

UCH-FC  
Biotecnología  
C 744  
C.1



UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE PREGRADO



**“TERMOESTABILIDAD DE LA ACTIVIDAD GTPÁSICA Y  
POLIMERIZACIÓN *IN VITRO* DE LA PROTEÍNA FTSZ DEL  
MESÓFILO *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.

**LUIS MIGUEL CONCHA MARAMBIO.**

Dr. Octavio Monasterio Opazo.  
Director de Seminario de Título:

Dra. Rosalba Lagos Mónaco.  
Co- Director de Seminario de Título

Noviembre de 2012  
Santiago - Chile



## INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el Sr.

### LUIS MIGUEL CONCHA MARAMBIO

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

*Dr. Octavio Monasterio.*  
**Director Seminario de Título**

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Octavio Monasterio', written over a horizontal line.

*Dra. Rosa Alba Lagos.*  
**Co-Directora**

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Rosa Lagos', written over a horizontal line.

**Comisión de Evaluación**

**Presidente (a) Comisión**

A handwritten signature in blue ink, written over a horizontal line.

**Evaluador**

A handwritten signature in blue ink, written over a horizontal line.

Santiago de Chile, Noviembre 2012



## **Autobiografía.**

Nací un 15 de septiembre de 1986 en la VI región de Chile. Realicé mi educación escolar en el Instituto Regional Federico Errázuriz, donde formé amistades que perduran hasta hoy, a pesar de la distancia y el tiempo. A los 17 años egresé del colegio e inicié mi vida en Santiago, ciudad a la que me mudé para estudiar Ingeniería en Biotecnología Molecular, gracias a la beca Juan Gómez Millas y al apoyo de mi familia. En este periodo conocí personas realmente admirables, tanto humana como profesionalmente y descubrí mi pasión por la ciencia y la naturaleza.

Los experimentos de esta memoria los realicé en el BEM, laboratorio que siempre he reconocido como mi "*alma máter*". Guardo especial aprecio por las personas de este laboratorio, pues gracias a su labor formativa pude realizar esta memoria de título de buena manera y gracias a ello encontrar la continuidad profesional que buscaba. En este momento vivo en Houston y trabajo en el departamento de neurología de la Universidad de Texas Health Science Center, donde formo parte de un laboratorio que estudia el mal plegamiento de proteínas endógenas como origen de enfermedades neurodegenerativas, tales como la enfermedad de Creutzfeldt–Jakob o Alzheimer.

**Dedicatoria.**

*A mi familia con cariño*

## **Agradecimientos.**

En primer lugar quiero agradecer a mis padres, Lucía y Luis, por el apoyo que me han brindado en todo momento y que ha permitido mi desarrollo personal y académico. Agradezco también a mi hermana Mariela por la paciencia y la labor docente durante mi infancia, así como la comprensión y crítica constructiva durante la adolescencia. A mi padrino y cuñado Marcelo, le agradezco la amistad y el consejo maduro y oportuno.

En segundo lugar quiero agradecer a mis abuelos Rosa y Miguel, de quienes aprendí el valor de la disciplina, humildad y austeridad. Punto aparte merece mi tía María quien me deslumbró con su astucia e inocencia infantil hasta el momento que nos dejó.

En tercer lugar quisiera agradecer al Dr. Octavio Monasterio y a la Dra. Rosa Alba Lagos por permitirme ingresar a su laboratorio y por tener la disponibilidad permanente de entregar consejo y soporte, ejerciendo de esta manera una amplia labor formativa. Del mismo modo agradezco a las personas del laboratorio que me recibieron con la mejor de las disposiciones, como Daniel Maturana, Marisol Espinoza, Cherie Andrade, Luis Pouchuq y Alexis Ordenes.

Especialmente agradezco a Felipe Montecinos por la amistad y la dedicada labor formativa, así como a César Díaz la ayuda, humor y amistad.

También agradezco a Don Pedro, a Macarena Collao y Roselin Orellana por la excelente labor que realizaron durante mi estadía en el BEM, además de la amabilidad y apoyo constante.

## Índice de Contenido.

<u>AUTOBIOGRAFÍA.</u>	<u>II</u>
<u>DEDICATORIA.</u>	<u>III</u>
<u>AGRADECIMIENTOS.</u>	<u>IV</u>
<u>LISTA DE TABLAS.</u>	<u>VI</u>
<u>LISTA DE FIGURAS.</u>	<u>VII</u>
<u>LISTA DE ABREVIATURAS.</u>	<u>VIII</u>
<u>RESUMEN.</u>	<u>1</u>
<u>INTRODUCCIÓN.</u>	<u>5</u>
<u>MATERIALES.</u>	<u>18</u>
<u>MÉTODOS.</u>	<u>19</u>
<u>RESULTADOS.</u>	<u>31</u>
<u>DISCUSION.</u>	<u>53</u>
<u>CONCLUSIONES.</u>	<u>61</u>
<u>BIBLIOGRAFÍA.</u>	<u>62</u>
<u>ANEXO.</u>	<u>67</u>

## **LISTA DE TABLAS.**

**Tabla 1.** Proteínas esenciales en la citoquinesis y su posible función.

**Tabla 2.** Lista de reactivos empleados con sus respectivos fabricantes.

**Tabla 3.** Protocolo para el tiempo de muestreo y la concentración de sustrato.

**Tabla 4.** Concentración crítica y constante catalítica determinada a partir de la actividad GTPásica en función de la temperatura.

**Tabla 5.** Parámetros del ajuste de la cinética de inactivación de FtsZ por la temperatura.

**Tabla 6.** Parámetros del ajuste de la inactivación de FtsZ a dos concentraciones de proteína.

**Tabla 7.** Constante cinética de despolimerización de los polímeros de EcFtsZ.

**Tabla 8.** Concentración crítica de FtsZ determinada a partir de la dependencia de la dispersión máxima de luz a 90° en función de la concentración de FtsZ.

## **LISTA DE FIGURAS.**

**Figura 1.** Determinación de la constante de Michaelis y Menten de la actividad GTPásica y la concentración crítica de polimerización de FtsZ a 30 °C

**Figura 2.** Determinación de velocidades iniciales ( $V_0$ ) de la actividad GTPásica de FtsZ a distintas temperaturas.

**Figura 3.** Concentración crítica y  $k_{cat}$  de la actividad GTPásica de FtsZ.

**Figura 4.** Gráfico de Arrhenius de la actividad GTPásica de FtsZ.

**Figura 5.** Gráfico de Eyring de la actividad GTPásica de FtsZ.

**Figura 6.** Inactivación de la actividad GTPásica de FtsZ por la temperatura.

**Figura 7.** Cinética de inactivación por temperatura de la actividad GTPásica de FtsZ.

**Figura 8.** Cinética normalizada de inactivación de la actividad GTPásica de FtsZ en ausencia de GTP.

**Figura 9.** Dependencia de la inactivación de la actividad GTPásica de FtsZ con la concentración de proteína.

**Figura 10.** Ajuste de los datos normalizados de la inactivación de FtsZ a dos concentraciones de proteína.

**Figura 11.** Curvas de polimerización-despolimerización de FtsZ a distintas temperaturas.

**Figura 12.** Gráfico de Arrhenius de la despolimerización de FtsZ.

**Figura 13.** Gráfico de Eyring de la despolimerización de FtsZ.

**Figura 14.** Visualización de filamentos de FtsZ por microscopía electrónica.

**Figura 15.** Distribución del ancho de los polímeros de FtsZ.

**Figura 16.** Curvas de concentración crítica de FtsZ determinadas por dispersión de luz en 90°.



## LISTA DE ABREVIATURAS.

<b>ADN</b>	: Acido desoxirribonucleico
<b>ATP</b>	: Adenosina trifosfato
<b>BLAST</b>	: Basic Local Alignment Search Tool
<b>C<sub>c</sub></b>	: Concentración crítica
<b><i>E. coli</i></b>	: <i>Escherichia coli</i>
<b>E<sub>a</sub></b>	: Energía de activación
<b>EDTA</b>	: Ácido etilendiaminotetraacético
<b>ELISA</b>	: Enzyme-linked immunosorbent assay
<b>ET</b>	: Estado de transición
<b>FRAP</b>	: Fluorescence Recovery After Photobleaching
<b>FtsZ</b>	: Filamentous temperature sensitive cepa Z
<b>g</b>	: Constante de aceleración gravitacional, equivalente a 9.8 m/s <sup>2</sup>
<b>GTP</b>	: Guanosina trifosfato
<b>GdmCl</b>	: Cloruro de guanidinio
<b>GDP</b>	: Guanosina difosfato
<b>IPTG</b>	: Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
<b>k<sub>cat</sub></b>	: Constante catalítica
<b>K<sub>d</sub></b>	: Constante de disociación
<b>k<sub>desp</sub></b>	: Constante cinética de despolimerización
<b>k<sub>in</sub></b>	: Constante cinética de inactivación
<b>K<sub>M</sub></b>	: Constante de Michaelis y Menten
<b>Kv</b>	: Kilovolts
<b>LB</b>	: Luria Bertani
<b><i>M. jannaschii</i></b>	: <i>Methanococcus jannaschii</i>
<b>mts</b>	: Membrane targeting secuencia
<b>OD<sub>600</sub></b>	: Densidad óptica a 600 nm
<b>PBP</b>	: Penicilin-binding proteins
<b>Pi</b>	: Fosfato inorgánico
<b>rpm</b>	: Revoluciones por minuto
<b>TET</b>	: Teoría del estado de transición
<b>YFP</b>	: Proteína fluorescente amarilla

## RESUMEN.

Filamentous temperature sensitive strain Z (FtsZ) es una proteína citosólica bacteriana que forma un anillo en la mitad longitudinal de la célula durante la división celular. Este anillo se ensambla junto a otras 10 proteínas en *Escherichia coli* y forma el divisoma bacteriano. FtsZ es el componente más importante del citoesqueleto bacteriano involucrado en la división celular y comparte actividades similares a tubulina, como la capacidad de polimerización reversible y la actividad GTPásica. El mecanismo de polimerización de FtsZ y la asociación con su actividad GTPásica son desconocidos, tanto *in vitro* como *in vivo*.

En esta memoria de título se realizó una descripción cuantitativa a distintas temperaturas de la cinética de despolimerización y actividad GTPásica de FtsZ de *Escherichia coli* (EcFtsZ) y se determinó la energía de activación ( $E_a$ ) de ambos procesos. Esta información se comparó con datos existentes de su homólogo termófilo FtsZ de *Methanococcus jannaschii* (MjFtsZ).

Al aumentar la temperatura las velocidades de reacción de despolimerización y de actividad GTPásica aumentan. EcFtsZ presenta un aumento exponencial esperado, mientras que MjFtsZ presenta una desviación de este comportamiento. Al determinar la energía de activación ( $E_a$ ) usando la ecuación de Arrhenius, se observó que la actividad GTPásica y la velocidad de despolimerización de EcFtsZ poseen una sola  $E_a$ , a diferencia de MjFtsZ que posee dos. Por lo tanto postulamos que esto se debe a la dependencia diferencial con la temperatura de algún paso del mecanismo de hidrólisis y despolimerización.

De acuerdo a lo anterior, los polímeros visualizados por microscopía electrónica que cada proteína forma son diferentes, incluso la tendencia de asociación lateral es

opuesta, a medida que la temperatura disminuye EcFtsZ forma polímeros más anchos y MjFtsZ más delgados.

Debido a que ambas proteínas comparten una alta similitud en la secuencia y poseen un rol estructural conservado, es de esperar que la conformación de ambas proteínas sea similar. Proponemos que las diferencias observadas en las actividades *in vitro* de estas proteínas se deben a que poseen diferente flexibilidad y estabilidad, causadas por la pequeña diferencia entre sus secuencias, como la mayor presencia de glicinas en EcFtsZ proveyendo una mayor flexibilidad estructural y la mayor presencia de lisinas en MjFtsZ, residuo que puede formar puentes salinos y estabilizar interacciones laterales a altas temperaturas.

## Abstract

FtsZ (Filamentous temperature sensitive strain Z) is a cytosolic bacterial protein which polymerizes to form a ring structure at the midpoint of the rod shape cell, perpendicular to the longitudinal axis during cell division. This ring recruits at least other 10 proteins in *Escherichia coli* to form the called *divisome*.

FtsZ, the most important bacterial cytoskeletal component involved in cell division, has similar features to tubulin, like reversible polymerization and GTPase activity. However, the FtsZ mechanisms of polymerization and GTPase activity are unknown *in vitro* and *in vivo*.

Here, we show a quantitative kinetic description of *Escherichia coli* FtsZ (EcFtsZ) disassembly and GTPase activity at different temperatures. Using Arrhenius plot analysis we determined the activation energies ( $E_a$ ) of both processes. This data was compared with similar existent information of its thermophile homologous *Methanococcus jannaschii* FtsZ (MjFtsZ).

Disassembly and GTPase activity rates increases at higher temperatures. EcFtsZ show an ideal exponential behavior, although MjFtsZ show a deviation. Using Arrhenius equation we obtained only one  $E_a$  for both EcFtsZ polymer disassembly and GTPase activity, instead of two were found for MjFtsZ within the physiological temperature range analyzed. We propose that this dissimilarity is due to the different temperature dependence of a single step in the disassembly mechanism and the GTPase activity. Accordingly, the polymer morphology of both proteins viewed by electronic microscopy was different, actually was the opposite. MjFtsZ forms wider filaments due to lateral association at higher temperatures and EcFtsZ does it at lower temperatures.

Due to the sequence similarity and the conserved structural role of both proteins, it is possible to predict that their structural conformation is very similar. Therefore, the observed behavior differences respect to the temperature in the *in vitro* experiments could be explained by the different flexibility and thermal stability of both proteins. This is given by the small sequence differences, like the presence of a higher glycine number in EcFtsZ, responsible of a more flexible structure, and the presence of higher lysine number in MjFtsZ, which are able to form salt bridges that stabilize lateral interactions at higher temperatures.

## INTRODUCCIÓN.

**División celular en *Escherichia coli*.** *Escherichia coli* es el modelo de estudio por excelencia de las bacterias gram negativas. Es un bacilo que posee dos membranas celulares con un espacio entre ellas denominado periplasma, donde se ubica una capa de peptidoglicano que constituye la pared celular.

Durante la división celular o citoquinesis ocurre una invaginación de las membranas en la mitad longitudinal de la bacteria, provocando una septación en la sección transversal que genera dos células hijas independientes. En *E. coli* este proceso (así como la replicación del DNA) está correlacionado con el alcance de una masa celular específica, denominada masa de iniciación de la división (Donachie, 1968) y es llevado a cabo por una maquinaria macromolecular multiprotéica denominada divisoma, cuyos componentes se ensamblan en una jerarquía determinada en el sitio de división (Aarsman y cols, 2005).

Según Errington (Errington y cols, 2003) en la división celular de procariontes se pueden identificar 4 etapas. La primera es la selección del lugar de septación mediante la oclusión del nucleoide y el sistema Min. La oclusión del nucleoide es un mecanismo que inhibe la división celular en las vecindades del nucleoide, según se ha visto en experimentos donde se ha interrumpido la replicación del DNA o su segregación. En una célula en división, cuyo cromosoma ya ha sido replicado y segregado, hay 3 sitios carentes de DNA o con menor concentración efectiva de éste, la mitad longitudinal (entre ambos nucleoides) y los polos (Errington y cols, 2003). Este mecanismo ofrece no solo una regulación espacial, sino que también temporal, puesto que sólo cuando ocurrió la replicación y segregación del cromosoma el centro

longitudinal de la célula presenta una menor concentración de DNA y se permite el inicio de la división celular.

El sistema Min (llamado así por el fenotipo mini-células que presentan las mutantes de los genes *min*) cumple la función de evitar la citoquinesis en los polos celulares y consta de 3 proteínas; MinC, MinD y MinE. MinD es una ATPasa de membrana que secuestra a MinC en la membrana y juntos inhiben el ensamble del divisoma, mientras que MinE provee especificidad espacial al evitar que el complejo inhibitor Min actúe en la mitad longitudinal de la bacteria (Bramkamp y van Baarle, 2009).

En segundo lugar ocurre el ensamblaje de un protoanillo en la mitad longitudinal de la bacteria por la cara citoplasmática de la membrana celular interna. Este protoanillo está formado por las proteínas FtsZ, FtsA (filamentous temperature sensitive cepa Z y A, respectivamente) y ZipA (FtsZ interacting protein A). El acrónimo Fts se acuñó ya que mediante el aislamiento de bacterias mutantes sensibles a la temperatura, que forman largos filamentos con nucleoides separados regularmente a temperatura no permisiva, se ha podido identificar una serie de genes que actúan en la división celular, como *ftsZ*, *ftsA*, *ftsL*, *ftsI*, *ftsQ*, *ftsW*, *ftsK* y *ftsN* (Lutkenhaus y Addinall, 1997). En la tercera etapa ocurre un acoplamiento entre elementos del protoanillo y proteínas de membrana, proporcionándole unión a la membrana celular y potencialmente a otras capas celulares (Errington y cols., 2003). Finalmente se unen al complejo proteínas con dominios extracelulares, particularmente PBPs (Penicillin-binding proteins) que participan en la síntesis de pared celular y se produce la contracción del denominado anillo Z, generando la separación de las células hijas (Errington y cols., 2003).

En *E. coli* hay 10 proteínas esenciales involucradas en el proceso de citoquinesis. Si alguna está ausente hay elongación celular, replicación y segregación del DNA pero no división celular (González y cols., 2010). El reclutamiento de estas proteínas esenciales al protoanillo sigue una jerarquía bien definida, cuyo orden es FtsZ > [FtsA, ZipA] > FtsK > FtsQ > (FtsB, FtsL) > FtsI > FtsN, donde las proteínas entre corchetes tienen un reclutamiento independiente entre sí, pero dependiente de FtsZ y aquellas entre paréntesis se ensamblan simultáneamente (Vicente y cols., 2006). En la tabla 1 se indican los principales componentes del divisoma y sus posibles funciones.

**FtsZ, la proteína clave de la división celular.** FtsZ es probablemente el componente más importante de la maquinaria de división por varias razones; (i) es el gen más conservado y ampliamente distribuido, incluyendo prácticamente todas las eubacterias, arqueas e incluso organelos eucariontes (Margolin, 2000); (ii) está a la cabeza en la jerarquía de ensamble del divisoma, ya que casi todas las posteriores requieren de su presencia para integrarse a la maquinaria de división (Vicente y cols., 2006); (iii) mutaciones que afectan la forma del anillo Z generan una morfología anormal en la célula (Addinall y Lutkenhaus, 1996); (iv) también es un punto clave en la regulación de la citoquinesis, puesto que no solo es inhibido por la oclusión del nucleoide o el sistema Min, sino que también por el sistema SOS de reparación del DNA a través de SulA (Lutkenhaus y Addinall, 1997). En este sistema, la proteína RecA detecta la presencia de DNA simple hebra (producto de horquillas en el DNA o detención de la polimerasa) y remueve al represor LexA del operador de los genes de respuesta SOS, entre los que se encuentra *sulA*. De esta manera se permite la transcripción y expresión de SulA que interactúa directamente con FtsZ evitando que forme el anillo Z en la mitad



longitudinal de la célula y detiene la división celular (Dajkovic y cols., 2008) y (v) los niveles citoplasmáticos de FtsZ regulan la frecuencia de la división celular (Bi y Lutkenhaus, 1990).

**Tabla 1.** Proteínas esenciales en la citoquinesis y su posible función.

Proteína	Posible función
<b>FtsZ</b>	Tiene un dominio Rossman de unión a GTP similar al de tubulina y posee actividad GTPásica. Polimeriza en forma de filamentos y fue el primer elemento de citoesqueleto bacteriano descrito (Löwe y cols., 2004).
<b>FtsA</b>	Pertenece a la familia de las actinas, tiene actividad ATPasa (Weinstein, 2009), se une a la región carboxilo terminal de FtsZ y junto a FtsZ son las únicas que no tienen zona de anclaje a membrana. Sería modulador del ensamble de otras proteínas (Pichoff y Lutkenhaus, 2002)
<b>ZipA</b>	Se ha visto que ZipA tiene una función similar a la de FtsA, dado que mutantes de ganancia de función de FtsA hacen innecesaria la participación de ZipA en el divisoma. Incluso se une a la misma región de FtsZ que FtsA. (Löwe y cols., 2004)
<b>FtsK</b>	Es una gran proteína multifuncional, su región amino terminal es esencial para la división y el dominio carboxilo es una translocasa de DNA dependiente de ATP, que actúa en la segregación de cromosomas y resolución del dímero de cromosomas (Vicente y cols., 2006)
<b>FtsB, L y Q</b>	Forman un subcomplejo bitópico que sería el puente entre las proteínas predominantemente citoplasmáticas con las predominantemente periplasmáticas. FtsQ tiene un dominio POTRA ( <u>p</u> olypeptide <u>t</u> ransport-associated, asociado a función chaperona) y estabilizaría la mayor parte de las interacciones entre proteínas (González y cols., 2010).
<b>FtsI</b>	Es una PBP3 ( <u>p</u> enicillin- <u>b</u> inding <u>p</u> roteína <u>c</u> lass <u>3</u> ) con actividad transpeptidasa y está involucrada en la síntesis de peptidoglicano. (Vicente y cols., 2006)
<b>FtsN</b>	Es la última proteína que se integra al divisoma, que no es totalmente estable hasta el ensamble de FtsN. (Mingorance y cols., 2010). Tiene un sitio de unión a peptidoglicano (Vicente y cols., 2006).

FtsZ se ubica en el borde citoplasmático de la invaginación de las membranas y es la proteína que forma el denominado anillo Z. Antes de la división celular FtsZ permanece en el citoplasma, luego se ensambla en la mitad longitudinal de la célula, forma el anillo Z y permanece en este anillo que se constriñe para luego distribuirse nuevamente en el citoplasma una vez terminada la citoquinesis (Bi y Lutkenhaus, 1991). Sin embargo, se han reportado evidencias que indican que el anillo se forma tempranamente en el ciclo celular, incluso el ensamble podría comenzar en las células hijas una vez terminada la citoquinesis (Erickson y cols., 2010).

El anillo Z es una estructura dinámica, de hecho durante la esporulación de *B. subtilis* se ha reportado que el anillo migra desde el centro hacia los polos, donde se observa una forma helicoidal del anillo (Vicente y cols., 2006), una dinámica que es similar al movimiento del sistema Min. En *E. coli* también se ha observado esta dinámica y se ha propuesto que esta formación de hélices colapsa en el centro longitudinal de la célula y forma el anillo Z (Erickson y cols., 2010). Se ha propuesto también que el anillo Z sería una estructura continua, mientras que las hélices estarían formadas por oligómeros (Mingorance y cols., 2010).

**FtsZ como origen de la fuerza de constricción.** FtsZ tiene actividad GTPásica y polimeriza dependientemente de GTP, características por las cuales es considerado como el principal componente del citoesqueleto procarionte y actor central en la transformación de energía química en energía mecánica para producir la constricción de las membranas celulares (Erickson y cols., 2010). Concordantemente con esta idea, algunas arqueas y bacterias que no tienen pared celular, poseen FtsZ y carecen del resto de la maquinaria del divisoma de *E. coli* (Erickson, 2009). Se ha descrito también que en bacterias que carecen de las proteínas mureina hidrolasas, la división celular

ocurre en ausencia de síntesis de peptidoglicano, indicando a su vez que la fuerza motriz necesaria para lograr la constricción proviene de un mecanismo citoplasmático (Mingorance y cols., 2010)

En el trabajo de Osawa (Osawa y cols., 2008) se construyó una mutante de FtsZ, denominada FtsZ-*mts*, a la cual se le removió la secuencia de unión a FtsA o ZipA y se agregó la secuencia de YFP-Venus y una hélice anfipática de MinD que interactúa con la membrana de *E. coli*. Esta proteína quimera se purificó y se agregó al interior de liposomas gigantes. En el interior de los liposomas FtsZ-*mts* formó anillos y al agregar GTP se pudo apreciar constricción de las paredes multilamelares del liposoma. Recientemente el mismo grupo (Osawa y cols., 2011) describió que el ensamblaje de anillos de *mts*-FtsZ (ahora las secuencias de YFP y la hélice anfipática están en la parte amino de la proteína) en la superficie externa de liposomas es capaz de "constreñir" el liposoma en presencia de GTP. Sin embargo las bases moleculares del origen de la fuerza mecánica son aún desconocidas.

**Propiedades bioquímicas de FtsZ.** Los residuos 105-111 de FtsZ [GGGTGTG] tienen una alta identidad de secuencia con la secuencia firma de las tubulinas, que es una región rica en glicinas [G/AGGTGSG] presente en  $\alpha$  y  $\beta$  tubulina, así como con los residuos 140-148 de  $\gamma$  tubulina, que forman parte de la región de unión a nucleótido (RayChaudhuri y Park, 1992). Hay también una alta similitud de estructura entre FtsZ y tubulina, pues ambas tienen 2 dominios formados por una hoja beta rodeada por hélices, unidos por una hélice central denominada H7 (Nogales y cols., 1998; Löwe y cols., 2004). Sin embargo difieren en la estructura del extremo C-terminal, donde FtsZ carece de 2 largas hélices  $\alpha$  presentes en tubulina. Por lo tanto se pensó que FtsZ podría tener funciones similares a tubulina y ser el componente principal del

citoesqueleto bacteriano involucrado en la citoquinesis, por lo que se analizó la actividad GTPásica y la capacidad de polimerización *in vitro* (RayChaudhuri y Park, 1992; Bramhill y Thompson, 1994).

FtsZ une de forma selectiva GTP y GDP (unión saturable a 40 y 80  $\mu\text{M}$  a 37 °C, respectivamente) consistente con una cinética de un sitio de unión con  $K_d$  de 3,7 y 7,7  $\mu\text{M}$  para GTP y GDP, respectivamente (Mukherjee y cols., 1993). FtsZ hidroliza GTP en presencia de magnesio, el cual no es necesario para la unión del nucleótido (RayChaudhuri y Park, 1992; Mukherjee y cols., 1993). La actividad GTPásica de FtsZ de *Escherichia coli* (EcFtsZ) presenta una  $K_M$  de 46  $\mu\text{M}$  y una  $k_{cat}$  de 0,78  $\text{min}^{-1}$  a 30 °C y pH 6,5 (Nova y cols., 2007). A pH 7,5, mayor fuerza iónica y a temperatura ambiente se ha reportado una  $K_M$  de 39,5  $\mu\text{M}$  (Chung y col. 2007) y de 82  $\mu\text{M}$  a 37 °C (Sossong y col. 1999).

La actividad GTPásica es dependiente de la concentración de proteína, pues presenta una concentración crítica ( $C_c$ ,  $\mu\text{M}$ ) bajo la cual no hay hidrolisis de nucleótido (Scheffers y cols., 2002). Los valores típicos de  $C_c$  de la actividad GTPásica están en torno a 1  $\mu\text{M}$ , dependiendo de las condiciones *in vitro* utilizadas. Así lo confirma uno de los reportes más recientes de concentración crítica  $1,2 \pm 0,1 \mu\text{M}$  (Jaiswal y cols., 2011).

El sitio activo para la actividad GTPásica no se encuentra presente en el monómero de FtsZ, si no que se forma en la interfase de interacción del dímero de FtsZ, donde los residuos aspartato 209 y 212 pertenecientes al loop T7, juegan un rol fundamental en la catálisis (Scheffers y cols., 2002), así como asparagina 207 (Erickson y cols., 2010).

Actualmente se sabe que FtsZ polimeriza *in vitro* en presencia de GTP formando filamentos simples, dobles, sabanas, ovillos o túbulos según las condiciones experimentales empleadas (Lu y cols., 2000; Popp y cols., 2010). A pesar de esto, es

ampliamente aceptado que el polímero base de FtsZ es el protofilamento (filamento único) y tiene un tamaño relativamente corto, de 50 a 150 subunidades de largo (Mingorance y cols., 2010).

La polimerización (al igual que la actividad GTPásica) es dependiente de la concentración de proteína, evidenciando también una  $C_c$  bajo la cual no hay ensamble de polímeros. La  $C_c$  de la polimerización de FtsZ varía entre 0,88 a 2,5  $\mu\text{M}$  (Huecas y cols., 2008; Mukherjee y Lutkenhaus, 1999), dependiendo de las condiciones *in vitro* utilizadas y la metodología de medición, que generalmente corresponden a sedimentación y dispersión de luz.

Debido a la hidrólisis de GTP, éste deja de estar disponible y provoca el desensamble de los filamentos. Debido a este equilibrio dependiente de GTP entre los estados polimerizado y despolimerizado, el ensamble de FtsZ se denomina reversible. Actualmente hay varias evidencias que sugieren que el intercambio de GTP por GDP ocurre en los monómeros libres en solución, durante el recambio de las subunidades del polímero y no en las subunidades interiores del filamento (Chen y Erickson, 2009; Mingorance y cols., 2010).

Por otro lado se ha demostrado que la actividad GTPásica y la capacidad de polimerización están desacopladas, ya que FtsZ polimeriza al reemplazar GTP por análogos no hidrolizables de GTP o al quelar el magnesio de la solución agregando EDTA (Lu y cols., 2000). Incluso se ha visto formación de polímeros inducidos con GDP estabilizados por la resina policatiónica DEAE-dextrano (Mukherjee y Lutkenhaus, 1994). Sin embargo se ha observado una disminución del recambio de subunidades *in vivo* en células que poseen FtsZ mutantes sin actividad GTPásica (Stricker y cols., 2002), así como una disminución en la capacidad de constricción en liposomas (Osawa y Erickson, 2011)



**Mecanismo de polimerización.** Tubulina se cristalizó en estado polimerizado y se observa un desplazamiento del loop T7 que se inserta en el bolsillo de unión a nucleótido de la subunidad siguiente en el filamento y activaría la hidrólisis de GTP (Nogales y cols., 1998). Dado que la estructura monomérica de FtsZ es superponible a la de tubulina y a que presenta un loop homólogo al loop T7, se piensa que tienen un mecanismo de polimerización y activación de la actividad GTPásica similar (Löwe y cols., 2004). Sin embargo, la falta de información estructural a resolución atómica no ha permitido conocer cómo se ensamblan los polímeros y cómo el loop T7 permite la actividad GTPásica.

Existen varios modelos de polimerización de FtsZ, debido a que presenta un comportamiento bastante particular. La presencia de una  $C_c$  y una débil nucleación de dímeros son características encontradas en varios elementos de citoesqueleto que polimerizan como filamentos dobles o con forma helicoidal, sin embargo FtsZ forma filamentos de una subunidad de ancho. Por lo tanto, genera o pierde una interacción por subunidad que ingresa o sale del filamento, respectivamente (Erickson, 2009). En estas condiciones la polimerización de FtsZ debería seguir un mecanismo isodésmico, en el que la energía de formación de un dímero o la adición de un monómero a un filamento de  $n$  subunidades es la misma, sin fase de nucleación o concentración crítica como en polímeros helicoidales (Oosawa y Asakura, 1975).

Un modelo teórico que explica la concentración crítica y la fase de nucleación dimérica ha sido propuesto (Huecas y cols., 2008; Miraldi y cols., 2008) y coincide con los postulados de cooperatividad propuestos por Oosawa y Asakura. La idea central es que FtsZ tiene una conformación de baja afinidad en estado monomérico y una de alta afinidad cuando está en estado oligomérico. La interacción de la superficie de 2

monómeros generaría un cambio conformacional generalizado en la proteína, de modo que también cambiaría la superficie contraria a la interacción de la subunidad, es decir, el lado opuesto a la interacción. Si bien, este modelo explica la concentración crítica y fase de nucleación dimerica, experimentalmente no se han encontrado indicios decisivos de cambios conformacionales, incluso el estado monomérico y polimerizado de FtsZ son casi iguales (Huecas y cols., 2008). Se han encontrado mediante estudios bioinformáticos ciertos movimientos que indicarían una cierta flexibilidad de subdominios de FtsZ (Martín-Galiano y cols., 2010), pero en los cristales de FtsZ de distintos organismos y en presencia de distintos nucleótidos, siempre se observa la misma estructura 3D (Oliva y cols., 2007).

La polimerización *in vivo* es un tema aun más interesante, puesto que experimentos *in vitro* indican que la fuerza de constricción es generada en su mayoría o totalidad por el anillo Z (Osawa y cols., 2008). Actualmente se proponen 2 mecanismos principales de generación de fuerza, comentados por Erickson y Löwe (Erickson, 2009; Oliva y cols., 2007). El primero indica que filamentos cortos de FtsZ superponen sus extremos y forman el anillo Z, de modo que la constricción se produciría al deslizarse un filamento sobre el otro, al generar interacciones laterales favorables entre filamentos. La otra teoría, se basa en la curvatura de 22° que muestran los filamentos en estado GDP versus el filamento recto observado en estado GTP, de modo que el paso de recto a curvo al hidrolizar el nucleótido, generaría la fuerza necesaria para la invaginación de la membrana, que continuaría con la producción de peptidoglicano.

La estructura de los filamentos del anillo Z en la célula es aún desconocida, pues puede ser una estructura continua o un conjunto de oligómeros superpuestos. Se sabe que sólo alrededor del 30% de FtsZ forma parte del anillo Z y que el número de

monómeros en el citoplasma varía entre 3200 y 15000 según el autor y la cepa bacteriana utilizada (Löwe y cols., 2004), una cantidad suficiente para recorrer varias la circunferencia transversal interna de la célula.

El intercambio de las subunidades monoméricas en el citoplasma con el anillo Z es algo que también se ha medido *in vivo* y es un punto importante a la hora de proponer un mecanismo de polimerización. Mediante FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) se estudió el intercambio de subunidades de FtsZ entre el anillo Z y el citoplasma, obteniendo un tiempo de recuperación de la mitad de la intensidad de fluorescencia de 31,7 s a 30 °C (Stricker y cols., 2002), indicando que el intercambio es bastante rápido y el anillo es una estructura altamente dinámica.

**FtsZ de *Methanococcus jannaschii*.** *Methanococcus jannaschii* (cuyo nombre sistemático es *Methanocaldococcus jannaschii*) es una arquea que fue recolectada en 1983 desde una fumarola submarina a 2600 metros de profundidad en el este del océano pacífico, que alcanza temperaturas máximas de 380 °C y altas concentraciones de H<sub>2</sub>S (Jones y cols. 1983).

Las condiciones ambientales extremas a la cuales se adaptó *M. jannaschii* son bastante diferentes al ambiente de los hospederos homeotermos usados por *E. coli*. Sin embargo, las secuencias de FtsZ de ambos organismos tienen una identidad de 47 % y similitud de 68 %, según se determinó mediante la herramienta de alineamiento de secuencias de NCBI (BLAST). La estructura cristalina de FtsZ de *Methanococcus jannaschii* (MjFtsZ) se resolvió por cristalografía de rayos X a una resolución de 2,8 Å (Löwe y Amos, 1998) y debería ser parecida a la estructura de FtsZ de *E. coli* (EcFtsZ), a pesar de pertenecer a 2 dominios de la vida distintos.



Las diferencias en la secuencia de ambas proteínas deberían dar cuenta de las distintas adaptaciones térmicas que sufrieron ambas proteínas y por lo tanto en un sistema *in vitro* deberían evidenciar diferencias en su actividad y estabilidad, a menos que las arqueas termófilas desarrollaran algún mecanismo estabilizador de proteínas a altas temperaturas.

MjFtsZ y EcFtsZ se han comparado a nivel de estabilidad de estructura secundaria frente a agentes caotrópicos (cloruro de guanidinio, GdmCl), como apoproteína y con nucleótido (Andreu y cols., 2002). En aquel estudio se muestra como MjFtsZ es más estable que su par mesófila en un rango de temperaturas y que ambas proteínas *in vitro* tienen estabilidades óptimas muy por debajo de la temperatura óptima de crecimiento del microorganismo del cual provienen. En el trabajo de Andreu y cols., también observaron algo muy interesante y es que MjFtsZ no se ve estabilizada al unir nucleótido, mientras que EcFtsZ sí lo hace.

En el laboratorio de Biología Estructural y Molecular (BEM), se realizó una caracterización cinética de MjFtsZ, donde se calculó la velocidad inicial, la energía de activación y los parámetros termodinámicos del ET de las reacciones de hidrólisis de GTP y despolimerización (Maldonado, 2011). La presencia de 2 pendientes (comportamiento bifásico) en el gráfico de Arrhenius indicó la presencia de 2 pasos limitantes de la reacción según la temperatura, cada uno con una  $E_a$  (ver anexo). Esta es una característica vista previamente en otras proteínas hipertermófilas.

Los datos existentes en laboratorio BEM respecto a la cinética de despolimerización y actividad GTPásica de MjFtsZ a distintas temperaturas y las diferencias encontradas en la estabilidad frente a agentes caotrópicos entre MjFtsZ y EcFtsZ, nos hacen pensar que EcFtsZ puede tener un comportamiento diferente a MjFtsZ en cuanto a cinética de despolimerización y actividad GTPásica a distintas

temperaturas. De haber diferencias, deberían estar de acuerdo a las características evolutivas adquiridas por los microorganismos de los cuales se provienen, es decir, MjFtsZ presentando mayor actividad a altas temperaturas y EcFtsZ a menores. Por lo tanto el comportamiento cinético bifásico de la actividad GTPásica y despolimerización de MjFtsZ se debería a que proviene de un organismo hipertermófilo y no es un comportamiento intrínseco de las FtsZ en general. De esta manera se hace necesario determinar las energías de activación de la actividad GTPásica y despolimerización de EcFtsZ. Por lo tanto se propone la siguiente hipótesis:

### **Hipótesis**

"Los filamentos de EcFtsZ tiene una estabilidad cinética (manifestada en energía de activación) distinta a la de MjFtsZ"

### **Objetivo General:**

Determinar la termoestabilidad cinética de los polímeros de EcFtsZ en cuanto a su actividad GTPásica y despolimerización.

### **Objetivos Específicos:**

1. Determinar la velocidad y energía de activación de la despolimerización, además de la concentración crítica de la polimerización y la morfología de los filamentos a distintas temperaturas.
2. Determinar energía de activación de la actividad GTPásica, así como la velocidad máxima y concentración crítica a distintas temperaturas.
3. Calcular los parámetros termodinámicos de activación de la hidrólisis de GTP y despolimerización.

## MATERIALES.

Todas las soluciones se prepararon con agua nanopura (resistividad de 18,2  $\mu\Omega/\text{cm}^2$ ). Los reactivos usados y sus fabricantes se indican en la tabla 2.

**Tabla 2.** Lista de reactivos empleados con sus respectivos fabricantes.

Reactivo	Fabricante
Amonio heptamolibdato tetrahidro ( $\text{MnNH}_4$ )	
Cloruro de potasio (KCl)	
Cloruro de sodio (NaCl)	Merck
Cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ )	
Sulfato de amonio ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ )	
Oxalato de verde malaquita	
Guanosina 5'-trifostato (GTP)	
L-Glutamato de potasio	Sigma
Cloruro de magnesio ( $\text{MgCl}_2$ )	
Tween 20	
Cloruro de guanidinio	Winkler
Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)	
Glicerol	
Ácido piperazina-N,N'-bis(2-etanosulfónico) (PIPES)	
Ampicilina	US Biological
Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG)	
Tris(hidroximetil)aminometano (Tris)	
Acido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES)	Phyto Technology Laboratories
Coctel inhibidor de proteasas sin EDTA	Roche

## MÉTODOS.

**Purificación de FtsZ.** Se purificó FtsZ desde *Escherichia coli* BL21(DE3) transformadas con el vector PMFV57, que provee un sistema de transcripción inducible por IPTG del gen *ftsZ*. La purificación de FtsZ consiste básicamente en ciclos de polimerización-despolimerización gracias a la cual se obtiene proteína funcional con una pureza estimada de 91%.

A partir de una colonia bacteriana transformada con PMFV57 resistente a ampicilina (0,1 mg/mL) y que sobreexpresó la proteína FtsZ en presencia de IPTG (analizado por ensayos de sobreexpresión previos), se creció un pre-inóculo de 5 mL a 37 °C con agitación orbital. De éste, se agregó 1 mL a un litro de medio de cultivo Luria Bertani fresco (LB; 1L se compone de 10 gr. de Triptona, 5 gr. de extracto de levadura, 10 gr de NaCl y se ajustó a pH 7,5 con NaOH 10N), se incubó a 150 rpm y 37 °C hasta que el cultivo alcanzó una  $DO_{600}$  de 0,7 unidades de absorbancia y se suplementó con IPTG 0,3 mM. Se permitió el crecimiento del cultivo bacteriano durante 4 horas en agitación a 150 rpm y 37 °C. Se centrifugó el cultivo durante 40 minutos a 2000 x g y se eliminó el sobrenadante, el sedimento bacteriano se suspendió en 20 mL de amortiguador TEN (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM y NaCl 0,1 M) y se centrifugó a 3800 x g durante 30 min. Se realizaron 3 lavados como el ya mencionado para eliminar el medio LB restante y el sedimento bacteriano resultante se guardó a -80 °C hasta el día siguiente. Las bacterias sedimentadas se descongelaron y suspendieron en 20 mL de amortiguador A frío (Tris-Cl 50 mM pH 8, KCl 50 mM, EDTA 1 mM y glicerol 10%), se agregó una pastilla de coctel inhibidor de proteasas (Roche) y la solución se mantuvo 15 minutos a 4 °C. Luego se efectuaron 6 ciclos de sonicación de 20 segundos a 6 Watts con un minuto de intermedio y se ultracentrifugó durante 90

minutos a 4 °C y 100000 x g para precipitar restos celulares membranosos y ribosomas. Se extrajo el sobrenadante y se agregó sulfato de amonio a saturación, solución que se mantuvo en agitación durante 90 minutos y se centrifugó a 5600 x g y 4 °C durante 30 minutos. El sobrenadante resultante se eliminó rápidamente y el sedimento se disolvió en 5 mL de amortiguador A. La solución obtenida se dializó contra un volumen de 2 L de amortiguador A durante toda la noche con agitación a 4 °C para dializar restos de sulfato de amonio. Al día siguiente se centrifugó a 4 °C a 5600 x g durante 30 minutos para eliminar posibles agregados de proteína. El sobrenadante se sometió a 6 ciclos de polimerización-despolimerización. El ciclo comienza al agregar el sobrenadante (5 mL aproximadamente) a 15 mL de una solución que contiene: PIPES 50 mM pH 6,5, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, glutamato 1 M y GTP 2 mM. Esta mezcla de reacción se incubó a 37 °C durante 30 minutos, donde se formó una solución tipo gel altamente viscosa producto de la polimerización. Posteriormente se centrifugó a 5000 x g y 25 °C durante 30 minutos. El sobrenadante se descartó, mientras que el sedimento se disolvió en 5 mL de amortiguador A frío (despolimerización) y se centrifugó a 5000 x g durante 30 minutos para eliminar agregados de proteína que no despolimerizaron (proteína no funcional). Finalizados los 6 ciclos, la proteína resultante se dializó extensivamente 2 veces contra una solución de amortiguador A y la muestra se guardó a -80 °C en alícuotas de 100 µL.

**Cuantificación de FtsZ.** La cuantificación de la proteína se hizo midiendo la absorbancia a 254 y 280 nanómetros, longitudes de onda a las que absorbe el GDP y los aminoácidos aromáticos de la proteína, respectivamente. Las muestras se midieron en triplicado a una dilución 1:20. Se usaron los coeficientes de extinción molar ( $\epsilon$ ) reportados para GDP a 280 y 254 nm cuyos valores son  $8100 \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  y  $13600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ,

respectivamente. Para FtsZ los coeficientes de extinción molar a 280 y 254 nm son 3840 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> y 2750 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>, respectivamente. Dado que la absorbancia de una solución a cierta longitud de onda es la suma de las absorbancias individuales de sus componentes y que la absorbancia se define como el producto de la concentración, el paso óptico y  $\epsilon$ , podemos definir la absorbancia como una combinación lineal:

$$A_{280} = \epsilon_{280}^{GDP} \cdot C_{GDP} + \epsilon_{280}^{FtsZ} \cdot C_{FtsZ} \quad [1]$$

$$A_{254} = \epsilon_{254}^{GDP} \cdot C_{GDP} + \epsilon_{254}^{FtsZ} \cdot C_{FtsZ} \quad [2]$$

donde  $A_i$  corresponde a la absorbancia a la longitud de onda  $i$ ,  $\epsilon$  es el coeficiente de extinción molar del nucleótido o de la proteína a cierta longitud de onda (según se indique en el sub y superíndice) y  $C$  es la concentración del nucleótido o la proteína.

Despejando  $C_{FtsZ}$  se obtiene:

$$C_{FtsZ} = \frac{A_{254} \cdot \epsilon_{280}^{GDP} - A_{280} \cdot \epsilon_{254}^{GDP}}{\epsilon_{280}^{GDP} \cdot \epsilon_{254}^{FtsZ} - \epsilon_{254}^{GDP} \cdot \epsilon_{280}^{FtsZ}} \quad [3]$$

De este modo se determinó una concentración de proteína de 500  $\mu$ M (20 mg/ml). Las mediciones de la concentración de proteína se realizaron en una cubeta de absorbancia de cuarzo (Hellma) y en un espectrofotómetro con arreglo de diodos Hewlett-Packard 8452A. Luego de cuantificar FtsZ, se corroboró su funcionalidad determinando la actividad GTPásica y  $C_c$  de polimerización a 30 °C (métodos en sección Actividad GTPásica y Dispersión de luz, respectivamente).

**Actividad GTPásica.** La concentración de fosfato inorgánico producto de la hidrólisis de GTP se determinó cuantitativamente por el método colorimétrico de verde malaquita. Un volumen de 13 mL de la solución colorante de éste método se compone de 10 mL de verde malaquita 1,32 mM en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3,1 M, 2,5 mL de heptamolibdato de amonio al 15% en agua y 0,5 mL de Tween 20 al 11% en agua. Estas soluciones stock

se mantuvieron a temperatura ambiente y la mezcla colorante se preparó al momento de la determinación.

Un volumen de 160  $\mu\text{L}$  de las muestras cuya concentración de Pi se desea determinar, se depositó en pocillos de placas ELISA mantenidas en hielo. Luego se agregó 40  $\mu\text{L}$  de colorante y se agitó a una potencia de 750 rpm durante 2 minutos en un agitador de placas de ELISA Heidolph modelo Titramax 101. Se mantuvo la placa de ELISA a temperatura ambiente y protegida de la luz durante 30 minutos para que la solución de cada pocillo alcanzara una absorbancia estable, según se determinó en un experimento de la cinética de la reacción de coloración realizado previamente (no mostrado). Posteriormente se midió la absorbancia a 630 nm en un equipo Epoch de Biotek.

Se preparó una curva de calibración de 11 puntos por dilución seriada al 75 % a partir de una solución 450  $\mu\text{M}$  de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Es decir, a partir de la solución 450  $\mu\text{M}$  de Pi se tomó  $\frac{3}{4}$  del volumen y se agregó a  $\frac{1}{4}$  de agua, y así sucesivamente. De modo que, la curva de calibración cubre un rango de concentraciones desde 450 a 25,34  $\mu\text{M}$  de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , más un blanco libre de Pi. En todo el rango de concentraciones la absorbancia fue directamente proporcional a la concentración de Pi (no mostrado). Las muestras para la curva de calibración se guardaron a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  y se agregaron a cada una de las placas de ELISA para ser analizadas, dado que el colorante se prepara cada vez que se hace el experimento.

Se tomaron 30  $\mu\text{L}$  de las soluciones de la curva de calibración y de las mezclas de reacción de hidrólisis de GTP por FtsZ, y se agregaron a 770  $\mu\text{L}$  de ácido perclórico 0,32 M. Dado que existe hidrólisis acida del GTP por el ácido perclórico, las soluciones se mantuvieron en hielo hasta el momento en que se agregó los 160  $\mu\text{L}$  a los pocillos de la placa de ELISA.

**Cinética de la actividad GTPásica.** Para los experimentos cinéticos de saturación por sustrato se usó una concentración de 3  $\mu\text{M}$  de FtsZ en amortiguador de polimerización MES-KOH pH 6,5 50 mM, KCl 50 mM y  $\text{MgCl}_2$  5 mM a 30 °C. Se emplearon concentraciones de 20, 45, 80, 160, 350, 600 y 1000  $\mu\text{M}$  de GTP. La proteína purificada en amortiguador A (pH 8) correspondió a 1:25 veces el volumen total de reacción, por lo que se supone no tuvo influencia sobre el pH (6,5) de la mezcla de reacción, al igual que en el resto de los experimentos de actividad GTPásica. A menores concentraciones de sustrato se tomaron muestras en un intervalo de tiempo menor, como se muestra en la tabla 3, para estar siempre en el rango de tiempo de velocidad inicial. El valor de  $K_M$  se obtuvo al ajustar la ecuación de una hipérbola a los puntos experimentales, usando el programa SigmaPlot 11 de SYSTAT. Todos los gráficos y ajustes presentes en esta tesis se hicieron en SigmaPlot. El segundo paso de la verificación de las propiedades de la proteína purificada fue determinar la concentración crítica a 30 °C (ver dispersión de luz, determinación de concentración crítica a 30 °C).

**Tabla 3.** Protocolo para el tiempo de muestreo y la concentración de sustrato.

Tiempo (minutos)	[GTP] ( $\mu\text{M}$ )						
	20 <sup>a</sup>	45	80	160	350	600	1000
0	x	x	x	x	x	x	x
0,5	x	x					
1	x	x	x	x	x	x	x
1,5	x	x					
2	x	x	x	x	x	x	x
3	x	x	x	x			
4					x	x	x
5			x	x			
7			x	x	x	x	x
9					x	x	x

<sup>a</sup>En caso de 20  $\mu\text{M}$  de GTP, la muestra tomada a 3 minutos ya muestra el efecto de la ausencia de sustrato producto de su hidrólisis, por lo que no se consideró en el análisis.



**Curvas de progreso.** Las curvas de progreso se midieron a una temperatura de 30 °C para determinar el tiempo en que la proteína se mantiene en condiciones de sustrato saturante. Debido a que la proteína se almacena a -80 °C en amortiguador A pH 8 (ver purificación de FtsZ), las distintas concentraciones de proteína analizadas se prepararon por dilución seriada a un 75 % para que todas las mezclas de reacción tuviesen la misma cantidad de amortiguador A pH 8. En todas las mezclas de reacción la proteína en amortiguador A se descongeló en hielo y se diluyó 25 veces, por lo que se supone un pH 6,5 final, correspondiente al amortiguador de polimerización MES-KOH pH 6,5 50 mM, KCl 50 mM y MgCl<sub>2</sub> 5 mM.

Se usaron concentraciones de FtsZ entre 7,5 y 2,3 µM preparadas por dilución seriada al 75% más una de 0,5 µM a la cual se le completó el volumen común de amortiguador A para cumplir con la condición de 1:25 en relación al volumen final. La concentración 1 mM de GTP fue igual para todas las preparaciones.

Se utilizó un tiempo de pre-incubación de 4 minutos en el cual la mezcla de reacción alcanza la temperatura del baño termoregulado. Se agregó GTP 1 mM, se agitó en un Vortex a baja potencia y se tomó 30 µL de la mezcla de reacción (tiempo cero) que se depositó en 770 µL de ácido perclórico. Esta nueva solución se mantuvo en hielo hasta el momento de depositar 160 µL de las muestras en la placa de ELISA. De esta misma forma se tomaron muestras a tiempo 0, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 30, 40, 50, y 60 minutos. Con el mismo procedimiento se hicieron los controles sin GTP y sin proteína. El experimento se realizó en un baño termoregulado VWR y la temperatura se siguió permanentemente con una termocupla de Bailey Instruments.

**Determinación de la actividad GTPásica de FtsZ a distintas temperaturas.** La actividad GTPásica de FtsZ se midió en amortiguador de polimerización MES-KOH 50 mM pH 6,5, KCl 50 mM y MgCl<sub>2</sub> 5 mM a las temperaturas indicadas, entre 10 y 35 °C, en condiciones de sustrato saturante. Los experimentos se realizaron en un baño termoregulado VWR y la temperatura se siguió permanentemente con una termocupla de Bailey Instruments. Para temperaturas menores que la ambiente, se usó un refrigerador de inmersión Julabo FT401. Las temperaturas del rango 20 a 35 °C presentaron una variación de  $\pm 0,1$  °C durante los experimentos, mientras que los experimentos realizados a 10 y 15 °C presentaron una variación de  $\pm 0,2$  °C.

Las muestras de las mezclas de reacción se tomaron a los 0, 3, 6 y 9 minutos, mientras que el tiempo de pre-incubación para que la mezcla de reacción alcanzara la temperatura deseada fue de 4 minutos a todas las temperaturas. Cada experimento se realizó 3 veces en duplicado. Si bien se determinó la concentración de Pi de las muestras a los diferentes tiempos, el valor relevante para el análisis es el cambio en la concentración de Pi en el tiempo (velocidad inicial) por lo que se informan las desviaciones estándar del promedio de las pendientes de las curvas de progreso. La pendiente de la recta de velocidad de reacción *versus* concentración de proteína corresponde a la constante catalítica ( $k_{cat}$ ) de FtsZ a cada temperatura. Usando los valores determinados de  $k_{cat}$  se construyó el grafico de Arrhenius y el grafico de Eyring, asumiendo un valor de coeficiente de transmisión ( $\kappa$ , ver anexo) igual a 1 (Fersht, 1999).

**Inactivación de la actividad GTPásica por la temperatura.** Para determinar la inactivación que se produce por temperatura en ausencia de GTP durante la pre-incubación de las mediciones de actividad, se pre-incubaron las muestras de proteína a diferentes temperaturas por un tiempo determinado, esto se hizo entre 10 y 45 °C.

Los experimentos se hicieron en una mezcla de reacción que contenía; FtsZ 5  $\mu$ M y amortiguador de polimerización MES-KOH pH 6,5, 50 mM, KCl 50 mM y MgCl<sub>2</sub> 5 mM. Se preparó un stock de mezcla de reacción para cada temperatura estudiada; 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, y 45°C. Dicho stock se alicuotó en 6 tubos, de los cuales 4 se pre-incubaron a cada una de las temperaturas de estudio y los dos restantes a 30 °C. Este control a 30 °C se hizo cada vez en forma simultánea a la pre-incubación a distintas temperaturas. Luego de la pre-incubación se midió la actividad GTPásica a 30 °C de ambos grupos de muestras. En primera instancia se ensayó una pre-incubación de 13 minutos, que es el tiempo que demoraron los ensayos de actividad GTPásica (4 minutos de pre-incubación más 9 de hidrolisis de GTP) y luego de 30 minutos.

**Cinética de la inactivación de FtsZ por temperatura.** La cinética de inactivación de FtsZ se determinó en amortiguador de polimerización MES-KOH 50 mM pH 6,5, KCl 50 mM y MgCl<sub>2</sub> 5 mM a 10, 20 y 30 °C. Se descongeló FtsZ en hielo, se diluyó en amortiguador de polimerización a una concentración final 5  $\mu$ M y se pre-incubó sin GTP a las 3 temperaturas y se tomaron muestras a los tiempos 0, 3, 6, 9, 12, 20, 30, 40 50 y 60 minutos. Luego del periodo de pre-incubación, a cada una de las muestras se les determinó la actividad GTPásica por el método verde malaquita a 30 °C. El efecto de la concentración de proteína en la inactivación se estudió a 30 °C usando FtsZ 15  $\mu$ M. Se analizaron los mismos tiempos y se comparó con la inactivación detectada a 5  $\mu$ M. Para hacer compatible los valores de los parámetros de inactivación

en todos los casos, los datos experimentales se normalizaron al dividir la actividad a cada tiempo por la actividad a tiempo cero.

**Dispersión de luz en 90° por los polímeros de FtsZ.** La dispersión de luz se midió en un espectrofluorímetro Perkin Elmer LS50 con una cubeta de cuarzo QS (Hellma) de 10.00 mm de paso óptico. Para secarla y eliminar las partículas de polvo de su superficie se usó nitrógeno gaseoso. La temperatura en la cubeta se mantuvo por medio de un baño termoregulado y una punta refrigerada de inmersión. Durante los experimentos se registro una variación de temperatura de  $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$  para las mediciones entre 20 y 30  $^{\circ}\text{C}$  y de  $\pm 0,2^{\circ}\text{C}$  para las realizadas a 10 y 15  $^{\circ}\text{C}$ . Antes y después de cada polimerización se midió la temperatura. La cubeta con amortiguador (previamente ambientada) se mantuvo 10 minutos en el portacubetas del espectrofluorímetro para que alcanzara la temperatura deseada. Luego se agregó FtsZ, se agitó usando una micropipeta P200 y se comenzó a registrar la dispersión de luz a 90°. La línea base se registró por alrededor de 300 segundos y se agregó GTP, se agitó con una micropipeta y se registró la polimerización y despolimerización de FtsZ. A cada uno de los espectros de polimerización se le restó el promedio del valor de dispersión de la línea base, por lo que todos los espectros comienzan con valor de dispersión cero. La concentración de GTP usada en todos los casos fue 1 mM, al igual que en los experimentos para determinar  $k_{cat}$  y  $C_c$  por medio de la actividad GTPásica.

Al igual que en el caso de la actividad GTPásica, la proporción de amortiguador a pH 8 de FtsZ respecto de la mezcla total es de 1:25 por lo que se supone un pH 6,5 en la reacción. Se utilizó una longitud de onda de emisión y excitación de 350 nm con un ancho de banda de emisión y excitación de 7,0 nm. Se usó un atenuador de 4%, un tiempo de respuesta de 0,5 s y un intervalo de 1 s.

**Concentración crítica de FtsZ a 30 °C.** A partir de 20  $\mu\text{M}$  de FtsZ en amortiguador de polimerización MES-KOH pH 6,5, 50 mM, KCl 50 mM y  $\text{MgCl}_2$  5 mM se prepararon concentraciones decrecientes por dilución seriada al 75% desde 20 a 2,67  $\mu\text{M}$ . En cada espectro de polimerización se calculó la diferencia de Intensidad de luz a 350 nm ( $\Delta I$ ), entre la línea base inicial y el máximo de dispersión del espectro de polimerización, diferencia que se graficó versus la concentración de proteína.

**Velocidad de despolimerización de FtsZ.** Se estudió la cinética de despolimerización de FtsZ a los 10, 15, 20, 25 y 30 °C a una concentración de proteína constante de 20  $\mu\text{M}$ , en amortiguador de polimerización MES-KOH 50 mM pH 6,5, KCl 50 mM y  $\text{MgCl}_2$  5 mM. A esta concentración es factible detectar una pendiente de despolimerización apreciable a todas las temperaturas en un tiempo aceptable. Los experimentos se realizaron dos veces.

La cinética de despolimerización se ajustó a una recta, cuya pendiente corresponde a la disminución de la polimerización en unidades arbitrarias de dispersión de luz por segundo, es decir, una constante cinética ( $k_{desp}$ ). Debido a que según la temperatura cambia el tiempo en el cual los filamentos despolimerizan, no se consideró un intervalo de tiempo al cual ajustar la recta, si no que se ajustó a la mayor cantidad de puntos posible durante el desensamble de los polímeros.  $k_{desp}$  se utilizó para construir los gráficos de Arrhenius y Eyring.

**Determinación de la concentración crítica de FtsZ a distintas temperaturas.** La determinación de la  $C_c$  de la polimerización de FtsZ a diferentes temperaturas también se hizo en amortiguador de polimerización MES-KOH 50 mM pH 6,5, KCl 50 mM y  $MgCl_2$  5 mM. Se determinó la  $C_c$  cada 5 °C en el rango de 10 a 30 °C. En primera instancia se prepararon diluciones seriadas de FtsZ al 75% desde 20 hasta 2,67  $\mu$ M, pero debido a que a baja temperatura y concentraciones altas de proteína se detectó que el  $\Delta$  de intensidad de dispersión de luz no era proporcional a la concentración de FtsZ, se analizó otro conjunto de concentraciones, preparadas como diluciones seriadas al 75% desde una solución 10  $\mu$ M hasta 1  $\mu$ M de FtsZ. La región común de datos fue superponible y se construyeron las curvas de concentración crítica desde 1 hasta 20  $\mu$ M de FtsZ, mostradas en la sección de resultados. Se mantuvo en 1:25 la cantidad de proteína más amortiguador A en relación a la solución total, por lo que se supone un pH 6,5. La polimerización se indujo al agregar 1 mM de GTP una vez que se alcanzó la línea base inicial. La  $C_c$  a cada temperatura se determinó ajustando la región lineal de los datos a una recta, cuyo valor se obtuvo de la extrapolación al eje de la abscisa. Esta región lineal corresponde a los datos obtenidos a concentraciones bajas, menores a 5  $\mu$ M. Cada recta de  $C_c$  se ajustó con al menos 4 puntos.

**Visualización de los filamentos de FtsZ mediante microscopía electrónica de transmisión.** La polimerización de los filamentos de FtsZ se indujo con GTP 1 mM en amortiguador de polimerización MES-KOH 50 mM pH 6,5, KCl 50 mM y  $MgCl_2$  5 mM. Se usó una concentración de 10  $\mu$ M de FtsZ, que corresponde aproximadamente a la cantidad máxima de 15.000 monómeros de FtsZ en el volumen de una bacteria *E. coli* BL21(DE3) (Lu y cols., 1998). Para tomar las muestras para microscopía electrónica se realizó un ensayo de dispersión de luz como se describió en la sección anterior y una

vez inducido el proceso de polimerización, registrado como un aumento en la dispersión, se tomó una muestra de 10  $\mu\text{L}$  y se posó sobre parafilm depositado sobre un cubo metálico mantenido a la temperatura deseada. Se puso una grilla de cobre cubierta con parlodion sobre los 10  $\mu\text{L}$  de muestra durante 2 minutos. Se eliminó el exceso de mezcla de reacción con papel filtro y se eliminó el exceso de sales en la grilla con 3 lavados sucesivos con agua. Posteriormente se dejó la grilla 2 minutos en tinción negativa, acetato de uranilo 2%.

Para la tinción negativa a las temperaturas de 10, 15 y 20 °C se mantuvo el cubo metálico en un recipiente aislante y la temperatura en la superficie del parafilm que envolvía el cubo fue constante, de 9,9, 14,9 y 20,1 °C, respectivamente. Para las temperaturas de 25 y 30 °C se usó un termoblock que mantuvo la temperatura en la superficie del parafilm a 25,1 y 30,2 °C en promedio, respectivamente, con una variación de 0,3 °C.

Se usó un microscopio electrónico de transmisión Philips Tecnai 12 Bio Twin (Servicio de Microscopia Electrónica, PUC) con un potencial de aceleración de 80 kV.

Con el programa Image J (descarga gratuita desde la pagina web <http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>) se determinó el ancho en nanómetros de los filamentos de las fotografías escaneadas.

## RESULTADOS.

**Parámetros cinéticos de la actividad GTPasa de FtsZ.** La constante de Michaelis y Menten ( $K_M$ ) es un parámetro cuyo valor es igual a la concentración de sustrato necesaria para alcanzar la mitad de la velocidad máxima y es independiente de la concentración de proteína, que en este caso fue de 3  $\mu\text{M}$  (0,12 mg/ml). En la figura 1A se muestran las curvas de progreso de la actividad GTPasa de FtsZ a distintas concentraciones de sustrato. La pendiente, que corresponde a la velocidad inicial de la reacción, se graficó *versus* la concentración de GTP (figura 1B). Se aprecia que al aumentar la concentración de sustrato por sobre 300 mM hay una tendencia a la saturación, alcanzando un valor límite de velocidad inicial que se denomina velocidad máxima. Los datos experimentales se ajustaron a una hipérbola rectangular desde donde se obtuvo un valor para la  $K_M$  de  $34 \pm 2,7 \mu\text{M}$  y una velocidad máxima de  $39.08 \pm 4 \cdot 10^{-4} \text{ nmol de Pi min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ .

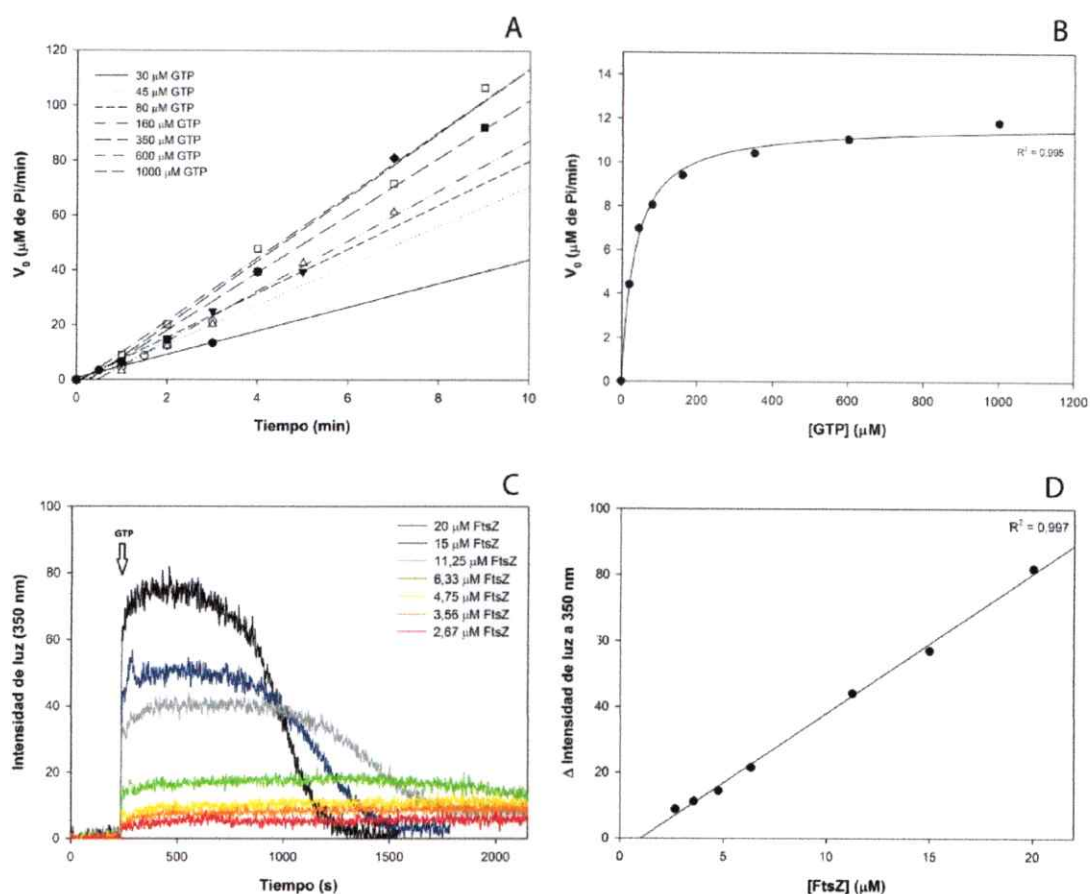
**Concentración crítica a 30 °C.** La polimerización de FtsZ es muy rápida al momento de agregar GTP, como se puede apreciar en la figura 1C. Al incubar la solución de FtsZ en ausencia de GTP se observa que se mantiene constante la línea base hasta cuando se agrega GTP 1 mM, que induce un brusco aumento en la dispersión de luz hasta alcanzar un máximo. Luego la dispersión disminuye gradualmente debido a que los polímeros se desensamblan por la hidrólisis de GTP. Es notorio que la diferencia de dispersión de luz entre el máximo y el promedio de la línea base ( $\Delta$  intensidad de luz), se correlaciona con la concentración de FtsZ, es decir a mayor concentración de proteína hay mayor proteína polimerizada con la misma cantidad de GTP. La misma dependencia muestra la velocidad de despolimerización, puesto que al tener una



concentración constante de GTP, a mayor concentración de proteína el nucleótido se hidroliza más rápido y los filamentos se desensamblan al hidrolizarse el GTP. De la misma forma el estado polimerizado es más perdurable a menores concentraciones de proteína, debido a que GTP permanece por más tiempo en la solución.

Para determinar el valor de la concentración crítica ( $C_c$ ), intuitivamente definido como la mínima concentración sobre la cual FtsZ polimeriza, y considerando que el  $\Delta$  intensidad de luz a 350 nm es proporcional a la masa de polímero, se graficó su valor *versus* la concentración de proteína y a partir de la intersección de la recta con la abscisa se obtuvo un valor de  $0,99 \pm 0,3 \mu\text{M}^{-1}$  de  $C_c$  como se muestra en la figura 1D. Termodinámicamente,  $C_c$  corresponde al valor inverso de la constante de unión de un monómero al polímero durante el proceso de elongación (Oosawa y Asakura, 1975).

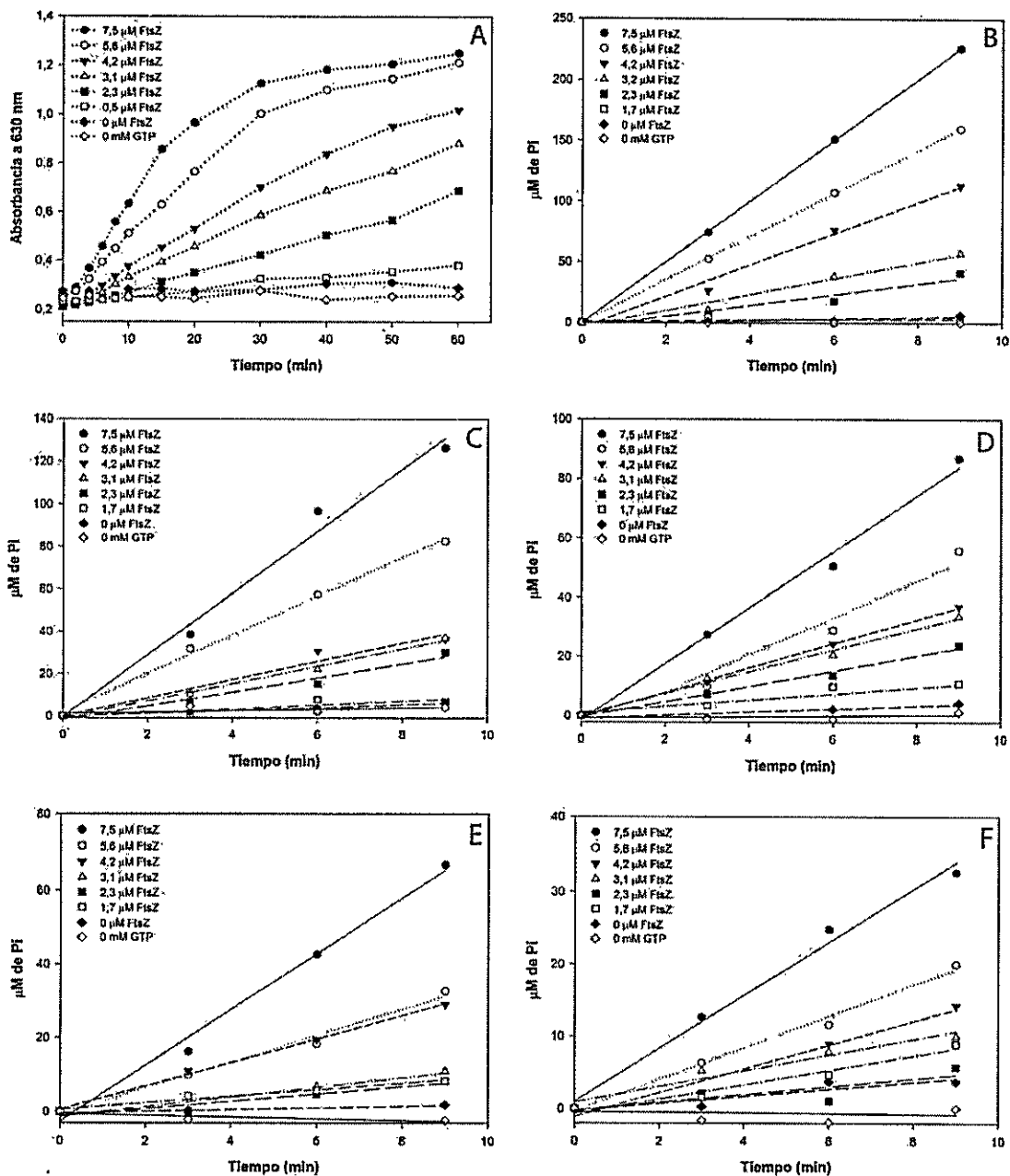
**Efecto de la concentración de FtsZ sobre la velocidad máxima de hidrólisis de GTP.** En la figura 2A se muestran las curvas de progreso de la actividad GTPasa, medidas a 630 nm, y se observa que el producto (Pi) aumenta de manera lineal durante los primeros 15 minutos de reacción, en todo el rango de concentración de FtsZ usado. Durante este tiempo la velocidad inicial de la reacción ( $V_0$ ) es igual a la velocidad máxima ( $V_{\text{max}}$ ), puesto que el sustrato está en exceso respecto a la  $K_M$  y se cumple el postulado del estado estacionario de Michaelis y Menten. Por lo tanto, todas las medidas de  $V_0$  posteriores se determinaron midiendo la cantidad de Pi producido a partir de la hidrólisis de GTP a los 0, 3, 6 y 9 minutos. También se decidió utilizar  $1,7 \mu\text{M}$  de FtsZ como la menor concentración para mantener la absorbancia por sobre el



**Figura 1. Determinación de la constante de Michaelis y Menten de la actividad GTPásica y la concentración crítica de polimerización de FtsZ a 30 °C.** Los ensayos experimentales se hicieron en amortiguador MES-KOH 50 mM pH 6,5, KCl 50 mM y MgCl<sub>2</sub> 5 mM. **A.** Curvas de progreso de la hidrólisis de GTP a distintas concentraciones de sustrato con 3 μM de FtsZ. La pendiente corresponde a la velocidad de la reacción. **B.** Influencia de la concentración de sustrato sobre la velocidad inicial de hidrólisis de GTP de FtsZ. El valor de la velocidad máxima corresponde a 39.08 nmol de Pi min<sup>-1</sup>mg<sup>-1</sup> y la K<sub>M</sub> a 34 μM. **C.** Polimerización y despolimerización de FtsZ determinada por dispersión de luz a 350 nm. La flecha indica la adición de GTP **D.** Gráfico de Δ intensidad de luz a 350 nm para la polimerización máxima versus la concentración de FtsZ, la intersección de la recta con el eje de la abscisa corresponde a la concentración crítica (C<sub>c</sub>), cuyo valor es de 0,99 ± 0,3 μM.

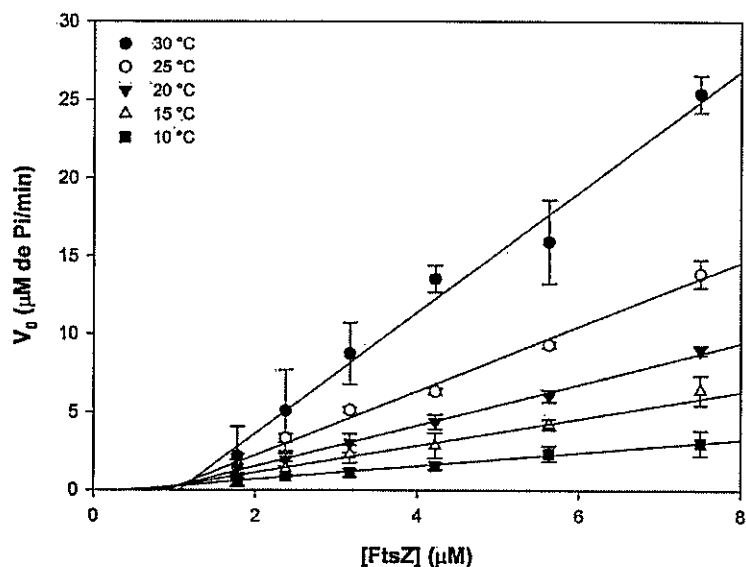
límite de detección del equipo a las temperaturas menores, en las que se esperaba una menor velocidad de la reacción.

En las figuras 2B a 2F se muestran las curvas de progreso para cada concentración de FtsZ ensayada a diferentes temperaturas. Se observa un descenso de la actividad GTPásica al disminuir la temperatura. Todas las curvas de progreso son lineales y el aumento de temperatura de desde 10 a 30 °C produce un aumento del Pi desde 7,5 a 225  $\mu\text{M}$  a la mayor concentración de proteína a 9 minutos. A 35 °C se obtuvo valores de actividad muy por debajo a lo esperado y a 40°C se registraron absorbancias cercanas al límite de detección (no mostrado), indicando procesos de inactivación dependiente de temperatura, por lo tanto se consideró el rango de 10 a 30 °C en este estudio del estado de transición. Por otro lado, no se apreció actividad GTPásica en ausencia de proteína o GTP, como era de esperar. Las curvas de progreso hasta 9 minutos se realizaron 3 veces en duplicado. Se calculó  $V_0$  para cada temperatura y concentración de proteína.



**Figura 2.** Determinación de velocidades iniciales ( $V_0$ ) de la actividad GTPásica de FtsZ a distintas temperaturas. El amortiguador experimental es el mismo utilizado en la figura 1. **A.** Curvas de progreso a 30 °C y diferentes concentraciones de proteína. **B-F.** Curvas de progreso de los 9 minutos iniciales en condiciones de sustrato saturante (1 mM), a 30, 25, 20, 15 y 10 °C, respectivamente.

En la figura 3 se observa un aumento lineal de la actividad GTPásica con la concentración de proteína y una menor actividad GTPásica a menor temperatura. Debido a que las determinaciones de velocidad inicial se hicieron a sustrato saturante (1 mM de GTP) la pendiente de las rectas mostradas en la figura 3, corresponden a la constante catalítica o número de recambio ( $k_{cat}$ ,  $[\text{min}^{-1}]$ ), equivalente al número de moles de producto que genera un mol de enzima por minuto. El valor de la constante catalítica  $k_{cat}$  para cada temperatura se muestra en la tabla 4 al igual que el ajuste de los datos. Por otro lado el valor de la intersección de la recta con la abscisa corresponde a la  $C_c$  de FtsZ para la actividad GTPásica. Los valores también se muestran en la tabla 4. Se observa que a medida que aumenta la temperatura aumenta la  $C_c$ , desde  $0,37 \mu\text{M}$  a  $10^\circ\text{C}$  hasta  $1,05 \mu\text{M}$  a  $30^\circ\text{C}$ .

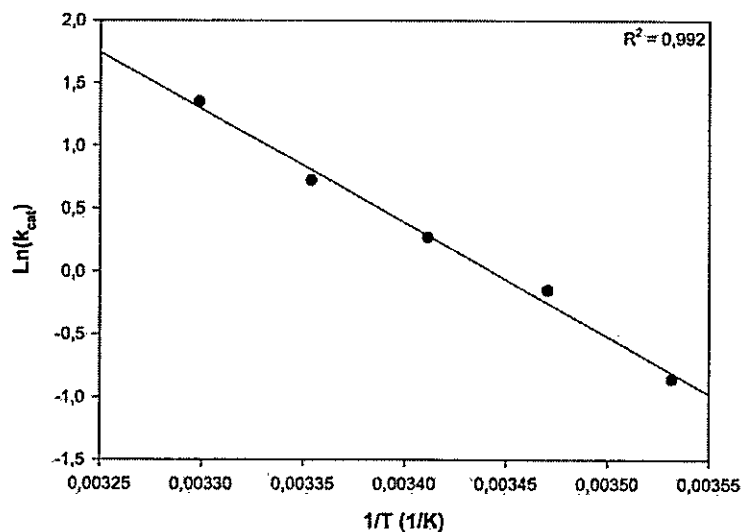


**Figura 3. Concentración crítica y  $k_{cat}$  de la actividad GTPásica de FtsZ.** La intersección de la línea de regresión con la abscisa indica la  $C_c$  ( $\mu\text{M}$ ), mientras que la pendiente corresponde a  $k_{cat}$  ( $\text{min}^{-1}$ ). La concentración de sustrato corresponde a 1 mM. Las barras de error indican la desviación estándar del promedio de las velocidades iniciales determinadas a cada concentración.

**Tabla 4.** Concentración crítica y constante catalítica determinada a partir de la actividad GTPásica en función de la temperatura.

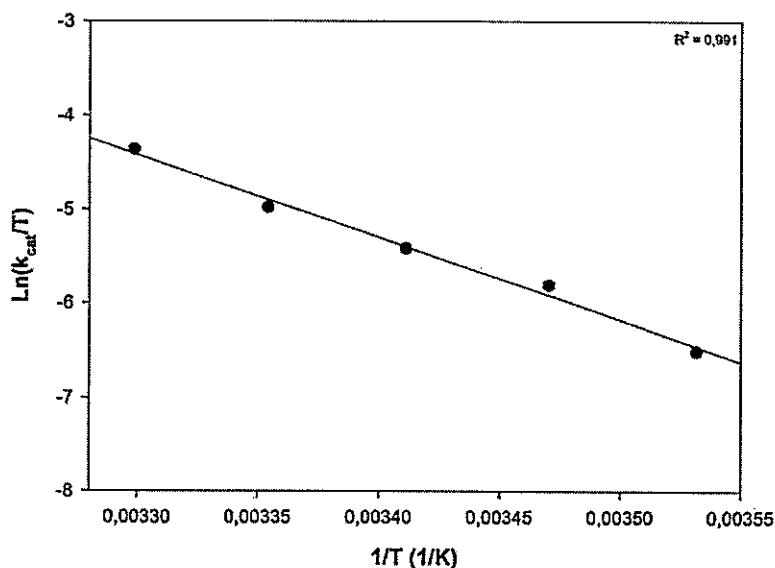
Temperatura (°C)	Concentración crítica [ $\mu\text{M}$ ]	Constante catalítica, [ $\text{min}^{-1}$ ]	Ecuación / $R^2$
10	$0,37 \pm 0,02$	$0,4264 \pm 0,019$	$y = 0,4264x - 0,1575 / 0,992$
15	$0,70 \pm 0,07$	$0,8640 \pm 0,043$	$y = 0,8640x - 0,603 / 0,988$
20	$0,83 \pm 0,03$	$1,3095 \pm 0,042$	$y = 1,3095x - 1,085 / 0,996$
25	$0,91 \pm 0,10$	$2,0554 \pm 0,099$	$y = 2,0554x - 1,8698 / 0,990$
30	$1,05 \pm 0,35$	$3,8616 \pm 0,248$	$y = 3,8616x - 4,0706 / 0,983$

Conociendo los valores de  $k_{cat}$  de la actividad GTPásica, se calculó la energía de activación del estado de transición, mediante en gráfico de Arrhenius. Como se observa en la figura 4, hay un sólo valor de energía de activación de la actividad GTPásica, pues sigue una tendencia lineal en el rango de temperaturas estudiado y por lo tanto tiene una sola pendiente representativa.



**Figura 4.** Gráfico de Arrhenius de la actividad GTPásica de FtsZ. Se observa un comportamiento lineal entre los 10 y 30 °C.

A partir del ajuste lineal de los datos se obtuvo un valor de energía de activación igual a  $75,28 \pm 3,9$  kJ/mol y un factor preexponencial de  $3,46 \cdot 10^{13}$  (ecuación 5, anexo). Con los valores de  $k_{cat}$  de la actividad GTPásica de FtsZ a distintas temperaturas también se puede calcular la entalpía de activación, mediante el gráfico de Eyring, donde se grafica el logaritmo natural de  $k_{cat}/T$  versus el inverso de la temperatura absoluta (figura 5). Los parámetros de la regresión lineal que se ajustaron a los datos y la ecuación de Eyring (ecuación 11, anexo) nos permitió calcular un valor de  $\Delta H^\ddagger$  de 72,82 kJ/mol. Es habitual en algunos trabajos con enzimas calcular la entropía de activación  $\Delta S^\ddagger$ , sin embargo como es un valor que se obtiene de la extrapolación del ajuste a la ordenada el error en la estimación es muy grande. Debemos mencionar también que este valor de  $\Delta H^\ddagger$  no es absoluto, puesto que se consideró un valor para  $\kappa$  igual a 1 (ecuación 11, anexo). Por estas razones no se puede calcular un valor de energía libre de activación de Gibbs. Esta situación se tratará en la discusión.



**Figura 5. Gráfico de Eyring de la actividad GTPásica de FtsZ.** El ajuste se hizo entre 10 y 30 °C y de la pendiente se determinó un valor de  $\Delta H^\ddagger$  igual a 72,82 kJ/mol.

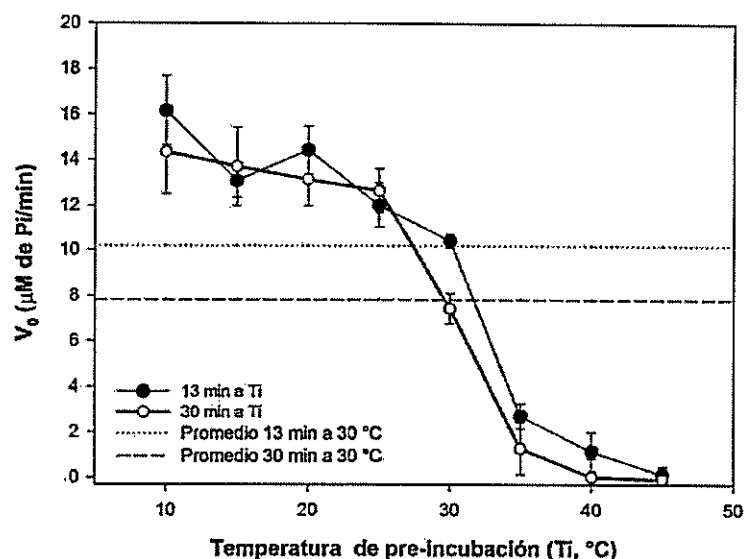
### **Estabilidad de FtsZ en las condiciones experimentales de trabajo.**

**Control de la inactivación térmica.** La disminución y supresión de la actividad GTPásica observada a 35 y 40 °C, respectivamente, indican eventuales procesos de inactivación de la proteína, que se pueden deber a la pérdida de estabilidad de FtsZ en el amortiguador de polimerización. Se hizo un experimento donde se pre-incubó la proteína a una temperatura de prueba ( $T_i$ ) y luego se midió la actividad a la temperatura óptima. Si la actividad disminuye, es debido a una inactivación por temperatura durante la pre-incubación.

Se descongeló FtsZ en hielo y se pre-incubó sin GTP en amortiguador de polimerización a diferentes  $T_i$  (10, 15, 20, 25, 35, 40 y 45 °C) durante 13 y 30 minutos y se midió la hidrólisis de GTP. Se comparó la actividad residual de las diferentes  $T_i$  con 30 °C, temperatura a la cual se observó previamente la mayor  $K_{cat}$ . El resultado se presenta en la figura 6, donde se observa que por sobre 30 °C hay una inactivación importante de FtsZ, registrándose una actividad muy por debajo del control a 30 °C (línea punteada horizontal y línea discontinua para 13 y 30 minutos, respectivamente). En el rango de 10 a 20 °C no hay diferencias significativas en la actividad luego de la pre-incubación. A 13 o 30 minutos, la conducta de la estabilidad de FtsZ es similar, sin embargo, a 30 °C se observa un aumento importante y significativo de la inactivación al aumentar el tiempo de pre-incubación. Si bien a 35 y 40 °C las barras de error se superponen, hay una clara tendencia a la disminución de la actividad luego de aumentar el tiempo de pre-incubación a estas temperaturas.

Por lo tanto, ocurre una inactivación de FtsZ por el aumento de la temperatura por sobre 30 °C en ausencia de GTP, que es dependiente del tiempo de incubación (salvo a 45 °C donde la actividad para ambos tiempos es cercana a cero).

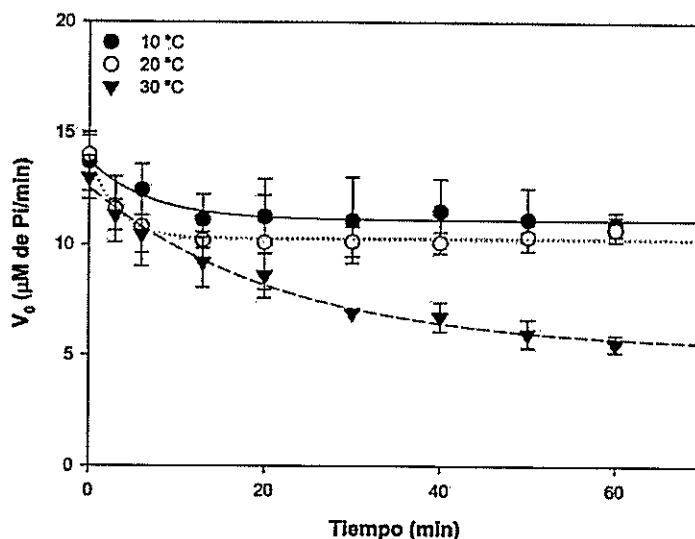




**Figura 6. Inactivación de la actividad GTPásica de FtsZ por la temperatura.** En círculos llenos se muestra la actividad GTPásica luego de una pre-incubación por 13. min, en ausencia de GTP, a las temperaturas indicadas. En círculos vacíos el mismo experimento con una pre-incubación de 30 min. Para una fácil comparación, en línea punteada se muestra el valor promedio de los controles pre-incubados a 30 °C durante 13 minutos y en línea segmentada el promedio de los controles pre-incubados 30 minutos.

**Cinética de la inactivación de FtsZ.** Para conocer la dependencia temporal de los procesos de inactivación por la temperatura, que ocurren dentro del rango de análisis del estado de transición de la actividad GTPásica, se hicieron las cinéticas de inactivación a 10, 20 y 30 °C. Básicamente consistió en descongelar la proteína en hielo y pre-incubarla a dichas temperaturas en amortiguador de polimerización, en ausencia de GTP y tomar alícuotas a diferentes tiempos para medir su actividad GTPásica a 30 °C. Los resultados se muestran en la figura 7, donde se observa que a medida que aumenta el tiempo de pre-incubación a todas las temperaturas, la velocidad inicial de la actividad GTPásica residual disminuye y tiende a un valor

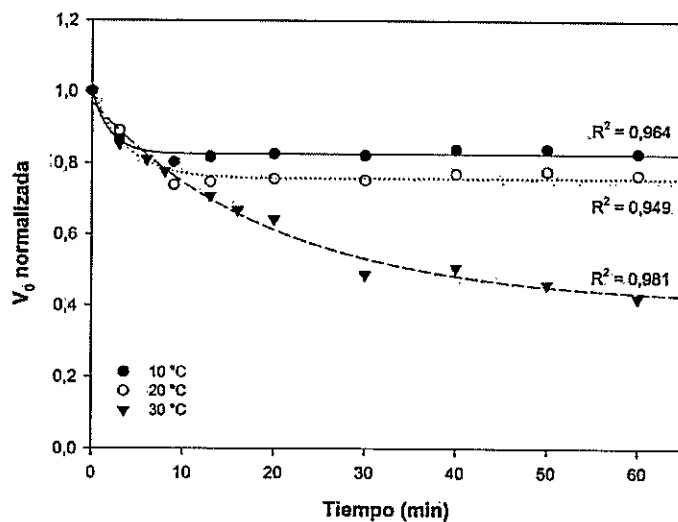
mínimo en el cual se estabiliza. Se observa, en concordancia con la figura 6, que el proceso de inactivación termina antes de los 10 minutos a 10 y 20 °C, mientras que a 30 °C este proceso continúa al menos hasta 60 minutos.



**Figura 7. Cinética de inactivación por temperatura de la actividad GTPásica de FtsZ.** Se descongeló FtsZ en hielo, se pre-incubó sin GTP a 10, 20 y 30 °C y luego se determinaron las velocidades iniciales ( $V_0$ ) a 30 °C a distintos tiempos de pre-incubación. Se usó una concentración 5  $\mu\text{M}$  de FtsZ y 1 mM de GTP.

Para analizar el efecto de la temperatura sobre la inactivación de FtsZ medida a través de la velocidad de hidrólisis de GTP y obtener parámetros comparables de inactivación, se normalizaron los datos. Como se observa en la figura 8, los datos experimentales no se ajustan a una exponencial decreciente simple, sino más bien a una exponencial decreciente de 3 parámetros ( $y = y_0 + a \cdot e^{-bx}$ ), los valores calculados se presentan en la tabla 5. Puesto que se normalizaron los datos, el valor constante  $y_0$  que llamaremos actividad límite ( $V_{lim}$ , adimensional), corresponde a la proporción de la velocidad a la cual tiende la proteína (debido a la inactivación a cierta temperatura) respecto a la velocidad a tiempo cero. El valor  $b$ , que llamaremos

constante cinética de inactivación ( $k_{in}$ ,  $\text{min}^{-1}$ ) corresponde a la velocidad con la cual la proteína se inactiva. El porcentaje de actividad límite es de 82,5%, 75,7% y 40,7% a 10, 20 y 30 °C, respectivamente.

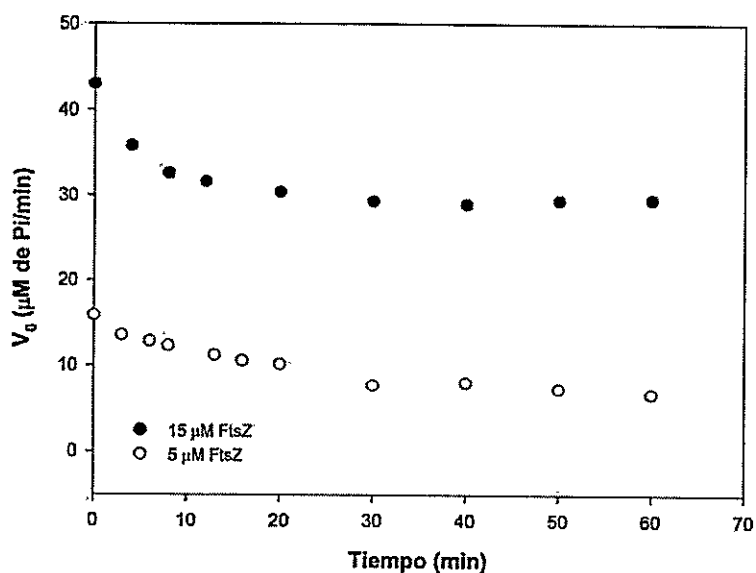


**Figura 8.** Cinética normalizada de inactivación de la actividad GTPásica de FtsZ en ausencia de GTP. Los datos se normalizaron y se ajustaron a una ecuación exponencial de decaimiento de la actividad con dos componentes.

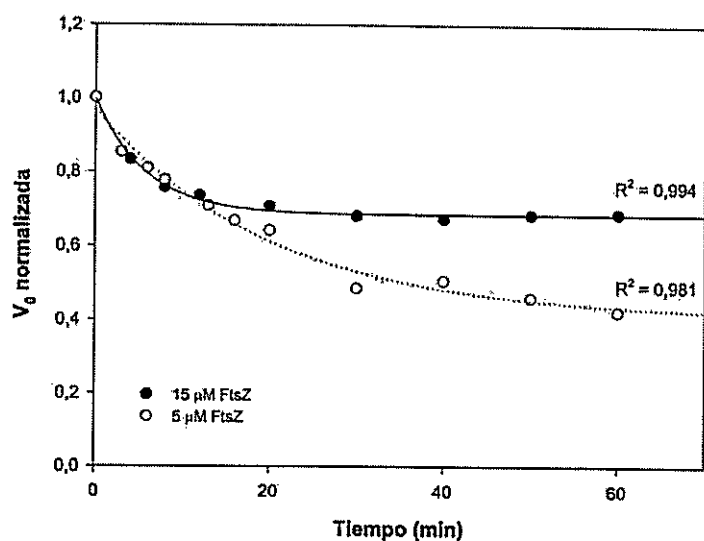
**Tabla 5.** Parámetros del ajuste de la cinética de inactivación de FtsZ por la temperatura.

Temperatura (°C)	$V_{lim}$	$a$	$k_{in}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$R^2$
10	$0,825 \pm 0,009$	$0,176 \pm 0,024$	$0,514 \pm 0,218$	0,964
20	$0,757 \pm 0,010$	$0,250 \pm 0,024$	$0,280 \pm 0,072$	0,949
30	$0,407 \pm 0,025$	$0,562 \pm 0,025$	$0,050 \pm 0,006$	0,981

Finalmente se analizó el efecto de la concentración de proteína en el proceso de inactivación de FtsZ. Para ello se hizo el experimento de inactivación a una concentración de 15  $\mu\text{M}$  de FtsZ a 30  $^{\circ}\text{C}$  y se comparó con los valores obtenidos para 5  $\mu\text{M}$ . Como era de esperar, la  $V_0$  a tiempo cero de FtsZ 15  $\mu\text{M}$ , es mayor y corresponde aproximadamente a 3 veces la velocidad con FtsZ 5  $\mu\text{M}$ . Ambas series de datos tienden a un  $y_0$  específico para cada temperatura (figura 9). Se normalizaron los datos y se ajustaron a una exponencial de 3 parámetros como ya se describió. El gráfico normalizado se muestra en la figura 10 y los parámetros en la tabla 6. Se observa que el comportamiento general de inactivación es similar, pues ambas tienden a un valor  $V_{lim}$  distinto de cero. A 15  $\mu\text{M}$  de FtsZ se alcanza una velocidad relativamente constante después de 20 minutos aproximadamente y a 5  $\mu\text{M}$  disminuye hasta los 60 minutos.



**Figura 9. Dependencia de la inactivación de la actividad GTPásica de FtsZ con la concentración de proteína.** Las condiciones experimentales son las que se describen en materiales y métodos para medir la velocidad de hidrólisis de GTP.



**Figura 10.** Ajuste de los datos normalizados de la inactivación de FtsZ a dos concentraciones de proteína. Se observa que la mayor concentración de proteína produce un efecto protector frente a la inactivación a 30 °C.

El porcentaje de  $V_{lim}$  de la mayor concentración de proteína alcanzó 68,5% mientras que la menor concentración alcanzó un 40,7%. La constante cinética de inactivación ( $k_{in}$ ), que define el tiempo en que la proteína alcanza el porcentaje de actividad límite tuvo un valor de  $0,174 \text{ min}^{-1}$  y  $0,05 \text{ min}^{-1}$  a 15 y 5  $\mu\text{M}$  de FtsZ, respectivamente.

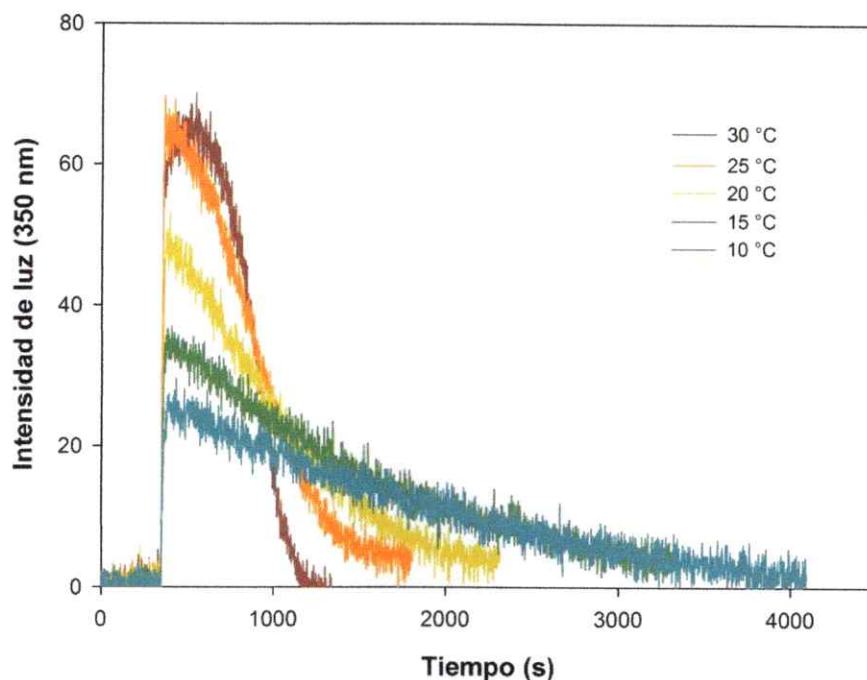
**Tabla 6.** Parámetros del ajuste de la inactivación de FtsZ a dos concentraciones de proteína.

FtsZ ( $\mu\text{M}$ )	$V_{lim}$	a	$k_{in}$ (1/min)	$R^2$
5	$0,407 \pm 0,025$	$0,562 \pm 0,025$	$0,050 \pm 0,006$	0,981
15	$0,685 \pm 0,011$	$0,312 \pm 0,023$	$0,174 \pm 0,029$	0,994

**Efecto de la temperatura sobre la velocidad de despolimerización de los polímeros de FtsZ.** La velocidad de despolimerización de los polímeros de FtsZ se siguió por medio de experimentos de dispersión de luz. La reacción se llevó a cabo en amortiguador de polimerización a una concentración de 20  $\mu\text{M}$  de FtsZ y la polimerización se indujo al agregar 1 mM de GTP. Como se observa en la figura 11, antes de agregar GTP la línea base se mantiene constante indicando que la proteína no se agrega en ausencia de GTP. Al agregar GTP hay un aumento abrupto en la dispersión de luz evidenciando la polimerización de FtsZ, seguido de una disminución de la dispersión de luz correspondiente a la despolimerización.

Tal como se observó en los experimentos preliminares de dispersión de luz a 30 °C, la polimerización fue reversible, pues en todos los casos, una vez ocurrida la despolimerización, se alcanzó la línea base. En la figura 11 también se observa que el máximo de polimerización se correlaciona con la temperatura, excepto a 25 y 30 °C que muestran valores similares.

A partir de la parte recta de las curvas de despolimerización se calculó la pendiente (materiales y métodos, pág. 31) que equivale a la constante cinética de la despolimerización ( $k_{desp}$ ,  $\text{min}^{-1}$ ) y los valores determinados se muestran en la tabla 7.



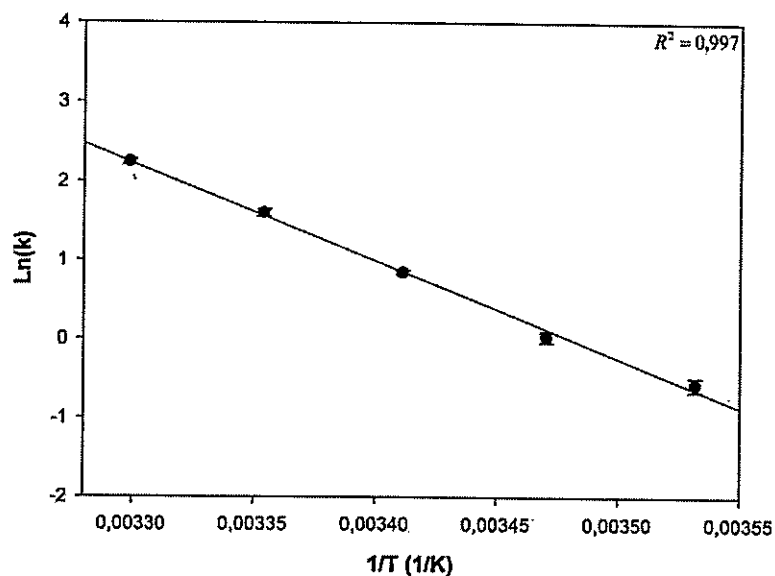
**Figura 11. Curvas de polimerización-despolimerización de FtsZ a distintas temperaturas.** Se observa una polimerización reversible, cuyo máximo es dependiente de la temperatura, así como el tiempo en el cual la despolimerización termina.

**Tabla 7.** Constante cinética de despolimerización de los polímeros de EcFtsZ.

Temperatura (°C)	$k_{desp}$ [min <sup>-1</sup> ]
10	0,564 ± 0,051
15	1,026 ± 0,068
20	2,331 ± 0,063
25	4,941 ± 0,224
30	9,450 ± 0,288

Con los valores de la constante cinética de despolimerización mostrados en la tabla 7, se construyó el gráfico de Arrhenius que se muestra en la figura 12. Al igual que el gráfico de Arrhenius de la actividad GTPásica se observa un comportamiento

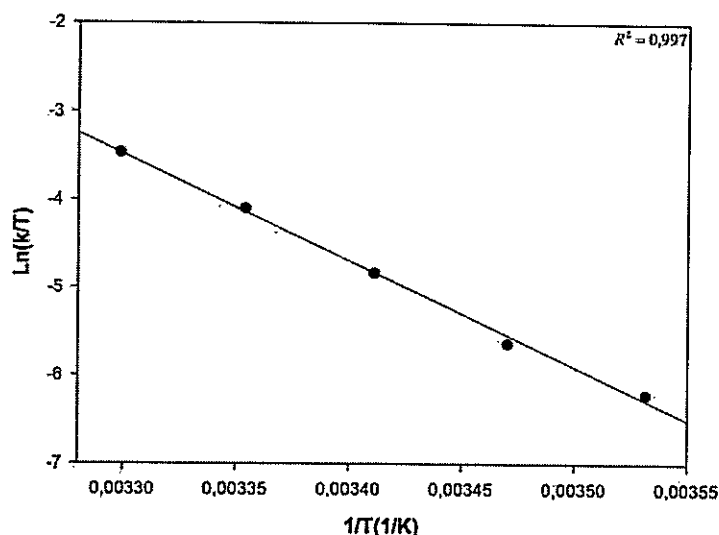
lineal caracterizado por una sola energía de activación cuyo valor se estimó en  $103 \pm 3,14$  kJ/mol, mientras que el factor pre-exponencial alcanzó un valor de  $5,14 \cdot 10^{18}$ .



**Figura 12. Gráfico de Arrhenius de la despolimerización de FtsZ.** Los experimentos se realizaron 2 veces y se observa un comportamiento lineal, caracterizado por un solo valor de energía de activación.

También se construyó el gráfico de Eyring con los valores de las velocidades de despolimerización. Los datos y el ajuste se muestran en la figura 13 donde se observa un comportamiento lineal. A partir de la pendiente se calculó el valor de la entalpía de activación para la despolimerización de los polímeros de FtsZ cuyo valor fue de 100,4 kJ/mol. Como ya se explicó para la actividad GTPásica, no es posible a partir de estos datos calcular la entropía de activación.

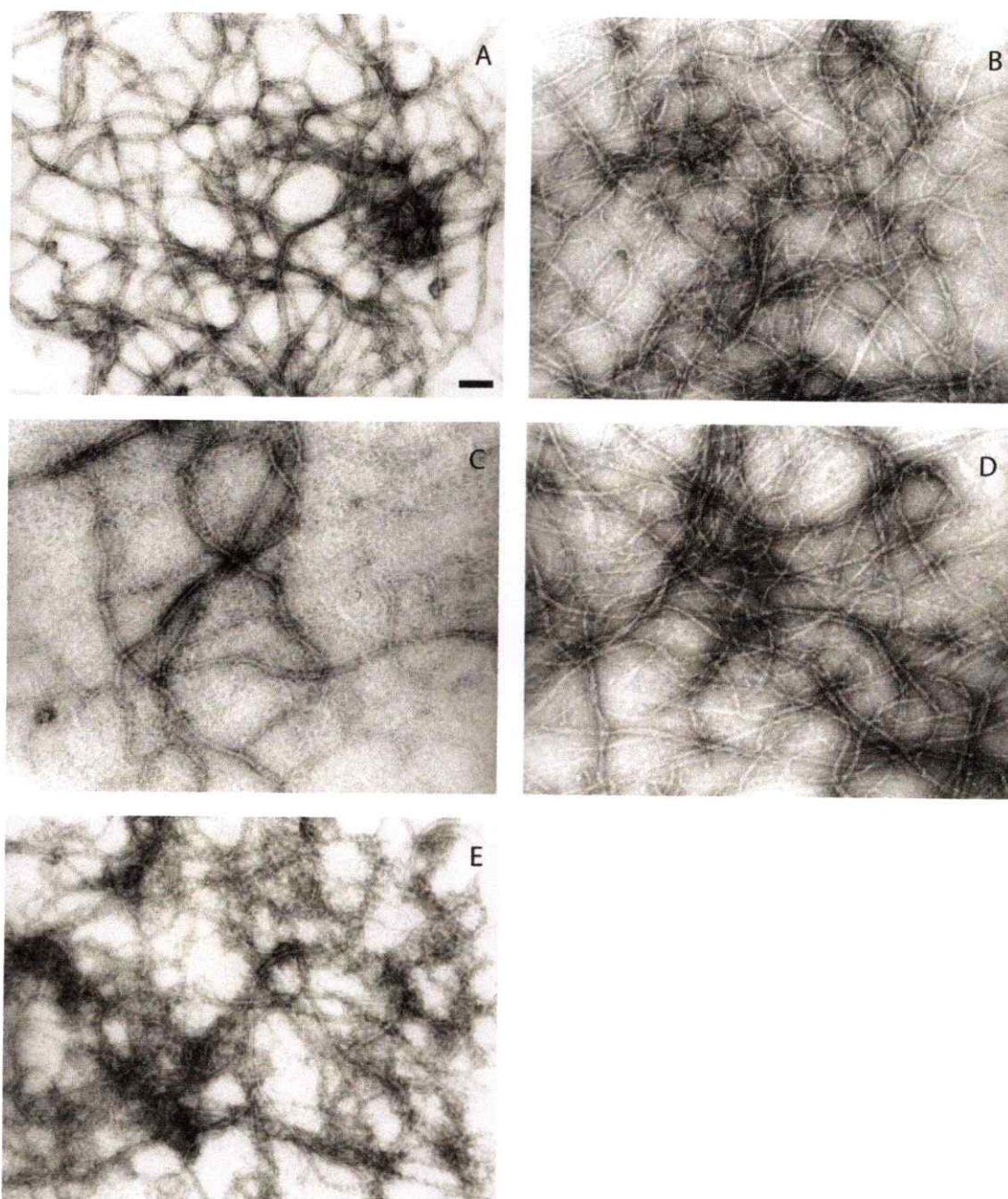




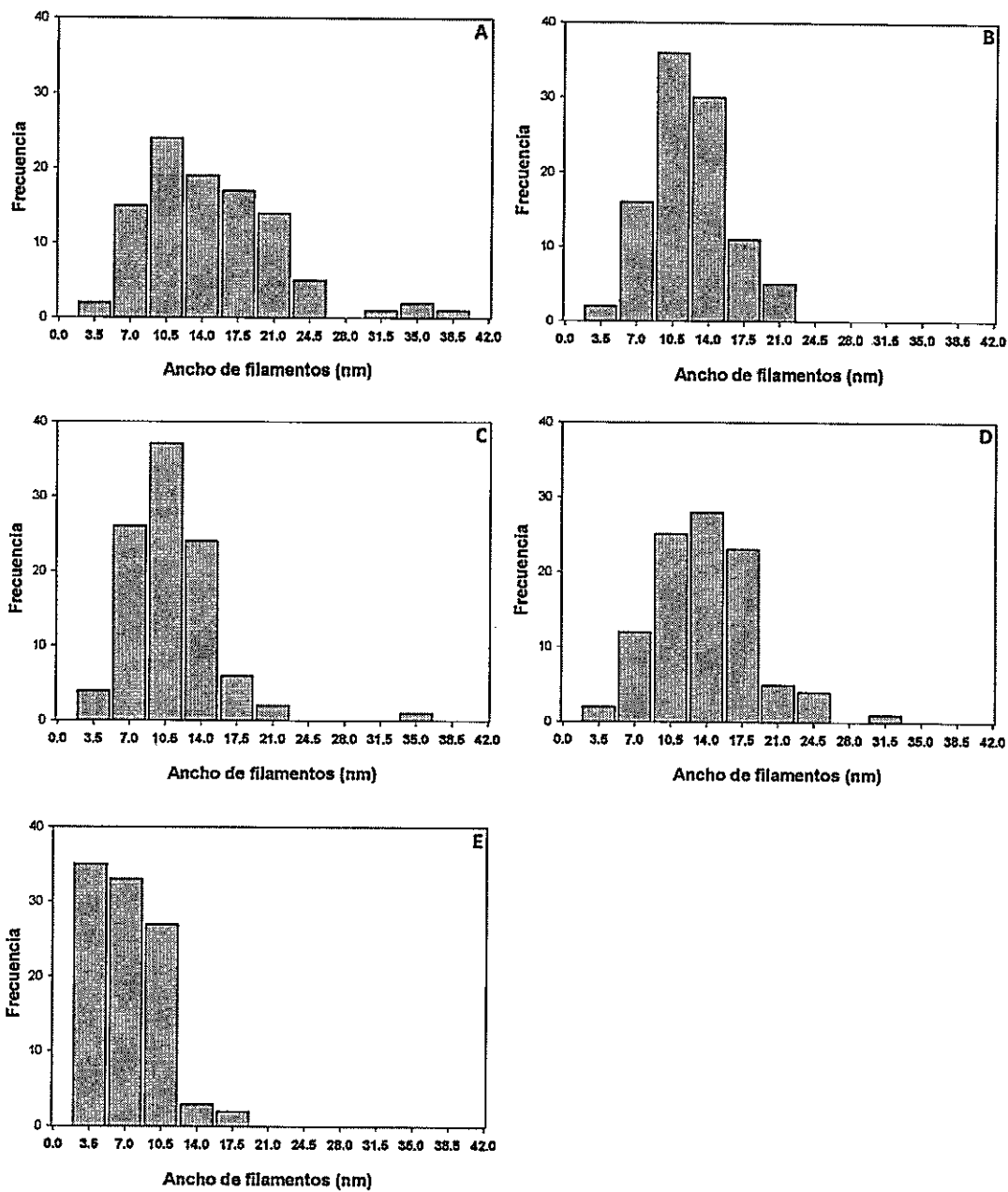
**Figura 13. Gráfico de Eyring de la despolimerización de FtsZ.** Se observa el comportamiento monofásico caracterizado por una sola  $E_a$ .

**Efecto de la temperatura sobre la morfología de los filamentos de FtsZ.** La morfología de los polímeros de FtsZ a 10, 15, 20, 25 y 30 °C se visualizó por medio de microscopía electrónica. Como se observa en la figura 14, a todas las temperaturas ensayadas se formaron filamentos y a menor temperatura aparecen filamentos muy largos y anchos, incluso, a 10 °C se pueden observar túbulos. A medida que se aumenta la temperatura se aprecia un aumento en la cantidad de polímeros pero su tamaño es menor y son en su mayoría filamentos más delgados.

La figura 15 muestra la distribución del ancho de los filamentos de FtsZ polimerizados entre 10 y 30 °C. Se observa que a 10 °C hay muy pocos filamentos simples y en su mayoría se distribuyen casi homogéneamente en filamentos que miden de 3,5 a 24,5 nm, equivalente a polímeros de 2 a 6 protofilamentos. Además se observaron filamentos de 31,5, 35 y 38,5 nm, que estarían formados por 9, 10 y 11 protofilamentos, respectivamente. A 30 °C la gran mayoría de los filamentos de FtsZ están formados por protofilamentos simples, dobles y triples.

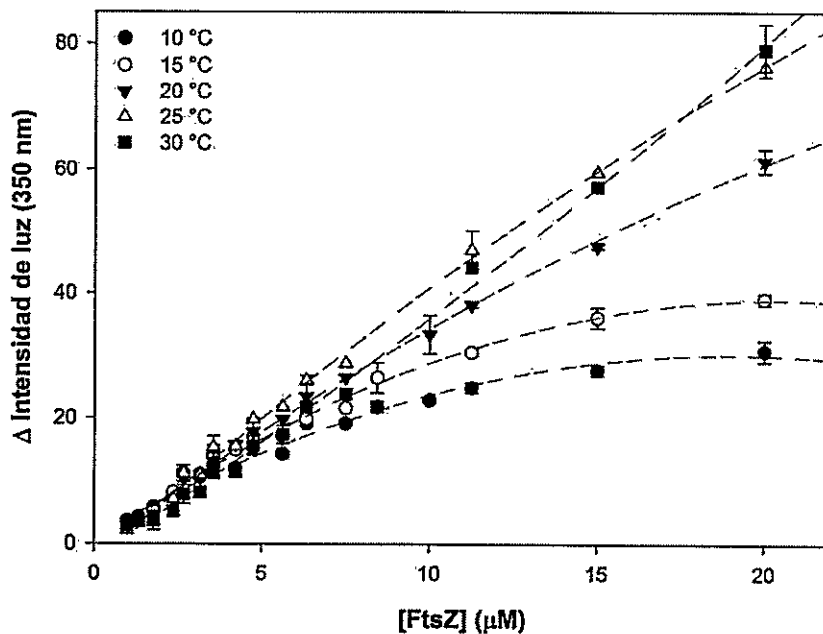


**Figura 14. Visualización de filamentos de FtsZ por microscopía electrónica.** La polimerización se hizo en las mismas condiciones que se muestran en la figura 1 con 1 mM de GTP a 10, 15, 20, 25 y 30 °C que se muestran respectivamente en las figuras A-E. Una vez alcanzada la polimerización máxima los polímeros se fijaron en grillas de parlodion y se visualizaron por microscopía electrónica. Barra de escala indica 100 nm, todas las imágenes están con el mismo aumento.



**Figura 15. Distribución del ancho de los polímeros de FtsZ.** Los valores del ancho de los filamentos se obtuvieron de las fotografías de microscopía electrónica mostradas en la figura 14, con el mismo orden de temperaturas.

**Concentración crítica de la polimerización de FtsZ.** La concentración crítica ( $C_c$ ) se determinó polimerizando FtsZ a diferentes concentraciones de proteína (1 a 20  $\mu\text{M}$ ) y a diferentes temperaturas en el rango entre 10 a 30  $^{\circ}\text{C}$  con intervalos de 5  $^{\circ}\text{C}$ . Los resultados se muestran en la figura 16, donde se observa que a 10, 15 y 20  $^{\circ}\text{C}$  la dependencia del  $\Delta$  intensidad de luz respecto a la concentración de proteína pierde su linealidad, aumentando la curvatura a medida que se baja la temperatura. Solo a 30  $^{\circ}\text{C}$  se observa una conducta lineal. Para calcular la  $C_c$  se hizo un ajuste lineal a los datos experimentales obtenidos a baja concentración de proteína, es decir, donde los puntos experimentales muestran linealidad entre la dispersión de luz y la concentración de proteína. El valor de la  $C_c$  corresponde a la concentración de proteína obtenida del punto de intersección de la recta con la abscisa.



**Figura 16.** Curvas de concentración crítica de FtsZ determinadas por dispersión de luz en  $90^{\circ}$ . Se observa la pérdida de linealidad de las curvas a menores temperaturas y mayores concentraciones de proteína.

Los valores calculados se muestran en la tabla 8 y se observa que a medida que aumenta la temperatura aumenta la  $C_c$ , desfavoreciendo la constante de elongación de la polimerización de FtsZ. Este resultado es congruente con lo observado por microscopía electrónica, pues a medida que se aumenta la temperatura se observan polímeros más cortos.

**Tabla 8.** Concentración crítica de FtsZ determinada a partir de la dependencia de la dispersión máxima de luz a  $90^\circ$  en función de la concentración de FtsZ.

Temperatura (°C)	Concentración crítica ( $\mu\text{M}$ )	Ecuación / $R^2$
10	$0,164 \pm 0,475$	$y = 3,670x - 0,602 / 0,93$
15	$0,492 \pm 0,180$	$y = 4,473x - 2,201 / 0,97$
20	$0,769 \pm 2,506$	$y = 4,718x - 3,627 / 0,87$
25	$0,881 \pm 1,482$	$y = 5,079x - 4,477 / 0,90$
30	$1,271 \pm 0,094$	$y = 4,209x - 5,352 / 0,99$



## DISCUSIÓN.

Todos los experimentos de este estudio se hicieron *in vitro*, usando condiciones experimentales dentro de los rangos que mejor mantienen la actividad de la proteína y que no están necesariamente dentro de los rangos fisiológicos de *E. coli* (Erickson y cols., 2010), cuyo pH intracelular varía de 7,4 a 7,8 según sea el pH extracelular. *E. coli* tiene una concentración de KCl que varía entre 140 y 760 mM, dependiendo de la osmolaridad extracelular y el magnesio libre es alrededor de 1 mM.

El mismo criterio de maximización de la actividad se siguió previamente para MjFtsZ y la única diferencia entre los medios de reacción de ambas proteínas es la cantidad de KCl, que con MjFtsZ fue 6 veces mayor (300 mM) respecto a EcFtsZ, en este trabajo. En el análisis de las energías de activación, dado que las condiciones *in vitro* empleadas para Mj y EcFtsZ son muy similares, la aproximación de suponer un coeficiente de transmisión en la ecuación de Eyring igual en ambos casos y definirlo como 1 es bastante razonable. Por lo tanto, las diferencias observadas entre ambas proteínas, tanto cualitativa como cuantitativamente no se deberían al sistema *in vitro* utilizado para cada una, sino que a las propiedades intrínsecas de cada proteína.

MjFtsZ se purificó mediante una columna de níquel, pues se insertó en su secuencia aminoacídica una región C-terminal de 6 histidinas (Maldonado, 2011). Si bien se han reportado diferencias entre los polímeros de MjFtsZ con y sin la región de poli-histidina al visualizarlos por ME (Oliva y cols., 2003), también se han realizado estudios de estabilidad frente a cloruro de guanidinio (GdmCl) a distintas temperaturas y no se registraron diferencias entre MjFtsZ silvestre y la que posee la región poli-histidina (Andreu y cols., 2002). También se ha comparado la polimerización por dispersión de luz y su actividad GTPásica, sin registrarse diferencias significativas

(Oliva y cols., 2003). Si bien el comportamiento frente a agentes caotrópicos no tiene por qué ser igual al exhibido frente a cambios de temperatura del sistema, ambos experimentos son mediciones de la estabilidad de la proteína, en términos de energía libre, por lo que consideramos que es una buena aproximación suponer que no hay influencia de la región poli-histidina en la determinación de constantes cinéticas a distintas temperaturas y por lo tanto son valores extrapolables a la proteína silvestre y comparables con los de EcFtsZ. Por lo tanto, si bien los resultados presentados aquí no son extrapolables a lo que ocurre *in vivo*, nos permiten comparar las propiedades intrínsecas de dos FtsZ provenientes de un organismo hipertermófilo del dominio Archaea y de un organismo mesófilo del dominio Bacteria.

Las secuencias de MjFtsZ y EcFtsZ tienen un 47% de identidad y un 68% de similitud, porcentajes bastante altos teniendo en cuenta que el límite recomendable para hacer un modelamiento de estructura es de 30%. Por lo tanto es el 53% de diferencia lo que produce la divergencia en el comportamiento.

Los valores de la concentración crítica de polimerización ( $1 \mu\text{M}$ ), la constante catalítica y la  $K_M$  ( $34 \mu\text{M}$ ) para la actividad GTPásica están de acuerdo a lo que ha sido reportado (ver introducción). El valor de la constante catalítica y el de la  $K_M$  es muy similar al reportado por Nova (Nova y col, 2007). La  $C_c$  también está de acuerdo a los valores reportados (Mukherjee y Lutkenhaus 1999; Díaz-Espinoza y col. 2007; Mingorance y col. 2010) y la despolimerización es completa, de acuerdo con la reversibilidad del proceso previamente descrita.

Los datos cinéticos obtenidos son consistentes entre sí. A mayor temperatura la actividad GTPásica es mayor y por lo tanto la despolimerización es más rápida, debido al agotamiento del GTP. Ocasionalmente se define como estabilidad dinámica el valor máximo de emisión de luz que permanece relativamente constante en el tiempo, es

decir, la dispersión generada por el máximo número relativamente constante de polímeros y se habla de mayor o menor estabilidad modulada por GTP. Sin embargo, esta no es una medida de la estabilidad termodinámica, pues solo refleja el tiempo en el cual la concentración de GTP es suficiente para mantener la máxima cantidad de proteína en estado polimerizado, de modo que depende de la actividad GTPásica, la concentración de proteína, la temperatura y la concentración de nucleótido.

La actividad GTPásica de EcFtsZ fue muy baja a 35 °C evidenciando inestabilidad de la proteína a esta temperatura, que se refleja en los resultados mostrados en la figura 6, en ausencia de GTP. Según los experimentos de estabilidad térmica de EcFtsZ, la inactivación en ausencia de GTP que se produce en los 4 minutos de pre-incubación previo a cada medición de  $V_0$ , no significa un impedimento para registrar las velocidades iniciales a 10, 20 o 30 °C, puesto que se observó una proporcionalidad directa entre la actividad y la concentración de proteína, así como el comportamiento exponencial esperado para  $k_{cat}$ . Probablemente los valores reportados de  $K_M$  a 37 °C han sido afectados por la inestabilidad de la proteína a esa temperatura, lo que afecta la unión del sustrato y por eso el valor de  $K_M$  es mayor, incluso al doble.

Se ha reportado que la unión de GDP tiene un efecto protector de la estructura secundaria de EcFtsZ frente a GdmCl (Andreu y cols., 2002). Este efecto se observó también al medir la inactivación por temperatura de la actividad GTPásica a distintas concentraciones de FtsZ (por lo tanto también de GDP, pues FtsZ purifica uniendo GDP en relación 1:1). Así, al diluir la proteína se disminuye la concentración de GDP y de proteína lo que desfavorece la reacción de unión, aumentando la disociación y la inestabilidad de la proteína con la temperatura.

Las cinéticas de inactivación normalizadas a distintas temperaturas muestran que la actividad tiende a un valor menor que se mantiene en el tiempo ( $V_{lim}$ ). Debido a



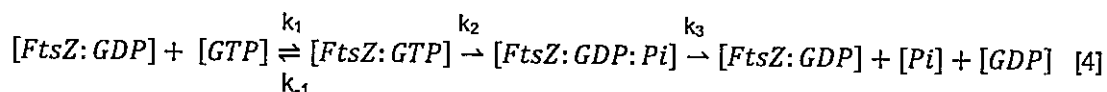
esto, la constante de inactivación ( $k_{in}$ , Tabla 6) no es representativa del fenómeno de inactivación debido a la temperatura, si no que describe la velocidad con la cual se alcanza el valor de  $V_{lim}$ . Por lo tanto es lógico que a mayor temperatura el valor de la constante de inactivación sea menor, porque a alta temperatura la pérdida de actividad continuó hasta los 60 minutos que duró el experimento. La mayoría de los experimentos de inactivación de otras proteínas se registran con 10 minutos de pre-incubación en las condiciones de estudio y la actividad que se sigue en el tiempo llega a cero, de modo que los datos se ajustan a una exponencial simple y la constante cinética de inactivación realmente representa la inactivación sufrida por la proteína.

Estos resultados nos indican que los valores del gráfico de Arrhenius podrían estar influidos por inactivación durante la pre-incubación antes de la medición de la actividad GTPásica, lo que disminuiría la actividad a mayor temperatura y a menor concentración de proteína. Sin embargo, la linealidad de este gráfico (figura 4) nos permite descartar esta pequeña influencia. Se concluye que la manipulación de FtsZ sin GTP en amortiguador de polimerización a temperatura ambiente desfavorece la estabilidad de la preparación, por lo que se sugiere su manipulación en hielo en amortiguador A hasta el momento previo al experimento, donde se diluye en amortiguador de polimerización. Conociendo las cinéticas de inactivación, es posible conocer el porcentaje de actividad que se pierde durante la pre-incubación y así corregir posibles errores. Por esto se hace necesario caracterizar la inactivación por temperatura de MjFtZ, pues puede ser una explicación al comportamiento de la proteína en el gráfico de Arrhenius.

La  $C_c$  de la actividad GTPásica aumenta con la temperatura. La explicación más simple es que hay inactivación de FtsZ en el estado monomérico que forma parte del equilibrio  $FtsZ + GDP \rightleftharpoons FtsZ:GDP$  en ausencia de GTP y no necesariamente de un

cambio en la constante de elongación del polímero. De este modo a mayor temperatura ocurriría una mayor reducción en la concentración de proteína activa, provocando un aumento aparente en la  $C_c$ . Un efecto aun mayor se aprecia en la  $C_c$  de la polimerización (tabla 9) y podría deberse al mayor tiempo de pre-incubación que toma a las muestras alcanzar línea base. Aun más, es probable que la inactivación corresponda a la formación irreversible de pequeños agregados, puesto que la dispersión aumenta levemente hasta que se estabiliza la línea base.

La actividad GTPásica mostró una dependencia exponencial con la temperatura, obteniéndose un aumento de 3 veces en la velocidad por cada aumento de 10 °C (valor conocido como  $Q_{10}$ ). La  $k_{cat}$  determinada corresponde a  $k_2$  en el modelo Michaeliano utilizado como marco teórico (ecuación 4) y puesto que la hidrólisis es el paso limitante de la actividad GTPásica (Romberg y Mitchison, 2004) y que la concentración de sustrato es saturante, la velocidad de la reacción solo depende de la concentración de proteína que en su totalidad está unida a GTP.



El grafico de Arrhenius de  $k_{cat}$  mostró una sola  $E_a$  de 75,28 kJ/mol en el rango de temperaturas estudiado, un valor menor a los 103 kJ/mol de la  $E_a$  de la despolimerización. Este valor no es sorpresivo, puesto que se sabe que el polímero posee una proporción de subunidades unidas a GDP que va desde el 50 al 20% (Chen y Erickson, 2009; Romberg y Mitchison, 2004). Por lo tanto es de esperar que la reacción de despolimerización sea más lenta y limitante con una mayor  $E_a$ . Curiosamente, a 10 °C la despolimerización es levemente más lenta que la actividad GTPásica, mientras que a 30 °C es 3 veces más lenta. Probablemente se debe a que 10 °C es una temperatura muy baja a la cual hay una actividad GTPásica en general

bastante residual de FtsZ y de alguna manera esto valida la decisión de considerar 10 °C como extremo inferior del rango de temperaturas.

Es interesante analizar los valores de la  $E_a$  para la actividad GTPásica y de despolimerización en términos comparativos, pues un mayor valor de esta última para la despolimerización nos dice que en este proceso ésta el paso limitante. De hecho al bajar la temperatura ambas velocidades se hacen parecidas, pero siempre la despolimerización es más lenta. Este comportamiento de baja actividad a baja temperatura probablemente provoca que la proteína polimerice y permanezca polimerizada como manojos de filamentos por más tiempo (figura 15) hasta que el GTP se agote.

Los resultados de las energías de activación indican que las velocidades de los distintos pasos de la hidrólisis de GTP y la despolimerización tienen una dependencia lineal con la temperatura, pues se obtuvo una sola  $E_a$  representativa para cada proceso en todo el rango de temperaturas analizadas. En MjFtsZ se observó un comportamiento bifásico del gráfico de Arrhenius, tanto para la actividad GTPásica como para la despolimerización, mostrando una energía de activación menor a mayores temperaturas, por lo que la reacción se favorece cinéticamente con la temperatura (Maldonado, 2011).

Al comparar la  $E_a$  de EcFtsZ y MjFtsZ en el rango fisiológico de temperaturas para los respectivos organismos, podemos observar que sorprendentemente la  $E_a$  de despolimerización es igual para ambas proteínas (Maldonado, 2011). Esto significa que la dependencia de la temperatura de la despolimerización de los filamentos de FtsZ de dos organismos que viven en condiciones de temperatura totalmente distintas, probablemente ha convergido al mismo mecanismo de despolimerización, considerando la similitud de secuencia y el conservado rol funcional. No así la actividad

GTPásica, pues MjFtsZ tiene una  $E_a$  mucho menor que EcFtsZ. Estos datos nos permiten predecir un mayor porcentaje de subunidades en estado GDP en MjFtsZ que en EcFtsZ durante el denominado estado estacionario, probablemente debido a la formación de manojos de filamentos que serían más estables que los protofilamentos. Es interesante hacer notar que la formación de manojos ocurre a altas temperaturas para MjFtsZ y bajas temperaturas para EcFtsZ, en el rango fisiológico de la proteína termófila y fuera de él para la mesófila. Este fenómeno parece ser el responsable del quiebre en la pendiente del gráfico de Arrhenius para MjFtsZ (Maldonado, 2011) y no así para EcFtsZ. No se puede descartar que el comportamiento bifásico de MjFtsZ se deba a una inactivación de la proteína en el rango de temperatura fisiológico que dé cuenta de las menores velocidades, pues se ha descrito que a pesar de que MjFtsZ pertenece a un organismo hipertermófilo, a 80 °C presenta una pérdida del 20 % de la estructura secundaria (Andreu y cols., 2002). En este mismo estudio se concluye que la estabilidad de MjFtsZ frente a GdmCl es máxima a 40 °C.

La polimerización de EcFtsZ (figura 18) es mayor a mayores concentraciones y temperaturas, pero la proporcionalidad entre la concentración y la dispersión se pierde a medida que disminuye la temperatura. Esto sugiere la formación de polímeros con forma distinta o un cambio en el largo de los filamentos, lo que produciría una pérdida de la proporcionalidad de la dispersión de luz con la masa de proteína en estado polimerizado. Este último caso se puede descartar debido a que se ha demostrado que a 30 °C los filamentos en general ya tienen un largo mayor a 3,5 veces la longitud de onda de excitación, lo necesario para mantener la proporcionalidad del método (Mukherjee y Lutkenhaus, 1999; Gaskin y cols., 1974) y en la figura 14 se observan polímeros más largos a menores temperaturas, estabilizados por interacciones laterales, ya sea específicas o no. También aumentó el ancho de filamentos a menores

temperaturas, registrándose túbulos e incluso una población de polímeros de ancho equivalente a 11 filamentos a 10 °C. De este modo se confirma que la pérdida de proporcionalidad en los experimentos de polimerización se debe a un cambio en la forma de los polímeros (ancho) al aumentar la temperatura y concentración de proteína.

La entalpía de activación ( $\Delta H^\ddagger$ ) obtenida para la actividad GTPásica a partir del gráfico de Eyring muestra un valor de 72,8 kJ/mol para EcFtsZ y de 16,7 kJ/mol para MjFtsZ (Maldonado, 2011). Se observa que para la hidrólisis de GTP se necesita una mayor energía para alcanzar el estado activado (proceso endergónico) para EcFtsZ que para MjFtsZ.

El valor del  $\Delta H^\ddagger$  para la despolimerización de EcFtsZ es de 100,4 kJ/mol y el MjFtsZ es de 91,1 kJ/mol, valores más similares que los de la actividad GTPásica. Estos valores indican la energía necesaria para romper los enlaces responsables de la estabilidad del polímero. Se observa que ambos polímeros muestran una misma conducta termodinámica de despolimerización aunque lo hacen en muy diferentes rangos de temperatura. Estos resultados se pueden interpretar como una adaptación de la estructura de FtsZ de mesófilos y de termófilos para producir polímeros con características de enlaces similares que luego de la hidrólisis de GTP pierden su estabilidad e inducen la despolimerización de los filamentos.

## CONCLUSIONES.

Los estados de transición de la actividad GTPásica y despolimerización de EcFtsZ muestran un comportamiento diferente a los de MjFtsZ, pues cada uno presenta una sola energía de activación que lo caracteriza, a diferencia de MjFtsZ que presenta un gráfico de Arrhenius bifásico, definido por 2 energías de activación en ambos casos.

El comportamiento de los filamentos formados por EcFtsZ y por MjFtsZ en función de la temperatura también son diferentes, mientras que MjFtsZ genera estructuras mayores en el rango fisiológico del *M. jannaschii*, EcFtsZ genera incluso túbulos a temperaturas por debajo del rango fisiológico de *E. coli*. Del mismo modo la concentración crítica de la polimerización en EcFtsZ aumenta al aumentar la temperatura, mientras que en MjFtsZ disminuye, aunque levemente.

Estas observaciones nos permiten concluir que la polimerización y actividad GTPásica de ambas proteínas es diferente y que este comportamiento *in vitro* se debe exclusivamente a la información codificada en la secuencia peptídica, pues según nuestro conocimiento, los experimentos se realizaron con la proteína purificada, sin otros componentes del divisoma, cofactores o moduladores. Esto apoya indirectamente la idea de que FtsZ es la proteína fundamental del divisoma.

## BIBLIOGRAFÍA.

- Aarsman, M. E., Piette, A., Fraipont, C., Vinkenvleugel, T.M., Nguyen-Distèche, M., y den Blaauwen, T. 2005. Maturation of the *Escherichia coli* divisome occurs in two steps. *Mol Microbiol.* 55:1631-1645.
- Addinall, S.G. and Lutkenhaus, J. 1996. FtsZ spirals and -arcs determine the shape of the invaginating septa in some mutants of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology.* 22:231-237.
- Andreu, J.M., Oliva, M.A., y Monasterio, O. 2002. Reversible Unfolding of FtsZ Cell Division Protein from Archaea and Bacteria. *The Journal of Biological Chemistry.* 277:43262-43270.
- Atkins, P. y Paula, J. 2006. *Atkins' Physical Chemistry.* pp 880-883. Oxford University Press. New York.
- Bi, E., y Lutkenhaus, J. 1990. FtsZ regulates the frequency of cell division in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology.* 172:2765-2668.
- Bi, E., y Lutkenhaus, J. 1991. FtsZ ring structure associates with division in *Escherichia coli*. *Nature.* 354:161-164.
- Bramkamp, M., y van Baarle, S. 2009. Division site selection in rod-shaped bacteria. *Current Opinion in Microbiology.* 12:683-688.
- Bramhill, D., y Thompson, C. M. 1994. GTP-dependent polymerization of *Escherichia coli* FtsZ protein to form tubules. *PNAS.* 91:5813-5817.
- Castellan, G. W. 1983. *Physical Chemistry.* Rogers, T., L y Pinette, M. (Eds.) pp 856-859. Addison-Wesley Publishing Company, Inc. Boston.
- Chen, Y., y Erickson, H.P. 2009. FtsZ Filament Dynamics at Steady State: Subunit Exchange with and without Nucleotide Hydrolysis. *Biochemistry.* 48:6664-6673.
- Chung K.M., Hsu H.H., Yeh H.Y y Chang B.Y. 2007. Mechanism of Regulation of Prokaryotic Tubulin-like GTPase FtsZ by Membrane Protein EzrA. *The Journal of Biological Chemistry.* 282:14891-14897.
- Dajkovic, A., Mukherjee, A. y Lutkenhaus J. 2008. Investigation of Regulation of FtsZ Assembly by SulA and Development of a Model for FtsZ Polymerization. *Journal of Bacteriology.* 190: 2513-2526.
- Daniel, R.M., y Danson, M.J. 2001. Assaying Activity and Assessing Thermostability of Hyperthermophilic Enzyme. *Methods in Enzymology.* 334:283-293.

- Diaz-Espinoza, R., Garcés, A., Arbildua, J.J., Montecinos, F., Brunet, J.E., Lagos, R., y Monasterio, O. 2007. Domain folding and flexibility of *Escherichia coli* FtsZ determined by tryptophan site-directed mutagenesis. *Protein Science* 16:1543-1556.
- Donachie, W.D., 1968. Relationship between Cell Size and Time of Initiation of DNA Replication. *Nature*. 219:1077-1079
- Erickson, H.P. 2009. Modeling the physics of FtsZ assembly and force generation. *PNAS*. 106:9238-9243.
- Erickson, H.P., Anderson, D.E., y Osawa, M. 2010. FtsZ in Bacterial Cytokinesis: Cytoskeleton and Force Generator All in One. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 74:504-528.
- Errington, J., Daniel, R.A., y Scheffers, D. 2003. Cytokinesis in Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 67:52-65.
- Fersht, A. 1999. Structure and mechanism in protein science: a guide to enzyme catalysis and protein folding. M.R. Julet (ed.). pp 54-57. W. H. Freeman & company, New York.
- Gaskin, F., Cantor, C.R., y Shelansky, M.L. 1974. Turbidimetric Studies of the in Vitro Assembly and Disassembly of Porcine Neurotubules. *Journal of Molecular Biology*. 89:737-758.
- Gonzalez, M.D., Akbay, E.A., Boyd, B. y Beckwith J. 2010. Multiple Interaction Domains in FtsL, a Protein Component of the Widely Conserved Bacterial FtsLBQ Cell Division Complex. *Journal of Bacteriology*. 192: 2757-2768.
- Gupta M.C. 1990. *Statistical Thermodynamics*. pp 363-367. Wiley Eastern Limited. New Delhi.
- Huecas, S., Llorca, O., Boskovic, J., Màrtín-Benito, J., Valpuesta, J.M., y Jose´ Manuel Andreu. 2008. Energetics and Geometry of FtsZ Polymers: Nucleated Self-Assembly of Single Protofilaments. *Biophysical Journal*. 94: 1796–1806.
- Jaiswal, R., Patel, R.Y., Asthana, J., Jindal, B., Balaji, P.V., y Panda, D. 2011. E93R Substitution of *Escherichia coli* FtsZ Induces Bundling of Protofilaments, Reduces GTPase Activity, and Impairs Bacterial Cytokinesis. *The Journal Of Biological Chemistry*. 285: 31796–31805.



- Jones, W.J., Leigh, J.A., Mayer, F., Woese, C.R. y Wolfe, R.S. 1983. *Methanococcus jannaschii* sp. nov., an extremely thermophilic methanogen from a submarine hydrothermal vent. *Archives of Microbiology*. 136:254-261.
- Löwe, J. y Amos, L.A. 1998. Crystal structure of the bacterial cell-division protein FtsZ. *Nature*. 391:203-206.
- Löwe, J., van den Ent, F. y Amos, L. 2004. Molecules of the Bacterial Cytoskeleton. *Annual Review Biomolecular Structure*. 33:177-198.
- Lu, C., Stricker, J. y Erickson, H.P. 1998. FtsZ from *Escherichia coli*, *Azotobacter vinelandii*, and *Thermotoga maritima* - Quantitation, GTP Hydrolysis, and Assembly. *Cell Motility and the Cytoskeleton*. 40:71-86.
- Lu, C., Reedy, M. y Erickson, H.P. 2000. Straight and Curved Conformations of FtsZ Are Regulated by GTP Hydrolysis. *Journal of Bacteriology*. 182:164-170.
- Lutkenhaus, J. y Addinall S.G. 1997. Bacterial Cell Division and The Z Ring. *Annual Review Biochemistry*. 66:93-116.
- Maldonado, P. 2011. Caracterización de la polimerización y actividad GTPasa de FtsZ de *Methanococcus Jannaschii* a distintas temperaturas. Seminario de título para optar al título de Ingeniería en Biotecnología Molecular. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Margolin, W. 2000. Organelle division: self-assembling GTPases caught in the middle. *Current Biology* 10:328-330.
- Martín-Galiano, A. J., Buey, R.M., Cabezas, M., y Andreu, J.M. 2010. Mapping Flexibility and the Assembly Switch of cell Division Protein FtsZ by Computational and Mutational Approaches. *JBC* 285:22554-22565.
- Miraldi, E.R., Thomas, P.J., y Romberg, L. 2008. Allosteric Models for Cooperative Polymerization of Linear Polymers. *Biophysical Journal*. 95:2470-2486.
- Mingorance, J., Rivas, G., Vélez, M., Gomes-Puertas, P. y Vicente, M. 2010. Strong FtsZ is with the force: mechanisms to constrict bacteria. *Trends in Microbiology*. 18:348-56.
- McGuffee, S. R., y Elcock, A.H. 2010. Diffusion, crowding and protein stability in a dynamic molecular model of the bacterial cytoplasm. *PLoS Computational Biology*. 6:1-18.

- Mukherjee, A, Dai, K. y Lutkenhaus, J. 1993. Escherichia coli cell division protein FtsZ is a guanine nucleotide binding protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90:1053-105.
- Mukherjee, A. y Lutkenhaus, J. 1994. Guanine Nucleotide-Dependent Assembly of FtsZ into Filaments. Journal of Bacteriology. 176:2754-2758.
- Mukherjee, A. y Lutkenhaus, J. 1999. Analysis of FtsZ Assembly by Light Scattering and Determination of the Role of Divalent Metal Cations. Journal of Bacteriology. 181:823-832
- Nelson D.L. y Cox M.M. 2006. Lehninger Principios de Bioquímica, pp 193-197. Editorial Omega. Barcelona.
- Nogales, E., Downing, K.H., Amos, L.A. y Löwe, J. 1998. Tubulin and FtsZ form a distinct family of GTPases. Nature. 5:451-458.
- Nova, E., Montecinos, F., Brunet J.E., Lagos, R. y Monasterio, O. 2007. 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) induces bundling of Escherichia coli FtsZ polymers inhibiting the GTPase activity. Archives of Biochemistry and Biophysics. 465:315-319
- Oliva, M.A., Huecas, S., Palacios, J.M., Martín-Benito, J., Valpuesta, J.M., Andreu, J.M. 2003. Assembly of Archaeal Cell Division Protein FtsZ and a GTPase-inactive Mutant into Double-stranded Filaments. Journal of Biological Chemistry. 278:33562-33570.
- Oliva, M.A., Trambaioli, D. y Löwe, J. 2007. Structural Insights into the Conformational Variability of FtsZ. Journal of Molecular Biology. 373:1229-1242
- Oosawa F., y Asakura, S. 1975. Thermodynamics of the Polymerization of Protein. Horecker, B., Kaplan, N.O., Marmur, J. y Scheraga, H.A. (eds), pp 28-32. Academic Press. London.
- Osawa, M., Anderson, D.E., y Erickson, H.P. 2008. Reconstitution of Contractile FtsZ Rings in Liposomes. Science. 320:792-794.
- Osawa, M. y Erickson, H.P. 2011. Inside-out Z rings - constriction with and without GTP hydrolysis. Molecular Microbiology. 81:571-579.
- Pichoff, S and Lutkenhaus, J. 2002. Unique and overlapping roles for ZipA and FtsA in septal ring assembly in Escherichia coli. EMBO J. 21:685-693.

- Popp, D., Iwasa, M., Erickson, H.P., Narita, A., Maéda, Y. y Robinson, R.C. 2010. Suprastructures and Dynamics Properties of Mycobacterium tuberculosis FtsZ. *The Journal of Biological Chemistry*. 285:11281-11289.
- RayChaudhuri, D. y Park, J.T. 1992. Escherichia coli cell-division gene ftsZ encodes a novel GTP-binding protein. *Nature*. 359:251-254.
- Romberg, L., y Mitchison, T.J. 2004. Rate-Limiting Guanosine 5'-Triphosphate Hydrolysis during Nucleotide Turnover by FtsZ, a Prokaryotic Tubulin Homologue Involved in Bacterial Cell Division. *Biochemistry*. 43:282-288.
- Scheffers, D., de Wit, J.G., den Blaauwen, T, y Driesen A.J.M. 2002. GTP Hydrolysis of Cell Division Proteina FtsZ: Evidence that the Active Site Is Formes bt the Association of Monomers. *Biochemistry*. 41:521-529.
- Sosong, T.M., Brigham-Burke, M.R., Hensley, P. and Pearce, K.H. 1999. Self-Activation of Guanosine Triphosphatase Activity by Oligomerization of the Bacterial Cell Division Protein FtsZ. *Biochemistry* 38:14843-14850
- Stricker, J., Maddox, P., Salmon, E. D., y Erickson, H.P. 2002. Rapid assembly dynamics of the Escherichia coli FtsZ-ring demonstrated by fluorescence recovery after photobleaching. *PNAS* 99:3171-3175.
- Vicente, M., Rico M.I., Martínez-Arteaga, R. y Mingorance, J. 2006. Minireview. Septum Enlightenment: Assembly of bacterial Division Proteins. *Journal of Bacteriology*. 188:19-27.
- Weinstein, D. 2009. Determinación de la interacción de FtsA con FtsZ y su influencia sobre la actividad ATPásica de una preparación de FtsA. Seminario de título para optar al título de Ingeniería en Biotecnología Molecular. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.



## ANEXO.

**Ecuación de Arrhenius.** El cambio en la velocidad de una reacción con la temperatura se suele presentar mediante el gráfico de Arrhenius, cuya ecuación determinada empíricamente para reacciones gaseosas [5] nos permite determinar la energía de activación de la reacción catalizada en un rango de temperaturas en el cual no ocurra denaturación o degradación de la enzima o sustrato.

$$k = A \cdot e^{-(E_a/RT)} \quad [5]$$

donde  $k$  es la constante de velocidad de primer orden,  $A$  es el factor pre-exponencial,  $E_a$  es la energía de activación,  $R$  es la constante de los gases y  $T$  es la temperatura absoluta (Daniel y Danson, 2001). Según este modelo de reacciones gaseosas, del total de colisiones, solo una parte equivalente a  $e^{-(E_a/RT)}$  poseerá una energía igual o mayor a  $E_a$  y dependiendo de la orientación de la colisión, podrá generar productos (Castellan, 1983). Clásicamente se utiliza una linealización de la ecuación de Arrhenius para determinar el valor de  $E_a$  (2).

$$\ln(k) = -\frac{E_a}{R} \left(\frac{1}{T}\right) + \ln(A) \quad [6]$$

Conocer la  $E_a$  de los distintos pasos de una reacción global (o reacciones acopladas) es importante para la determinación del paso limitante de la reacción y de esta manera proponer mecanismos basados en evidencia cinética.

**Teoría del estado de transición.** La teoría del estado de transición (TET) es un modelo cinético de las reacciones químicas a partir del cual se pueden determinar parámetros termodinámicos. Establece que en el estado basal, los reactantes colisionan y avanzan en la coordenada de reacción hacia la formación de productos a

través de un estado de transición (ET). Se define como estado de transición (ET) al agregado molecular más inestable (de mayor energía) previo a la formación de productos. Se define también una región de la superficie de potencial cercana al ET, denominada complejo activado.

Para una derivación matemática de la TET ver libros de fisicoquímica y termodinámica estadística (Atkins y Paula, 2006; Gupta, 1990; Castellan, 1983). Para una derivación más intuitiva ver libros de bioquímica (Fersht, 1999; Nelson y Cox, 2006). Acá se presentan sólo los aspectos teóricos, ecuaciones y supuestos más importantes.

En esta teoría se asume que el estado de transición está en equilibrio con los reactantes:



Donde  $A$  y  $B$  son reactantes,  $X^\ddagger$  el estado de transición y  $P$  es producto. Por lo tanto podemos describir una constante de equilibrio  $K^\ddagger$ :

$$K^\ddagger = \frac{[X^\ddagger]}{[A][B]} \quad [8]$$

La TET supone también que el paso limitante de la reacción es el paso del estado de transición a productos. Por lo tanto la velocidad global de la reacción es igual a la velocidad de la descomposición unimolecular del ET. Por otro lado, si los movimientos de tipo vibracional a lo largo del eje de reacción ocurren con una frecuencia  $\nu$ , entonces el complejo activado se aproxima al ET con la misma frecuencia. Sin embargo, es posible que no todas oscilaciones del complejo activado generen un ET, por lo tanto se asume que la velocidad de formación del ET a partir del complejo activado es proporcional a la frecuencia de oscilación. La constante de

proporcionalidad se denomina el coeficiente de transmisión ( $\kappa$ ). Considerando todo lo anterior se obtiene la ecuación de Eyring:

$$k_2 = \kappa \cdot \frac{k_B T}{h} \mathcal{K}_c^\ddagger \quad [9]$$

donde  $k_2$  es la constante de velocidad bimolecular,  $k_B$  es la constante de Boltzman,  $T$  la temperatura,  $h$  la constante de Plank y  $\mathcal{K}_c^\ddagger$  la constante de equilibrio derivada de las funciones de partición de las especies involucradas, sin una vibración del ET.

Se asume que esta constante  $\mathcal{K}_c^\ddagger$  es la constante de equilibrio de la reacción  $K^\ddagger$  y se expresa en función de la energía libre del estado de transición [ecuación 10]. Para determinar valores de entalpía del ET ( $\Delta H^\ddagger$ ) y entropía del ET ( $\Delta S^\ddagger$ ), se expresa la energía libre del ET ( $\Delta G^\ddagger$ ) en función de estos parámetros y se linealiza la ecuación mediante logaritmo natural [ecuación 11].

$$k_2 = \kappa \cdot \frac{k_B T}{h} \cdot e^{-\Delta G^\ddagger/RT} \quad [10]$$

$$\ln\left(\frac{k}{T}\right) = -\left(\frac{\Delta H^\ddagger}{R}\right)\frac{1}{T} + \left(\ln\left(\frac{\kappa k_B}{h}\right) + \frac{\Delta S^\ddagger}{R}\right) \quad [11]$$

El coeficiente de transmisión ( $\kappa$ ) se asume igual a 1 para reacciones simples, pero puede atenuarse en reacciones complejas por la viscosidad del medio o el tipo de reactantes involucrados. Sin embargo es ampliamente aceptado y utilizado un  $\kappa$  de 1 para reacciones enzimáticas y así obtener parámetros aparentes que permiten comparaciones entre sistemas similares (Fersht, 1999).