monómero de PaFtsZ unida a GTP. Luego, ambas estructuras se usaron como moldes para generar el modelo 3D de EcFtsZ en estado monomérico y unida a GTP (EcFtsZ-GTP) con Modeller v6.2 (figura 2).



**Figura 2.** Esquema resumen de los alineamientos utilizados para la construcción de EcFtsZ monomérica unida a GTP. En la parte superior se observan los alineamientos utilizados para la construcción de las estructuras de MjFtsZ y PaFtsZ unidas a GTP a partir de la estructura de  $\alpha$ -tubulina. En la parte inferior, la representación del alineamiento usado para la construcción del modelo 3D de EcFtsZ-GTP en estado monomérico a partir de las estructuras de MjFtsZ y PaFtsZ unidas a GTP. Simbología: (/) indica el final de la secuencia aminoacídica, (-) indica un gap en el alineamiento, (.) indica heteroátomo y (\*) el final del modelo.

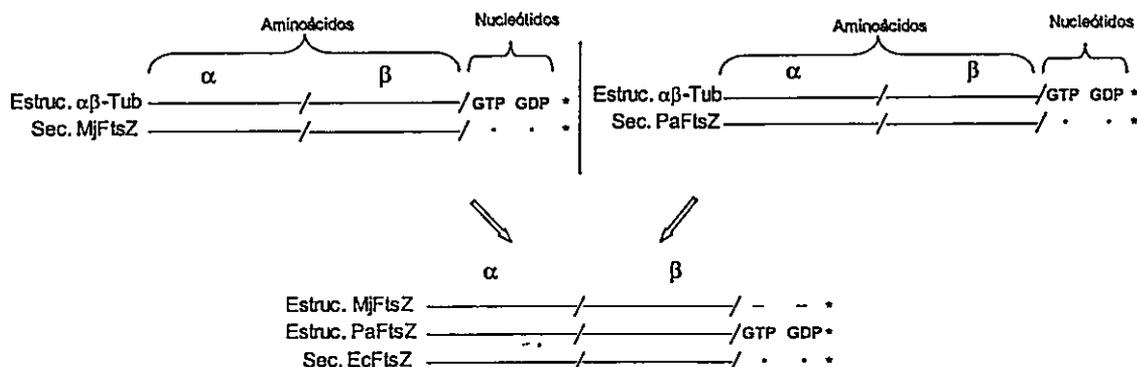
Los 30 modelos generados en cada caso se construyó con el nivel de refinamiento dado por la subrutina `refine_4` de Modeller v6.2, que utiliza el campo de fuerza de *Charmm* para acomodar las cadenas laterales de los residuos según su ambiente sin afectar la distribución de los carbonos alfa de la molécula. Se seleccionó el modelo 3D de menor pseudo-energía entregado por Modeller v6.2 (valor estadístico que indica que este modelo fue el que cumplió mejor las restricciones extraídas del molde), y el mejor evaluado de acuerdo al valor de pseudo-energía entregado por Prosall, que evalúa la probabilidad de que el modelo construido se haya generado a partir de un molde adecuado (Sippl 1993).

**Construcción del dímero longitudinal de MjFtsZ y de PaFtsZ unidos a GTP y GDP.** Se alineó estructuralmente (con el algoritmo CE) el herodímero de  $\alpha\beta$ -tubulina (1jff.pdb) con MjFtsZ (1fsz.pdb) y PaFtsZ (1ofu.pdb) (figura 3A). Con el programa Modeller v6.2 se construyeron 30 modelos en que se consideró los heteroátomos GTP y GDP como se muestra en la figura 4. Se usó la subrutina de refinamiento `refine_4` y se eligió el mejor modelo de acuerdo a la evaluación de Prosall. El resultado fue la estructura dímica de MjFtsZ unida a GTP y GDP de 627 aminoácidos y la estructura dímica de PaFtsZ unida a GTP y GDP de 610 residuos.

**Construcción del dímero longitudinal de EcFtsZ unido a GTP y GDP (EcFtsZ-GTP/EcFtsZ-GDP).** Los modelos dímicos de MjFtsZ y de PaFtsZ obtenidos anteriormente se usaron de molde para obtener el modelo dímico de EcFtsZ. El alineamiento para modelar el dímero de EcFtsZ se muestra en la figura 3B.



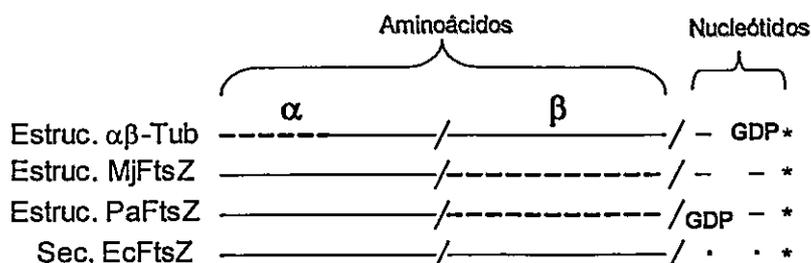
De manera esquemática se presenta en la siguiente figura el mismo alineamiento (figura 4).



**Figura 4. Esquema resumen de los alineamientos utilizados para la construcción del dímero longitudinal de EcFtsZ unido a GTP y GDP.** En la parte superior se observan los alineamientos utilizados para la construcción de los dímeros de MjFtsZ y PaFtsZ unidos a GTP y GDP a partir de la estructura de  $\alpha\beta$ -tubulina. En la parte inferior se muestra la representación del alineamiento usado para modelar la estructura 3D de EcFtsZ en estado dimérico unido a GTP y GDP a partir de las estructuras de MjFtsZ y PaFtsZ. Simbología: (/) indica el final de la secuencia aminoacídica, (-) indica un gap en el alineamiento, (.) indica heteroátomo y (\*) el final del modelo.

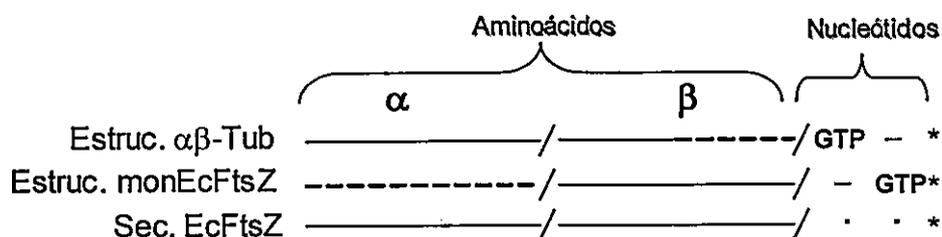
**Construcción del dímero longitudinal de EcFtsZ unido a GDP en ambas subunidades (EcFtsZ-GDP/EcFtsZ-GDP).** A partir del alineamiento mostrado en la figura 5 se construyó por modelado comparativo el dímero de EcFtsZ en conformación GDP. Para el modelo de la subunidad  $\alpha$  del dímero de EcFtsZ se usó como moldes la estructura cristalizada de MjFtsZ (1fsz.pdb) y la estructura de PaFtsZ (1ofu.pdb), ambas unidas a GDP. Para el modelo de la subunidad  $\beta$  se usó  $\beta$ -tubulina y su correspondiente nucleótido. En el alineamiento se consideró parte de los aminoácidos

de la interfase de  $\alpha$ -tubulina para mantener la interfase longitudinal determinada por su estructura dimérica.



**Figura 5. Esquema resumen de los alineamientos utilizados para la construcción del dímero longitudinal de EcFtsZ unido a GDP en ambas subunidades.** Simbología: (/) indica el final de la secuencia aminoacídica, (-) indica un gap en el alineamiento, (.) indica heteroátomo y (\*) el final del modelo.

**Construcción del dímero longitudinal de EcFtsZ unido a GTP en ambas subunidades (EcFtsZ-GTP/EcFtsZ-GTP).** Se construyó el dímero de EcFtsZ en conformación GTP a través de modelado comparativo de acuerdo al alineamiento mostrado en la figura 6. Para el modelo de la subunidad  $\alpha$  del dímero de EcFtsZ se usó  $\alpha$ -tubulina y su correspondiente nucleótido. Para el modelo de la subunidad  $\beta$  se usó el monómero EcFtsZ unido a GTP. En el alineamiento se consideró parte de los aminoácidos de la interfase de  $\beta$ -tubulina para mantener la interfase longitudinal determinada por su estructura dimérica. En la figura 6 se esquematiza el alineamiento utilizado.



**Figura 6. Esquema de los alineamientos utilizados para la construcción del dímero longitudinal de EcFtsZ, con GTP unido a ambas subunidades.** Simbología: (/) indica el final de la secuencia aminoacídica, (-) indica un *gap* en el alineamiento, (.) indica heteroátomo y (\*) el final del modelo.

**Evaluación de los modelos.** Para evaluar los distintos modelos se usó el programa Prosall (Sippl 1993). El programa entrega un valor de pseudo-energía basado en potenciales estadísticos que permite discriminar entre un modelo 3D construido a partir de un molde con un tipo de plegamiento correcto y si el alineamiento entre la secuencia del molde y la secuencia del modelo es adecuado. El valor de pseudo-energía entregado por Prosall se convierte en un valor de probabilidad (pG) que corrige por el largo de la secuencia. Si el valor de pG es igual a 1 significa que Prosall permite distinguir el valor de pseudo-energía obtenido para el modelo de los valores de pseudo-energía obtenidos para una distribución de modelos basados en moldes y alineamientos al azar (Sánchez y Sali 1998).

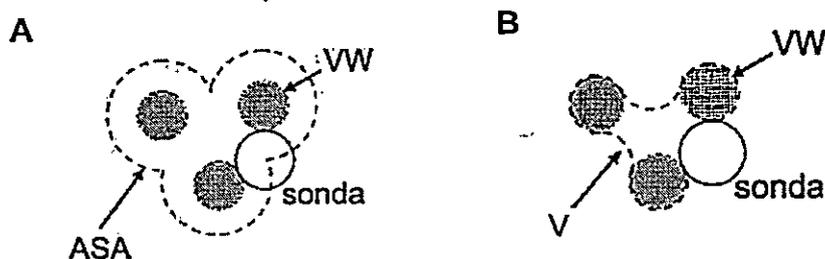
**Modelado explícito de lazos.** La evaluación de las regiones menos confiables de los modelos obtenidos para los dímeros de EcftsZ, se realizó con un alineamiento múltiple de los 10 mejores modelos construidos. La superposición de sus perfiles de pseudo-energía obtenidos de Prosall mostró zonas de las estructuras donde hay variaciones importantes entre un modelo y otro, estas zonas corresponden a lazos. Los lazos

generalmente requieren modelado independiente para obtener su conformación más probable (Fiser y col., 2000).

El método de modelado de lazos consiste en representar un segmento de la proteína con todos sus átomos, a excepción de los átomos de hidrógeno, de acuerdo a las preferencias estadísticas y restricciones espaciales que incluye el campo de fuerza Charmm27 como son: los ángulos de enlace, el largo de enlace, los ángulos dihedros, puentes de hidrógeno, constantes de solvatación, etc. Con dinámica molecular y *simulating annealing* se obtuvo 500 conformaciones distintas para los lazos indicados en la tabla 2 (Fiser y col., 2000).

Los cálculos de las conformaciones de los lazos se distribuyeron en un racimo de computadores mediante el programa de distribución *Codine* de SUN *microsystem*. Para esto, se programó una serie de programas en Perl, el primero de ellos (*./prepara\_nodos.sh*) copia los archivos necesarios para los cálculos en cada nodo. El segundo archivo (*reparte\_loop.pl*) determina el número de modelos que construye cada nodo. El tercer programa (*distrib\_loop.csh*) da instrucciones al programa de distribución *Codine* para ejecutar las tareas requeridas en cada nodo. Finalmente, el *script* (*ejecuta\_loop.pl*) obtiene las regiones modeladas mediante el programa Modeller v6.2. y la subrutina *Loop*. Los modelos generados se compararon entre si usando la subrutina *Maling3d* de Modeller v6.2 para determinar el  $RMSD_{(C,C\alpha,CO)}$  entre las conformaciones obtenidas. A partir de un gráfico de  $RMSD_{(C,C\alpha,CO)}$  y el valor de energía de cada modelo se seleccionó la conformación más probable para un determinado lazo en el dímero de EcFtsZ.

**Caracterización fisicoquímica de las interfases.** Se analizó las interfases de la interacción longitudinal de EcFtsZ en todos los estados de fosforilación del nucleótido (GTP/GDP) en el dímero, en el heterodímero de  $\alpha\beta$ -tubulina (1jff.pdb) y en el dímero de MjFtsZ (1w5a.pdb). Además, se caracterizaron las interfases de interacción lateral de EcFtsZ en cada uno de los tetrámeros modelados en distintos estados del nucleótido (GTP/GDP) y se caracterizaron las interfases inter-dominio de PaFtsZ (1ofu\_A.pdb), de *Mycobacterium tuberculosis* (MtbFtsZ) (1rq7.pdb), de MjFtsZ (1fsz.pdb) y del modelo 3D de EcFtsZ. Los parámetros utilizados para esta caracterización son el valor de  $\Delta$ ASA, el número de enlaces de hidrógeno por  $100 \text{ \AA}^2 \Delta$ ASA, el volumen *gap* y el porcentaje de residuos hidrofóbicos. Estos parámetros se definen a continuación: 1) El área de accesibilidad al solvente, ASA, es el área que describe el centro de una esfera de 1,4 Å de radio, que representa a la molécula de agua, al "rodar" por la superficie molecular manteniendo el contacto con los átomos a la distancia de van der Waals (VW) (esquema A). El valor  $\Delta$ ASA para un dímero AB formado por la interacción entre un monómero A y uno B es  $\frac{1}{2} ((ASA(A) + ASA(B) - ASA(AB)))$  estos valores se obtuvieron usando el servidor *Protein-Protein Interaction Server* v1.5 <http://www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/PP/server/> (Jones y Thornton 1996).



**Esquema.** Diagrama de las metodologías empleadas para los cálculos de (A) superficie de accesibilidad al solvente y (B) complementariedad geométrica.

Se consideró como residuos de interfase a aquellos aminoácidos que presentaron una diferencia en el valor de ASA mayor a  $1 \text{ \AA}^2$  entre los estados libre y acomplejado. 2) Número de enlaces de hidrógeno por  $100 \text{ \AA}^2 \Delta\text{ASA}$ , es calculado usando HBplus, [www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/hbplus/home.html](http://www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/hbplus/home.html). El programa genera un conjunto de posibles posiciones para los átomos de hidrógeno que asigna para la estructura y define cada enlace de hidrógeno entre donantes y aceptores (McDonald y Thornton 1994). 3) Volumen *gap*, es una medida del volumen de la cavidad vacía que queda en la superficie de interacción entre los monómeros y se calcula usando el programa SURFNET, <http://www.biochem.ucl.ac.uk/~roman/surfnet/surfnet.html> (Laskowski 1995). Este método ubica esferas (sonda) entre los átomos involucrados en la superficie de interacción proteína-proteína, estas esferas varían sus radios desde 1 a 5 Å, de manera de cubrir el máximo volumen posible respetando el radio de van der Waals (VW) de los átomos de la interfase. Así, la suma de todas las esferas da una medida del volumen total (V) entre las dos sub-unidades (esquema B). 4) Porcentaje de residuos hidrófobos en la interfase proteína-proteína se obtuvieron usando el servidor *Protein-Protein Interaction Server* v1.5 (Jones y Thornton 1996).

**Acoplamiento proteína-proteína.** El método de acoplamiento proteína-proteína es una técnica para predecir si una molécula se unirá a otra, usualmente una proteína. El acoplamiento entre una proteína y un ligando se hace a través de modelado de su interacción: si la geometría del par es complementaria e involucra interacciones bioquímicas favorables, entonces el ligando se unirá a la proteína *in vitro* o *in vivo*. Esta técnica considera a las moléculas como cuerpos rígidos, las que interactúan dejando a una de ellas estática y a la otra móvil (generalmente la de menor tamaño) para permitir la rotación en torno de la primera y la generación de los distintos complejos. El complejo

proteína-proteína más probable se selecciona de acuerdo al cumplimiento de criterios geométricos y fisicoquímicos definidos por las bases de datos de complejos proteicos cristalizados. Luego, se incluye el parámetro de flexibilidad, donde se permite a las cadenas laterales de los residuos de la interfase adoptar las conformaciones de mínima energía.

El complejo cristalizado FtsZ-SulA (1ofu.pdb) se utilizó como control positivo para la predicción de superficies de interacción y la metodología para determinar la seguridad de la predicción consistió en trazar sobre la interfase de FtsZ del complejo cristalizado una circunferencia de radio 10 Å que incluyó los residuos de la interfase de interacción FtsZ-SulA y otra del mismo radio que incluyó los residuos de la interfase predicha. La distancia entre los centros de ambas circunferencias fue de 3 Å, es decir existe un 80% de superposición entre ambas superficies, lo que indicó una muy buena coincidencia de las áreas analizadas.

El programa 3D-dock se eligió por su buena evaluación en el último *Benchmark* para acoplamiento proteína-proteína ([www.bmm.icnet.uk/docking](http://www.bmm.icnet.uk/docking)) (Carter y col., 2005). Consta básicamente de tres etapas: FTDock, que genera 10.000 modelos de acuerdo a su complementariedad de superficie y potencial electrostático, luego RPScore, que ordena los complejos generados en una clasificación jerárquica según la probabilidad de los residuos a encontrarse en la interfase de interacción y MultiDock que realiza una minimización de energía y refina los complejos anteriores. En nuestro caso, debido al gran número de átomos implicados en la interfase y el alto costo computacional que implicaba, esta etapa se reemplazó con minimizaciones de energía utilizando Charmm27. Así, los dímeros obtenidos por modelado comparativo se utilizaron para predecir la interacción lateral entre protofilamentos de EcFtsZ. En la figura 7 se esquematiza la metodología empleada en la construcción de los tetrámeros.

Para hacer una selección de los complejos construidos por acoplamiento proteína-proteína, se incorporaron análisis evolutivos que predicen superficies de interacción proteína-proteína a partir de la secuencia de aminoácidos (Pazos y col., 1997).

**Análisis de mutaciones correlacionadas.** Este análisis considera que las proteínas están sometidas a una presión selectiva. Esto significa que las proteínas en un complejo deben co-evolucionar de manera que mantengan la complementariedad geométrica o la atracción por cargas que conserva la funcionalidad de estas. El análisis se hizo a partir de un alineamiento de 470 secuencias de FtsZ (1fsz.hssp) (Schneider y col., 1997). El programa para calcular la correlación estadística entre los aminoácidos fue Plotcor (aporte del Dr. Alfonso Valencia del Centro Nacional de Biotecnología, España) (Pazos y col., 1997). Las correlaciones encontradas se extrapolaron a la secuencia de FtsZ de *E. coli* y se seleccionaron según los siguientes criterios:

- Se eliminó las correlaciones con un coeficiente de correlación ( $r$ ) menor a 0,58, debido a que pares de aminoácidos con valores menores de  $r$ , se encontraron mas bien aislados que agrupados sobre una posible cara lateral.
- Se descartó residuos con un porcentaje de conservación mayor a 90%.
- Se consideró los pares de aminoácidos ubicados en la superficie de la proteína, es decir residuos con un porcentaje de ASA de al menos un 10% de su superficie total.
- Se descartó los residuos que participan en la interacción longitudinal, considerando como interfase todos los residuos que estuvieran a menos de 5 Å de una y otra cadena de acuerdo el modelo dimérico de EcFtsZ construido anteriormente.

**Evolutionary tracing (ET).** Basado en un alineamiento de 270 secuencias de FtsZ con identidades superiores a un 40% alineadas según HSSP. El programa ET identificó los residuos con un 50% de conservación y que, además se agrupan en la estructura 3D de la proteína. El programa ET pertenece al paquete DS Modeling v1.1 (Copyright (C) 2001-2003 by Accelrys). Este criterio de selección se incorporó como segundo filtro evolutivo para clasificar los complejos obtenidos en la predicción de interacción lateral a través del acoplamiento proteína-proteína.

**Exploración computacional de alaninas.** Como herramienta para determinar la estabilidad de los tetrámeros obtenidos de acuerdo a su tipo de interacción, se utilizó un acoplamiento computacional de alaninas para interfases, servidor Robetta [www.rosetta.bakerlab.org](http://www.rosetta.bakerlab.org) (Clackson y Wells 1995). El programa hace un análisis sobre la estructura de un complejo proteico e identifica los aminoácidos energéticamente importantes en la interacción y que desestabilizarían el complejo al ser cambiados por alanina (*hot spots*). Este método usa una función de energía libre para calcular el efecto de una mutación por alanina en la superficie de interacción de un complejo proteína-proteína. La función consiste en una combinación del potencial de Lennard Jones (término de repulsión =  $E_{L\text{repul}}$  y atracción =  $E_{L\text{atrac}}$ ) para describir el empaquetamiento atómico de las interacciones, un modelo de solvatación implícita ( $G_{\text{sol}}$ ), el potencial de puentes de hidrógeno dependientes de la orientación atómica obtenido desde estructuras de alta resolución ( $E_{\text{HB(L-C)}}$ ,  $E_{\text{HB(C-C)}}$ ) y términos estadísticos que consideran los rotámeros probables. Así, se calculó la energía de estabilización del complejo y la de sus componentes en estado libre con la siguiente ecuación:

$$\Delta G = W_{\text{atrac}} E_{LJ\text{atrac}} + W_{\text{repul}} E_{LJ\text{repul}} + W_{\text{HB(L-C)}} E_{\text{HB(L-C)}} + W_{\text{HB(C-C)}} E_{\text{HB(C-C)}} + W_{\text{sol}} G_{\text{sol}}$$

donde W, es la ponderación de cada término en la función final.

Luego, la diferencia entre la energía de unión del complejo mutado y la del complejo silvestre esta dada por:

$$\Delta\Delta G_{\text{unión}} = (\Delta G_{\text{AB}}^{\text{MUT}} - \Delta G_{\text{A}}^{\text{MUT}} - \Delta G_{\text{B}}^{\text{MUT}}) - (\Delta G_{\text{AB}}^{\text{WT}} - \Delta G_{\text{A}}^{\text{WT}} - \Delta G_{\text{B}}^{\text{WT}})$$

**Análisis de movimientos correlacionados.** Utilizando la estructura modelada del monómero de EcFtsZ como estructura inicial, se realizó una simulación de dinámica molecular de 1 ns con el programa Gromacs v3.0 (Van Der Spoel y col., 2005). El archivo PDB se leyó y re-escribió al formato Gromacs, en el cual se agregaron átomos de hidrógeno. Se seleccionó el campo de fuerza Gromos96 y la proteína se sumergió en una caja cúbica de agua. Se consideraron 18 átomos de sodio para mantener la neutralidad del sistema. Se hizo una minimización de energía de 1 ps, luego se equilibró durante 200 ps a 300 °K, y se realizó una simulación de dinámica durante 1 ns. Se rescató la trayectoria de la dinámica con 400 instantáneas. Se analizó la matriz de co-varianza de movimientos para los carbonos alfa y se identificó la estructura secundaria correspondiente a FtsZ. Se localizaron en la matriz los residuos cercanos al GTP para analizar la existencia de correlación entre ellos y el resto de la estructura.

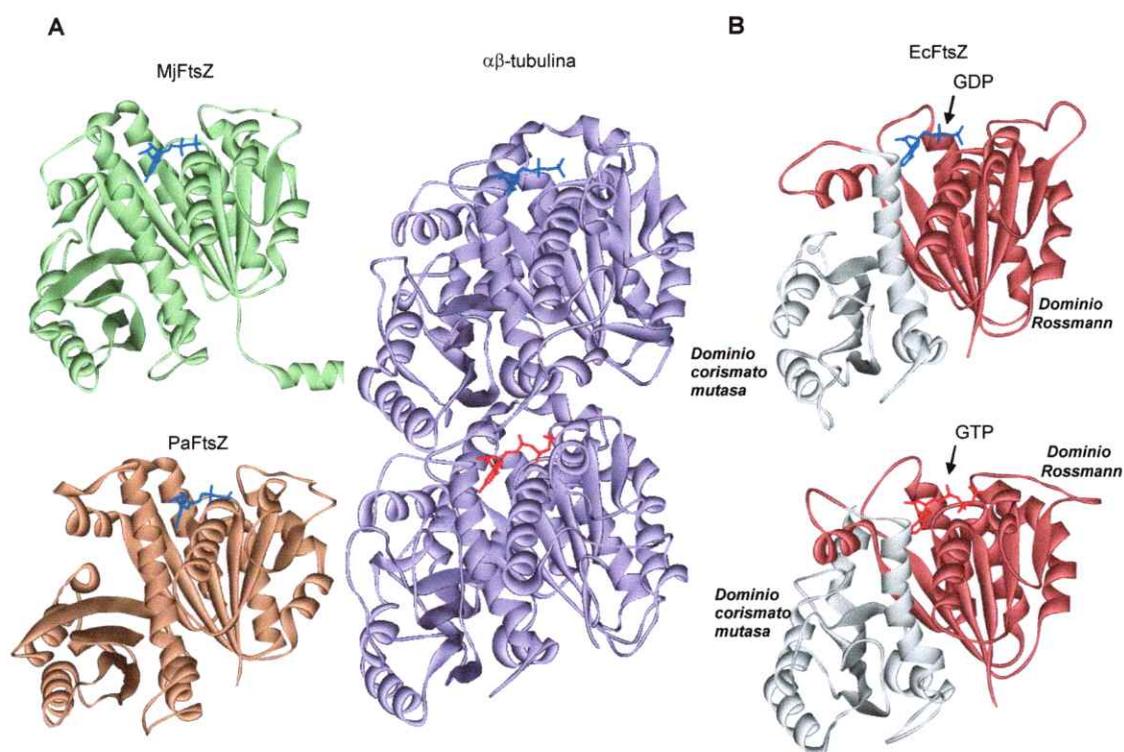
## RESULTADOS

### PREDICCIÓN DE LA ESTRUCTURA 3D DE EcFtsZ EN SUS DIFERENTES ESTADOS CONFORMACIONALES.

No se conoce la estructura tridimensional de FtsZ de *Escherichia coli* (EcFtsZ) por este motivo en esta tesis se utilizaron herramientas bioinformáticas para construir un modelo de su estructura. El Modelado Comparativo es el método mas apropiado para generar el modelo 3D de una proteína, pues se basa en información evolutiva y estructural (Sali y col., 1995). En este caso, las estructuras de FtsZ de *M. jannaschii* (MjFtsZ) y de *P. aeruginosa* (PaFtsZ) están disponibles en el PDB y poseen GDP en el sitio de unión de nucleótido. Esto junto a su alto porcentaje de identidad de secuencia respecto de EcFtsZ permitió utilizarlas como moldes estructurales de la conformación GDP del monómero de EcFtsZ. La conformación GTP se modeló utilizando como molde la estructura de  $\alpha$ -tubulina del heterodímero de  $\alpha\beta$ -tubulina, su homóloga en eucariontes, pues su estructura tridimensional con GTP esta resuelta a 3,5 Å y es apta como molde para el monómero de EcFtsZ unido a GTP y como polímero.

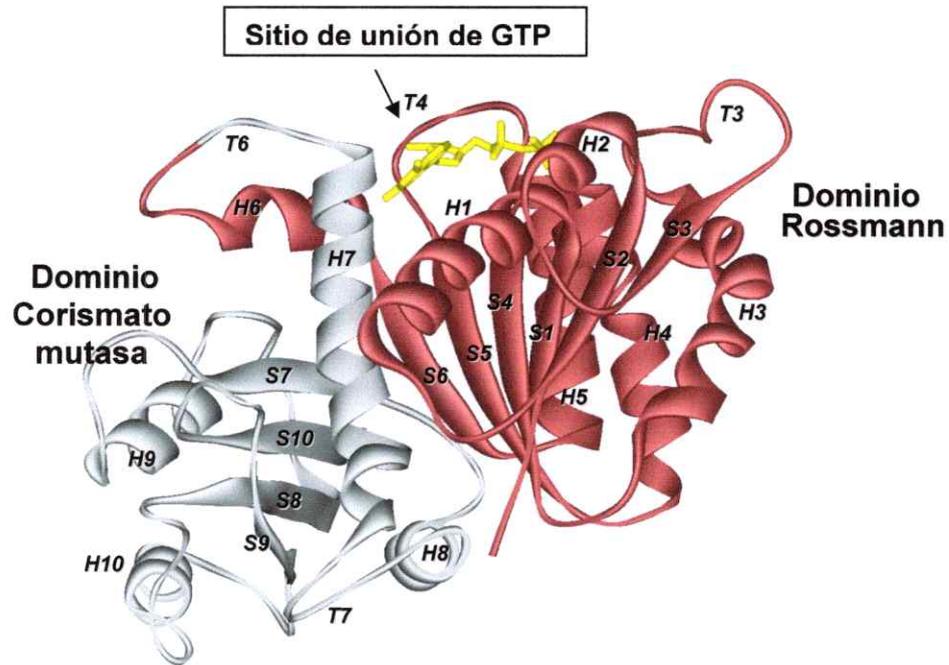
**Construcción del modelo 3D del monómero de EcFtsZ unido a GDP y GTP.** A partir de las estructuras de los cristales de PaFtsZ (1ofu.pdb) (Cordell y col., 2003), y MjFtsZ (1fsz.pdb) (Lowe y Amos 1998) y de la estructura resuelta por difracción electrónica de  $\alpha\beta$ -tubulina (1jff.pdb) (Nogales y col., 1998) se construyeron por modelado comparativo las estructuras de EcFtsZ en estado monomérico unidas a GTP y GDP, respectivamente (ver Materiales y Métodos). En la figura 8 se muestran las

estructuras de las proteínas antes mencionadas y de los modelos de la estructura 3D de los complejos EcFtsZ-GDP y EcFtsZ-GTP.



**Figura 8. Estructuras tridimensionales de MjFtsZ, PaFtsZ y  $\alpha\beta$ -tubulina, y de los modelos de EcFtsZ-GTP/GDP.** A. Estructuras de los cristales de MjFtsZ y PaFtsZ y de  $\alpha\beta$ -tubulina en un polímero (hoja de Zn). En color verde se muestra MjFtsZ (1fsz.pdb), en anaranjado PaFtsZ (1ofu\_A.pdb) y en color lila el heterodímero de  $\alpha\beta$ -tubulina (1jff.pdb). B. Modelos 3D de EcFtsZ-GDP (arriba) y EcFtsZ-GTP (abajo). El dominio amino de plegamiento Rossmann se muestra en color anaranjado y el dominio carboxilo de plegamiento corismato mutasa en color gris. GDP se muestra en todas las estructuras como “tubos” azules en el bolsillo de unión del nucleótido y el GTP en color rojo. Las figuras se construyeron con DS Modeling v1.1 package (Copyright (C) 2001-2003 by Accelrys).

Los elementos estructurales que conforman el modelo 3D de EcFtsZ se muestran en la figura 9.



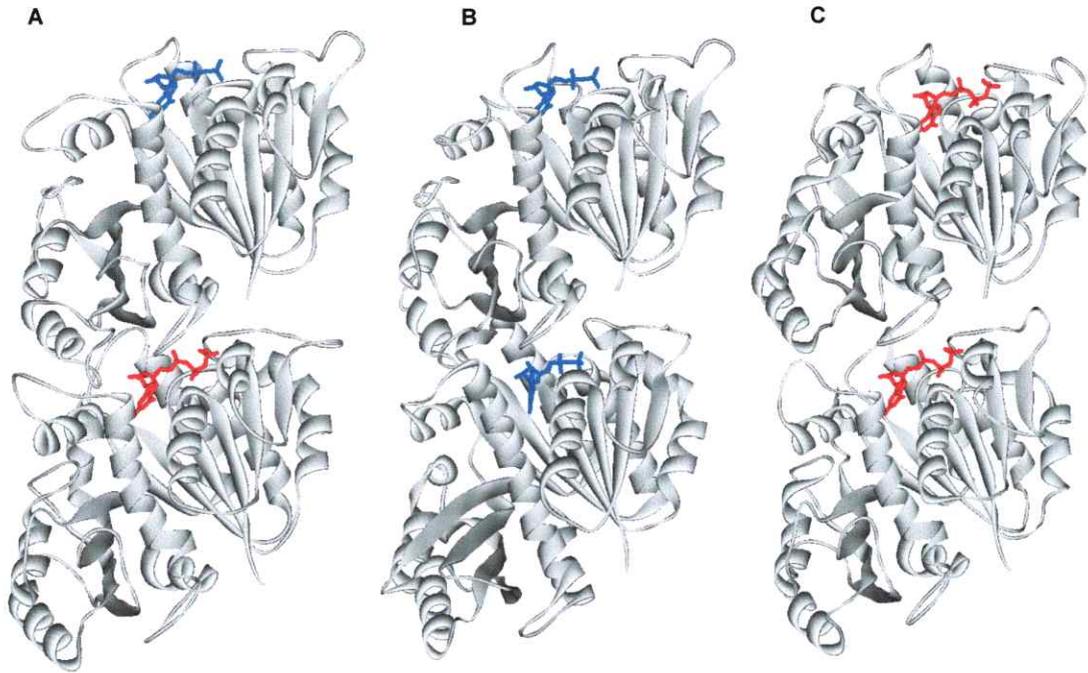
**Figura 9. Topología de los elementos estructurales del modelo 3D de EcFtsZ-GTP.** El dominio amino de plegamiento Rossmann se muestra en color anaranjado y el dominio carboxilo de plegamiento corismato mutasa en color gris. GDP se muestra en amarillo. Los elementos de la estructura secundaria se identifican de acuerdo a la nomenclatura de Amos y Lowe (1998). La figura se construyó con DS Modeling v1.1 package (Copyright (C) 2001-2003 by Accelrys).

El modelo tridimensional del monómero de EcFtsZ presenta una estructura con un dominio amino que posee un bolsillo de unión del nucleótido, esta constituido por 6 hebras beta que forman una sábana en el núcleo del dominio (S1, S2, S2, S3, S4, S5 y S6) y 6 hélices alfa que se encuentra conectadas de acuerdo al plegamiento

Rossmann, denominadas H1, H2, H3, H4, H5 y H6. El dominio carboxilo terminal se encuentra separado del dominio amino por una hélice alfa central (H7) que es parte de la interfase inter-dominio de EcFtsZ. Posee un plegamiento de tipo corismato mutasa que esta constituido por 4 hebras beta (S7, S8, S9 y S10) y tres hélices alfa (H8, H9 y H10). Los primeros 15 y los últimos 45 aminoácidos de EcFtsZ no se modelaron debido a que no están presentes en la estructura tridimensional de las proteínas utilizadas como molde. La evaluación de los modelos con el programa ProsaII (Materiales y Métodos) mostró estructuras totalmente confiables para los modelos construidos. Esto se debió a que los moldes utilizados poseen un alto porcentaje de identidad de secuencia con EcFtsZ.

Ambos modelos de EcFtsZ-GTP/GDP monoméricos de conformación diferente, se utilizaron para construir los dímeros de EcFtsZ con el objeto de caracterizar las interacciones longitudinales en los protofilamentos de los polímeros.

**Construcción de los modelos diméricos de EcFtsZ.** A partir de los monómeros de EcFtsZ unidos a GTP y GDP, se determinó la interacción longitudinal de FtsZ en el dímero de acuerdo a la estructura del sitio de interacción longitudinal en  $\alpha\beta$ -tubulina (ver Materiales y Métodos). Se obtuvo tres modelos diméricos de la combinación de los monómeros en estado GTP y GDP, cabe recordar que estos provienen de modelado a partir de  $\alpha$ -tubulina y MjFtsZ- PaFtsZ, respectivamente. En la figura 10 se muestran los dímeros que combinan (A) EcFtsZ-GTP/EcFtsZ-GDP, (B) EcFtsZ-GDP/EcFtsZ-GDP y (C) EcFtsZ-GTP/EcFtsZ-GTP, donde el símbolo (I) indica la interacción longitudinal entre los monómeros.



**Figura 10. Modelos 3D de EcFtsZ en estado dimérico.** Se muestran las estructuras diméricas de EcFtsZ en color gris, el GTP en rojo y GDP en azul. **A.** Dímero longitudinal de EcFtsZ con GTP y GDP (EcFtsZ-GTP/EcFtsZ-GDP) **B.** Dímero longitudinal de EcFtsZ con GDP (EcFtsZ-GDP/EcFtsZ-GDP). **C.** Dímero longitudinal de EcFtsZ con GTP (EcFtsZ-GTP/EcFtsZ-GTP). El símbolo (/) indica la interacción longitudinal entre los monómeros. Las figuras se construyeron con DS Modeling v1.1 (Copyright (C) 2001-2003 by Accelrys).

**Evaluación de los modelos de dímeros.** Cada modelo construido y los moldes utilizados se evaluaron con el programa ProSall (Sippl 1993), el cual considera las preferencias estadísticas de las interacciones  $C\alpha-C\alpha$  y  $C\beta-C\beta$  obtenidas desde la base de datos de estructuras de proteínas conocida (PDB). Valores negativos indican que el modelo está fuera de una distribución normal de “malos” modelos generados a partir de un molde al azar. Al evaluar en forma simultánea moldes y modelos se asegura un modelado confiable. De manera paralela, se utilizó el parámetro pG (Sanchez y Sali 1998), el cual determina la probabilidad de que el modelo evaluado esté basado en un

alineamiento correcto y una estructura molde adecuada al ubicarlo dentro de una distribución de “buenos” y “malos” modelos. Cuando el valor corregido (pG) es igual a 1, se considera al modelo como “bueno”. De acuerdo a los valores obtenidos con los moldes utilizados (tubulina, PaFtsZ, MjFtsZ), todos los dímeros modelados presentaron una buena evaluación (tabla 1).

**Tabla 1.** Evaluación de los moldes y modelos de dímero.

	Tub-GTP/ Tub-GDP	PaFtsZ-GTP/ PaFtsZ-GDP	MjFtsZ-GTP/ MjFtsZ-GDP	EcFtsZ-GTP/ EcFtsZ-GDP	EcFtsZ-GDP/ EcFtsZ-GDP	EcFtsZ-GTP/ EcFtsZ-GTP
No. Aa	867	610	627	620	620	630
Prosall	-13.98	-11.85	-11.48	-11.65	-14.13	-10.95
pG	1	1	1	1	1	1

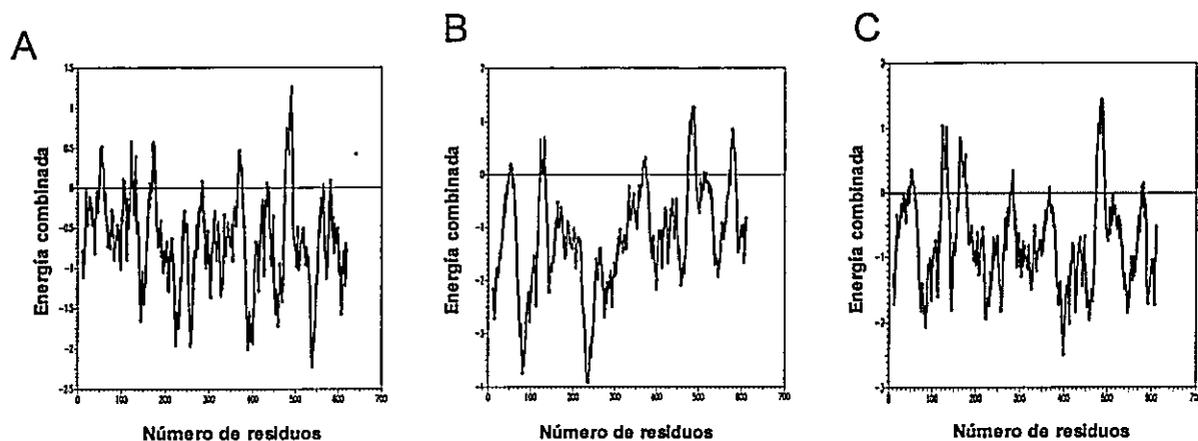
<sup>a</sup> Heterodímero de tubulina (1jff.pdb) unido con GTP y GDP.

<sup>b, c, d</sup> Dímero de FtsZ de *P. aureginosa*, de *M. jannaschii* y de *E. coli* unidos con GTP y GDP.

<sup>e</sup> Dímero de FtsZ de *E. coli* unido con GDP en ambos monómeros.

<sup>f</sup> Dímero de FtsZ de *E. coli* unido con GTP en ambos monómeros.

En la figura 11 se muestran los perfiles de energía combinada que considera los valores de pseudo-energía de las cadenas principales y laterales entregados por Prosall para cada dímero modelado. Se observa que predominan los valores negativos en los tres modelos diméricos analizados. Esto indica una alta confiabilidad en los modelos generados, sin embargo, existen regiones con valores positivos que indican que estas zonas podrían estar adoptando conformaciones que no satisfacen las restricciones estructurales entregadas por el potencial estadístico del programa utilizado (figura 11).



**Figura 11.** Perfil de energía combinada de los modelos de EcFtsZ en estado dimérico obtenido por Prosall. En cada caso se grafican los valores de energía combinada por aminoácido. Las zonas con valores negativos corresponden a las regiones bien evaluadas de los modelos construidos. **A.** Perfil del dímero longitudinal de EcFtsZ unido a GDP y GTP (EcFtsZ-GDP/EcFtsZ-GTP). **B.** Perfil de dímero longitudinal de EcFtsZ unido a GDP (EcFtsZ-GDP/EcFtsZ-GDP). **C.** Perfil del dímero longitudinal de EcFtsZ unido a GTP (EcFtsZ-GTP/EcFtsZ-GTP).

Para observar las zonas de mayor variabilidad espacial entre los modelos obtenidos, se comparó las estructuras de los 10 modelos de mejor pseudo-energía de cada conformación con la subrutina de Modeller v.6.2 Maling3D. Las regiones con mayor variabilidad espacial coincidieron con las zonas mal evaluadas y se observó que al ubicarlas en la estructura 3D de EcFtsZ correspondían a lazos externos (tabla 2). Por este motivo se modeló de manera explícita (independiente) estas regiones.

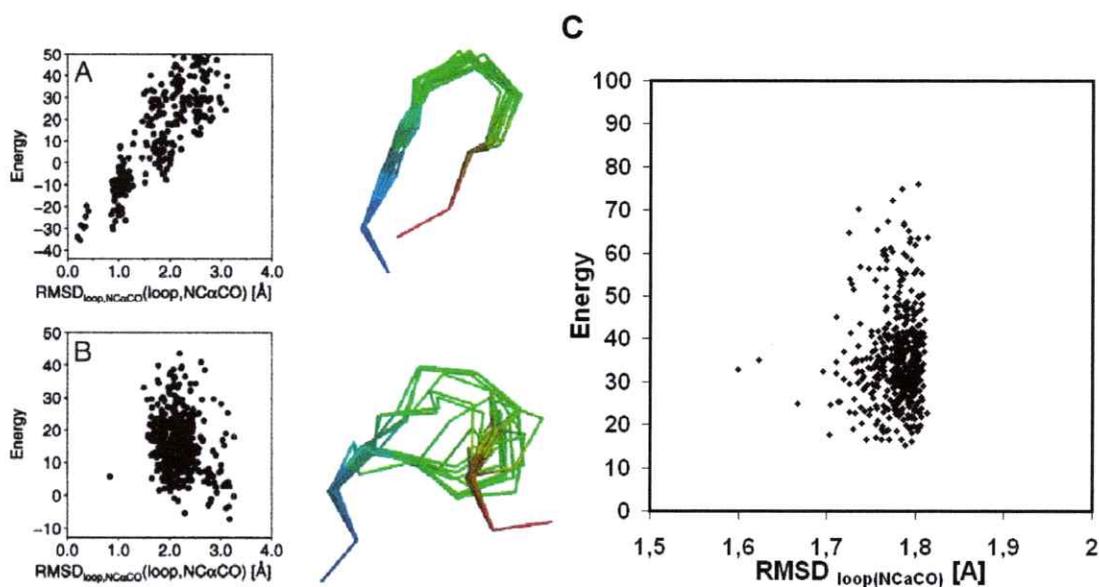
**Tabla 2.** Segmentos de la secuencia de los dímeros de FtsZ de mayor variabilidad.

EcFtsZ-GTP/ EcFtsZ-GDP		EcFtsZ-GTP/ EcFtsZ-GTP		EcFtsZ-GDP/ EcFtsZ-GDP	
Lazo 1	K124-K131 (7)	Lazo 1	G258-R262 (4)	Lazo 1	L163-L169 (6)
Lazo 2	G164-A172 (8)	Lazo 2	G164-A172 (8)	Lazo 2	G366-L373 (7)
Lazo 3	L477-A486 (9)			Lazo 3	L477-A486 (9)
				Lazo 4	A571-P580 (9)

( ) Indica el número de residuos involucrados en cada lazo.

**Modelado explícito de lazos.** La mejor predicción estructural de un lazo aislado se alcanza al minimizar el valor de su energía sobre el resto de las optimizaciones. Los valores de energía de cada modelo se grafican versus el RMSD local de cada conformación respecto de la conformación de mas baja energía. Una correlación positiva entre estas variables indica una alta seguridad de que el modelo del lazo aislado corresponde a la mejor disposición estructural en la proteína. Por el contrario, si esta correlación se pierde, la seguridad de una única estructura es baja, resultado compatible con flexibilidad estructural. Esto se ilustra en la figura 12, donde se observa una buena correlación para los lazos que presentan una estructura preferencial (A) y una mala correlación para los lazos con múltiples estructuras (B). La figura 12 C muestra que el lazo 1 del dímero EcFtsZ-GTP/ EcFtsZ-GDP no presentó correlación entre RMSD y energía, al igual que el resto de los lazos de EcFtsZ mal evaluados (tabla 2), lo que sugiere que estos lazos son mas bien flexibles, sin una estructura preferencial. Esta conducta es propia de lazos expuestos al solvente, sin una interacción permanente con el resto de la proteína que impida su movimiento, excepto por sus enlaces peptídicos. Cabe destacar que la seguridad en el modelado de lazos depende del largo del segmento a modelar, así, para segmentos de 4, 8 y 14 residuos

la seguridad en la predicción se estima en 100, 90 y 30%, respectivamente (Fiser y col., 2000). A excepción del lazo 1 del dímero EcFtsZ-GTP/EcFtsZ-GTP de 4 residuos, todos contienen entre 6 y 9 residuos.



**Figura 12. Correlación RMSD vs Energía como indicativo de seguridad del lazo modelado. A y B** tomados de (Fiser y col., 2000). Dos ejemplos de predicción de lazos. La energía de las conformaciones finales de 500 optimizaciones independientes se graficaron en función de RMSD de los átomos N, C $\alpha$  y C del grupo carbonilo. A la derecha se muestran las 17 estructuras de menor energía superpuestas. **C.** Ejemplo representativo de la ausencia de correlación observada para cada lazo modelado de manera explícita en cada complejo de EcFtsZ.

## CARACTERIZACIÓN DE LA INTERFASE DE INTERACCIÓN LONGITUDINAL DE EcFtsZ.

Una vez establecida la zona de interacción longitudinal EcFtsZ-EcFtsZ en el dímero se estimó necesario conocer sus características estructurales para establecer su participación en la formación del polímero de EcFtsZ. Con este propósito se determinó las características fisicoquímicas de la superficie de interacción longitudinal proteína-proteína en el modelo del dímero EcFtsZ-GTP/EcFtsZ-GDP, en el heterodímero de  $\alpha\beta$ -tubulina (1jff.pdb) y en el dímero MjFtsZ-GTP/MjFtsZ-GTP (1w5a.pdb). Para clasificar el tipo de interacción se compararon los valores obtenidos con aquellos reportados por Jones y Thornton (1996) que clasificó complejos proteína-proteína como complejos permanentes, es decir solo disociables por denaturación y no-permanentes (Tabla 3).

**Tabla 3.** Caracterización de la interfase longitudinal del polímero de FtsZ y del heterodímero de  $\alpha\beta$ -tubulina.

Parámetro	Complejos Permanentes*	Complejos No permanentes*	Interfase EcFtsZ	Interfase $\alpha\beta$ -tubulina	Interfase MjFtsZ.
$\Delta$ ASA ( $\text{\AA}^2$ ) <sup>a</sup>	1700	800	1300	1800	1000
Puentes de H por 100 $\text{\AA}^2$ $\Delta$ ASA	0,7	1,1	0,5	0,4	0,2
Volumen <i>gap</i> <sup>b</sup> / $\Delta$ ASA ( $\text{\AA}$ )	2,1	2,7	2,8	1,7	3,6
% Aa apolares	>47	<47	60	60	62

\* Valor promedio para homodímeros permanentes y no permanentes (Jones y Thornton 1996).

<sup>a</sup> $\Delta$ ASA: Cambio en el área de accesibilidad al solvente. El valor de  $\Delta$ ASA corresponde a la mitad de la suma de las áreas de los monómeros menos el área del dímero.

<sup>b</sup>El volumen *gap* es una medida de la complementariedad geométrica de las superficies de interacción entre los dos monómeros (Ver Materiales y Métodos).

En la tabla 3 se observa que la interacción longitudinal del complejo de EcFtsZ presentó un valor de  $\Delta$ ASA (cambio en el área de accesibilidad al solvente desde monómero a dímero) de  $1300 \text{ \AA}^2$  correspondiente a un 9% de la superficie total. La misma interacción en el heterodímero de  $\alpha\beta$ -tubulina mostró un valor de  $1800 \text{ \AA}^2$ , correspondiente a un 11% de su superficie total. Este último valor es cercano a  $1700 \text{ \AA}^2$ , reportado para complejos permanentes. El valor de  $\Delta$ ASA para EcFtsZ es difícil de ajustar a un tipo de interacción, pues es intermedio entre una interacción no permanente ( $800 \text{ \AA}^2$ ) y una permanente. Por esta razón se determinó otras características de esta interacción, como el porcentaje de aminoácidos apolares, el número de puentes de hidrógeno y el volumen *gap* o espacio vacío en la superficie de contacto (cuanto menor este valor, mejor es la complementariedad de las superficies). Así, se encontró un 60% de aminoácidos apolares participantes en la interacción longitudinal del dímero de EcFtsZ y  $\alpha\beta$ -tubulina. Estos valores se comparan con el valor mostrado en la tabla 3 para complejos permanentes, donde un 47% o más de los residuos de la interfase son hidrófobos. Se identificaron 6 puentes de hidrógeno para la interfase EcFtsZ-EcFtsZ, es decir 0,5 puentes de hidrógeno por  $100 \text{ \AA}^2$  de  $\Delta$ ASA, donde participan los residuos D45, Q47, G139, K140, D180, T201, N303, D273, D288, N289 y V292 de ambas superficies. De igual forma, para la interfase  $\alpha\beta$ -tubulina se observaron 8 puentes de hidrógeno, es decir 0,4 puentes de hidrógeno por  $100 \text{ \AA}^2$  de  $\Delta$ ASA que involucraron a los aminoácidos M1, Q15, K96, D98, N101, D128, T145, V181, P222, Q245, R251, N256, V258, S322 y W407. En ambos casos el número de puentes de hidrógeno es compatible con una interacción de tipo permanente (tabla3). Llama la atención la complementariedad geométrica que presentó el complejo EcFtsZ-EcFtsZ con un valor de  $2,8 \text{ \AA}$  de volumen *gap*/ $\Delta$ ASA, pues es más cercano al valor

medio para complejos no permanentes (2,7 Å), a diferencia del valor presentado por el heterodímero de  $\alpha\beta$ -tubulina (1,7 Å), que es más cercano al de un complejo permanente (2,1 Å), favoreciendo la formación de un heterodímero estable, una conclusión de acuerdo con los resultados de (Nogales y Wang 2006). Como se dijo, una interacción permanente solo se disocia con agentes caotrópicos como se observa en la desnaturación del heterodímero de tubulina con cloruro de guanidinio (Sanchez y col., 2004). Los valores para EcFtsZ en su conjunto muestran que el tipo de interacción longitudinal posee un carácter intermedio entre complejos clasificados como permanentes y no permanentes.

En la última columna de la tabla 3 se muestran los valores de los parámetros para la interfase del dímero de MjFtsZ, recientemente disponible en el PDB (1w5a.pdb). El 62% de los aminoácidos de la interfase corresponden a residuos apolares y se identificaron 0,2 puentes de hidrógeno por 100 Å<sup>2</sup> de  $\Delta$ ASA, estos valores le atribuyen la característica de complejo permanente, sin embargo, el valor de  $\Delta$ ASA para la interfase de este complejo es de 1000 Å<sup>2</sup> y el índice de complementariedad geométrica de 3,6 Å, por lo que de acuerdo a estos parámetros, la formación del dímero de MjFtsZ esta favorecida al igual que en EcFtsZ.

De la misma forma, la tabla 4 muestra la caracterización de las superficies de interacción longitudinal de los dímeros EcFtsZ-GTP/EcFtsZ-GDP, EcFtsZ-GTP/EcFtsZ-GTP, EcFtsZ-GDP/EcFtsZ-GDP.

Tabla 4. Caracterización de la interacción longitudinal de los dímeros EcFtsZ-GTP/EcFtsZ-GDP, EcFtsZ-GTP/EcFtsZ-GTP y EcFtsZ-GDP/EcFtsZ-GDP.

Parámetro	Complejos		Complejos		EcFtsZ-GTP/ EcFtsZ-GTP/ EcFtsZ-GTP/		
	Permanentes*	No permanentes*	Permanentes*	No permanentes*	EcFtsZ-GDP	EcFtsZ-GDP	EcFtsZ-GDP
$\Delta$ ASA ( $\text{\AA}^2$ ) <sup>a</sup>	1700	800	1300	1200	800	800	800
Puentes de H	0,7	1,1	0,5	0,9	0,7	0,7	0,7
por 100 $\text{\AA}^2$ $\Delta$ ASA <sup>b</sup>							
Volumen gap <sup>c</sup> / $\Delta$ ASA ( $\text{\AA}$ )	2,1	2,7	2,8	2,4	5,2	5,2	5,2
% Aa apolares	>47	<47	60	66	65	65	65

<sup>a</sup>Valor promedio para homodímeros permanentes y no permanentes (Jones y Thornton 1996).

<sup>b</sup> $\Delta$ ASA: Cambio en el área de accesibilidad al solvente. El valor de  $\Delta$ ASA corresponde a la mitad de la suma de las áreas de los monómeros menos el área del dímero.

<sup>c</sup>El volumen gap es una medida de la complementariedad geométrica de las superficies de interacción entre los dos monómeros.

Los resultados de este análisis sugieren que la característica de complejo intermediario para el dímero de EcFtsZ se mantiene independiente del estado fosforilado del nucleótido unido. De acuerdo a los valores de  $\Delta$ ASA, la estabilidad de la interacción longitudinal varía como sigue: EcFtsZ-GTP/EcFtsZ-GDP > EcFtsZ-GDP/EcFtsZ-GDP > EcFtsZ-GTP/EcFtsZ-GTP y el valor de complementariedad geométrica para este último dímero (5,2  $\text{\AA}$ ) es compatible con su menor estabilidad. El número de puentes de hidrógeno sugiere que EcFtsZ-GDP/EcFtsZ-GDP es el complejo con menor estabilidad, sin embargo, el porcentaje de aminoácidos apolares no varía significativamente entre dímeros.

## PREDICCIÓN COMPUTACIONAL DE LA SUPERFICIE DE INTERACCIÓN LATERAL ENTRE POLÍMEROS DE EcFtsZ-EcFtsZ.

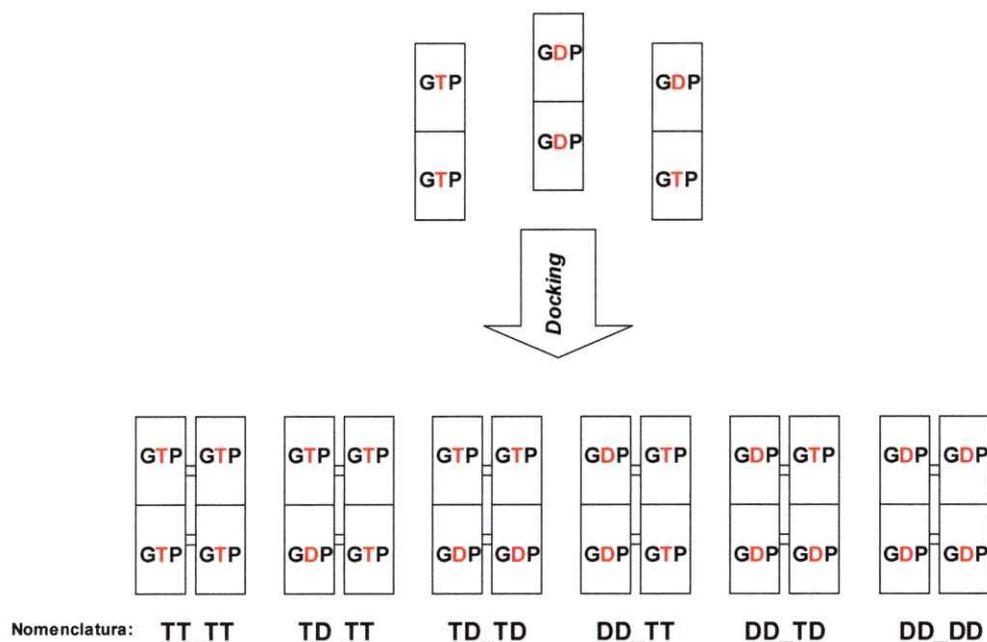
La predicción de interfases de interacción proteína-proteína se ha abordado con técnicas experimentales como mutagénesis sitio-dirigida, cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear, entre otras (Lichtarge y Sowa 2002; Cordell y col., 2003). La implementación de una aproximación computacional durante la predicción, permite complementar los resultados experimentales. Dependiendo del enfoque utilizado, la aproximación computacional puede basarse en información genómica, de estructura primaria o estructura terciaria, de manera que desde distintas fuentes es posible robustecer una predicción. A diferencia del enfoque computacional de modelado comparativo utilizado para predecir la interacción longitudinal de EcFtsZ, para predecir las interacciones laterales se usó otras herramientas computacionales. Así, el análisis computacional de la estructura primaria de la proteína, permite conocer la conservación evolutiva de los residuos a través de *Evolutionary tracing* y mutaciones correlacionadas, los cuales entregan información de aquellos residuos que podrían ser parte de la superficie de interacción proteína-proteína (Pazos y col., 1997; Lichtarge y col., 2003). El análisis computacional de la estructura terciaria por acoplamiento proteína-proteína o reconocimiento molecular permite predecir la superficie de interacción más probable a través de potenciales estadísticos y campos de fuerza aplicados de acuerdo a las características de las proteínas en estudio.

Los dímeros formados por interacción longitudinal de los monómeros de EcFtsZ con GTP o GDP en el sitio del nucleótido obtenidos de acuerdo a la estructura del heterodímero de tubulina se utilizaron para el estudio de las interacciones laterales. Es

preciso señalar que cada monómero del dímero en conformación recta posee una estructura que depende del estado de fosforilación del nucleótido.

Para identificar la superficie de interacción lateral entre los polímeros de EcFtsZ y su relación con la conformación de la proteína de acuerdo al estado de fosforilación del nucleótido, se utilizó una predicción computacional basada en información estructural y evolutiva. Así, a partir de los dímeros de EcFtsZ, construidos anteriormente por modelado comparativo, se hizo un acoplamiento proteína-proteína y de manera paralela, se incorporaron el análisis de *evolutionary tracing* y el de mutaciones correlacionadas para hacer una selección más exhaustiva de las regiones de interacción lateral.

**Acoplamiento proteína-proteína.** El acoplamiento entre los dímeros de EcFtsZ se hizo con todas las combinaciones posibles (6) de dímeros que contenían GTP o GDP en cada uno de sus monómeros (figura 7). En la figura 7 se esquematiza la construcción de los modelos tetraméricos de acuerdo a la conformación de la proteína y la nomenclatura utilizada para cada caso.



**Figura 7. Representación esquemática de la estrategia utilizada para la construcción de los complejos tetraméricos de EcFtsZ.** Cada dímero es representado como un rectángulo que contiene los monómeros ya sea en estado GTP o GDP. El estado de fosforilación se destaca en rojo y constituye la nomenclatura utilizada al pie de cada tetramero. El guión bajo “\_” indica la interacción lateral entre dímeros.

Se obtuvo 10.000 tetrameros en cada acoplamiento, de manera que para seleccionar los más adecuados desde un punto de vista biológico, en forma paralela se hizo una selección utilizando información evolutiva a través de un análisis de mutaciones correlacionadas y de *evolutionary tracing*.

**Predicción de sitios de interacción proteína-proteína usando información evolutiva.** La información evolutiva que es posible extraer desde un alineamiento múltiple de secuencias depende estrechamente del número de secuencias que lo constituyen y los rangos de porcentaje de identidad que posean entre si. Por esto, para dar mayor seguridad a la predicción de la interfase de interacción lateral de EcFtsZ se consideró la calidad del alineamiento utilizado y el tamaño de su familia. Así, a pesar de que FtsZ se encuentra ausente en la rama *crenarchaea* de las arqueas y en algunos grupos bacterianos, como por ejemplo, Planctomycetes, FtsZ es ampliamente conservada entre procariontes y la rama *euryarchaeal* de las arqueas, y también es posible encontrar homólogos de FtsZ en cloroplastos y mitocondrias de células primitivas de eucariontes como los protistas (Margolin 2005). Además, se han identificado dos homólogos en plantas mayores que parecen haber divergido tempranamente durante su evolución, quizás por tener diferentes funciones conservadas (Miyagishima y col., 2004). Esta extensa disponibilidad de información evolutiva hace posible desarrollar los análisis computacionales basados en la secuencia de aminoácidos que permiten predecir una superficie de interacción de manera confiable.

*Control positivo.* Se utilizó como control la estructura tridimensional conocida del complejo PaFtsZ-SulA resuelta por difracción de rayos X a 2,1 Å (1ofu.pdb). La superficie de interacción conocida estructuralmente se comparó con la obtenida mediante la predicción computacional (basada en la secuencia) de la interacción de PaFtsZ y SulA (inhibidor de la división celular) (ver Materiales y Métodos). Los resultados de la comparación mostraron similitud y un pequeño corrimiento de 3 Å

entre las superficies obtenidas por información evolutiva y por difracción de rayos X (Cordell y col., 2003).

Considerando los resultados de la información evolutiva procesada por mutaciones correlacionadas y *evolutionary tracing* (control positivo), más el de la aproximación estructural entregada por el acoplamiento proteína-proteína, se hizo la predicción de la superficie de interacción lateral de EcFtsZ.

*Análisis de mutaciones correlacionadas.* Los pares de residuos de aminoácidos correlacionados extraídos del alineamiento múltiple de secuencias de FtsZ, se localizaron en la estructura de EcFtsZ y se clasificaron según su porcentaje de accesibilidad al solvente. Se seleccionó los pares de residuos que presentaron mutaciones correlacionadas presentes en la superficie de la estructura y fuera de la interfase de interacción longitudinal de acuerdo a lo observado en la secuencia del heterodímero de  $\alpha\beta$ -tubulina.

*Evolutionary tracing.* A los pares de aminoácidos seleccionados por el análisis de mutaciones correlacionadas se les sumó el criterio de conservación dado por el método de *evolutionary tracing*, el cual identifica a aquellos residuos que se encuentran conservados y formando agrupaciones estructurales en la proteína, es decir, a menos de 10 Å unos de otros. Así, aminoácidos seleccionados como pares correlacionados presentaron a la vez, conservación en más de un 50%.

En la tabla 5 se muestra los pares de aminoácidos de EcFtsZ que mutan simultáneamente y que a la vez presentan un 50% de conservación encontrándose

agrupados en agrupaciones estructurales en la superficie de la proteína, ordenados de acuerdo a su coeficiente de correlación ( $r$ ).

**Tabla 5.** Pares de aminoácidos de superficie de EcFtsZ que mutan en forma simultánea<sup>a</sup>. Los códigos de una letra y la numeración corresponden a los residuos presentes en EcFtsZ.

Aa1	Aa2	r
K170	Y222	0,702
G124	R214	0,694
K167	Y222	0,686
K170	L254	0,670
S154	Y222	0,649
Y222	E237	0,641
G124	K167	0,637
Y222	S255	0,630
S177	L254	0,623
Y222	L254	0,614
A91	Y222	0,611
R89	Y222	0,610
R85	Y222	0,606
K170	S246	0,604
V229	E250	0,602
A91	K170	0,598
R85	K167	0,584
R85	K170	0,582

<sup>a</sup> Análisis de *evolutionary tracing* y de mutaciones correlacionadas.

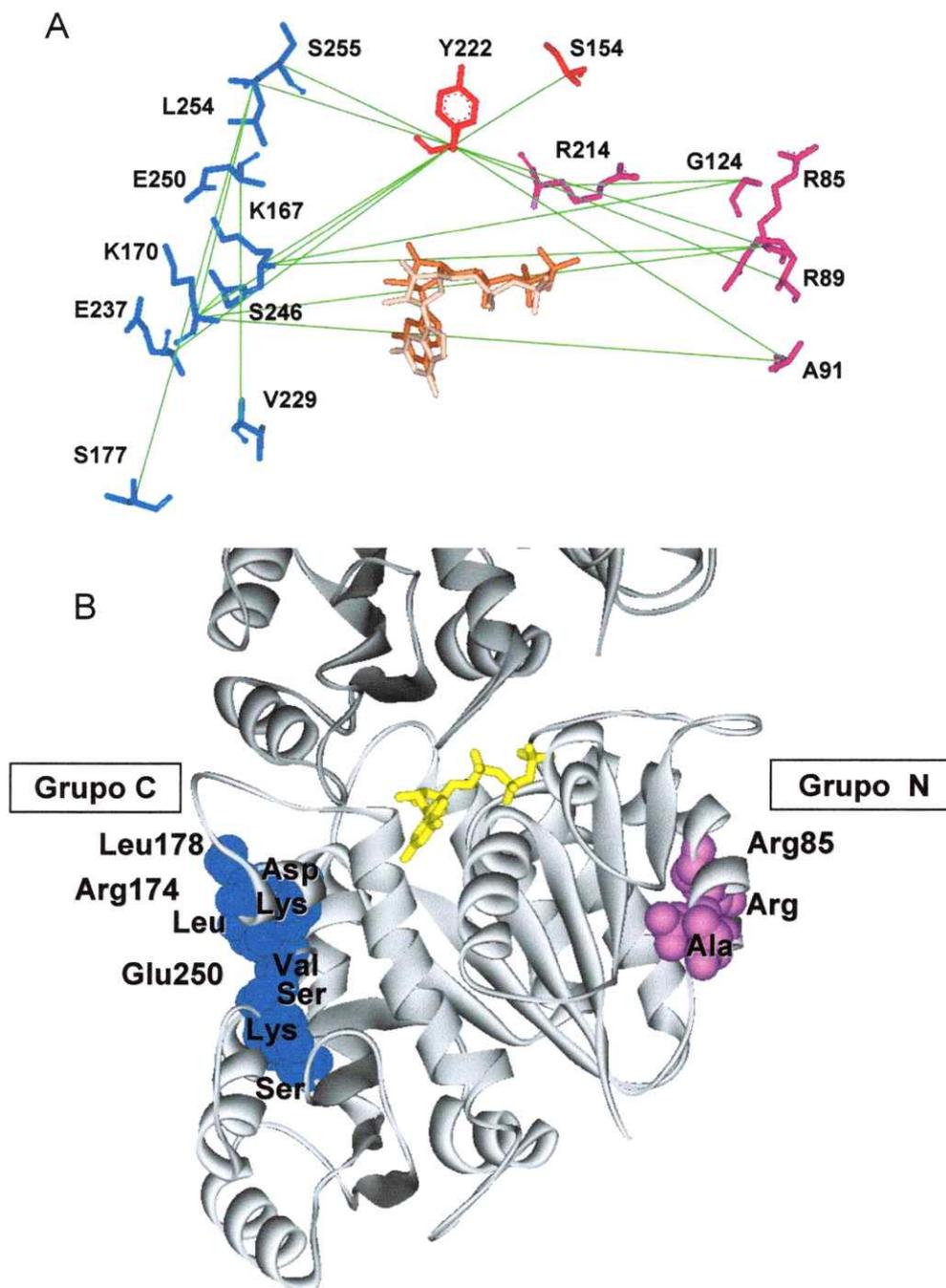
r: Coeficiente de correlación dado por el programa Plotcor.

Aa1 y Aa2: Aminoácidos que conforman el par correlacionado. No se consideraron los pares con  $r$  menores a 0,582 porque no formaban parte de las agrupaciones de los aminoácidos encontradas, como tampoco de nuevas agrupaciones (ver figura 13A).

En la tabla 5 se observa que en su mayoría los residuos seleccionados son cargados, propiedad típica de aminoácidos de superficie. Se observa correlaciones entre aminoácidos cargados y apolares (G124-R214, K170-L254, G124-K167, V229-E250 y A91-K170), y correlaciones entre aminoácidos aromáticos y cargados (K170-Y222, K167-Y222, E237-Y222, R89-Y222 y R85-Y222). Y222 mostró una correlación múltiple con un alto coeficiente de correlación que permite afirmar que es un

aminoácido clave en la estructura de EcFtsZ, pues si este muta varios otros pueden mutar. Se observa un número menor de correlaciones entre aminoácidos cargados, lo mismo para aminoácidos apolares y aromáticos, y polares y aromáticos.

En la figura 13A se muestra la ubicación de estos aminoácidos en la estructura 3D. Al observar a través del eje longitudinal del dímero de EcFtsZ, donde se han sobrepuesto ambos nucleótidos, se localiza el nucleótido y los residuos de aminoácidos seleccionados por el análisis evolutivo del monómero superior.



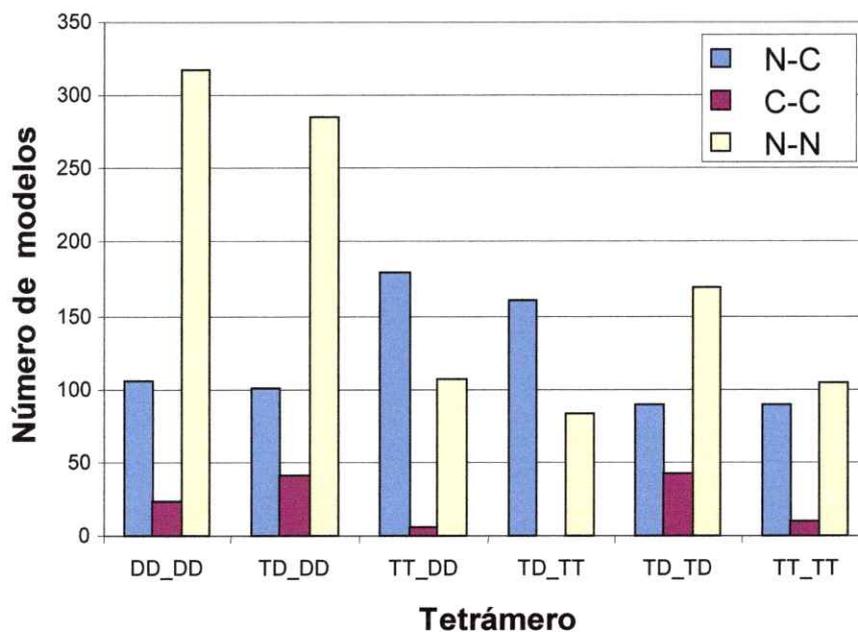
**Figura 13. Localización estructural de los aminoácidos de los grupos carboxilo (C) y amino (N) en EcFtsZ. A.** Vista a través del eje longitudinal del monómero superior del dímero de EcFtsZ, se observa la superposición de los nucleótidos de

ambos monómeros (naranja y crema) y la red de pares de mutaciones correlacionadas (líneas verdes) entre residuos distantes. B. Modelo dimérico de EcFtsZ, en CPK se muestran los aminoácidos seleccionados por el análisis de mutaciones correlacionadas y *evolutionary tracing* que formaron grupos. En color azul se indican los residuos del dominio carboxilo y rosa del dominio amino y en color amarillo el GTP. Las figuras se construyeron con DS Modeling v1.1 package (Copyright (C) 2001-2003 by Accelrys).

La figura 13B muestra dos grupos de residuos ubicados en caras opuestas en el monómero de EcFtsZ, específicamente, en cada dominio de EcFtsZ. Esta distribución calza perfectamente con los sitios de interacción lateral sugeridos para el polímero de MjFtsZ (Lowe y Amos 2000). Los aminoácidos vecinos pertenecientes a cada grupo se definieron como aquellos que presentaban distancias menores a 10 Å entre los átomos más cercanos. De este modo, se identificó un grupo en el dominio amino y otro en el dominio carboxilo. La distribución de la red de correlaciones (líneas verdes) muestra que éstas conectan residuos de caras opuestas en el dominio amino (N) y carboxilo (C) y entre aminoácidos del dominio C.

Esto indica una importante relación evolutiva entre residuos alejados en la estructura 3D de FtsZ, que podrían ser responsables de las interacciones proteína-proteína o ser parte de las regiones importantes en la funcionalidad de ésta. La correlación evolutiva observada entre residuos del dominio carboxilo podría deberse a la existencia de una relación funcional dentro del mismo monómero de FtsZ, la que se analizará en la discusión de esta tesis. La Y222, se presenta como un eje central de estas correlaciones, sin embargo, se encuentra fuera de los grupos definidos. Por otro lado, si observamos la estructura secundaria de los residuos seleccionados se observa que el grupo N se encuentra principalmente en la hélice  $\alpha$  H3 y el grupo C en los lazos S7-H9, H9-S8 y en la hélice  $\alpha$  H6.

**Análisis *in silico* de la dependencia de la interacción lateral N-C, N-N y C-C del estado de fosforilación del nucleótido.** Los grupos de residuos se utilizaron para definir las zonas de interacción lateral de EcFtsZ, se utilizó como restricción una distancia de 10 Å entre los aminoácidos del grupo y la superficie de interacción del dímero vecino. Se encontró que las zonas de interacción eran entre los dominios N-N, N-C y C-C. Con estas restricciones se evaluó la formación de complejos tetraméricos con GTP (T) y GDP (D). En la figura 14 se observa un gráfico del número de tetrámeros obtenidos por acoplamiento, que clasifica a cada tipo de tetrámero (TT\_TT, TD\_TT, TD\_TD, DD\_TT, DD\_TD, DD\_DD) según el tipo de interacción lateral que posee, es decir, C-C, N-N o N-C.



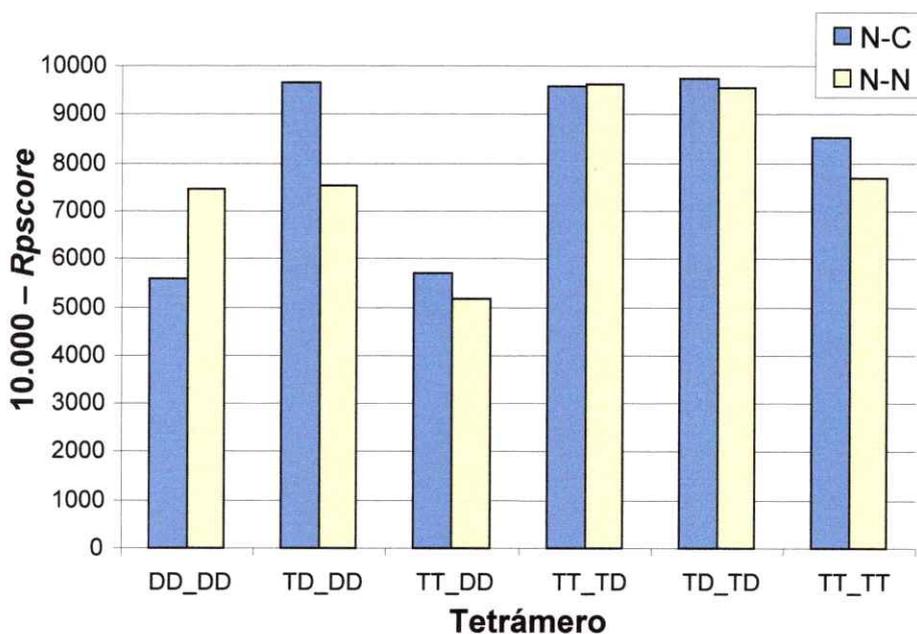
**Figura 14. Análisis de la dependencia de la interacción lateral N-C, N-N y C-C del estado de fosforilación del nucleótido.** El gráfico señala el número de complejos tetraméricos obtenidos por acoplamiento proteína-proteína clasificados según el tipo de interacción encontrada. La barra azul indica el número de complejos con interacción

del tipo N-C, la barra marrón representa a complejos con interacción C-C y la barra amarilla interacción N-N. En el eje X se clasifica cada tetrámero de acuerdo al estado conformacional que adopta la proteína con GTP (T) o GDP (D). Nomenclatura definida en la figura 7. La aplicación de la prueba de  $\chi^2$  indica, con una confianza del 95%, que todas las diferencias encontradas son significativas a excepción de las interacciones N-C y N-N del tetrámero TT\_TT.

Los resultados de este análisis revelan una mayor tendencia a la formación de tetrámeros con los tipos de interacción N-N y N-C para todas las conformaciones observadas. El número de tetrámeros que presentaron un tipo de interacción C-C es bajo para todas las conformaciones analizadas, además, al observar detalladamente la complementariedad geométrica de este tipo de complejos se reveló que era notoriamente baja, de manera que con estos antecedentes, se procedió a descartar este tipo de interacción. Los complejos donde un dímero contiene GDP en ambos monómeros (DD\_DD, TD\_DD) y TD\_TD muestran más de dos veces el número de complejos con el tipo de interacción N-N comparado con N-C. En los complejos donde un dímero contiene GTP en ambos monómeros (TD\_TT, TT\_DD) se observa que el número de interacciones del tipo N-C aumenta excepto para el tetrámero TT\_TT.

**Evaluación de la complementariedad geométrica de los tipos de interacción lateral de EcFtsZ.** Se evaluó la complementariedad geométrica de cada tetrámero de EcFtsZ, de acuerdo al valor de *RPscore* dado por el programa 3D-Dock. Se utilizó la diferencia entre los 10.000 complejos generados menos el lugar de su clasificación jerárquica, así, el primero de la lista debería mostrar el valor mas alto, es decir, 9.999 y así sucesivamente. En la figura 15 se graficó para cada tipo de interacción N-N y N-C

la diferencia  $10.000-RPscore$  para cada modelo de tetrámero definido en la figura 7 (no se consideró la posición relativa de los dímeros en el tetrámero, es decir si interactuaban en forma paralela o anti-paralela).

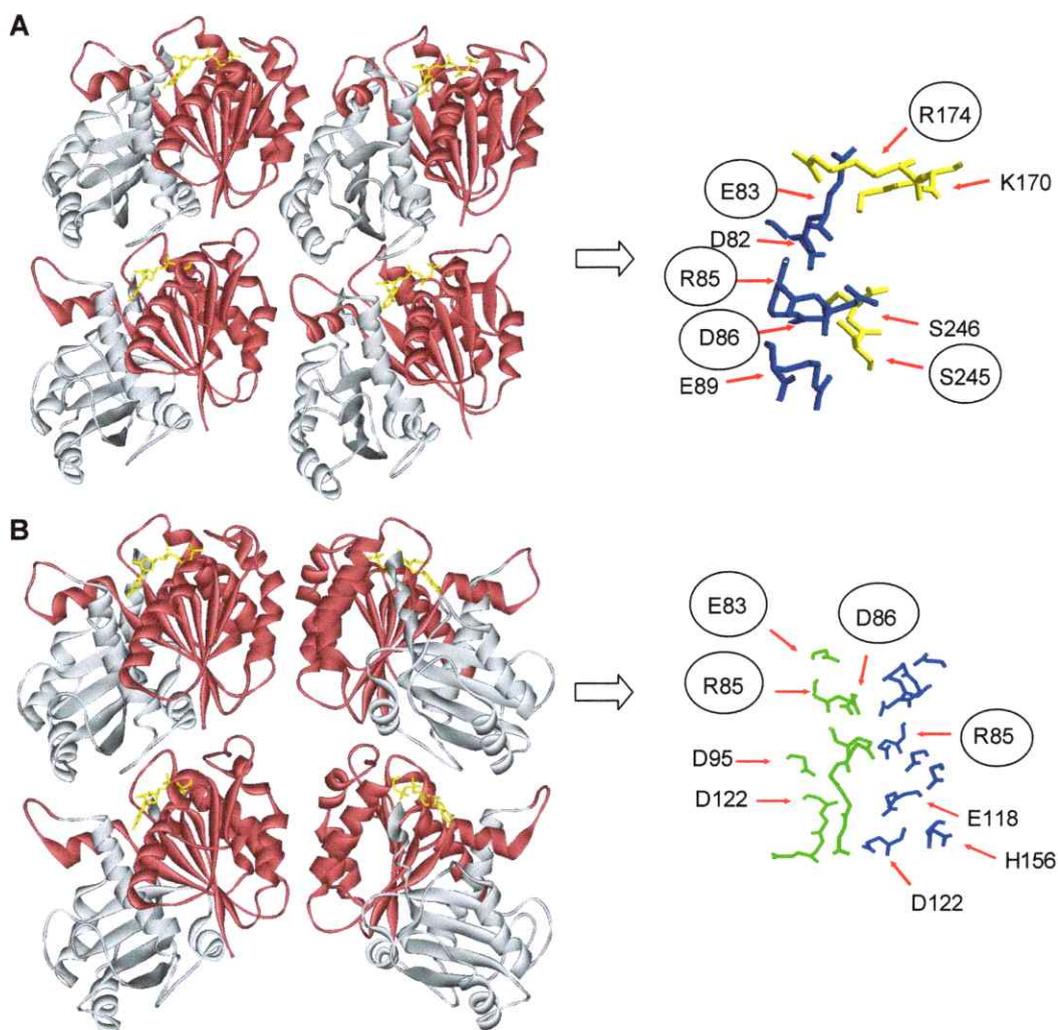


**Figura 15. Evaluación *in silico* de la complementariedad geométrica de los tipos de interacción lateral de EcFtsZ.** Se grafica el valor de  $10.000-RPscore$  asignado por el programa 3D-Dock a cada tetrámero de EcFtsZ, respecto al estado GTP/GDP de los monómeros en el tetrámero, de acuerdo a la nomenclatura de la figura 7. La barra azul indica el número de complejos con interacción del tipo N-C y la barra amarilla la interacción N-N.

Del análisis de los valores de complementariedad geométrica asignados a cada tetrámero se observa que en los complejos TT\_TD, TD\_TD están favorecidas ambas interacciones a diferencia del complejo TD\_DD donde la interacción N-C es más favorecida que la N-N. Esto también se observa en el complejo TT\_TT y TT\_DD que

presentan un valor mas bajo de *Rpscore*. El único tetrámero donde se observa mas favorecida la interacción N-N es en el complejo DD\_DD.

Para complementar estos resultados se analizó las superficies de las interacciones laterales predichas de acuerdo a las interacciones laterales descritas para la funcionalidad de EcFtsZ. Así, se analizó el efecto de mutaciones puntuales sobre la formación de polímeros, específicamente su efecto sobre la capacidad de formar manojos y sábanas (Lu y col., 2001; Koppelman y col., 2004; Redick y col., 2005). En la figura 16 se observa que las mutaciones puntuales ya descritas se encuentran sobre las superficies encontradas en este trabajo.



**Figura 16. Tetrámeros con sus interfases de interacción lateral en EcFtsZ**  
 Interacción lateral paralela N-C (A) y N-N (B) en el tetrámero de EcFtsZ. En ambos casos el dominio amino se muestra en color rojo y el dominio carboxilo en color gris. GTP en el sitio de unión se muestra en todas las estructuras como “tubos” amarillos. A la derecha se muestra en mayor detalle los residuos involucrados en cada tipo de interfase. En círculo se destacan los residuos mutados experimentalmente y que presentaron fenotipo de filamentos simples al ser observados por microscopía. Las figuras se construyeron con DS Modeling v1.1 package (Copyright (C) 2001-2003 by Accelrys).

La figura 16 muestra dos tetrámeros con una interacción lateral paralela de tipo N-N (fig. 16A) y N-C (fig. 16B). A la derecha de cada uno de ellos se muestran los aminoácidos que pertenecen a la superficie de interacción y se destacan con círculos las mutaciones puntuales que afectan esta interacción. Entre ellos, se destacan R174D, S245F y D86K (Lu y col., 2001; Koppelman y col., 2004), y otras mutaciones diseñadas en el laboratorio como R85Q y E83Q, que inhibieron las interacciones laterales responsables de la formación de sábanas y manojos (Tesis Magister de Jae Y. Shin).

Es interesante hacer notar que la coincidencia entre la estructura de las interfases de interacción lateral predichas por bioinformática y de mutaciones puntuales experimentales apoya fuertemente la existencia de dos regiones en la superficie de la proteína, una en el dominio amino terminal y otra en el dominio carboxilo terminal, responsables de la interacción lateral entre protofilamentos de FtsZ.

Como se observa en la figura 7, de acuerdo al estado de fosforilación del nucleótido se generaron 6 tipos de tetrámeros, que al incluir el tipo de interacción N-N, N-C y C-C aumentaron a 18 tetrámeros. La probabilidad de formación redujo la población a 12 tetrámeros, al descartarse la interacción de tipo C-C. Si consideramos la orientación de los dímeros en la interacción lateral, la población aumenta a 24 tetrámeros. Con el objeto de seleccionar los tetrámeros energéticamente más favorables se hizo una exploración por mutagénesis computacional de alaninas.

**Exploración por mutagénesis computacional de alaninas.** Una exploración por mutagénesis computacional de alaninas se hizo sobre la interfase de cada complejo para determinar si las superficies de interacción predichas eran energéticamente favorables y estimar la contribución energética a la energía libre de unión que provee

cada residuo para ser caracterizado como clave para la interacción (*hot spots*). La sumatoria de la contribución energética de cada aminoácido permitió hacer una estimación de la afinidad de los tetrámeros formados y seleccionar los más favorables.

En la tabla 6 se indican los valores de cambios en la energía libre de unión ( $\Delta\Delta G$ ), en kcal/mol, de cada complejo al mutar cada aminoácido perteneciente a la interfase por un residuo de alanina. Los valores de  $\Delta\Delta G$  indicados corresponden a la diferencia entre  $\Delta G_{\text{unión}}^{\text{MUT}} - \Delta G_{\text{unión}}^{\text{WT}}$ , y su valor mientras mas positivos indica que el reemplazo por alanina hace más desfavorable la interacción analizada.

**Tabla 6.** Exploración por mutagénesis computacional de alaninas.

Tetrámeros <sup>a</sup>	Interacción N-C		Interacción N-N	
	Paralela	Anti-paralela	Paralela	Anti-paralela
TT_TT	-6,4	6,7	8,2	-5,2
DT_TT	4,1	-18,4	-4,2	-9,8
DD_TT	15,7	1,4	-20,9	-3,8
DD_DT	-13,9	-8,8	1,2	-11,9
DD_DD	-2,0	-0,1	1,6	-9,2
DT_DT	-9,0	-6,5	-7,3	-2,9

<sup>a</sup>La nomenclatura utilizada para cada complejo tetramérico corresponde a la definida previamente en la figura 7.

El error de este método es de 1,06 kcal/mol (Kortemme y col., 2004).

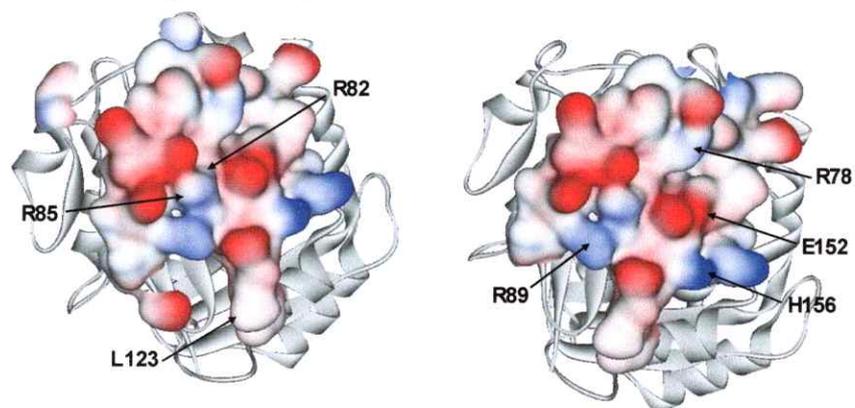
En la tabla 6 se observa que la interacción paralela N-N y la interacción anti-paralela N-C se ven desfavorecidas con las mutaciones por alanina en el complejo formado por dímeros en conformación GTP (TT\_TT) con valores totales de  $\Delta\Delta G_{\text{unión}}$  de 8,2 y 6,7 kcal/mol. Esto indica que estas interacciones son favorecidas en su estado no mutado. Por esto se sugiere la presencia de dos tipos de interacciones en el estado inicial de la polimerización de EcFtsZ, siendo más estable la interacción paralela N-N,

la cual coincide con el tipo de interacción lateral propuesto por (Lowe y Amos 1999). También se observa que la interacción paralela N-C esta favorecida en los complejos DT\_TT y DD\_TT. Estos valores son compatibles con el proceso de polimerización, pues los polímeros en presencia de GTP son mas estables que los polímeros en presencia de GDP como se observa para los complejos DD\_DD mutados, que presentan una diferencia energética de aproximadamente 6 kcal/mol, independiente de su orientación, paralela o anti-paralela. Cabe destacar que el mayor valor de  $\Delta\Delta G_{unión}$  corresponde al complejo DD\_TT con una interacción N-C paralela, que podría llegar a ser un intermediario en el proceso de despolimerización.

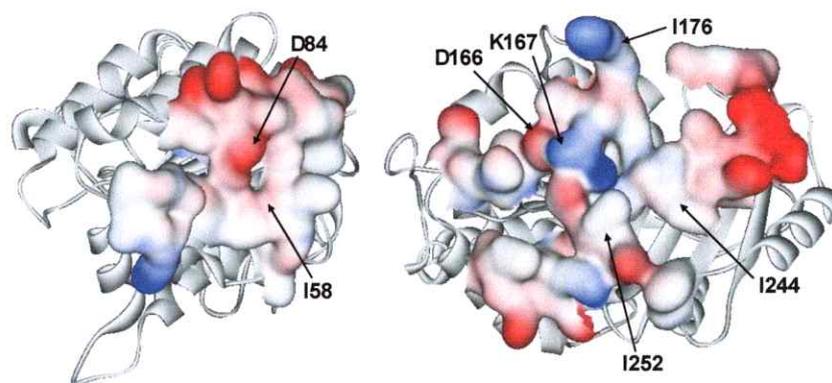
#### **CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LAS INTERFASES SUGERIDAS PARA LA INTERACCIÓN LATERAL DE EcFtsZ.**

Los tres tipos de interacciones sugeridas para la polimerización lateral de EcFtsZ, es decir, interfases N-C en sentido paralelo y anti-paralelo y la interfase N-N en sentido paralelo, se analizaron para identificar los residuos con mayor contribución energética (*hot spot*) a la formación del complejo, e identificar sus características fisicoquímicas. De esta forma, los residuos identificados podrían servir como blanco para el diseño de mutaciones sitio-dirigida en la caracterización experimental de las interacciones laterales. En la figura 17 se muestra la localización de los residuos *hot spots* en las superficies de estos tres tipos de interacciones, las cuales se representan como superficie coloreada de acuerdo al potencial electrostático que presentaron. En la tabla 7 se muestra la contribución energética de cada residuo al  $\Delta\Delta G_{unión}$  en kcal/mol, se observan residuos semi-*hot spots* (0,5 a 1 kcal/mol) y los *hot spots* (>1 kcal/mol).

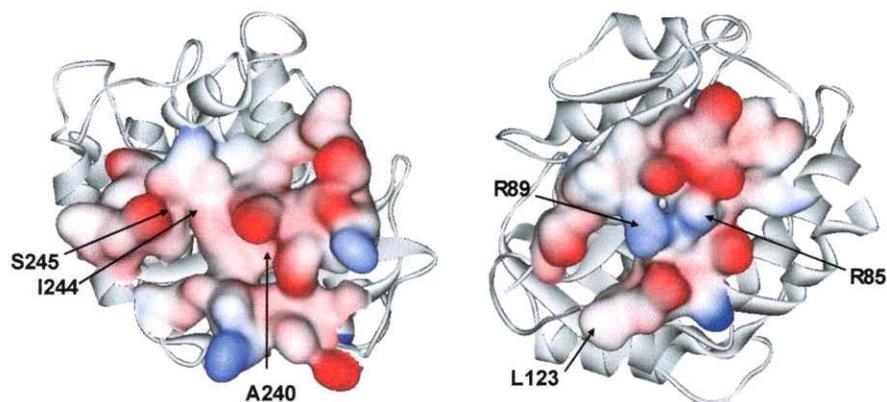
**A** Interacción paralela tipo N-N



**B** Interacción anti-paralela tipo N-C



**C** Interacción paralela tipo N-C



**Figura 17. Potencial electrostático e identificación de los aminoácidos claves en las interfases de interacción lateral de EcFtsZ. Se muestra un dímero del tetrámero**

que se ha separado como si fueran las hojas de un libro para mostrar las caras de interacción lateral de ambos monómeros. En ellas se muestran el potencial electrostático (rojo=negativo, azul=positivo). **A.** Interacción paralela N-N en el complejo TT\_TT. **B.** Interacción anti-paralela N-C en el complejo TT\_TT. **C.** Interacción paralela N-C en el complejo DD\_TT. Las figuras se construyeron con DS Modeling v1.1 package (Copyright (C) 2001-2003 by Accelrys).

**Tabla 7.** Residuos de mayor contribución energética de las caras de interacción lateral y sus respectivos valores de  $\Delta\Delta G$  de unión.

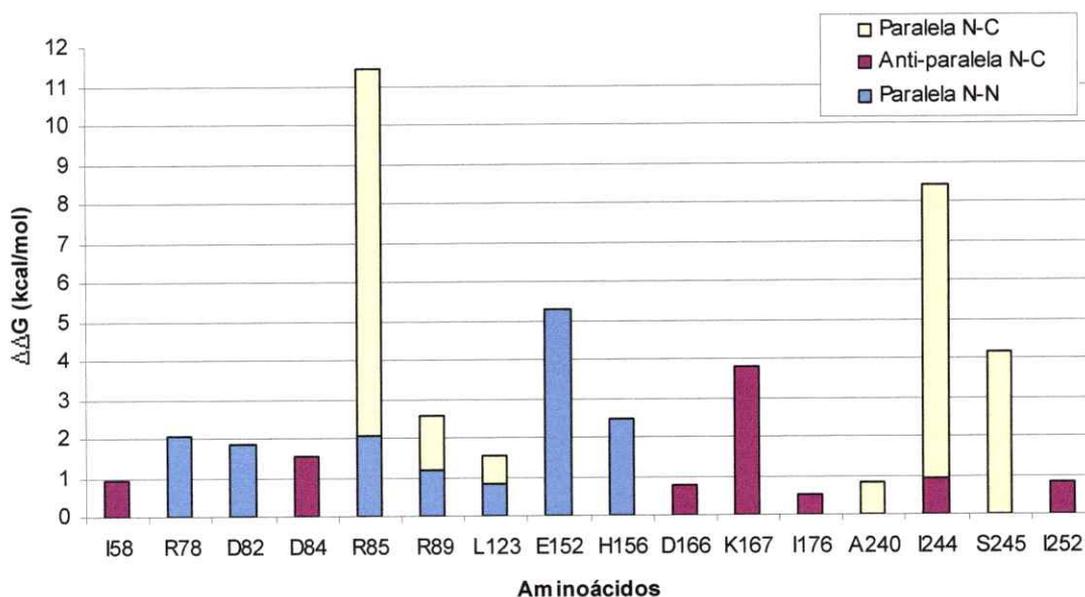
Paralela N-N		Anti-paralela N-C		Paralela N-C	
Aa	kcal/mol	Aa	kcal/mol	Aa	kcal/mol
R78	2,03	I58	0,91	R85	9,4
D82	1,86	D84	1,56	R89	1,36
R85	2,06	D166	0,79	L123	0,71
R89	1,18	K167	3,79	A240	0,8
L123	0,83	I176	0,52	I244	7,52
E152	5,29	I244	0,91	S245	4,13
H156	2,46	I252	0,84		

Se clasifican como *hot spots* los residuos con una contribución al  $\Delta\Delta G_{\text{unión}} > 1$  kcal/mol y *semi-hot spots* con una contribución al  $\Delta\Delta G_{\text{unión}}$  de 0,5 a 1 kcal/mol.

En la figura 17A se muestra el potencial electrostático de los aminoácidos de la superficie de interacción paralela N-N, donde las cargas se distribuyen en forma equitativa a través de toda la superficie, así, en una de las caras existen 6 aminoácidos positivos y 6 negativos, y en la otra 4 negativos y 3 positivos. En este caso, los residuos clasificados como *hot spots* son residuos cargados y corresponden a cuatro aminoácidos positivos (R78, R85, R89 y H156), dos aminoácidos negativos (D82 y E152) y un residuo denominado *semi-hot spot* identificado como L123 (tabla 7). Una tendencia semejante respecto del potencial electrostático se observa para la interfase anti-paralela N-C sugerida para el complejo TT\_TT (figura 17B). Así, una cara de la

interfase contiene el mismo número de residuos positivos y negativos, y la cara opuesta 3 residuos positivos y 2 negativos. Los aminoácidos D84 y K167 se identificaron como *hot spots* y como *semi-hot spots* los aminoácidos D166 y los apolares I58, I176, I244 y I256 (tabla 7). En la figura 17C se observa el potencial electrostático de la interacción paralela N-C. En este caso, la superficie de interacción tiene una clara tendencia a ser negativa, pues en una de las caras se observaron 7 residuos negativos y 2 positivos y en la cara opuesta 6 residuos negativos y 4 positivos. A pesar de esta tendencia, dentro de los aminoácidos con mayor aporte energético para la formación del complejo no se encontraron residuos negativos y en su lugar 2 residuos positivos (R85 y R89) que se identificaron como *hot spots* junto a la I244 y S245, además, de dos residuos *semi-hot spots* apolares (L123 y A240) (tabla 7).

Para analizar la magnitud de la contribución energética de los residuos clasificados como *semi-hot spots* y *hot spots*, se graficó la suma de los valores de  $\Delta\Delta G_{\text{unión}}$  destacando la contribución de cada residuo de acuerdo a la interfase donde participa. Así, en la figura 18 se muestra en el eje Y la contribución energética para cada uno de los aminoácidos claves para la formación del complejo proteína-proteína de EcFtsZ.



**Figura 18. Contribución energética de los residuos claves en las interacciones laterales de EcFtsZ.** Se grafica la suma de la contribución energética de los residuos *hot spots* y *semi-hot spots* a cada tipo de interacción. Con diferentes colores se destaca el aporte energético a cada tipo de interacción. En amarillo se representa la interacción paralela N-C, en marrón, la anti-paralela N-C y en azul la contribución de la interacción paralela N-N.

Se observa en la figura 18 que los aminoácidos con mayor contribución energética a la interacción paralela N-C (color amarillo) son la arginina 85 y la isoleucina 244 con 9,4 y 7,52 kcal/mol, respectivamente. Los siguientes residuos importantes para este tipo de interacción son la serina 245 que contribuye con 4,13 kcal/mol y la arginina 89 con 1,36 kcal/mol. La distribución de estos aminoácidos en la estructura secundaria del modelo 3D de EcFtsZ indica que la hélice H2 (dominio amino), la hélice H9 y los lazos que limitan esta última (dominio carboxilo) están directamente involucrados en la formación del complejo que interactúa de manera paralela a través de las caras de los dominios C y N.

En la interacción lateral paralela N-N (en color azul), el glutamato 152 contribuye con 5,29 kcal/mol y la histidina 156 con 2,46 kcal/mol y ambos residuos se ubican en la hélice H4 de la estructura de EcFtsZ. Los *hot spots* arginina 78 y el ácido aspártico 82 ubicados en la hélice H2 contribuyen con 2,03 y 1,86 kcal/mol, respectivamente. Se observa que la arginina 85, la arginina 89 y la leucina 123 participan en la interacción paralela N-N, con 2,06, 1,18 y 0,83 kcal/mol, respectivamente, de menor energía que su contribución a la interacción paralela N-C.

En el tercer tipo de interacción sugerida, la interacción anti-paralela N-C (en color marrón), los aminoácidos del dominio amino considerados *hot spots* son la lisina 167 con 3,79 kcal/mol, el ácido aspártico 84 con 1,56 kcal/mol, y *semi-hot spots* la isoleucina 58, ácido aspártico 166 y la isoleucina 176 con una contribución menor a 1 kcal/mol. Dentro del dominio carboxilo se ubican los *semi-hot spots* isoleucina 252 con una contribución de 0,84 kcal/mol y la isoleucina 244 con 0,91 kcal/mol, esta última también fue observada en el tipo de interacción paralela N-C.

Después de identificar y caracterizar las superficies de interacción lateral, surge la pregunta ¿cuál es la estabilidad de los complejos formados por los diferentes tipos de interacción? Para responder esta interrogante se determinó los valores de  $\Delta ASA$ , número de puentes de hidrógeno en  $100 \text{ \AA}^2$  de  $\Delta ASA$ , la complementariedad geométrica y el porcentaje de aminoácidos hidrófobos presentes en las interfases de la interacción lateral paralela N-N, paralela N-C y anti-paralela N-C para EcFtsZ, cuyos valores se compararon con valores característicos de complejos permanentes y no permanentes (Jones y Thornton 1996).

Tabla 8. Caracterización de los tipos de interacción sugeridos para la polimerización lateral de EcFtsZ.

Parámetro	Complejos		Complejos		Paralela		Anti-paralela		Paralela	
	Permanentes*	No-permanentes*	N-N	N-C	N-C	N-C	N-C	S3-S3 <sup>d</sup>		
$\Delta$ ASA ( $\text{\AA}^2$ ) <sup>a</sup>	1700	800	470	780	970	370				
Puentes de H por 100 $\text{\AA}^2$ $\Delta$ ASA <sup>b</sup>	0,7	1,1	0,6	0,5	0,1	0,5				
Volumen $gap^c/\Delta$ ASA ( $\text{\AA}$ )	2,1	2,7	4,6	3,9	2,9	4,8				
% Aa apolares	>47	<47	50	52	72	57				

\*Valor promedio de referencia para homodimeros permanentes y no permanentes (Jones y Thornton 1996).

<sup>a</sup> $\Delta$ ASA: Cambio en el área de accesibilidad al solvente.

<sup>b</sup>El número de puentes de hidrógeno por 100  $\text{\AA}^2$   $\Delta$ ASA se calculó con el programa HBplus, en el cual, los puentes de hidrógeno son definidos según el criterio de geometría estándar (McDonald y Thornton 1994).

<sup>c</sup>El volumen  $gap$  da una medida de la complementariedad geométrica de las superficies involucradas.

<sup>d</sup>Caracterización de la interfase S3-S3 propuesta por (Lowe y Arnos 1999).

En la tabla 8 se observa un valor de  $\Delta ASA$  de  $470 \text{ \AA}^2$  para la interacción lateral paralela N-N que equivale a un 3% de la superficie del monómero, un valor de  $\Delta ASA$  de  $780 \text{ \AA}^2$  para la interacción lateral paralela N-C con un 6% de la superficie del monómero, y un valor de  $\Delta ASA$  de  $970 \text{ \AA}^2$  para la interacción lateral anti-paralela N-C equivalente a un 7% de la superficie del monómero. Estos valores de  $\Delta ASA$  son compatibles con los valores reportados para interfases proteína-proteína de complejos no permanentes y los porcentajes de superficie son adecuados, por sobre 3% (Jones y col., 2000) para considerarlos como complejos con actividad biológica.

Los puentes de hidrógeno son cuatro para la interacción paralela N-C, tres para la interacción paralela N-N y uno para la interacción anti-paralela N-C, lo que equivale a 0,5, 0,6 y 0,1 puentes de hidrógeno por  $100 \text{ \AA}^2$  de  $\Delta ASA$ , como se muestra en la tabla 8. La complementariedad geométrica expresada como volumen  $gap/\Delta ASA$  mostró valores de  $4,6 \text{ \AA}$  para la interacción paralela N-N,  $3,9 \text{ \AA}$  para la interacción paralela N-C y  $2,95 \text{ \AA}$  para la interacción anti-paralela N-C. Se encontró un porcentaje de 52 y 50% de residuos apolares para las interacciones paralela N-N y paralela N-C, respectivamente. En la superficie de la interacción anti-paralela N-C se encontró un 72% de residuos hidrófobos.

En la última columna de la tabla 8 se muestra la misma caracterización para la interacción lateral sugerida por (Lowe y Amos 1999), obtenida por superposición manual de las estructuras 3D de MjFtsZ sobre la estructura a baja resolución de láminas de protofilamentos de EcFtsZ. Esta interacción es paralela N-N e involucra principalmente la hebra S3 de ambos monómeros de FtsZ. El valor de  $\Delta ASA$  de la superficie de interacción es  $370 \text{ \AA}^2$  que equivale a un 3% de la superficie total de la proteína. Esta interacción tiene un valor de  $\Delta ASA$  de  $101 \text{ \AA}^2$  menor que la interacción N-N determinada en este trabajo y el resto de los parámetros, volumen  $gap/\Delta ASA$ ,

puentes de hidrógeno por 100 Å<sup>2</sup> de ΔASA y porcentaje de residuos hidrófobos son similares.

Los resultados en su conjunto indican que los tres tipos de interacciones laterales sugeridas en esta tesis y la reportada por (Lowe y Amos 1999) presentan parámetros con valores característicos de complejos de interacción no permanente, característica esencial para entender la dinámica de los polímeros de EcFtsZ.

Se ha descrito que la interacción longitudinal y la lateral son mas bien de carácter no permanente, por este hecho se consideró necesario analizar la interacción entre los dominios amino y carboxilo en el monómero de EcFtsZ. A priori, postulamos que la interacción debiera ser del tipo permanente para mantener la integridad funcional del monómero cuando se producen los cambios estructurales dependientes de la hidrólisis del nucleótido.

**Análisis de la interfase inter-dominio de FtsZ.** Para determinar las características fisicoquímicas de la interacción entre el dominio amino y el dominio carboxilo de FtsZ, se analizaron las interfases inter-dominio de las estructuras de FtsZ disponibles en el PDB de PaFtsZ, de MtbFtsZ, de MjFtsZ y del modelo 3D de EcFtsZ, construido por homología (ver Materiales y Métodos) (tabla 9).

Tabla 9. Caracterización de los tipos de interacción inter-dominio de FtsZ.

Parámetro	Complejos		MjFtsZ <sup>d</sup>	PaFtsZ <sup>e</sup>		MbtFtsZ <sup>f</sup>		EcFtsZ <sup>g</sup>
	Permanentes*	No permanentes*		Inter-dominio	Inter-dominio	Inter-dominio	Inter-dominio	
$\Delta$ ASA (Å <sup>2</sup> ) <sup>a</sup>	1700	800	1980	1730	1630	1540		
Puentes de H por 100 Å <sup>2</sup> $\Delta$ ASA <sup>b</sup>	0,7	1,1	0,6	0,8	0,7	0,5		
Volumen gap <sup>c</sup> / $\Delta$ ASA (Å)	2,1	2,7	1,6	1,2	1,7	1,9		
% Aa apolares	>47	<47	71	70	71	75		

\*Valor promedio de referencia para homodímeros permanentes y no permanentes (Jones y Thornton 1996).

<sup>a</sup> $\Delta$ ASA: Cambio en el área de accesibilidad al solvente.

<sup>b</sup>El número de puentes de hidrógeno por 100 Å<sup>2</sup>  $\Delta$ ASA se calculó con el programa HBplus, en el cual, los puentes de hidrógeno son definidos según el criterio de geometría estándar (McDonald y Thornton 1994).

<sup>c</sup>El volumen gap da una medida de la complementariedad geométrica de las superficies involucradas.

<sup>d</sup>FtsZ de *Methanococcus jannaschii* (1fsz.pdb)

<sup>e</sup>FtsZ de *Pseudomonas aeruginosa* (1ofu\_A.pdb)

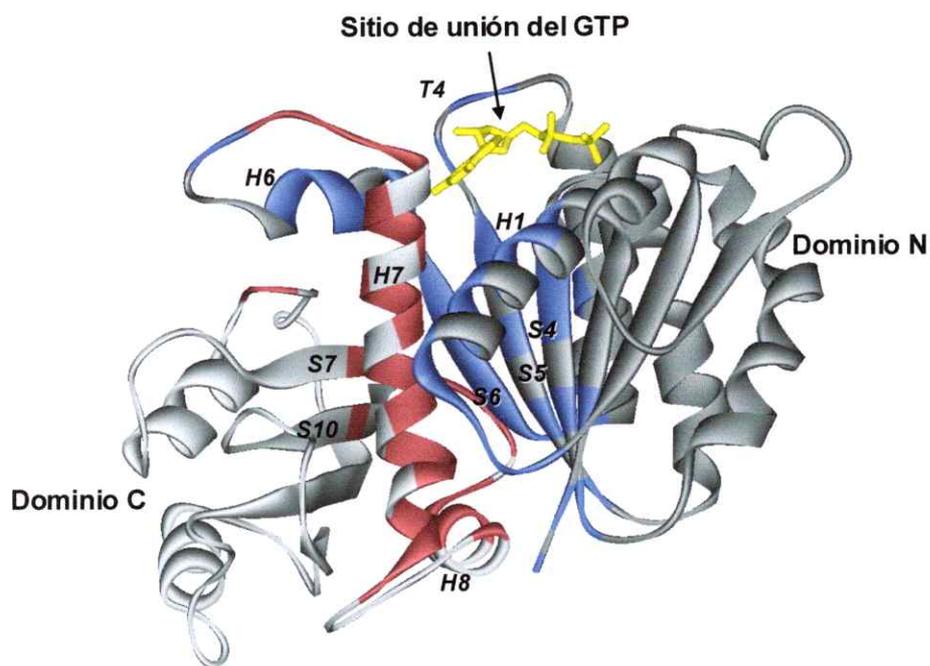
<sup>f</sup>FtsZ de *Mycobacterium tuberculosis* (1rq7.pdb)

<sup>g</sup>FtsZ de *Escherichia coli* (modelo 3D)

El análisis de las estructuras resueltas por difracción de rayos X revela que todas ellas presentan alrededor de un 21% de su superficie total involucrada en la interacción inter-dominio, con valores de 1980, 1730 y 1630 Å<sup>2</sup> de ΔASA para MjFtsZ, PaFtsZ y MbtFtsZ, respectivamente. En este mismo orden, cada interfase analizada presentó 0,6, 0,8 y 0,7 puentes de hidrógeno por 100 Å<sup>2</sup> de ΔASA y los índices de complementariedad geométrica mostraron valores de 1,6, 1,2 y 1,7 Å. La evaluación de estos parámetros y el carácter hidrófobo de las superficies estudiadas (mas del 70%) sugieren fuertemente la clasificación de interacción permanente entre ambos dominios. Al comparar estos resultados con el análisis del modelo 3D generado para EcFtsZ se observa que este también encaja perfectamente dentro de la clasificación de interacción permanente, se obtuvo un valor de ΔASA para la interfase inter-dominio de 1540 Å<sup>2</sup>, lo que equivale al 18% de su superficie total y un índice de complementariedad geométrica de 1,9 Å. Se encontraron 8 puentes de hidrógeno inter-dominio, alcanzando 0,5 puentes de hidrógeno por 100 Å<sup>2</sup> de ΔASA y se encontró que un 75% de los aminoácidos de la interfase son de carácter apolar.

En el modelo 3D de EcFtsZ se identificaron los elementos de estructura secundaria que participan en la superficie de interacción inter-dominio. En la figura 19, se observa en encintado la estructura 3D del modelo de EcFtsZ, el dominio amino de plegamiento Rossmann y el dominio carboxilo de plegamiento corismato mutasa coloreados en gris y blanco, además se destaca el GDP en su sitio de unión. El dominio carboxilo, presenta a las hélices α H7 y H8, el lazo H6-H7 y las hebras β S7 y S10. Estos elementos interactúan con las hélices α H1 y H6, el lazo T4 y la sábana formada por las hebras β S4, S5, S6 del dominio amino. Los Cα de los aminoácidos

que conforman la interfase entre ambos dominios son coloreados de acuerdo al dominio al que pertenecen.



**Figura 19. Modelo de la estructura 3D de EcFtsZ con GDP.** El dominio amino y el dominio carboxilo de EcFtsZ están en color gris y blanco, respectivamente. El GDP se muestra en amarillo en el sitio de unión del nucleótido. Los residuos que conforman la interfase inter-dominio se colorean de acuerdo al dominio al que pertenecen. Se identifican los elementos estructurales involucrados en la interacción.

Estos resultados sugieren la existencia de una fuerte interacción entre el dominio amino y carboxilo de FtsZ, indicando una asociación permanente de ambos dominios, la cual permitiría mantener una comunicación estructural global en la proteína. La tabla 9 muestra el análisis hecho para el modelo 3D de EcFtsZ y para la estructura de los cristales de PaFtsZ, MbtFtsZ y MjFtsZ, disponibles en el PDB, confirmando el carácter permanente de esta interacción. Este comportamiento se

conserva en todas las estructuras de FtsZ analizadas, las cuales incluyen proteínas de extremófilos y mesófilos.

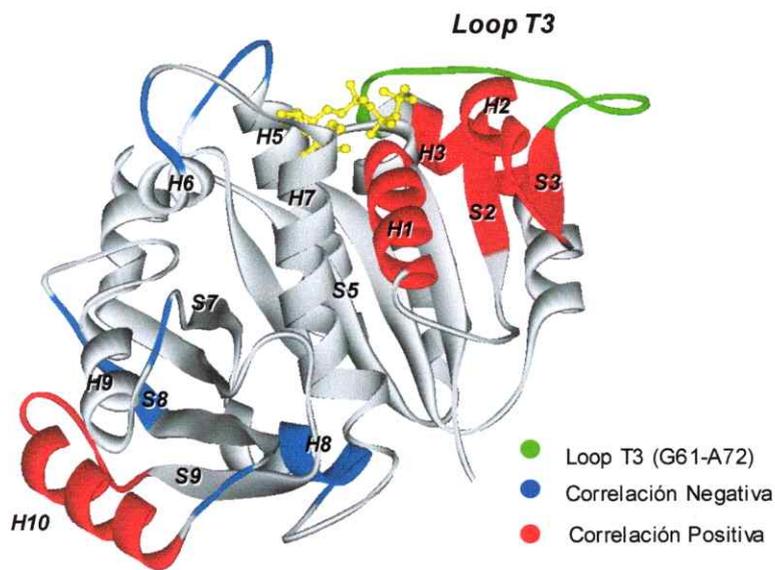
La existencia de una comunicación global entre los dominios de una proteína, permitiría la transmisión de perturbaciones desde la región "blanco" hasta zonas alejadas de esta. Así, el efecto que la hidrólisis de GTP tiene sobre la estructura de FtsZ, podría no solo afectar a las regiones aledañas, es decir, del dominio amino, si no también propagar los cambios estructurales hacia el dominio carboxilo. Para comprobar esta hipótesis se analizó la flexibilidad de FtsZ, de modo de explicar desde un punto de vista dinámico, la relación que existe entre ambos dominios. Con este objeto, se determinaron los movimientos correlacionados por una simulación de la dinámica molecular de la estructura de EcFtsZ y un análisis de flexibilidad intrínseca dado por el factor térmico (*B-factor*) de las estructuras tridimensionales de los cristales de FtsZ.

## **FLEXIBILIDAD EN FTSZ.**

**Análisis de movimientos correlacionados.** El análisis de movimientos acoplados en proteínas permite explicar cómo un cambio local en la estructura podría perturbar a regiones remotas de la proteína, lo que lo hace particularmente útil para entender por qué cambios lejos del sitio activo podrían tener consecuencias funcionales (Rod y col., 2003). Con una simulación de dinámica molecular es posible determinar la correlación de movimientos de elementos estructurales respecto a una región definida a través de

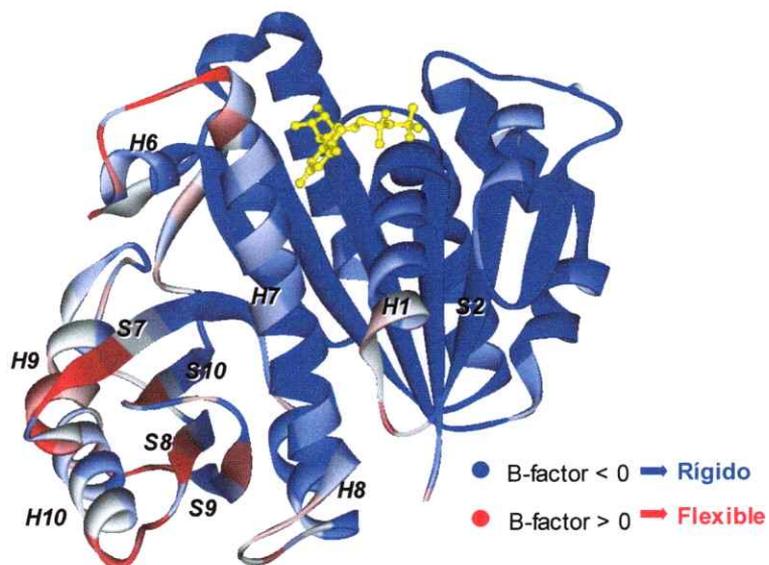
la co-varianza de sus movimientos (Ichiye y Karplus 1991; Amadei y col., 1993; Karplus y Ichiye 1996).

Para determinar los movimientos correlacionados entre los dominios de FtsZ se hizo una simulación de dinámica molecular por 1ns con el modelo 3D de EcFtsZ como estructura inicial para construir una matriz de covarianza (ver Materiales y Métodos). Específicamente, se identificó aquellos elementos estructurales que presentaron correlación en sus movimientos internos respecto a una región perteneciente al sitio de unión de GTP. El lazo G61-A72 en el modelo de EcFtsZ, equivalente al lazo T3 de MjFtsZ, se eligió como estructura de referencia debido a que se comporta como un *switch* para la hidrólisis del fosfato  $\gamma$  de GTP, es decir, es capaz de censar los cambios estructurales asociados a la actividad GTPásica de FtsZ (Diaz y col., 2001). En la figura 20 se observan los elementos estructurales cercanos al lazo de referencia (T3) en el dominio amino, la hélice  $\alpha$  H1, hebra S2, hélice  $\alpha$  H2, hebra S3, lazos S5-H5, H6-H7 y una porción de la hélice  $\alpha$  H3, los cuales presentaron movimientos correlacionados con los movimientos del lazo T3. También, se observó correlaciones dinámicas con algunos elementos estructurales alejados del lazo T3, la hélice  $\alpha$  H10, los lazos S9-H10, S7-H9, S8-H9 y las porciones de la hélice  $\alpha$  H8 y hebra S8 del dominio carboxilo. La correlación de movimientos de estas regiones respecto del lazo T3 apoya la hipótesis de una conexión dinámica entre los dominios amino y carboxilo de EcFtsZ que estaría relacionada con su actividad GTPasa.



**Figura 20. Análisis de movimientos correlacionados de FtsZ.** Simulación de dinámica molecular de 1 nanosegundo sobre el modelo 3D de EcFtsZ. Los elementos estructurales que se mueven en dirección opuesta respecto del lazo T3 corresponden a correlaciones negativas y se muestran en azul. Las correlaciones positivas, en las que los residuos se mueven en la misma dirección que el lazo T3, se muestran en rojo. El nucleótido en el sitio de unión de FtsZ se muestra en amarillo. La figura se construyó con DS Modeling v1.1 (Copyright (C) 2001-2003 by Accelrys).

**Análisis de la flexibilidad intrínseca de FtsZ.** La flexibilidad intrínseca de MjFtsZ se analizó por medio del valor de *B-factor* normalizado incluido en el archivo PDB (1fsz) (ver Materiales y Métodos). Los resultados mostraron evidencia una mayor rigidez en el dominio amino que incluye el sitio de unión del GTP en relación al dominio carboxilo. Las regiones flexibles se encontraron en una porción de la hélice  $\alpha$  central H1 y el lazo H1-S2 del dominio amino, como también en el dominio carboxilo, la hélice  $\alpha$  H9, la sábana  $\beta$  formada por las hebras S9, S8, S10 y S7, los lazos H7-H8, H6-H7, S9-H10 (figura 21).



**Figura 21. Análisis de la flexibilidad intrínseca de FtsZ.** El factor térmico de la estructura de MjFtsZ se muestra en colores de acuerdo a los valores de *B-factor* normalizado del archivo 1fsz.pdb. Las zonas que presentan mayor flexibilidad son mostradas en rojo y las zonas rígidas en azul. El nucleótido se muestra en amarillo en el sitio de unión de FtsZ. La figura se construyó con DS Modeling v1.1 (Copyright (C) 2001-2003 by Accelrys).

## DISCUSIÓN

La información disponible sobre la estructura 3D de FtsZ proviene de la cristalografía de las proteínas termófilas MjFtsZ, TmFtsZ y de la mesófila PaFtsZ y la mayor cantidad de información sobre la funcionalidad se ha obtenido con EcFtsZ. La relación entre la estructura y la función de FtsZ proviene de trabajos con MjFtsZ sobre estructuras de baja resolución. Con el fin de interpretar desde un punto de vista molecular la polimerización de EcFtsZ en esta memoria se construyó un modelo de su estructura 3D. Con este objeto, se determinó las características de las superficies de interacción inter-dominio en el monómero, y las interacciones longitudinal y lateral en el polímero y la influencia de la presencia del fosfato *gamma* en el sitio de unión del nucleótido. Se discutirá la robustez de los modelos estructurales en estado monomérico, dimérico y tetramérico y se relacionarán sus propiedades fisicoquímicas y estructurales con la funcionalidad de EcFtsZ.

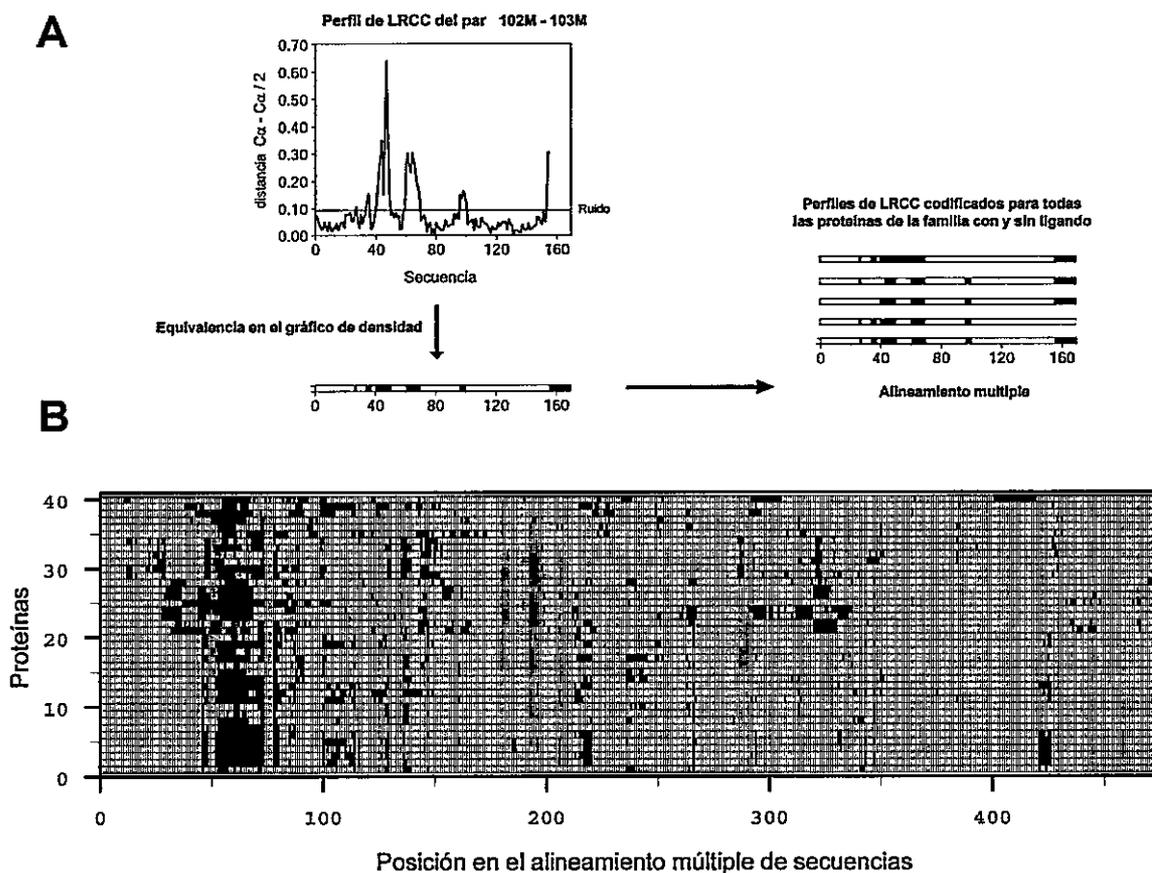
**Modelo de la estructura tridimensional de EcFtsZ.** La disponibilidad de la estructuras 3D de FtsZ de *M. jannaschii* (MjFtsZ) (1fsz.pdb) y de FtsZ de *P. aeruginosa* (PaFtsZ) (1ofu.pdb) ambas unidas a GDP y el alto porcentaje de identidad de secuencia comparadas con FtsZ de *E. coli* (EcFtsZ), de 40 y 58% respectivamente, permitió utilizarlas como moldes estructurales para el modelado por homología (Sanchez y Sali 1997) de la conformación GDP de EcFtsZ desde el aminoácido Asp10 al Thr324. Ambas estructuras cristalográficas son bastante semejantes entre si, poseen un 49% de identidad de secuencias y al hacer una superposición estructural de sus carbonos alfa se obtiene un RMSD total de 1,45 Å. Si bien, el considerar a la vez

dos moldes similares entre sí para modelar una estructura no implica un aporte en sí, es posible observar que en la estructura de PaFtsZ se identifican menos lazos que los encontrados en MjFtsZ por lo que se agregó como segundo molde para disminuir las regiones desestructuradas del modelo de EcFtsZ que se construyó. La posibilidad de errores en el alineamiento entre la secuencia del molde y del modelo se consideró despreciable debido al alto porcentaje de identidad de secuencia entre ellos. Además, el modelado explícito de los lazos (Fiser y col., 2000) para la estructura de EcFtsZ permitió tener la certeza de su carácter flexible.

Las coordenadas de la conformación estructural que FtsZ adoptaría al encontrarse unida a GTP se obtuvieron mediante un alineamiento de su secuencia con la de  $\alpha$ -tubulina, obtenida a partir de la difracción electrónica de la estructura de su homóloga en eucariontes,  $\alpha\beta$ -tubulina (1jff.pdb). La  $\alpha$ -tubulina del heterodímero se encuentra unida a GTP y a pesar de poseer un bajo porcentaje de identidad de secuencias con FtsZ (14%) presenta el mismo tipo de plegamiento, con excepción de algunos lazos externos que tubulina utiliza para la unión de chaperonas (Andreu y col., 2002) y que se encuentran ausentes en FtsZ. Dada la baja identidad de secuencias, los posibles errores en el alineamiento se minimizaron con la utilización de alineamientos estructurales y alineamientos múltiples de secuencia de FtsZ, a los cuales fue adjudicado un mayor peso estadístico al momento de incluir la secuencia de tubulina.

La aproximación de predecir los cambios conformacionales que FtsZ sufriría al encontrarse unida a GTP utilizando la estructura de la  $\alpha$ -tubulina esta basada en que la ruta de cambios conformacionales relacionadas con la unión del ligando (LRCC=*ligand related conformational changes*) es conservada en familias de proteínas homólogas, es

decir es posible identificar las regiones donde se propaga los cambios estructurales que sufre una proteína al unir un ligando (Tesis Doctorado José Jaime Arbildua). La figura 22 muestra un ejemplo del análisis de conservación de cambios conformacionales representado en un gráfico de densidades.

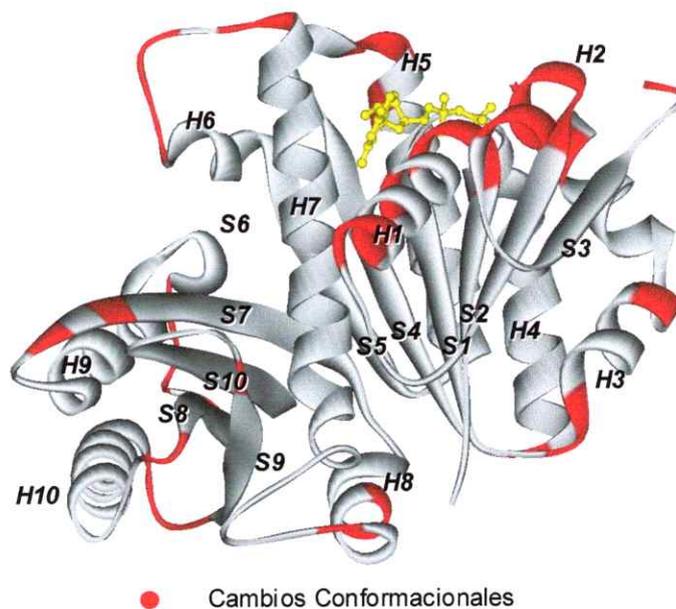


**Figura 22. Análisis del patrón de conservación de cambios conformacionales relacionados con la unión de un ligando (LRCC). A.** Metodología usada para la obtención del gráfico de densidades por familias de proteínas donde 102M y 103M son estructuras de proteínas homólogas con y sin ligando, respectivamente. **B.** Ejemplo de conservación de cambios conformacionales a través del gráfico de densidades de las secuencias de la familia de la quinasas (Tesis de Doctorado José Jaime Arbildua).

La figura 22A muestra el perfil de distancias entre los C $\alpha$  de un par de proteínas las cuales están como apo- y holo-proteína. Este perfil se transforma a un gráfico de densidad de acuerdo a la secuencia y se suma a los gráficos de densidades de los otros pares de proteínas homólogas analizados, donde se aprecia la conservación. La figura 22B muestra el resultado del análisis para la familia de las quinasas (código CATH 1.10.510.10), donde las zonas en negro son aquellas que sufrieron los mayores cambios conformacionales al unir el ligando. Así, se observa el patrón conservado de las regiones que censaron los cambios estructurales para la familia de las quinasas.

Durante el transcurso de esta tesis, la estructura dimérica de FtsZ de *Mycobacterium tuberculosis* (MtbFtsZ) se obtuvo por difracción de rayos X a una resolución de 2,08 Å. El dímero se formó por interacciones laterales de los monómeros, donde uno de ellos poseía un análogo no hidrolizable de GTP (GTP $\gamma$ S), en el sitio de unión del nucleótido y el otro permaneció vacío (Leung y col., 2004). La estructura del monómero de MtbFtsZ en conformación GTP se sobrepuso estructuralmente con el modelo 3D de EcFtsZ en el mismo estado, este análisis mostró un RMSD de 2.9 Å al considerar un alineamiento de 298 residuos, el que presentó un 4,4% de espacios vacíos en el alineamiento que correspondieron a residuos de los lazos T3 y T6. Este resultado indica que solo existen pequeñas diferencias entre ambas conformaciones que se pueden atribuir a la flexibilidad propia de regiones desestructuradas como los lazos y a que el lazo T3 participa directamente en la interacción lateral del cristal de MtbFtsZ, lo que lo obligaría a adoptar una conformación distinta a la que adopta en estado monomérico.

Los cambios conformacionales inducidos por la hidrólisis de GTP y liberación del fosfato en EcFtsZ, se determinaron al comparar las posiciones de los carbonos alfa de las estructuras cristalizadas de MtbFtsZ en estado GTP y GDP (1rlu.pdb, 1rq7.pdb) (Leung y col., 2004). Los mayores cambios conformacionales se presentaron principalmente en regiones externas de EcFtsZ, algunas de ellas cercanas al sitio de unión del GTP, otros cambios conformacionales se detectaron en regiones alejadas del sitio de unión de GTP, en el dominio carboxilo, por ejemplo, porciones de la hélice  $\alpha$  H8 y los lazos S8-H10 y S9-H10 (figura 23).



**Figura 23. Cambios conformacionales relacionados a la hidrólisis del GTP de FtsZ.** La estructura de MtbFtsZ se muestra en gris y las zonas que sufren los mayores cambios conformacionales se muestran en rojo. El nucleótido en el sitio de unión de FtsZ se muestra en amarillo.

De la misma manera que para obtener la conformación de EcFtsZ en estado GDP, las regiones predichas como lazos en la estructura de EcFtsZ unida a GTP se modelaron explícitamente para determinar su flexibilidad estructural (Fiser y col., 2000).

Los modelos 3D se evaluaron a través de perfiles de pseudo-energía y valores de pG-score que indicaron alta confiabilidad (Sippl 1993; Sanchez y Sali 1998).

**Superficies de interacción longitudinal en dímeros de EcFtsZ.** La estructura de EcFtsZ en estado polimerizado se construyó a partir de la interfase de interacción longitudinal de  $\alpha\beta$ -tubulina. La reconocida homología entre estas proteínas y la semejanza en cuanto al tipo de polímeros formados (Nogales y col., 1998) se utilizaron como base teórica para que la interacción longitudinal entre los monómeros de  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina sirviera como molde de la interfase longitudinal del polímero de EcFtsZ. Para disponer de polímeros en los diferentes estados conformacionales de la proteína de acuerdo al estado de fosforilación del nucleótido unido, se construyeron tres dímeros EcFtsZ-GDP/EcFtsZ-GDP, el cual presentó GDP en ambos monómeros, EcFtsZ-GTP/EcFtsZ-GDP, con GTP y GDP en cada monómero y EcFtsZ-GTP/EcFtsZ-GTP, con GTP unido en ambos monómeros. Durante el desarrollo de este trabajo, la estructura dimérica de MjFtsZ (1w5a.pdb) unida a GTP en ambos monómeros se resolvió a 2,4 Å (Oliva y col., 2004). Al hacer una superposición estructural del dímero EcFtsZ-GTP/EcFtsZ-GTP obtenido por modelado por homología en esta memoria y la estructura dimérica cristalizada se observó un valor de RMSD total de 5,7 Å considerando un total de 619 aminoácidos. Además, al inscribir la interfase de interacción longitudinal de ambos dímeros en una circunferencia de radio 10 Å, se

observó una diferencia de 3,2 Å entre ambos centros, lo que implica una buena superposición entre ambas áreas de 79%. Estos datos sugieren que la interfase longitudinal del heterodímero de  $\alpha\beta$ -tubulina como molde para predecir la superficie de interacción longitudinal de los polímeros de EcFtsZ es apropiada y que el pequeño corrimiento observado puede deberse a la presencia de una serie de lazos externos en tubulina, ausentes en FtsZ que contribuirían al área de interacción entre ambos monómeros de  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina.

Actualmente, la caracterización de superficies de interacción proteína-proteína permite definir a los complejos macromoleculares como de tipo permanente o no permanente de acuerdo a las constantes de disociación de ellos (Jones y Thornton 1996). La interacción entre los monómeros de  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina en el heterodímero se describió como una interacción del tipo permanente debido a que el heterodímero no se disocia en solución, pues se considera como la unidad básica requerida para la formación de microtúbulos (Caplow y Fee 2002) (Downing y Nogales 1999). Los parámetros utilizados en esta tesis confirman que la interacción de los monómeros en el heterodímero de tubulina es de tipo permanente. Así, el valor de  $\Delta$ ASA, el número de puentes de hidrógeno, el índice de complementariedad geométrica y el porcentaje de hidrofobicidad de los aminoácidos involucrados son coincidentes con la información experimental respaldando la estrategia bioinformática utilizada.

La caracterización de la interfase longitudinal predicha para el dímero de EcFtsZ, EcFtsZ-GDP/EcFtsZ-GTP, sugiere que este complejo se clasifica como intermedio entre complejos permanentes y no permanentes. Esta conducta se confirma al analizar la interfase del dímero cristalizado de MjFtsZ que presenta un alto valor de complementariedad geométrica y un valor de  $\Delta$ ASA más cercano al valor medio de

complejos no permanentes. En los dímeros EcFtsZ-GTP/EcFtsZ-GTP, EcFtsZ-GTP/EcFtsZ-GDP y EcFtsZ-GDP/EcFtsZ-GDP, el estado de fosforilación del nucleótido no influyó sobre esta conducta de interacción, sin embargo, es interesante hacer notar que el complejo EcFtsZ-GTP/EcFtsZ-GTP presentó una menor estabilidad relativa a los otros dos dímeros en diferentes estados de fosforilación del nucleótido. El  $\Delta\Delta G$  de unión obtenido por una exploración de mutagénesis computacional de alanina confirmó estos resultados, pues para cada superficie de interacción longitudinal mostró valores positivos para los tres dímeros, es decir las interacciones en estas superficies favorecen la formación del complejo, y los valores de  $\Delta\Delta G$  de unión de los dímeros EcFtsZ-GDP/EcFtsZ-GTP y EcFtsZ-GDP/EcFtsZ-GDP (22,3 y 22,8 kcal/mol, respectivamente) mostraron una mayor estabilidad comparada al dímero EcFtsZ-GTP/EcFtsZ-GTP (2,8 kcal/mol).

Estos resultados son coincidentes con los experimentos de sedimentación al equilibrio desarrollados por Rivas y col., (2002), quienes concluyeron que FtsZ en ausencia de magnesio es un monómero globular con tendencia a auto-asociarse y que este catión induce la formación de polímeros de tamaños heterogéneos de manera indefinida (Rivas y col., 2000).

**Superficies de interacción lateral entre polímeros de EcFtsZ.** La predicción computacional de la interacción lateral entre los dímeros de EcFtsZ construidos por modelado comparativo se hizo por acoplamiento proteína-proteína. El uso de la estructura de EcFtsZ en estado polimerizado permitió aumentar la probabilidad de contacto lateral entre los dímeros, debido al aumento de la superficie disponible para interactuar, que favorece el encuentro y la formación de enlaces entre ellos. Dentro de sus limitaciones generales es necesario considerar que se usan representaciones de

las proteínas con una elevada complementariedad geométrica y sin cambios conformacionales de gran alcance, como por ejemplo el movimiento de dominios. En general, se necesita de información alternativa para filtrar interacciones biológicamente improbables como la información de secuencia, mutaciones o deleciones. En este trabajo se utilizó como filtro una segunda predicción computacional basada en la estructura primaria. Esta predicción consistió en análisis de conservación de secuencias con *evolutionary tracing* (ET) y de mutaciones correlacionadas.

Los criterios utilizados para determinar superficies de interacción reconocen los sitios de unión conservados de las proteínas aunque ocurran cambios evolutivos en el resto de su superficie, de allí que la búsqueda de estos patrones de conservación es útil al momento de predecir una superficie de interacción proteína-proteína (Lichtarge y Sowa 2002; Ma y col., 2003). Esto se ha demostrado experimentalmente con mutagénesis por alanina de algunos residuos que contribuyen en forma mayoritaria a la estabilidad del complejo. Estos residuos, denominados *hot spots*, son los que contribuyen de manera significativa a la energía libre de unión del complejo (DeLano 2002). Halperin y col. (2004) analizaron 250 complejos proteína-proteína encontrando una correlación positiva entre los residuos estructuralmente conservados y aquellos considerados *hot spots* en la internase. Estos residuos presentaron un alto nivel de empaquetamiento, de manera que al mutarlos se afectaría un mayor número de residuos vecinos alterando la afinidad proteína-proteína, esta sería una de las razones de su conservación. Así, se demostró la preferencia de algunos pares de residuos a participar acoplados en la superficie de interacción: apolar-apolar, cargado-apolar, cargado-aromático. De manera particular se observó la preferencia de la glicina a acoplarse a aromáticos, polares y residuos cargados y una desfavorable interacción con metionina, prolina, leucina e isoleucina.

El análisis de la información evolutiva y estructural de FtsZ en esta memoria mostró que la mayoría de los pares de aminoácidos que estarían interactuando en la interfase proteína-proteína, presentan relaciones favorables según los antecedentes mencionados, es decir, aromático-cargado y cargado-apolar. Se observa que la Y222 es fundamental en las relaciones observadas y que las interacciones carga-carga se observan en menor medida, a pesar de que la participación de residuos cargados es importante en las relaciones encontradas. La distribución de los residuos seleccionados en la estructura tridimensional de EcFtsZ permitió definir un grupo C y otro N, que estarían participando en la interacción lateral de EcFtsZ, donde la Y222 se mantiene alejada de estos grupos. La red de correlaciones relaciona a ambos grupos prediciendo un tipo de interacción lateral N-C, además, relaciona residuos de un mismo grupo, lo que podría implicar una interacción C-C o simplemente una correlación producto de la cercanía espacial.

Una limitación de la estrategia de *evolutionary tracing* y mutaciones correlacionadas basadas en el análisis de secuencia, es la imposibilidad de discriminar entre pares de mutaciones correlacionadas que estén participando en el área de interacción proteína-proteína de zonas de cambios conformacionales que permite a la proteína ser estable y dinámica. Un ejemplo que podría representar esta situación es la Y222, la cual parece importante desde un punto de vista evolutivo, pero que no participaría directamente en el área de interacción lateral FtsZ-FtsZ. Es por este motivo que la contribución de información experimental, tal como mutaciones puntuales y estudios de funcionalidad de estos mutantes es fundamental en la toma de decisiones al hacer una predicción.

Los resultados de la predicción de superficie de interacción lateral de FtsZ de acoplamiento proteína-proteína se filtraron con los de *evolutionary tracing* y mutaciones

correlacionadas y se observó la frecuencia de formación de los distintos complejos tetraméricos de acuerdo a su tipo de interacción. El bajo número de tetrámeros con las diferentes combinaciones GTP/GDP que presentaron interacción lateral a través de sus dominios carboxilos (C-C) indicó que este tipo de interacción es improbable de acuerdo a las restricciones geométricas y energéticas impuestas en la estrategia anterior. La correlación encontrada en el análisis de mutaciones correlacionadas entre residuos del dominio carboxilo se podría explicar ya que esta región sería sensible a cambios conformacionales asociados con la funcionalidad de EcFtsZ, de manera que es requerida una estrecha relación entre aminoácidos vecinos. El análisis de movimientos correlacionados da cuenta de esta hipótesis, debido a que mostró regiones del dominio carboxilo dinámicamente relacionadas con zonas del dominio amino involucradas en la hidrólisis del GTP como el lazo T3 (Díaz y col., 2001). La flexibilidad en estas zonas sería más marcada en el dominio C como lo demuestra el valor del *B-factor*. Esto está de acuerdo con el hecho que la flexibilidad en las proteínas está asociada a su función (Hilser y col., 1998; Freire 1999).

El análisis de flexibilidad muestra una fuerte conexión dinámica entre los dominios amino y carboxilo de FtsZ. Los resultados muestran que un 73% de los elementos estructurales involucrados en cambios conformacionales inducidos por la hidrólisis del GTP forman parte de los movimientos correlacionados observados por la dinámica molecular. Así, las regiones flexibles localizadas en el dominio carboxilo según el análisis del factor térmico corresponden a zonas que participan en los cambios conformacionales que experimenta la proteína al hidrolizar el nucleótido. Por esto, se podría especular que la flexibilidad del dominio carboxilo podría estar asociada a un efecto alostérico producido por la hidrólisis de GTP que debilitaría la interacción longitudinal en el protofilamento facilitando la despolimerización de FtsZ.

En el laboratorio se diseñó y caracterizó la mutante I294W, localizada en el dominio carboxilo de EcFtsZ, esta mutación indujo la polimerización de láminas estables que afectaron la funcionalidad de EcFtsZ, sin afectar su estabilidad estructural. Una hipótesis para sustentar estos resultados indica que la flexibilidad propia del dominio carboxilo se perdería producto de la formación de un *stacking* (interacción entre los anillos aromáticos a través de fuerza electrostáticas o de Van der Waals) formado por W294 y la F275, inhibiendo el cambio conformacional responsable de la despolimerización (Tesis Pregrado Rodrigo Díaz).

Los resultados anteriores en su conjunto sugieren que los tipos de interacción lateral más probables son entre los dominios amino y carboxilo (N-C) y entre ambos dominios amino (N-N), de manera que las interacciones laterales se discutirán considerando este tipo de interacciones. La clasificación jerárquica que evalúa la complementariedad geométrica indicó que no existen mayores diferencias entre ambos tipos de interacciones para todos los tipos de tetrámeros, con la excepción de DD\_DD y TD\_DD donde se favorece las interacciones N-N y N-C, respectivamente.

La localización tridimensional de mutaciones sitio-dirigida experimentales que inhiben la interacción lateral entre protofilamentos de FtsZ coincide con los grupos C y N determinados por *evolutionary tracing* y por análisis de mutaciones correlacionadas, confirmando la predicción de la zona de interacción lateral de FtsZ. En el laboratorio se diseñó y caracterizó la mutante R85Q, localizada en la hélice  $\alpha$  H3 del dominio amino de EcFtsZ (grupo N), que inhibió las interacciones laterales (Tesis Magíster Jae Y. Shin). La mutante Y222W estabilizó los polímeros de EcFtsZ, efecto que podría asociarse con su rol importante en la red de mutaciones correlacionadas que relaciona a ambas caras laterales de FtsZ (Tesis Pregrado Rodrigo Díaz).

Oliva y col., (2003) sugieren que a diferencia de las interacciones laterales de los microtúbulos, FtsZ utiliza una unidad básica de polimerización que consiste en un doble filamento, en el cual la interacción FtsZ-FtsZ involucraría residuos de ambos dominios N de los monómeros del complejo, es decir un tipo de interacción N-N. Así, la formación de láminas inducidas con calcio ocurriría a través de la interacción de los dobles filamentos en forma anti-paralela por los dominios carboxilo (Lowe y Amos 1999). La posibilidad que ambas interacciones ocurran se evaluó mediante una exploración por mutagénesis computacional de alaninas de las interfases laterales, donde se consideraron las orientaciones paralela y anti-paralela de los dímeros en el tetrámero de acuerdo a la ubicación del nucleótido. La interacción paralela N-N, que es compatible con el tipo de interacción lateral informado por Oliva y col., (2003) mostró valores favorables de  $\Delta\Delta G_{unión}$  para la formación de los tetrámeros TT\_TT, DD\_TD y DD\_DD, con diferencias energéticas acordes al proceso de polimerización de FtsZ (Bertrand y col., 2005). En la estructura tridimensional de polímeros de MtbFtsZ resuelta por difracción de rayos X, se observó que la interacción lateral se producía a través de los dominios N de ambos monómeros (Leung y col., 2004).

Se sabe que la polimerización de EcFtsZ es inducida por GTP, así, la interacción longitudinal para formar el dímero EcFtsZ-GTP/EcFtsZ-GTP debiera ser la más favorable. La aparente contradicción con la polimerización de una menor estabilidad del dímero EcFtsZ-GTP/EcFtsZ-GTP (interacción longitudinal) y una mayor estabilidad del tetrámero TT\_TT (interacción lateral), se puede explicar considerando que el equilibrio entre las tres especies involucradas (monómero, dímero y tetrámero) esta fuertemente desplazado hacia la formación del tetrámero, lo que favorece la formación del dímero a pesar de su menor estabilidad.

La exploración de mutagénesis computacional de alaninas mostró que las interacciones del tipo N-C paralela y anti-paralela son factibles, lo que podría explicar tanto un número par como impar de protofilamentos asociados en láminas (Tesis Doctorado Jae Y. Shin). Si las interacciones N-N son más favorables que las C-C debieran existir solo números pares de protofilamentos asociados en una lámina inducida por cofactores como el calcio y DEAE-dextrano (Yu y Margolin 1997; Lowe y Amos 1999). Recientemente, se reportó una predicción *in silico* de la interacción lateral de FtsZ, donde se postula que la interacción entre protofilamentos es del tipo paralela N-C (Mukherjee y col., 2005), lo que concuerda con las predicciones de esta memoria.

Las proyecciones de esta memoria proporcionan un modelo para entender las interacciones involucradas en la formación del divisoma bacteriano y dan un marco teórico para experimentos de mutagénesis sitio-dirigidas que afecten las interacciones de EcFtsZ. La certeza en la predicción de un residuo como *hot spot* a partir de los residuos de la interfase de interacción proteína-proteína es de un 80% (Kortemme y Baker 2002) por esto los residuos encontrados en esta tesis como *hot spots* son buenos candidatos a mutar para confirmar las propiedades de las interacciones laterales en los polímeros de EcFtsZ. La identificación de estos residuos mostró que la R85 y la I244 son importantes para la interacción paralela N-C, sin embargo se debe tener cuidado con estas mutaciones, pues podrían afectar también las interacciones N-N paralela y anti-paralela. Buenos candidatos que afectarían de manera específica la energía libre de unión de la interacción paralela N-N podrían ser la H156 ( $\Delta\Delta G_{\text{unión}} = 2,46$  kcal/mol) y E152 ( $\Delta\Delta G_{\text{unión}} = 5,29$  kcal/mol). La mutación del E152 podría afectar su interacción con el *hot spots* R85 de la cara opuesta que contribuye con 2,06 kcal/mol. La interacción paralela N-C podría ser afectada en 4,13 kcal/mol con un cambio de la S245 por alanina, además su interacción con R89 y R85 afectaría a la vez a las contribuciones de

1,36 y 9,4 kcal/mol, respectivamente. La interacción anti-paralela N-C podría ser fuertemente afectada con la mutación de la K167, debido que esta contribuye con 3,79 kcal/mol e interactúa con D84 de la cara opuesta, que contribuye con 1,56 kcal/mol a la energía de unión del complejo.

La evaluación de los parámetros fisicoquímicos de las interfases de interacción lateral de EcFtsZ sugeridas en esta tesis mostró valores característicos de complejos no permanentes, lo que concuerda con un proceso de polimerización de tipo cooperativo, donde las interacciones laterales se hacen más favorables a medida que crece el polímero. La interacción lateral anti-paralela N-C se presentó como la interacción de mayor estabilidad entre las tres superficies propuestas, con la mayor complementariedad geométrica, el mayor porcentaje de residuos hidrófobos y la mayor área de accesibilidad al solvente. La interacción paralela N-N incluye la interacción S3-S3 propuesta por Lowe (Lowe y Amos 1999). Si bien, poseen complementariedades geométricas similares, el valor de ASA para la interacción paralela N-N aumenta en 100 Å ubicándola dentro del conjunto de interfases probables y con rol biológico.

La continuación de este trabajo debiera dirigirse a caracterizar las interacciones de EcFtsZ en presencia de solvente de modo de entender la acción de co-factores como calcio para la inducción de láminas. También, debiera caracterizarse la interacción con ZipA y FtsA, para entender la unión del anillo Z a la membrana citoplasmática de la bacteria y la interacción de proteínas tardías con el anillo.

## CONCLUSIONES

Las propiedades de la interfase inter-dominio de FtsZ corresponden a una interacción de tipo permanente.

Las propiedades de la interfase longitudinal del dímero de EcFtsZ corresponden a una interacción de tipo intermedio entre permanente y no permanente.

La interacción lateral entre protofilamentos de EcFtsZ es de carácter no permanente. La información evolutiva determinó dos grupos estructurales de residuos que participarían en la interacción lateral entre protofilamentos de EcFtsZ, uno ubicado en el dominio amino (N) y otro en el dominio carboxilo (C).

El número de tretrámeros y la complementariedad geométrica indicó que las interacciones de tipo paralela N-N, paralela N-C y anti-paralela N-C son mas probables, descartándose la interacción C-C.

Entre los aminoácidos que contribuyen mayoritariamente a las interacciones laterales, se sugiere como posibles candidatos para mutaciones sitio-dirigida: en la interacción paralela N-N, la H156 y E152; en la interacción paralela N-C, la S245 y en la interacción anti-paralela N-C la K167.

El mecanismo de polimerización de EcFtsZ implica un cambio conformacional al estado GTP para formar el polímero y GDP para su despolimerización. Los resultados muestran que el estado conformacional del dímero GTPGTP presenta una menor superficie de interacción longitudinal que el dímero GTPGDP y GDPGDP, por esta razón la estabilidad de los polímeros estaría dada por la interacción lateral en el tetrámero.

A continuación se muestran las presentaciones a congresos nacionales donde se presentaron trabajos relacionados con el desarrollo de esta tesis:

**Garcés, A.,** Arbildua, J., Monasterio, O. "Prediction and characterization of longitudinal and lateral interactions in FtsZ polymers". *Annual meeting of Society of Biochemistry and Molecular Biology of Chile*. p.31, September, 2004.

**Garcés, A.,** Arbildua, J., Monasterio, O. "Prediction of the protein interaction zones involved in the initial steps of the bacterial divisome location and formation". *Annual meeting of Society of Microbiology of Chile, Acta Microbiológica*, v.10, N°1, p.139, December, 2004.

**Garcés, A.,** Díaz, R., Arbildua, J., Lagos, R., Monasterio, O. "Importance of the carboxyl domain in the function of *E. coli* FtsZ". *Annual meeting of Society of Biology of Chile. Biological Research*, v.37, N°4, p.R73, November, 2004.

Díaz, R., **Garcés, A.,** Montecinos, F., Lagos, R., Monasterio, O. "Structural and functional analysis of the *E. coli* FtsZ C-terminal region". *Annual meeting of Society of Microbiology of Chile, Acta Microbiológica*, v.10, N°1, p.107, December, 2004.

Arbildua, J., **Garcés, A.,** Díaz, R., Lagos, R., Monasterio, O. "Essential regions of the 3D structure for the stability and function of FtsZ". *Annual meeting of Society of Biology of Chile. Biological Research*, v.38, N°2-3, p.R-86, October, 2005.

Arbildua, J., **Garcés, A.,** Montecinos, F., Katz, A., Díaz, R., Lagos, R., O. Monasterio. "Relationship between FtsZ structural flexibility and the conformational change induced by GTP/GDP". *Annual meeting of Society of Biochemistry and Molecular Biology of Chile*. p17, January, 2006.

Shin, J.Y., **Garcés, A.,** Lagos, R. y Monasterio, O. "Arginine 85 of EcFtsZ is essential for a correct cell division". XVIII Latino American *meeting of Microbiology, Acta Microbiológica*, 2006.

**Garcés, A.,** Shin, J.Y., Arbildua, J., Lagos, R. y Monasterio, O. "*In situ, in vitro* and *in silico* characterization of interaction between ZipA and FtsZ polymers". *Annual meeting of Society of Biology of Chile. Biological Research*, 2006.

Montecinos, F., **Garcés, A.,** Arbildua, J., Lagos, R. y Monasterio, O. "In vivo reconstitution of *E. coli* FtsZ function from its domains expressed separately". *Annual meeting of Society of Biology of Chile. Biological Research*, 2006.

Monasterio, O., Díaz, R., **Garcés, A.,** Arbildua, J., Montecinos, F., Brunet, J., Lagos, R. "Flexibility and folding of *Escherichia coli* FtsZ determined by sitedirected mutagenesis". *Annual meeting of Society of Biology of Chile. Biological Research*, 2006.

## REFERENCIAS

- Amadei, A., Linssen, A. B. and Berendsen, H. J. (1993). "Essential dynamics of proteins." *Proteins* **17**(4): 412-25.
- Andreu, J. M., Oliva, M. A. and Monasterio, O. (2002). "Reversible unfolding of FtsZ cell division proteins from archaea and bacteria. Comparison with eukaryotic tubulin folding and assembly." *J Biol Chem* **277**(45): 43262-70.
- Bertrand, S., Barthelemy, I., Oliva, M. A., Carrascosa, J. L., Andreu, J. M. and Valpuesta, J. M. (2005). "Folding, stability and polymerization properties of FtsZ chimeras with inserted tubulin loops involved in the interaction with the cytosolic chaperonin CCT and in microtubule formation." *J Mol Biol* **346**(1): 319-30.
- Bogan, A. A. and Thorn, K. S. (1998). "Anatomy of hot spots in protein interfaces." *J Mol Biol* **280**(1): 1-9.
- Bramhill, D. and Thompson, C. M. (1994). "GTP-dependent polymerization of *Escherichia coli* FtsZ protein to form tubules." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(13): 5813-7.
- Buey, R. M., Diaz, J. F. and Andreu, J. M. (2006). "The nucleotide switch of tubulin and microtubule assembly: a polymerization-driven structural change." *Biochemistry* **45**(19): 5933-8.
- Caplow, M. and Fee, L. (2002). "Dissociation of the tubulin dimer is extremely slow, thermodynamically very unfavorable, and reversible in the absence of an energy source." *Mol Biol Cell* **13**(6): 2120-31.
- Carettoni, D., Gomez-Puertas, P., Yim, L., Mingorance, J., Massidda, O., Vicente, M., Valencia, A., Domenici, E. and Anderluzzi, D. (2003). "Phage-display and correlated mutations identify an essential region of subdomain 1C involved in homodimerization of *Escherichia coli* FtsA." *Proteins* **50**(2): 192-206.
- Carter, P., Lesk, V. I., Islam, S. A. and Sternberg, M. J. (2005). "Protein-protein docking using 3D-Dock in rounds 3, 4, and 5 of CAPRI." *Proteins* **60**(2): 281-8.
- Clackson, T. and Wells, J. A. (1995). "A hot spot of binding energy in a hormone-receptor interface." *Science* **267**(5196): 383-6.

- Cordell, S. C., Robinson, E. J. and Lowe, J. (2003). "Crystal structure of the SOS cell division inhibitor SulA and in complex with FtsZ." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(13): 7889-94.
- DeLano, W. L. (2002). "Unraveling hot spots in binding interfaces: progress and challenges." *Curr Opin Struct Biol* **12**(1): 14-20.
- Diaz, J. F., Kralicek, A., Mingorance, J., Palacios, J. M., Vicente, M. and Andreu, J. M. (2001). "Activation of cell division protein FtsZ. Control of switch loop T3 conformation by the nucleotide gamma-phosphate." *J Biol Chem* **276**(20): 17307-15.
- Downing, K. H. and Nogales, E. (1999). "Crystallographic structure of tubulin: implications for dynamics and drug binding." *Cell Struct Funct* **24**(5): 269-75.
- Errington, J., Daniel, R. A. and Scheffers, D. J. (2003). "Cytokinesis in bacteria." *Microbiol Mol Biol Rev* **67**(1): 52-65, table of contents.
- Fiser, A., Do, R. K. and Sali, A. (2000). "Modeling of loops in protein structures." *Protein Sci* **9**(9): 1753-73.
- Freire, E. (1999). "The propagation of binding interactions to remote sites in proteins: analysis of the binding of the monoclonal antibody D1.3 to lysozyme." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(18): 10118-22.
- Halperin, I., Wolfson, H. and Nussinov, R. (2004). "Protein-protein interactions; coupling of structurally conserved residues and of hot spots across interfaces. Implications for docking." *Structure (Camb)* **12**(6): 1027-38.
- Henrick, K. and Thornton, J. M. (1998). "PQS: a protein quaternary structure file server." *Trends Biochem Sci* **23**(9): 358-61.
- Hilser, V. J., Dowdy, D., Oas, T. G. and Freire, E. (1998). "The structural distribution of cooperative interactions in proteins: analysis of the native state ensemble." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(17): 9903-8.
- Huecas, S. and Andreu, J. M. (2004). "Polymerization of nucleotide-free, GDP- and GTP-bound cell division protein FtsZ: GDP makes the difference." *FEBS Lett* **569**(1-3): 43-8.
- Huo, S., Massova, I. and Kollman, P. A. (2002). "Computational alanine scanning of the 1:1 human growth hormone-receptor complex." *J Comput Chem* **23**(1): 15-27.

- Ichiye, T. and Karplus, M. (1991). "Collective motions in proteins: a covariance analysis of atomic fluctuations in molecular dynamics and normal mode simulations." *Proteins* **11**(3): 205-17.
- Jones, S., Marin, A. and Thornton, J. M. (2000). "Protein domain interfaces: characterization and comparison with oligomeric protein interfaces." *Protein Eng* **13**(2): 77-82.
- Jones, S. and Thornton, J. M. (1996). "Principles of protein-protein interactions." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(1): 13-20.
- Karplus, M. and Ichiye, T. (1996). "Comment on a "fluctuation and cross correlation analysis of protein motions observed in nanosecond molecular dynamics simulations"." *J Mol Biol* **263**(2): 120-2.
- Koppelman, C. M., Aarsman, M. E., Postmus, J., Pas, E., Muijsers, A. O., Scheffers, D. J., Nanninga, N. and den Blaauwen, T. (2004). "R174 of Escherichia coli FtsZ is involved in membrane interaction and protofilament bundling, and is essential for cell division." *Mol Microbiol* **51**(3): 645-57.
- Kortemme, T. and Baker, D. (2002). "A simple physical model for binding energy hot spots in protein-protein complexes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(22): 14116-21.
- Kortemme, T., Kim, D. E. and Baker, D. (2004). "Computational alanine scanning of protein-protein interfaces." *Sci STKE* **2004**(219): pi2.
- Laskowski, R. A. (1995). "SURFNET: a program for visualizing molecular surfaces, cavities, and intermolecular interactions." *J Mol Graph* **13**(5): 323-30, 307-8.
- Leung, A. K., Lucile White, E., Ross, L. J., Reynolds, R. C., DeVito, J. A. and Borhani, D. W. (2004). "Structure of Mycobacterium tuberculosis FtsZ reveals unexpected, G protein-like conformational switches." *J Mol Biol* **342**(3): 953-70.
- Lichtarge, O. and Sowa, M. E. (2002). "Evolutionary predictions of binding surfaces and interactions." *Curr Opin Struct Biol* **12**(1): 21-7.
- Lichtarge, O., Yao, H., Kristensen, D. M., Madabushi, S. and Mihalek, I. (2003). "Accurate and scalable identification of functional sites by evolutionary tracing." *J Struct Funct Genomics* **4**(2-3): 159-66.
- Lowe, J. (1998). "Crystal structure determination of FtsZ from Methanococcus jannaschii." *J Struct Biol* **124**(2-3): 235-43.
- Lowe, J. and Amos, L. A. (1998). "Crystal structure of the bacterial cell-division protein FtsZ." *Nature* **391**(6663): 203-6.

- Lowe, J. and Amos, L. A. (1999). "Tubulin-like protofilaments in Ca<sup>2+</sup>-induced FtsZ sheets." *Embo J* **18**(9): 2364-71.
- Lowe, J. and Amos, L. A. (2000). "Helical tubes of FtsZ from *Methanococcus jannaschii*." *Biol Chem* **381**(9-10): 993-9.
- Lu, C., Reedy, M. and Erickson, H. P. (2000). "Straight and curved conformations of FtsZ are regulated by GTP hydrolysis." *J Bacteriol* **182**(1): 164-70.
- Lu, C., Stricker, J. and Erickson, H. P. (2001). "Site-specific mutations of FtsZ--effects on GTPase and in vitro assembly." *BMC Microbiol* **1**(1): 7.
- Ma, B., Elkayam, T., Wolfson, H. and Nussinov, R. (2003). "Protein-protein interactions: structurally conserved residues distinguish between binding sites and exposed protein surfaces." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(10): 5772-7.
- Margolin, W. (2005). "FtsZ and the division of prokaryotic cells and organelles." *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(11): 862-71.
- McDonald, I. K. and Thornton, J. M. (1994). "Satisfying hydrogen bonding potential in proteins." *J Mol Biol* **238**(5): 777-93.
- Miyagishima, S. Y., Nozaki, H., Nishida, K., Nishida, K., Matsuzaki, M. and Kuroiwa, T. (2004). "Two types of FtsZ proteins in mitochondria and red-lineage chloroplasts: the duplication of FtsZ is implicated in endosymbiosis." *J Mol Evol* **58**(3): 291-303.
- Mukherjee, A., Santra, M. K., Beuria, T. K. and Panda, D. (2005). "A natural osmolyte trimethylamine N-oxide promotes assembly and bundling of the bacterial cell division protein, FtsZ and counteracts the denaturing effects of urea." *Febs J* **272**(11): 2760-72.
- Nogales, E., Downing, K. H., Amos, L. A. and Lowe, J. (1998). "Tubulin and FtsZ form a distinct family of GTPases." *Nat Struct Biol* **5**(6): 451-8.
- Nogales, E. and Wang, H. W. (2006). "Structural mechanisms underlying nucleotide-dependent self-assembly of tubulin and its relatives." *Curr Opin Struct Biol* **16**(2): 221-9.
- Nooren, I. M. and Thornton, J. M. (2003). "Structural characterisation and functional significance of transient protein-protein interactions." *J Mol Biol* **325**(5): 991-1018.
- Oliva, M. A., Cordell, S. C. and Lowe, J. (2004). "Structural insights into FtsZ protofilament formation." *Nat Struct Mol Biol* **11**(12): 1243-50.

- Oliva, M. A., Huecas, S., Palacios, J. M., Martin-Benito, J., Valpuesta, J. M. and Andreu, J. M. (2003). "Assembly of archaeal cell division protein FtsZ and a GTPase-inactive mutant into double-stranded filaments." *J Biol Chem* **278**(35): 33562-70.
- Olmea, O. and Valencia, A. (1997). "Improving contact predictions by the combination of correlated mutations and other sources of sequence information." *Fold Des* **2**(3): S25-32.
- Pazos, F., Helmer-Citterich, M., Ausiello, G. and Valencia, A. (1997). "Correlated mutations contain information about protein-protein interaction." *J Mol Biol* **271**(4): 511-23.
- Pazos, F., Olmea, O. and Valencia, A. (1997). "A graphical interface for correlated mutations and other protein structure prediction methods." *Comput Appl Biosci* **13**(3): 319-21.
- Redick, S. D., Stricker, J., Briscoe, G. and Erickson, H. P. (2005). "Mutants of FtsZ targeting the protofilament interface: effects on cell division and GTPase activity." *J Bacteriol* **187**(8): 2727-36.
- Rivas, G., Lopez, A., Mingorance, J., Ferrandiz, 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. The primary steps for FtsZ assembly." *J Biol Chem* **275**(16): 11740-9.
- Rod, T. H., Radkiewicz, J. L. and Brooks, C. L., 3rd (2003). "Correlated motion and the effect of distal mutations in dihydrofolate reductase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(12): 6980-5.
- Romberg, L. and Levin, P. A. (2003). "Assembly dynamics of the bacterial cell division protein FTSZ: poised at the edge of stability." *Annu Rev Microbiol* **57**: 125-54.
- Sali, A., Potterton, L., Yuan, F., van Vlijmen, H. and Karplus, M. (1995). "Evaluation of comparative protein modeling by MODELLER." *Proteins* **23**(3): 318-26.
- Sanchez, R. and Sali, A. (1997). "Evaluation of comparative protein structure modeling by MODELLER-3." *Proteins Suppl* **1**: 50-8.
- Sanchez, R. and Sali, A. (1998). "Large-scale protein structure modeling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(23): 13597-602.

- Sanchez, S. A., Brunet, J. E., Jameson, D. M., Lagos, R. and Monasterio, O. (2004). "Tubulin equilibrium unfolding followed by time-resolved fluorescence and fluorescence correlation spectroscopy." *Protein Sci* **13**(1): 81-8.
- Schneider, R., de Daruvar, A. and Sander, C. (1997). "The HSSP database of protein structure-sequence alignments." *Nucleic Acids Res* **25**(1): 226-30.
- Shindyalov, I. N. and Bourne, P. E. (2001). "A database and tools for 3-D protein structure comparison and alignment using the Combinatorial Extension (CE) algorithm." *Nucleic Acids Res* **29**(1): 228-9.
- Sippl, M. J. (1993). "Recognition of errors in three-dimensional structures of proteins." *Proteins* **17**(4): 355-62.
- Thorn, K. S. and Bogan, A. A. (2001). "ASEdb: a database of alanine mutations and their effects on the free energy of binding in protein interactions." *Bioinformatics* **17**(3): 284-5.
- Van Der Spoel, D., Lindahl, E., Hess, B., Groenhof, G., Mark, A. E. and Berendsen, H. J. (2005). "GROMACS: fast, flexible, and free." *J Comput Chem* **26**(16): 1701-18.
- Vicente, M., Rico, A. I., Martinez-Arteaga, R. and Mingorance, J. (2006). "Septum enlightenment: assembly of bacterial division proteins." *J Bacteriol* **188**(1): 19-27.
- Yu, X. C. and Margolin, W. (1997). "Ca<sup>2+</sup>-mediated GTP-dependent dynamic assembly of bacterial cell division protein FtsZ into asters and polymer networks in vitro." *Embo J* **16**(17): 5455-63.
- Yuan, Z., Zhao, J. and Wang, Z. X. (2003). "Flexibility analysis of enzyme active sites by crystallographic temperature factors." *Protein Eng* **16**(2): 109-14.