



UNIVERSIDAD DE CHILE

**Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas**

**Programa de Doctorado en Bioquímica**

**TITULO DEL PROYECTO DE TESIS:**

**Estudio de la dinámica, termodinámica y resistencia mecánica del complejo FtsZ-ZipA de *Escherichia coli*.**

**Valentina Constanza Carrasco Grimaldi**

**DIRECTORES DE TESIS**

Dr. Octavio Monasterio Opazo

Dr. Christian A.M. Wilson

Santiago – Chile 2022

Firmas de los directores de tesis y la estudiante

Octavio Monasterio



Christian A.M. Wilson



Valentina Carrasco

## PRODUCTOS GENERADOS DURANTE LA TESIS

### Publicaciones:

“Mechanical resistance of the FtsZ-ZipA complex of *Escherichia coli*, measured by rupture force experiments, supports a highly dynamic protein interaction in the divisome”. Valentina Carrasco, Camilo Berríos-Pastén, Alexis Órdenes, Christian A.M. Wilson & Octavio Monasterio. BBA General subjects, en preparación.

“Determination of Protein-Protein Interactions at the single-molecule level Using Optical Tweezers” Sánchez WN, Robeson L, Carrasco V, Figueroa NL, Burgos-Bravo F, Wilson CAM, Casanova-Morales N. Q Rev Biophys. 2022 Aug 10;55:e8. doi: 10.1017/S0033583522000075.

### Presentación a congreso:

V. Carrasco, C. Berríos-Pastén, C.A.M. Wilson, O. Monasterio “Biophysical characterization of the FtsZ-ZipA complex of *E. coli*, using *in multiplo* and *in singulo* approaches”. XLIV reunión anual Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile. Santiago de Chile, 26-28 de octubre, 2021.

## PREMIO RECIBIDO ASOCIADO A ESTA TESIS

IUBMB-SBBMCH Award Outstanding oral presentation. XLIV reunión anual Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile. Santiago de Chile, 26-28 de octubre, 2021.

## FONDOS CONCURSABLES ADJUDICADOS POR LA TESISTA

Proyecto INACH Apoyo a Tesis de Posgrado en Temas Antárticos DG\_19-19

Gastos Operacionales asociados a Beca de Doctorado Nacional CONICYT número 21180872

## ÍNDICE GENERAL

GLOSARIO.....	6
ÍNDICE DE FIGURAS .....	7
ÍNDICE DE TABLAS.....	9
RESUMEN .....	10
ABSTRACT .....	12
1. INTRODUCCIÓN.....	14
1.1 El divisoma y su rol en la división celular bacteriana .....	14
1.2 Estructura y función de la proteína FtsZ .....	15
1.3 El protoanillo está formado por las proteínas FtsZ, FtsA y ZipA .....	17
1.4 Estructura y función de la proteína ZipA .....	18
1.5 Bases de la interacción entre FtsZ y ZipA.....	19
1.6 FtsZ puede ejercer un rol en la generación de la fuerza de constricción durante la división bacteriana.....	20
2. HIPÓTESIS.....	23
3. OBJETIVOS.....	24
3.1 OJETIVO GENERAL.....	24
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	24
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
4.1 Modelamiento molecular y minimización de la proteína FtsZ.....	25
4.2 Dinámica molecular de FtsZ.....	26
4.3 <i>Steered Molecular Dynamics</i> de FtsZ y ZipA .....	27
4.4 Reactivos y protocolos generales .....	27
4.4.1 Cuantificación de proteínas .....	27
4.4.2 Crecimiento bacteriano .....	28
Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	28
<i>Western blot</i> o inmunoblot .....	28
4.5 Purificación y caracterización de las proteínas .....	29
4.5.1 Purificación de FtsZ .....	29
4.5.2 Ensayo de polimerización de FtsZ:.....	31
4.5.3 Slot blot anti FtsZ.....	31
4.5.4 <i>Western blot</i> Anti FtsZ .....	32
4.5.5 Purificación de sZipA .....	33

4.5.6	<i>Western blot</i> anti ZipA.....	34
4.6	Calorimetría de Titulación Isotérmica.....	35
4.7	Pinza Óptica.....	35
4.7.1	Derivatización de las esferas de poliestireno.....	37
4.7.2	Mediciones en pinza óptica.....	39
4.7.3	Procesamiento y análisis de los datos y análisis de los resultados. ....	41
5.	RESULTADOS .....	45
5.1	Purificación y caracterización de proteínas.....	45
5.1.2	Purificación y caracterización de FtsZ .....	45
5.1.3	Purificación y caracterización de sZipA .....	49
5.2	Objetivo específico 1: Determinar $\Delta G^{\circ}$ , $\Delta H^{\circ}$ y $\Delta S^{\circ}$ de la asociación de FtsZ-ZipA.....	52
5.3	Objetivo específico 2: Determinar, el tiempo de residencia y la resistencia mecánica de FtsZ-ZipA.....	55
5.3.1	Selección de anticuerpo anti FtsZ.....	56
5.3.2	Determinación de la frecuencia de la interacción entre FtsZ-sZipA.....	57
5.3.3	Determinación de la fuerza de ruptura entre FtsZ-sZipA. ....	58
5.3.4	Determinación del tiempo de residencia, distancia al estado de transición y energía libre del estado de transición. ....	62
5.3.5	Probabilidad de ruptura de la interacción FtsZ-sZipA .....	63
5.4	Objetivo específico 3: Correlacionar las medidas de fuerza con las medidas termodinámicas y dinámicas del complejo FtsZ-ZipA .....	66
5.4.1	Ensamblaje del complejo FtsZ y ZipA.....	66
5.4.2	<i>Steered Molecular Dynamic</i> del complejo FtsZ-ZipA .....	67
6.	DISCUSIÓN.....	77
7.	CONCLUSIONES .....	89
8.	PROYECCIONES.....	91
9.	REFERENCIAS .....	92

## GLOSARIO

6xHis: Polihistidina

AAS: Área accesible al solvente

CDM: Centros de masas

DMP: N,N-dimetilformamida.

DO: Densidad óptica

FEL: *Free energy landscape* o panorama de energía libre

FtsZ: *Filamenting thermosensitive Z*

GTP: Guanosina trifosfato.

ITC: Calorimetría de titulación isotérmica

LCT: *linker* C-terminal de FtsZ

OE: Objetivo específico

PCT: Péptido C-terminal de FtsZ

RID: Región intrínsecamente desordenada

SDS-PAGE: Electroferesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio.

SMD: *Steered molecular dynamics*

sZipA: ZipA soluble sin la región N-terminal transmembrana (27-328)

WB: *western blot*

ZipA: *FtsZ interacting protein A*

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema del divisoma de una bacteria gran negativa .....	15
Figura 2. Interacción entre FtsZ y ZipA .....	16
Figura 3. FtsZ forma protofilamentos que interactúan lateralmente entre sí. ....	17
Figura 4. Configuración de los experimentos de fuerza llevados a cabo en pinza óptica.....	37
Figura 5. Interacciones medidas en los experimentos en Pinza Óptica. ....	41
Figura 6: Modelo de histograma de fuerzas de ruptura.....	42
Figura 7. Geles de SDS-PAGE al 10 % de fracción de FtsZ.....	46
Figura 8 Western blot anti FtsZ marca Abcam .....	47
Figura 9 Western blot anti FtsZ monoclonal anti N-terminal.....	47
Figura 11 Geles SDS-PAGE 10 % sZipA purificada.....	50
Figura 12 Western blot anti Poli-histidina .....	51
Figura 13 Isotermograma de la titulación de ZipA con FtsZ. ....	53
Figura 14: Slot blot de anticuerpos contra FtsZ de E. coli. ....	56
Figura 15: Frecuencia de adhesión (%) de los experimentos en Pinza Óptica. ....	57
Figura 16 Histogramas de distribución de fuerzas de experimentos en pinza óptica. ....	59
Figura 17 Fuerzas de ruptura entre FtsZ y sZipA por pinza óptica sin interacciones inespecíficas. A Histograma de fuerzas de ruptura entre FtsZ y ZipA.. B Ajuste Gaussiano de fuerzas de ruptura entre FtsZ y ZipA. ....	61
obtuvo un $R^2$ de 0.9835 y la fuerza promedio obtenida fue $27.51 \pm 1.15$ pN. ....	61
Figura 18 Gráfico de Fuerza de Ruptura vs tiempo de la interacción FtsZ-ZipA determinado por Pinza Óptica. ....	62
Figura 19: Probabilidad de ruptura de la interacción FtsZ-sZipA determinado por pinza óptica .....	64
Figura 20 Diagrama de energía libre del modelo de FtsZ. ....	67
Figura 21 Trazas de fuerza y energía vs tiempo de la disociación de FtsZ-ZipA por SMD .....	69
Figura 22. Imágenes del complejo FtsZ-ZipA en momentos clave durante la dinámica molecular SMD.....	71
Figura 23. Distancia entre C-terminal ZipA y C-terminal FtsZ durante las simulaciones por SMD.....	72

Figura 24. Área accesible al solvente de la disociación entre C-terminal de FtsZ y C-terminal de ZipA por SMD .....	75
Figura 25. Esquema de la interacción FtsZ-ZipA de acuerdo a la literatura y a los hallazgos obtenidos en esta tesis.....	90

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Parámetros termodinámicos de la interacción FtsZ y sZipA obtenidos por medio de calorimetría de titulación isotérmica.....	54
Tabla 2 Frecuencia de adhesión entre esferas usadas en los experimentos en Pinza Óptica.....	58
Tabla 4 Resumen de los parámetros <i>in singulo</i> de la interacción FtsZ-ZipA obtenidos mediante los modelos DHS y CHS.....	63
Tabla 5. Fuerza vs tiempo de los momentos más relevantes de la disociación del C-terminal de FtsZ y C-terminal de ZipA por SMD .....	70
Tabla 6 Distancia entre los centros de masa y aminoácidos más importantes para la interacción C-terminal ZipA y C-terminal FtsZ durante las simulaciones por SMD	73
Tabla 7: Referencias de constante de disociación del complejo FtsZ-ZipA.....	78

## RESUMEN

El divisoma está compuesto por alrededor de veinte proteínas que en conjunto llevan a cabo la división celular en la mayoría de los microorganismos. El ensamblaje y desensamblaje de las proteínas del divisoma es un proceso altamente dinámico y ordenado, por lo que es de vital importancia la unión de las primeras proteínas. FtsZ es una proteína citosólica y la primera en ensamblarse en el divisoma y es anclada a la membrana de la bacteria por la proteína bitópica ZipA. FtsZ polimeriza para formar estructuras llamadas protofilamentos en el ecuador de la bacteria, que dan origen al anillo Z. La torción y curvatura de los protofilamentos de FtsZ, generan fuerza y se ha propuesto que esta fuerza puede tener un rol en la estrangulación de la bacteria durante la división. A pesar de lo anterior, no se ha estudiado como el recambio dinámico de proteínas en el divisoma, particularmente la asociación y disociación de FtsZ a su proteína ancla ZipA podría ser compatible con un rol generador de fuerza. De esta manera, se plantea la siguiente hipótesis: Los valores termodinámicos, la fuerza de disociación y la naturaleza de la interacción de FtsZ con ZipA son concordantes con la fuerza ejercida por el anillo Z para la invaginación de la membrana citoplasmática en *Escherichia coli*. Para comprobar esta hipótesis: 1) se simuló la disociación del complejo por medio de una separación mecánica con el uso de SMD, 2) se determinó la probabilidad de ruptura de la interacción por pinza óptica y se determinaron los parámetros estructurales (distancia al estado de transición de  $0,287 \pm 0,029$  nm) y cinéticos ( $k_{\text{off}}$   $0,082 \pm 0,005$  s<sup>-1</sup> y  $\tau$   $12,2 \pm 0,7$  s) del complejo y 3) mediante ITC se midieron los parámetros termodinámicos ( $\Delta S^{\circ}$   $-8,50 \pm 0,91$ ,  $-T\Delta S^{\circ}$   $-5,63 \pm 0,60$  kcal/mol y  $\Delta H^{\circ}$   $-2,86 \pm 0,31$  kcal/mol,  $\Delta G^{\ddagger}$   $2,40 \pm 0,74$ ). Se concluyó que la interacción FtsZ-ZipA está dominada

por un cambio entrópico más bien que entálpico y es lo suficientemente lábil para permitir el intercambio dinámico de FtsZ y ZipA durante la división bacteriana. Se encontró que un solo complejo FtsZ-ZipA no es suficiente para resistir la fuerza generada por los protofilamentos de FtsZ para invaginar la membrana. Por ende, calculamos que al menos un bloque de ocho moléculas de ZipA, ancladas a un protofilamento, serían necesarias para transmitir la fuerza generada por la torción de un protofilamento sobre la membrana, en el sitio de septación.

## ABSTRACT

The divisome is formed by about twenty proteins that together carry out cell division in most microorganisms. The assembly and disassembly of the divisome proteins is a highly dynamic and order process, therefore the binding of the first proteins is extremely relevant. FtsZ is a cytosolic protein and the first to assemble into the divisome, it is anchored to the membrane of bacterium by the bitopic protein ZipA. FtsZ polymerizes at the equator of the cell to form structures called protofilaments, these in turn form the Z ring. The torsion and curvature of the protofilaments of FtsZ generate a force that has been proposed to have a role in bacteria septation during division. Nevertheless, how the dynamic exchange of the divisome proteins, specifically the association and dissociation of FtsZ to the anchor protein ZipA may be compatible with a force generating role has not been elucidated yet. Therefore, we hypothesize that the thermodynamic values, the dissociation force and the nature of the interaction between FtsZ and ZipA are in agreement with the force exerted by the Z ring for membrane invagination. To prove this hypothesis: 1) The dissociation of the complex by mechanical pulling was simulated by SMD, 2) The rupture probability, structural (Distance from bound state to transition state  $0,287 \pm 0,029$  nm) and kinetic  $k_{off}$  ( $0,082 \pm 0,005$  s<sup>-1</sup> y  $\tau$   $12,2 \pm 0,7$  s) parameters of FtsZ-ZipA complex were determined by optical tweezers and 3) The thermodynamic parameters ( $\Delta S^{\circ}$   $-8,50 \pm 0,91$ ,  $-T\Delta S^{\circ}$   $-5,63 \pm 0,60$  kcal/mol y  $\Delta H^{\circ}$   $-2,86 \pm 0,31$  kcal/mol,  $\Delta G^{\ddagger}$   $2,40 \pm 0,74$ ) were determined by ITC. We conclude that the FtsZ-ZipA is dominated by an entropic change and is labile enough to allow the dynamic association between FtsZ and ZipA during bacterial cell division. We found that one

FtsZ-ZipA complex is not enough to tolerate the force generated by FtsZ protofilaments to invaginate the membrane. We calculate that at least a block of eight ZipA molecules anchored to a protofilament are enough to transfer the force generated by the twisting and turning of FtsZ to the membrane at the division site.

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1 El divisoma y su rol en la división celular bacteriana**

Uno de los complejos proteicos más conservados y transversales en los microorganismos es el formado por las proteínas de la división celular. Este proceso, también conocido como citoquinesis bacteriana, consiste en la división de la célula por fisión, generando dos células hijas con dos nuevos polos celulares<sup>1</sup>. Para lograr esto, las capas de la envoltura celular deben ser remodeladas durante la división, lo cual es llevado a cabo por el llamado divisoma.

El divisoma, es un complejo de múltiples proteínas de intercambio muy dinámico<sup>2</sup>, el cual sintetiza los componentes necesarios para la envoltura celular en el ecuador de la bacteria, en el caso de bacterias Gram negativas, los componentes de la envoltura celular son desde adentro hacia fuera: la membrana citoplasmática, una única capa de peptidoglicano embebido en el espacio citoplasmático y la membrana externa<sup>3</sup> (Fig. 1).

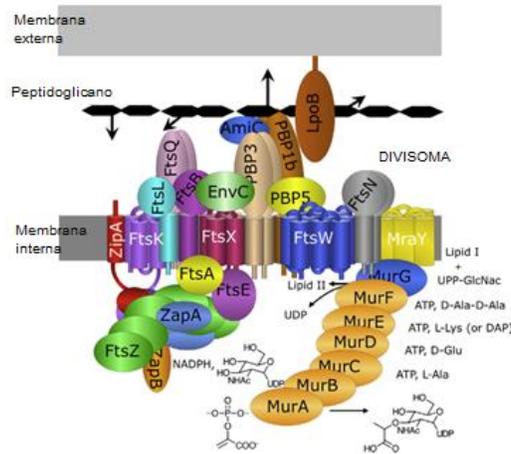


Figura 1. Esquema del divisoma de una bacteria gran negativa. Se muestran la membrana citosólica y membrana externa, en medio el espacio periplasmático y la monocapa de peptidoglicano. FtsZ polimeriza y se ancla a la membrana por ZipA y FtsA. El resto de las proteínas y enzimas del divisoma se ensambla de manera jerárquica para finalmente dar lugar a la síntesis de péptido glicano. Modificado de den Blaauwen et. al<sup>4</sup>

## 1.2 Estructura y función de la proteína FtsZ

FtsZ (de sus siglas en inglés, *Filamenting temperature sensitive Z*), codificada por el gen *ftsZ*<sup>5</sup>, es una proteína citosólica y es la primera de las proteínas del divisoma en ensamblarse<sup>6</sup>. El rol de FtsZ en el divisoma es tan relevante que ha sido propuesta como blanco para desarrollo de antibióticos<sup>7</sup>. FtsZ es una proteína de 40 kDa cuya estructura tridimensional en *E. coli* fue determinada por primera vez en 2020<sup>8</sup>. FtsZ se encuentra conservada en bacterias, arqueas y también en cloroplastos y mitocondrias de algunos organismos eucariotas<sup>5,9,10</sup> y es análoga a tubulina de eucariontes<sup>11</sup>. Estructuralmente FtsZ está formada por tres regiones principales, un *core* compuesto de un dominio N-terminal (aminoácidos 1-220) y un dominio C-terminal (aminoácidos 223-314), una región intrínscamente

desordenada (RID) también conocida como *linker* C-terminal (LCT) (aminoácidos 315-366) y un péptido C-terminal (PCT) (aminoácidos 367-383) (Fig. 2<sup>a</sup>).

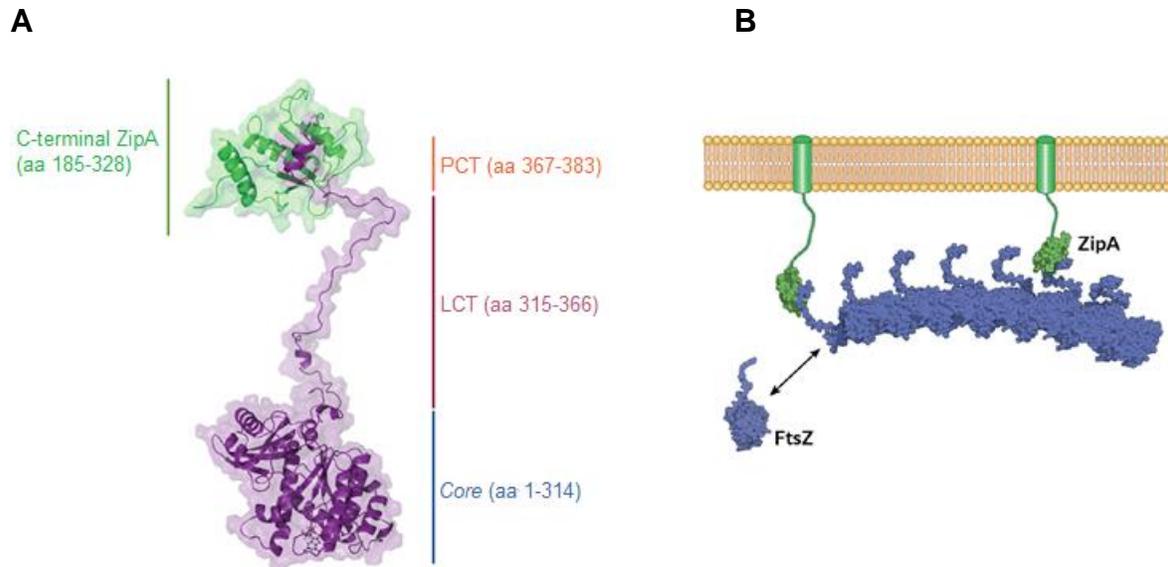


Figura 2. Interacción entre FtsZ y ZipA. **A.** En verde el dominio C-terminal globular de ZipA, en morado FtsZ y sus unidades estructurales PCT (Péptido C-terminal), LTC (*linker* C-terminal) y Core. **B.** ZipA anclada a la membrana citosólica por su dominio N-terminal transmembrana y la interacción de su dominio C-terminal con el PCT de FtsZ de un protofilamento. Las imágenes fueron construidas a partir de modelos PDB, para más detalle revisar la metodología.

La proteína FtsZ polimeriza cuando está unida a GTP, formando un protofilamento, varios de estos protofilamentos interactúan lateralmente entre sí y forman una estructura andamio, conocida como anillo Z<sup>12</sup> (Fig. 3), sobre el cual se van uniendo de manera jerárquica el resto de las proteínas del divisoma<sup>13,14</sup>. El ensamblaje y desensamblaje del divisoma se ha descrito como un proceso muy dinámico, lo que significa que el recambio de FtsZ en los protofilamentos, así como la asociación y disociación de las proteínas que forman este complejo es rápido. El tiempo de vida media del anillo Z en *E. coli*, determinado por FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*) y FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) es entre 7 y 30 segundos<sup>11,15</sup>.

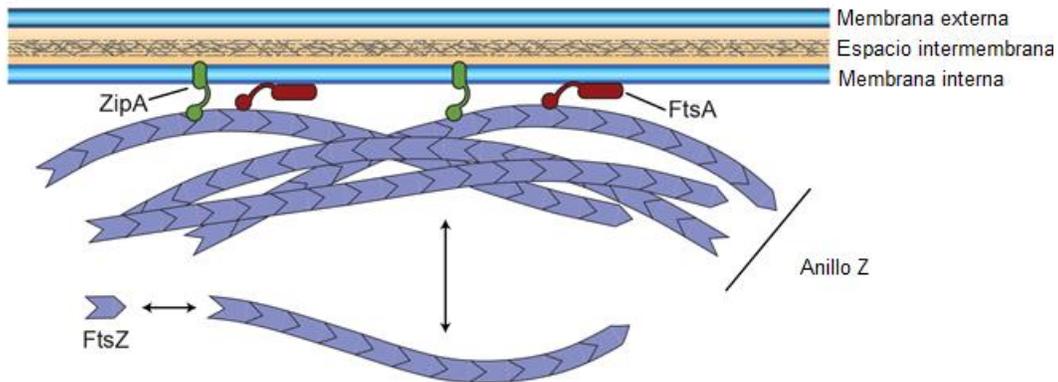


Figura 3. FtsZ forma protofilamentos que interactúan lateralmente entre sí. Los protofilamentos son anclados a la membrana interna de la bacteria por FtsA y ZipA.

La hidrólisis de GTP induce el desensamblaje de los polímeros<sup>16</sup>. Este ensamblaje y desensamblaje de polímeros de FtsZ provoca que estos se alarguen por el extremo donde hay polimerización y se acorten por el extremo donde hay una menor despolimerización. *Treadmilling* se le llama a la elongación de los protofilamentos de FtsZ a lo largo del ecuador de la bacteria, impulsado por la polimerización y despolimerización<sup>17</sup>, esto en semejanza a las máquinas caminadoras o *treadmillers*. Así a medida que los protofilamentos van cubriendo nuevas regiones de la membrana citosólica, se van armando divisomas, lo que genera la síntesis del peptidoglicano alrededor del sitio de septación, para formar los nuevos polos de las células hijas. Es por este motivo que el divisoma se reconoce como un complejo dinámico.

### 1.3 El protoanillo está formado por las proteínas FtsZ, FtsA y ZipA

Luego de la formación del anillo-Z ( $FtsZ_n$ ), se reclutan dos proteínas al divisoma, una de sus funciones es anclar los protofilamentos de FtsZ a la membrana citoplasmática, por su cara interna, estas son FtsA y ZipA, el complejo  $FtsZ_n$ -FtsA o

FtsZ<sub>n</sub>-ZipA se conoce como proto-anillo<sup>6</sup>. Tanto FtsA como ZipA interactúan con el dominio CTP de FtsZ, de manera independiente<sup>18-20</sup>. FtsA tiene una hélice anfipática en su extremo N-terminal y por medio de esta se asocia a la membrana citoplasmática y ZipA es una proteína de paso único de transmembrana que, a través de una hélice, que forma parte de su extremo N-terminal, se une a la membrana<sup>2,21</sup> (Fig. 2). Así, al unirse a FtsZ y dar origen al anillo Z se establece el sitio de la división al interior de la membrana donde se unirán en forma secuencial las otras proteínas que forman parte del divisoma<sup>6</sup>. Una porción de ellas lo hará por el lado periplasmático para sintetizar el nuevo peptidoglicano de la envoltura celular<sup>22</sup>.

#### **1.4 Estructura y función de la proteína ZipA**

ZipA (de sus siglas en inglés, *Z interacting protein A*) fue identificada en *E. coli* como una proteína de 36,4 kDa que interactúa con FtsZ<sup>11</sup>. *In vivo*, ZipA es 10 a 100 veces menos abundante que FtsZ<sup>23</sup> y es esencial para la división en *E. coli* y su secuencia primaria no es muy conservada, solo se encuentra presente en algunas bacterias Gram negativas, en bacterias Gram positivas esta función puede ser reemplazada por FtsA o por otras proteínas como SepF<sup>22,24</sup>. Estructuralmente tiene una región N-terminal anclada a la membrana (residuos 1-25) seguida hacia su extremo C-terminal por una gran región citoplasmática que consiste en dos dominios, uno rico en Prolina y Glutamina (residuos 26-184) y un dominio globular C-terminal (residuos 185-328)<sup>22,25,26</sup>. ZipA se localiza en el anillo Z de manera FtsZ dependiente y FtsA independiente<sup>11</sup> y su tiempo de vida media en el sitio del septo determinado por

FRAP es 27,9 s<sup>11</sup>. La dinámica de localización de ZipA es muy similar a la de FtsZ, solo un 30 % del *pool* de ZipA se encuentra en el sitio de la división, además existe un constante intercambio de proteínas entre las asociadas al anillo Z y el *pool* externo<sup>25-27</sup>. ZipA es requerida para el reclutamiento de varias proteínas al sitio del septo<sup>28</sup> y ejerce una función regulatoria de enzimas con actividad glicosiltransferasa<sup>29,30</sup>. También estabiliza tanto la unión de GTP a FtsZ, como al anillo Z<sup>31,32</sup>, lo que promueve la formación de manojos de protofilamentos *in vitro*<sup>31,33</sup>, los cuales son estructuras formadas por interacciones laterales entre los protofilamentos<sup>34</sup>. En cuanto a una caracterización más biofísica de la interacción entre FtsZ y ZipA, se ha determinado la constante de disociación de la interacción de FtsZ y ZipA en nuestro laboratorio por medio de anisotropía de fluorescencia (Tesis de Alexis Órdenes<sup>35</sup>). La constante de disociación del complejo FtsZ-ZipA en liposomas es de  $1,39 \pm 0,20 \mu\text{M}$  y la constante con ZipA solubilizada en detergente es  $1,72 \pm 0,10 \mu\text{M}$ ). En ese trabajo se concluyó que la sección transmembrana de FtsZ no tiene un rol en la interacción entre FtsZ y ZipA.

### **1.5 Bases de la interacción entre FtsZ y ZipA**

Tanto FtsZ como ZipA interactúan a través de sus extremos C-terminal, estas regiones de ambas proteínas son ricas en aminoácidos hidrófobos<sup>33</sup>. Los residuos Asp370, Tyr371, Leu372, Ile374, Phe377, Leu378 y Gln381 del CTP de FtsZ son los que interactúan con ZipA y los que tienen un rol más crucial en la interacción son principalmente Ile374, Phe377 y Leu378 y también Asp370. En el caso de ZipA los residuos Val194, Ile196, Ala246, Thr267, Phe269, Met226, Ile228, Met248,

Val249, Lys250y Arg305 son los que participan en la interacción. En general la interacción entre ZipA y FtsZ se basa en ocultar dos superficies hidrófobas expuestas por lo que hay un rol importante de los residuos hidrofóbicos en la interacción<sup>3</sup>. También hay formación de puentes de hidrógeno al generarse el complejo FtsZ-ZipA en estas interacciones participan átomos del esqueleto peptídico entre los residuos Asp370 y Leu372 de FtsZ y Lys250 y Met248 de ZipA<sup>18,36</sup>.

Si bien la interacción FtsZ-ZipA se encuentra bien caracterizada en algunos aspectos estructurales y funcionales, aún queda por resolver los parámetros termodinámicos de su asociación. Particularmente detalles de si la interacción está balanceada hacia una dominancia entrópica o entálpica aún no se han averiguado. En base a la información estructural del complejo FtsZ-ZipA, es de suponer que la salida de solvente de la cavidad de ZipA y la desolvatación de la hélice C-terminal de FtsZ jueguen un rol crucial en la formación del complejo, lo cual ha sido observado en estudios bioinformáticos de la interacción de estas dos proteínas<sup>36</sup>.

### **1.6 FtsZ puede ejercer un rol en la generación de la fuerza de constricción durante la división bacteriana**

Un tema muy relevante y que aún no ha sido resuelto en el campo de la división bacteriana es el origen de la fuerza de constricción que es necesaria para iniciar la septación de la bacteria en el sitio de división, donde FtsZ y ZipA podrían jugar un rol fundamental<sup>37,38</sup>. Se ha reportado que FtsZ es una proteína generadora de fuerza<sup>39</sup>, la que estaría dada por la transición de una conformación recta a una curva

de FtsZ en los protofilamentos<sup>40</sup>. En un trabajo de Osawa et al<sup>37</sup> se fabricó una mutante de FtsZ en que a su región C-terminal se le quitó el CTP que interactúa con FtsA y ZipA y se reemplazó con una hélice anfipática, así se generó una FtsZ capaz de asociarse directamente a la membrana. En este trabajo se observó que en presencia de GTP se produce una curvatura en la membrana, posteriormente se calculó la magnitud de esta fuerza utilizando diversos modelos matemáticos y computacionales, con los que se determinó que la fuerza ejercida por los protofilamentos de FtsZ en estas condiciones está en el rango de los 45 a 100 pN<sup>41,42,43,44</sup>. Esta fuerza tendría un rol en la invaginación de la membrana citosólica durante la división bacteriana. Es importante notar que, en estas determinaciones de fuerza, no se ha estudiado el rol de las proteínas anclas, el cual es fundamental ya que es a través de ellas que la fuerza generada por los protofilamentos debe ser transmitida hacia la membrana. Particularmente ZipA podría tener un rol más protagónico en la transmisión de fuerza que FtsA, pues se ha visto que FtsA a diferencia de ZipA es capaz de formar estructuras tipo anillos, las cuales son antagónicas a la interacción entre filamentos de FtsZ<sup>3</sup>, lo que perjudicaría la generación de fuerzas de mayor magnitud que podrían generarse por manojos de protofilamentos.

En general la determinación de las fuerzas involucradas en procesos biológicos es sumamente relevante debido a que las macromoléculas se encuentran en condiciones fuera de equilibrio sometidas a factores como presión osmótica, sobre poblamiento (*crowding*) molecular y presencia de fuerzas. Particularmente en el caso de la división bacteriana cobra relevancia medir las fuerzas involucradas en el

proceso debido a que permitiría dilucidar cómo ocurre el mecanismo de la constricción de la bacteria, además estudios de medición directa de fuerza aún no se han llevado a cabo en el divisoma. De esta manera al medir las fuerzas involucradas en la interacción FtsZ-ZipA permitirá validar la posibilidad de que la fuerza ejercida por los protofilamentos de FtsZ tenga un rol en la formación del septo bacteriano. También, se sabe que el divisoma es un complejo muy dinámico tanto en el ensamblaje y desensamblaje como en la actividad enzimática que lleva a la síntesis de peptidoglicano, sin embargo, todas las determinaciones del recambio de proteínas en este complejo han sido realizadas por técnicas *in multiplo*. Se sabe que medidas *in multiplo* pueden enmascarar comportamientos individuales de las moléculas que se pierden en el cálculo del promedio, por lo que medidas *in singulo* podrían complementar la información acerca de si las primeras interacciones proteicas que se establecen en el divisoma son efectivamente dinámicas. Sumado a todo lo anterior es importante considerar que la interacción FtsZ-ZipA debe ser lo suficientemente dinámica para ser compatible con la dinámica de recambio del anillo Z y del divisoma, pero aun así ser lo suficientemente estable y resistente para tolerar la fuerza ejercida por los protofilamentos de FtsZ y de este modo ser transmitida hacia la membrana citosólica a través de ZipA.

## 2. HIPÓTESIS

Los valores termodinámicos, la fuerza de disociación y la naturaleza de la interacción de FtsZ con ZipA son concordantes con la fuerza ejercida por el anillo Z para la invaginación de la membrana citoplasmática en *Escherichia coli*.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OJETIVO GENERAL**

Determinar los valores termodinámicos, tiempo de residencia y resistencia mecánica de la interacción FtsZ-ZipA de *Escherichia coli*.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

OE1: Determinar  $\Delta G^{\circ}$ ,  $\Delta H^{\circ}$  y  $\Delta S^{\circ}$  de la asociación de FtsZ-ZipA

OE2: Determinar, el tiempo de residencia y la resistencia mecánica de FtsZ-ZipA

OE3: Correlacionar las medidas de fuerza con las medidas termodinámicas y dinámicas del complejo FtsZ-ZipA

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Modelamiento molecular y minimización de la proteína FtsZ.

Todas las estructuras tridimensionales de FtsZ de diversos microorganismos que están almacenadas en el *Protein Data Bank* solo abarcan el dominio globular de FtsZ, dejando de lado la región LCT, esto es debido a que el LCT al ser una RID es imposible de resolver estructuralmente por técnicas como Cristalografía de rayos X y Resonancia magnética nuclear. También se encuentra disponible la región PCT que fue co-cristalizada junto al dominio C-terminal de ZipA de *E. coli*. Para obtener un modelo de FtsZ de *E. coli* que incluya la proteína completa fue necesario realizar una estrategia híbrida que incluyó modelado comparativo de proteínas (MCP) y modelamiento *ab initio*. Para modelar el core se utilizaron los archivos PDB ID: 6LL5 (*Klebsiella pneumoniae*), 6UNX (*Escherichia coli*), 6UMK (*Escherichia coli*), 6LL6 (*Escherichia coli*), 1OFU (*Pseudomonas aureginosa*) y 2VAW (*Pseudomonas aureginosa*), para modelar el PCT se utilizó el PDB ID: 1F47 (*Escherichia coli*) y para modelar el CTL de FtsZ se utilizó CABSfold<sup>45,46</sup>. Para esto se generaron 20 modelos. Se utilizó MODELLER v9.10<sup>47,48</sup> para ensamblar las estructuras y se generaron 100 modelos de FtsZ completa, luego se seleccionaron los mejores modelos en base al DOPE score. Posteriormente los 10 modelos se analizaron con PROCHECK<sup>49,50</sup>, MolProbity<sup>51</sup> que obtuviera menores advertencias y QMEANDisCo<sup>52</sup> que diera el mejor coeficiente Q, de esta forma se seleccionó el mejor modelo.

## 4.2 Dinámica molecular de FtsZ

Para tener un modelo solvatado y estable como punto de partida para realizar SMD, se hizo dinámica molecular, para esto se utilizó GROMACS 5.1.5 con el campo de fuerza CHARMM36<sup>53</sup>. El modelo de FtsZ se insertó en el centro de una caja de forma dodecaedro, a una distancia mínima de 1.0 nm de los bordes. Se agregaron moléculas de agua con el modelo TIP3P y luego se añadieron iones Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> para neutralizar las cargas. Se ejecutó el algoritmo de minimización (*Steepest descent algorithm*) hasta que la fuerza máxima para cualquier átomo fuera menor a 10 kJ/mol nm (10 kN/mol nm o  $1,66 \times 10^8$  pN/pm), para determinar la fuerza electrostática se utilizó el método *Particle-Mesh Ewald* (PME). Para equilibrar los iones y solvente alrededor de la proteína se llevó a equilibrio con NVT y NPT a 300 K y 1 bar respectivamente. Equilibrio NVT (Número de partículas, Volumen y Temperatura constante) implica someter el sistema a 300 K hasta que la temperatura se estabilice. NPT (Número de partículas, presión y temperatura constante) significa someter el sistema a presión constante de 1 bar, lo que se monitoreó al evaluar la estabilidad de la densidad del sistema. Finalmente se realizó una dinámica molecular de 200 ns, guardando las coordenadas cada 2 ps. Se analizaron las trayectorias con Pymol (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.3.0 Schrödinger, LLC)<sup>54</sup> y el panorama de energía libre (*Free energy landscape* o FEL) se calculó con el plugin de Pymol *G Measures* v0.8<sup>55</sup>

### **4.3 Steered Molecular Dynamics de FtsZ y ZipA**

A partir de la estructura con menor energía libre del modelo de FtsZ determinada por el FEL se extrajo la región correspondiente a LCT y PCT, llamado C-terminal de FtsZ. Se obtuvo la región C-terminal de ZipA desde PDB ID: 1F47 y se acopló al PCT de FtsZ, para esto se utilizó el alineamiento estructural de PyMol y el complejo se insertó en una caja de 24x24x24 nm centrado en las coordenadas 12,12,12 nm. Se utilizó el modelo de agua TIP3P para solvatar la caja y se agregaron iones Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> para neutralizar las cargas. Se realizó la minimización de energía de la misma manera mencionada anteriormente y se llevó a equilibrio NVT y NPT. Se llevaron a cabo la simulación SMD, se tiró del C-terminal de FtsZ desde su centro de masa en dirección opuesta al C-terminal de ZipA a lo largo del eje x durante 1000 ps, con una constante de resorte 1000 kJ/mol nm<sup>2</sup> a una velocidad de 100 nm/ns.

### **4.4 Reactivos y protocolos generales**

**4.4.1 Cuantificación de proteínas:** Para determinar la concentración de FtsZ y ZipA purificadas y diluciones para pinza óptica se realizó un ensayo con el reactivo de Bradford<sup>56</sup> (BioRad #200-0205) y para los ensayos de calorimetría se cuantificó por el método de BCA<sup>57</sup> (BCA Protein Assay Kit, Pierce, #NK181370, Thermo Scientific). Todas estas mediciones se realizaron en el espectrofotómetro en modalidad placa de 96 pocillos, Epoch, Biotek utilizando como calibración una curva de BSA y un volumen final del ensayo de 150 µL.

**4.4.2 Crecimiento bacteriano:** La densidad óptica de los cultivos bacterianos fue medida a los 600 nm en el equipo Hewlett Packard Diode Array Spectrophotometer.

Purificación de plasmidios: Se utilizó el kit E.Z.N.A. Plasmid DNA Mini Kit I #D6943-01 siguiendo las instrucciones del fabricante.

**4.4.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE):** Se prepararon geles de SDS-PAGE al 12 %, en el sistema MiniGel de *Bio-Rad*, se utilizó como a una corriente de 50 mA por número de geles en el sistema de electroforesis. Se tiñeron con una solución de azul de Coomasie R350 al 0,4 %, metanol al 20 % y ácido acético al 10 % en agua nanopura y se dejó agitando toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente los geles se destiñeron agitando en una solución de metanol 20 %, y ácido acético al 10 % en agua nanopura. Los geles se analizaron con el programa GelAnalyzer 19.1 ([www.gelanalyzer.com](http://www.gelanalyzer.com)) by Istvan Lazar Jr., PhD and Istvan Lazar Sr., PhD, CSc, programa que permitió determinar la densidad de las bandas de los geles y su peso molecular aproximado.

**4.4.4 Western blot o inmunoblot<sup>58</sup>:** Se corrieron geles SDS-PAGE al 12 %. El gel y la membrana de nitrocelulosa y papeles filtro se ambientaron en solución de transferencia (Tris 25 mM, Glicina 192 mM y Metanol al 20% v/v) durante 5 minutos y se realizó una electrotransferencia a membrana de nitrocelulosa (Porablot NCP #741280, Macherey-Nagel) a 350 mA durante 90 minutos, con la cámara inmersa en baño de hielo. Posteriormente la transferencia fue verificada con Rojo Ponceau

y la membrana se sometió a bloqueo con leche desnatada al 5 % en PBS-T (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 41,8 mM, pH 7,4 y Tween 20 al 0,1 %), durante 1 hora a temperatura ambiente. Se incubó con anticuerpo primario diluído en PBS-T durante toda la noche a 4°C en agitador orbital a velocidad mínima. Al día siguiente se realizaron 3 lavados de 10 minutos con PBS-T a temperatura ambiente y se incubó con anticuerpo secundario cabra anti-conejo IgG-HRP sc-2030 o cabra anti-ratón IgG-HRP sc-2005 (Santa Cruz) diluídos 1:2000 con leche al 1 % en PBS-T durante 1,5 horas a temperatura ambiente. Se realizaron 4 lavados de 10 minutos con PBS-T. La membrana se incubó con solución quimioluminiscente ECL<sup>59</sup> Clarity™ Western ECL Substrate, 200 ml #1705060 Bio-Rad Laboratories, Inc. y se reveló en el equipo Alliance 4.7 con el programa Uviband Max ver. 15.07, Uvitec, Cambridge.

## **4.5 Purificación y caracterización de las proteínas**

**4.5.1 Purificación de FtsZ.** Esta proteína fue purificada por ciclos de polimerización de acuerdo a lo descrito por Montecinos-Franjola<sup>60</sup>. En una placa de LB agar con Ampicilina 100 µg/mL se sembró la cepa BL21(DE3) transformada con pMFV57 (plasmidio que contiene la secuencia de FtsZ de *E. coli*). Se incubó durante toda la noche a 37 °C, al día siguiente se picó una colonia y se sembró un pre-inóculo de 10 mL de LB con 100 µg/mL el cual se incubó durante toda la noche a 37 °C con agitación. Al día siguiente se inocularon 4 litros de LB ampicilina con el pre-inóculo y se incubó a 200 rpm y 37°C hasta que los cultivos alcanzaron la fase exponencial

(DO<sub>600</sub> 0,45). Se agregó IPTG para llegar a una concentración de 0,5 mM y se incubó durante 2,5 horas a 200 rpm y 37°C. Posterior a esto, las bacterias se centrifugaron para precipitarlas, esto se hizo en centrífuga Sorvall, rotor GSA a 4 °C a 7000 rpm durante 20 minutos. El *pellet* se almacenó a -80 °C hasta el día siguiente. Las bacterias se resuspendieron en Amortiguador A (Tris-HCl 20 mM pH 8,0, KCl 50 mM, EDTA 1 mM MgCl<sub>2</sub> 5 mM y glicerol al 10 %) que se encontraba a 4 °C y suplementado con una tableta de inhibidores de proteasas *cOmplete* protease inhibitor cocktail 11873580001, Roche. Luego las células resuspendidas se lisaron por sonicación con 5 pulsos de 45 W y dos pulsos de 75 (MISONIX 3000, Farmingdale, NY). Posterior a esto la muestra fue sometida a centrifugación a 20.000 rpm en centrífuga Sorvall rotor SS-34, durante 2 horas a 4 °C. Se rescató el sobrenadante, se midió el volumen y se agregó sulfato de amonio para llegar a un 33% *p/v* mientras la solución estaba en agitación y en hielo, posterior a esto, se siguió incubando durante 30 minutos y luego la muestra se centrifugó. El sobrenadante se sometió a diálisis a 4 °C contra Amortiguador A durante toda la noche, para esto se utilizó la membrana Spectrum™ Labs Spectra/Por™ 1 6-8 kD MWCO Standard RC Dry Dialysis Kit #11511040, 5 m length, 20.4 mm diameter. Al día siguiente se realizaron ciclos de polimerización/despolimerización, los cuales consistieron en incubar la muestra con amortiguador de polimerización (MES 50 mM pH 6,5, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, Glutamato 1M, GTP 20 mg/mL) fresco para llegar a un volumen final de 20 mL. Al producto de la diálisis se le agregó amortiguador de polimerización y se incubó por 30 minutos a 37° C, luego se centrifugó a 10.000xg por 20 minutos a temperatura ambiente en centrifuga Beckman Avanti-30 rotor F0650. El pellet se resuspendió en un volumen máximo de

5 mL de amortiguador A frío y se incubó por 10 minutos en el hielo para resuspender el *pellet* de polímeros. Se centrifugó a 4 °C a 10.000xg durante 20 minutos y se recuperó el sobrenadante. Se repitieron 2 ciclos de polimerización/despolimerización. Finalmente, en sobrenadante del último ciclo se dializó toda la noche contra amortiguador A y se guardó en alícuotas de 100 µL a -80 °C hasta su uso.

**4.5.2 Ensayo de polimerización de FtsZ:** La polimerización fue medida siguiendo el protocolo de Concha-Marambio 2017<sup>61</sup> en el equipo LS50 Fluorescence Spectrometer, Perkin Elmer. Este procedimiento consistió en medir dispersión de luz a distintas concentraciones de FtsZ de 5 a 15 µM a 350 nm, utilizando un filtro atenuador del 1 %. Se registró la dispersión de luz durante 5 minutos, posterior a esto se añadió GTP 1 mM y se siguió registrando el aumento de la dispersión y su decaimiento. Para determinar la concentración crítica se graficó la diferencia de intensidades en relación a la concentración molar de FtsZ utilizada en el ensayo.

**4.5.3 Slot blot anti FtsZ:** En el laboratorio de Biología Estructural y Molecular hay 3 anticuerpos anti FtsZ de *E. coli*, tres de estos anticuerpos son monoclonales producidos en ratón, denominados 1 y 2. Además se posee de una segunda preparación del anticuerpo 2 y también se dispone de un cuarto anticuerpo policlonal producido en conejo, denominado P. El anticuerpo monoclonal 1 se obtuvo utilizando como antígeno el péptido ADEDRDA de FtsZ, que corresponde a los

aminoácidos 90 a 96 del dominio amino. Las dos preparaciones del anticuerpo 2 fueron producidas con el péptido LGRGISL que corresponde a los aminoácidos 171 al 177 del dominio amino y un anticuerpo policlonal contra FtsZ completa. Los anticuerpos fueron sintetizados por la empresa Biosonda S.A. Para verificar el funcionamiento de los anticuerpos y elegir uno de estos para los experimentos de pinza óptica se hizo un ensayo de slot blot. Los anticuerpos P, 1 y 2 se diluyeron 1:10.000, 1:30.000, 1:70.000 y 1:100.000. El ensayo se realizó en el sistema Hybri.Slot 24 Slot Blotting Apparatus, de Core Life Sciences, con una carga de 40 µg de proteína FtsZ purificada. Posterior a esto se siguieron los mismos pasos de Western blot (como se indicó antes), tratando cada ranura que contenía la muestra de FtsZ por separado con cada anticuerpo primario a sus respectivas diluciones. Como anticuerpo secundario se utilizó el anticuerpo hecho en cabra anti conejo IgG-HRP para el anticuerpo primario P y sc-2030 o cabra anti ratón IgG-HRP sc-2005 para los anticuerpos monoclonales 1 y 2.

**4.5.4 Western blot Anti FtsZ:** Se utilizó un anticuerpo Anti-Cell Division Protein FtsZ antibody (ab225991) en dilución 1:1000 para identificar a FtsZ siguiendo el protocolo de western blot explicado anteriormente. Como anticuerpo secundario se utilizó Goat anti rabbit IgG-HRP sc-2030, Santa Cruz.

También se utilizó el anticuerpo 1 (seleccionado por los resultados de slot-blot) para identificar a FtsZ en dilución 1:10.000. Se utilizó como anticuerpo secundario *Goat anti mouse* IgG-HRP sc-2005, Santa Cruz.

**4.5.5 Purificación de sZipA:** sZipA o ZipA soluble corresponde a la proteína ZipA sin la región transmembrana N terminal, la cual fue reemplazada por una cola de poli histidina. Esta construcción se encuentra en el plasmidio pPLV1, el cual fue donado por el laboratorio de Germán Rivas del Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC) de Madrid. La expresión y purificación de sZipA se realizó inoculando una placa de LB con ampicilina (100 µg/mL) con la cepa *E. coli* c41 transformada con pPLV1. Se dejó creciendo toda la noche, al día siguiente se picó una colonia y se hizo un pre-inóculo y se dejó crecer durante toda la noche a 37 °C a 200 rpm. Al día siguiente se inocularon 4 litros de medio LB con ampicilina (100 µg/mL) hasta fase exponencial (DO<sub>600</sub> 0,45), la inducción se realizó con 0,75 mM de IPTG durante 3,5 horas a 200 rpm a 37° C hasta que los cultivos alcanzaron la fase exponencial. El cultivo se centrifugó en el equipo Sorvall, rotor GSA a 4 °C a 7000 rpm durante 20 minutos. Los precipitados se colectaron en una única muestra y se almacenaron a -80 °C hasta el día siguiente. Al *pellet* se le agregó amortiguador ZipA (Tris-HCl 25 mM pH 8,0 NaCl 500 mM, 5 mM de Imidazol) frío para llegar a un volumen no superior a 40 mL suplementado con una tableta de inhibidores de proteasas *cOmplete protease inhibitor cocktail* 11873580001, Roche. Luego las células re suspendidas se lisaron por sonicación con 5 pulsos de 45 W y dos pulsos de 75 (MISONIX 3000, Farmingdale, NY). Posteriormente se sometió a centrifugación a 20.000 rpm en centrífuga Sorvall rotor SS-34, durante 2 horas a 4 °C. Se rescató el sobrenadante y se cargó en una columna de Níquel de volumen 5 mL Ni-Sepharose (GE Healthcare, Piscataway, NJ) previamente ambientada con amortiguador ZipA,

en un baño de hielo y conectada a una bomba peristáltica Biorad a un flujo de 1 mL por minuto. Al cargar la muestra, se dejaron 25 mL de amortiguador ZipA y posteriormente se lavó con 15 mL de amortiguador ZipA. Posterior a esto se agregaron 15 mL de amortiguador ZipA con 50 mM de Imidazol, luego 15 mL de buffer ZipA con 100 mM de Imidazol, luego 15 mL de buffer ZipA con 200 mM de Imidazol y finalmente 15 mL de *buffer* ZipA con 500 mM de Imidazol. Durante el proceso de elución, desde que se agregó el primer buffer de 50 mM de Imidazol, se colectaron fracciones de 1 mL y fueron colocadas en hielo de manera temporal. Luego se tomaron 200  $\mu$ L de cada fracción y se cuantificó la concentración de proteínas midiendo la absorbancia a 280 nm en placas de Elisa en un espectrofotómetro Epoch de Biotek y se registró la absorbancia a 280 nm para determinar las fracciones que contenían más proteína. Una vez determinadas las fracciones se juntaron en una sola y se sometieron a diálisis contra amortiguador ZipA, durante toda la noche 4 °C en agitación.

**4.5.6 Western blot anti ZipA:** Para identificar a la proteína recombinante sZipA, la cual posee una cola de polihistidina en reemplazo de la hélice N-terminal transmembrana, se utilizó el anticuerpo *Monoclonal Anti-polyHistidine antibody produced in mouse* #H1029, Sigma-Aldrich. Se utilizó como anticuerpo secundario Goat anti mouse IgG-HRP sc-2005, Santa Cruz.

#### **4.6 Calorimetría de Titulación Isotérmica.**

El experimento fue simulado en el programa NanoAnalyze™ v3.10.0 de TA Instruments. lo cual permitió estimar las concentraciones apropiadas de cada proteína para la titulación en ITC. Las proteínas FtsZ y sZipA fueron concentradas por separado utilizando filtros Amicon Ultra 0.5 ml cut-off 3000 Merck Millipore, lo cual también permitió cambiar la solución amortiguadora de ambas proteínas a Tris 50 mM, KCl 500 mM pH 7,4. Se utilizó una solución de sZipA soluble en la celda del calorímetro a una concentración de 5,8  $\mu\text{M}$  y FtsZ se colocó en la posición de inyección (75  $\mu\text{L}$ ) a 150  $\mu\text{M}$ . Las medidas se realizaron a 37 °C, el volumen de la celda en la cual se encontraba la solución de sZipA fue de 200  $\mu\text{M}$ , el de las inyecciones de FtsZ fue de 2  $\mu\text{L}$ , con un número total de inyecciones de 18. Las mediciones se realizaron en el equipo Microcal PEAQ-ITC, Malvern Panalytical y los datos se analizaron con MicroCal PEAQ-ITC Analysis Software, Malvern Panalytical.

#### **4.7 Pinza Óptica**

La espectroscopía de fuerzas por Pinza Óptica permite determinar parámetros cinéticos y termodinámicos de la interacción entre proteínas a nivel de molécula única. La técnica consiste en formar el complejo de proteínas que se quiere estudiar y luego separar las proteínas a velocidad constante para favorecer la disociación de estas y así registrar la fuerza a la cual ocurrió la ruptura. Para esto, se utilizan esferas de poliestireno las cuales se recubren por las proteínas que se quiera estudiar, así, una esfera recubierta con proteína X es fijada en la punta de una pipeta

por succión y otra esfera recubierta de proteína Y es atrapada en la trampa óptica, formada por dos láseres infrarrojos y es acercada a la proteína X<sup>62</sup>. En este trabajo se inmovilizó la proteína FtsZ con esferas recubiertas de un anticuerpo específico para el extremo N-terminal de esta proteína y se inmovilizó sZipA con esferas recubiertas con un anticuerpo anti-poli-histidina (Fig. 4).

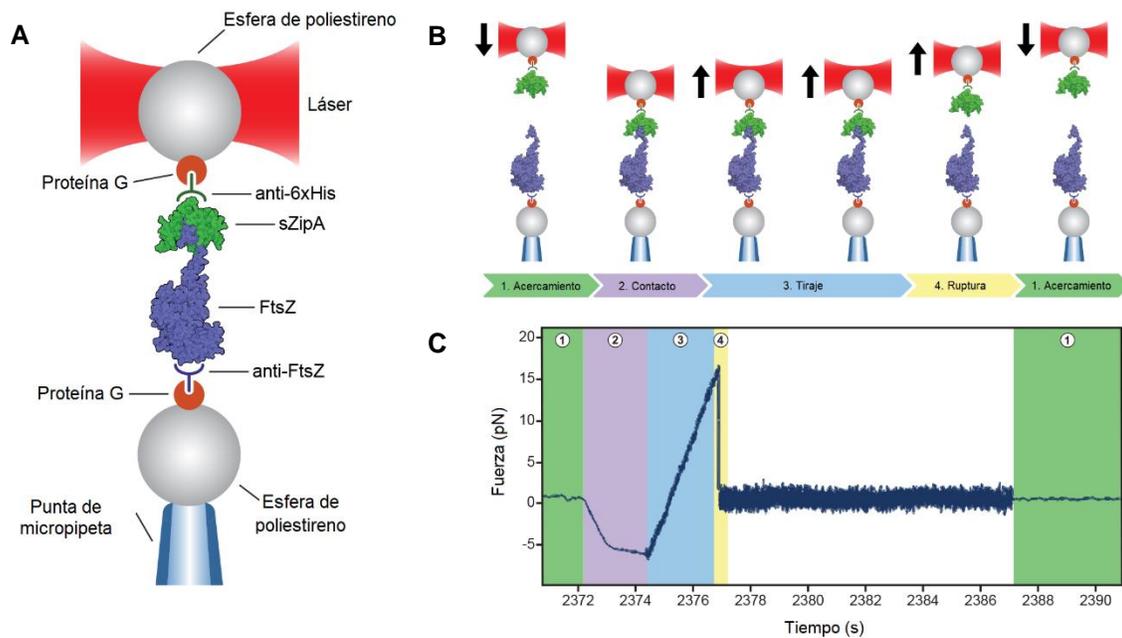


Figura 4. Configuración de los experimentos de fuerza llevados a cabo en pinza óptica **A** A Una esfera de poliestireno recubierta en proteína G y funcionalizada con anticuerpo Anti FtsZ se le une FtsZ y se inmoviliza por succión en una punta de micropipeta. A una segunda esfera de poliestireno recubierta con proteína G y funcionalizada con Anti poli-histidina se le une sZipA y es inmovilizada en la trampa láser. **B** Pasos de los ciclos de acercamiento y retracción: primero la esfera atrapada en el láser se mueve hacia la esfera inmovilizada en la punta de micropipeta tip (1) hasta establecer contacto (2), se puede determinar si hay interacción por una repentina baja en la fuerza, comienza la retracción a velocidad constante en dirección opuesta (3), hasta que la interacción se rompe (4) y se registra una repentina baja en la fuerza lo que indica la ruptura de la interacción (5). Luego comienza un nuevo ciclo de atracción y retracción (1). **C** Ejemplo de una traza de experimento de pinza óptica, los números en círculo se corresponden con los números de la figura B.

#### 4.7.1 Derivatización de las esferas de poliestireno

De manera general, para unir las proteínas FtsZ y sZipA a las esferas se utilizaron esferas recubiertas por proteína G. A una alícuota de estas esferas se les unió covalentemente anti FtsZ (Anticuerpo 1 seleccionado por los resultados en slot-blot) y a otra alícuota, anticuerpos Anti-polihistidina (para unir sZipA). La característica

de estos anticuerpos es que unen a las respectivas proteínas por sus extremos N terminal, ya que la interacción entre FtsZ y ZipA ocurre por sus extremos C terminal, a su vez los anticuerpos se unen por su región constante a la proteína G.

Para la derivatización se tomó 1 mL de solución homogénea de esferas conjugadas con proteína G (SPHERO™ Protein G #PGP-30-5, lote AH01, Spherotek), se centrifugó a 1000xg durante 2 minutos a temperatura ambiente, se descartó el sobrenadante y al *pellet* se le agregó 1 mL de solución de PBS pH 7,4, se resuspendió por inversión 3 veces. Se centrifugó a 1000xg durante 2 minutos a temperatura ambiente, se descartó el sobrenadante y las esferas se resuspendieron en 1 mL de PBS a pH 7,0 y se almacenaron a 4° C hasta su uso. Luego se tomó 1 mL de esferas en PBS y se le agregó 15 µL de anticuerpo anti 6xHis (#H1029, Sigma-Aldrich) de concentración 4 mg/mL y por separado a otro mL de esferas se le agregó 30 µL de anticuerpo monoclonal anti FtsZ a una concentración de 2 mg/mL. A cada una de estas muestras se les agregó 30 µL de solución del entrecruzador DMP (#21666, Thermo Scientific). La solución de DMP se preparó justo antes de agregar a las esferas, para esto 50 mg de DMP se disolvieron en 1 mL de solución de entrecruzamiento consistente en 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 100 mM de NaCl a pH 7,4. Los tubos de la reacción se cubrieron con papel aluminio y se dejaron en agitador orbital a temperatura ambiente durante 1 hora. Posterior a esto, cada suspensión de esferas se centrifugó a 1000xg durante 2 minutos a temperatura ambiente, se descartó el sobrenadante y el *pellet* se resuspendió en 1 mL de Tris 2 M. Las muestras se incubaron durante 2 horas en vórtex con agitación constante ajustado a la mínima velocidad a temperatura ambiente y el contenido de cada tubo

de reacción fue dividido en 3 y a cada uno se le adicionó 1 mL de PBS a pH 7,0. Se centrifugaron a 1000xg durante 2 minutos a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante y se agregó 1 mL de PBS pH 7,0, se homogenizó y se centrifugó a 1000xg por 2 minutos a temperatura ambiente y se descartó el sobrenadante, esto se repitió 2 veces. Las mezclas que contenían las esferas con el mismo anticuerpo se juntaron en un solo tubo y se les agregó 1 mL de PBS a pH 7,0 y se centrifugaron a 1000xg por 2 minutos, este lavado se repitió hasta que el pH de la solución se tornó básico (verificado por papel pH; Merck). Las esferas se centrifugaron a 1000xg por 2 minutos, se resuspendieron en PBS pH 7,0 y Azida de Sodio 5 mM y se almacenaron a 4 °C hasta su uso.

Una alícuota de 5 µL de esferas con anticuerpo anti FtsZ se incubó con FtsZ purificada a una concentración 323 µM, en paralelo 5 µL de esferas con anti-poli-histidina se incubaron con sZipA purificada a una concentración 100 nM, ambas en un volumen final de 10 µL. Se incubaron durante 15 minutos y posteriormente se les agregó 1 mL de amortiguador Tris 50 mM, KCl 500 mM pH 7,4. Se escogieron estas concentraciones de FtsZ y sZipA en base a estudios realizados en el laboratorio de Molécula Única y Mecanobiología<sup>63</sup> en los cuales se establecieron las concentraciones que permiten garantizar condiciones de molécula única.

#### **4.7.2 Mediciones en pinza óptica.**

Para el experimento de interacción entre FtsZ y sZipA se inyectaron las esferas con FtsZ por el canal inferior de la cámara de fluídica (MC120, Steven B. Smith Engineering) y se atrapó una esfera por succión, luego se inyectaron las esferas

con sZipA por el canal superior y se atrapó una esfera en la trampa óptica (Fig. 4B y C). Se utilizó el equipo Pinza Óptica (miniTweezers<sup>64</sup>, visitar <http://tweezerslab.unipr.it/cgi-bin/home.pl> para más detalles). Se realizaron 218 ciclos de atracción/retracción con 5 pares de esferas distintos.

También se realizaron dos controles con el objetivo de descartar las interacciones inespecíficas entre componentes del sistema que no correspondan a la interacción FtsZ-sZipA. En estos controles se evaluó la interacción proteína G – Proteína G y también la interacción FtsZ – Anti-poli-histidina (control sin sZipA). Para estudiar la interacción entre proteínas G, 5  $\mu$ L de esta suspensión de esferas se diluyeron en 1 mL de amortiguador Tris 50 mM, KCl 500 mM, pH 7,4 y se inyectaron en la cámara de fluídica tanto por el canal superior como inferior y se inmovilizaron en pipeta y trampa óptica (Fig. 5) se utilizaron 3 pares de esferas diferentes y se hicieron 83 acercamientos en total (Fig. 5A). Para los controles sin sZipA se midió la interacción entre las esferas con FtsZ con esferas Anti-poli-histidina, ambas suspensiones de esferas se inyectaron por separado en la pinza (canal inferior y superior respectivamente, Fig. 5B). se utilizaron 6 pares de esferas con 62 acercamientos y para el experimento FtsZ-ZipA. Para todas las mediciones la fuerza de tiraje mínima fue 0 pN, la fuerza de tiraje máxima fue de 140 pN y la velocidad de tiraje dureza aproximada de la trampa aproximada de 100 nm/seg con una de 0,1 pN/nm y se registró la fuerza de ruptura.

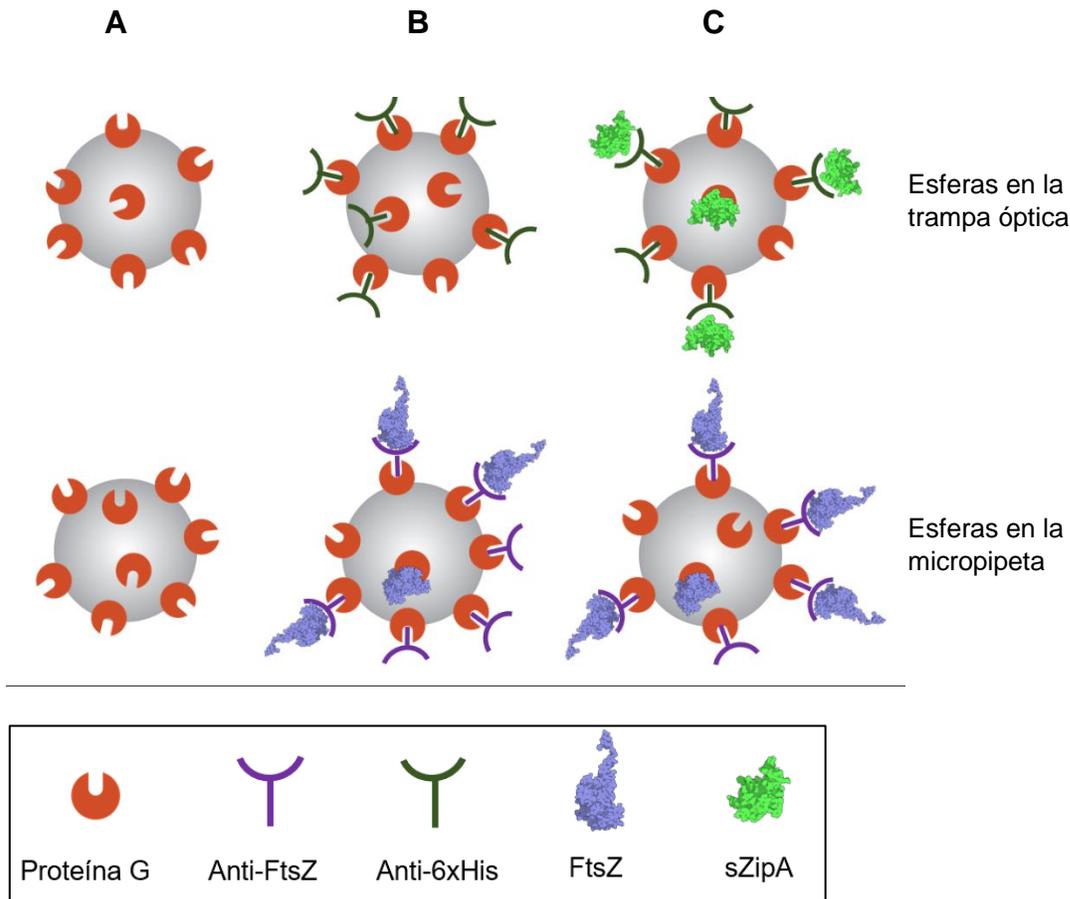


Figura 5. Interacciones medidas en los experimentos en Pinza Óptica. **A.** Interacción entre esferas con proteína G. **B** Interacción entre anti6xHis y FtsZ. **C.** Interacción entre sZipA y FtsZ.

#### 4.7.3 Procesamiento y análisis de los datos y análisis de los resultados.

La frecuencia de adhesión fue determinada dividiendo el número de interacciones por el número de eventos de acercamiento entre las esferas. El error estándar de la media se determinó por la desviación estándar dividida por la raíz del número de pares de esferas. Se aplicó la prueba de T de Student para determinar diferencias significativas entre las medidas.

Los datos de los eventos en los cuales hubo interacción fueron procesados con el script `TweezersAanalysis.m`<sup>65</sup> del programa MATLAB R2019a (©1984-2019 The MathWorks, Inc.) con el cual se obtuvo la fuerza de ruptura. Con esta información se construyeron histogramas de fuerzas de ruptura, hechos con el programa SigmaPlot versión 10.1 (Build10.0.0.54 Copyright© 2006 Systat Software, Inc.). El histograma de las fuerzas de la interacción de los complejos FtsZ-ZipA se filtró para las fuerzas inespecíficas con el histograma de las fuerzas de la interacción de los complejos FtsZ con anti 6xHis con cuatro scripts de MATLAB siguiendo el protocolo de Burgos-Bravo<sup>64</sup>.

Una vez filtrado el histograma para la interacción de los complejos de FtsZ con ZipA se utilizó el modelo de Dudko, Hummer y Szabo (DHS)<sup>66</sup> para obtener los parámetros de la interacción.

El modelo DHS consiste en transformar el histograma filtrado de fuerza de ruptura (Fig. 6), en tiempos de vida dependientes de la fuerza  $\tau(\mathbf{F})$  utilizando la ecuación 1.

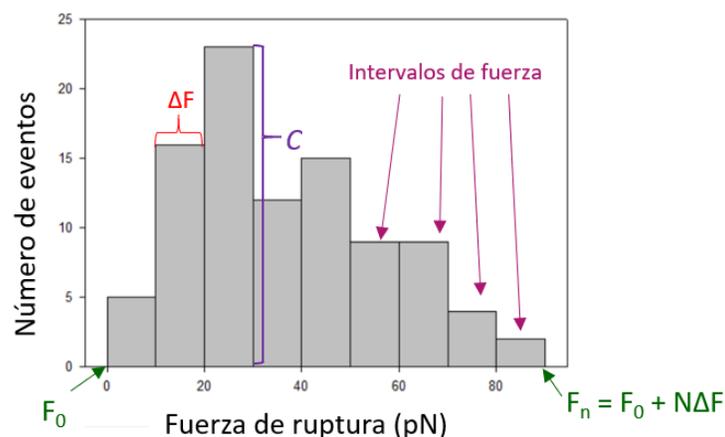


Figura 6: Modelo de histograma de fuerzas de ruptura.  $F_0$  Fuerza mínima registrada,  $\Delta F$  Ancho de los intervalos de fuerza.  $C$  Cuentas (número de eventos).

$$\tau \left( F_0 + \left( k - \frac{1}{2} \right) \Delta F \right) = \frac{\left( \frac{h_k}{2} + \sum_{i=k+1}^N h_i \right) \Delta F}{h_k F' \left[ \left( F_0 + \left( k - \frac{1}{2} \right) \Delta F \right) \right]} \quad (\text{Ecuación 1})$$

En la Ecuación 1 se pueden determinar los tiempos de residencia ( $\tau$ ) en función de la fuerza reemplazando directamente los datos del histograma de fuerzas de ruptura. El término  $h_k$  simboliza la altura normalizada de los intervalos de fuerza, para esto el número total de cuentas de cada intervalo ( $C_i$ ) se divide por el número total de cuentas ( $N_{\text{tot}}$ ) y por el ancho de intervalo ( $\Delta F$ ), es decir  $h_i = C_i / (N_{\text{tot}} \Delta F)$ , así para cada intervalo de fuerza,  $k = 1, k = 2$ , etc.

Como resultado se obtienen los valores de tiempo de residencia en función de la fuerza, a partir del cual se puede obtener el tiempo de residencia a fuerza cero ( $\tau_0$ ) y la constante cinética de disociación del complejo ( $k_{\text{off}}$ ), que es  $1/\tau_0$ .

Para obtener la distancia entre el estado basal y el estado de transición se utilizó la ecuación 2.

$$\tau(F) = \tau_0 \left( 1 - \frac{v F x^\ddagger}{\Delta G^\ddagger} \right)^{1-1/v} e^{-\beta \Delta G^\ddagger \left[ 1 - \left( 1 - v F x^\ddagger / \Delta G^\ddagger \right)^{1/v} \right]} \quad (\text{Ecuación 2})$$

Donde  $v$  es un factor de escalamiento que especifica la naturaleza del perfil de energía en ausencia de fuerzas que utilizamos el valor de  $2/3$  y  $\beta^{-1} = k_B T$ , que en este caso toma el valor de  $0,24$ ,  $x^\ddagger$  es la distancia desde el estado basal hasta el estado de transición y  $\Delta G^\ddagger$  es la energía libre de Gibbs desde el estado basal hasta el estado de transición.

A partir de los tiempos de vida dependientes de la fuerza se puede obtener la probabilidad de ruptura a distintas fuerzas utilizando la siguiente ecuación de acuerdo a Goldman et al<sup>67</sup>.

$$P(F) = \frac{k_i(F) - k_{off}}{k_i(F)} \quad (\text{Ecuación 3})$$

Donde  $P(F)$  es la probabilidad de ruptura dependiente de la fuerza,  $k_i$  es igual a  $1/\tau_i$ , donde  $\tau_i$  es el tiempo de vida dependiente de la fuerza. Posterior a esto se ajustaron los datos a una ecuación exponencial de dos variables.

Finalmente se determinó el coeficiente de ductilidad cinética, utilizando el modelo Cossio-Hummer-Szabo (CHS)<sup>32</sup>.

$$k(F) = k_0 \left(1 - \frac{\mu F x^\ddagger}{\Delta G^\ddagger}\right)^{2-1/\mu} e^{-\beta \Delta G^\ddagger \left[1 - (1 - \mu F x^\ddagger / \Delta G^\ddagger)^{1/\mu}\right]} \quad (\text{Ecuación 4})$$

Donde  $k$  es el inverso de  $\tau$  y  $\mu$  es el coeficiente de ductilidad cinética.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Purificación y caracterización de proteínas

Para los experimentos *in vitro* tanto en ITC como en espectroscopía de fuerzas por pinza óptica fue necesario contar con FtsZ y sZipA purificadas, por lo que antes de abordar estos experimentos se procedió a la purificación y caracterización de las proteínas. Es importante notar que la naturaleza de los experimentos no requiere de proteínas totalmente purificadas, pues en los experimentos de pinzas ópticas se utilizan anticuerpos específicos para cada una de ellas y en los experimentos de ITC, dada la especificidad de los sitios de reconocimiento se seleccionan entre ellas.

#### 5.1.2 Purificación y caracterización de FtsZ

FtsZ es una proteína de 40,2 kDa. Para purificarla se utilizó el protocolo de ciclos de polimerización, el cual se basa en purificar FtsZ a través de su actividad biológica. En general en las purificaciones se obtuvieron 4 a 6 mL de solución de FtsZ a concentraciones entre 10 a 13 mg/mL con una pureza > 90 % determinada por SDS-PAGE (Fig. 7)

En ambos geles de la figura 7 se observa una predominante banda a la altura de los 40 kDa, además, particularmente en la Fig. 7 B, que tiene el doble de proteína que Fig 7 A, se observa una tenue banda secundaria a la altura de los ~35 kDa. Para descartar o confirmar la presencia de proteínas contaminantes se realizó un WB con anticuerpos anti FtsZ. Primeramente, se utilizó un anticuerpo policlonal

comercial Abcam (Fig. 8) y luego se utilizó un anticuerpo monoclonal contra N-terminal de FtsZ (Fig. 9).

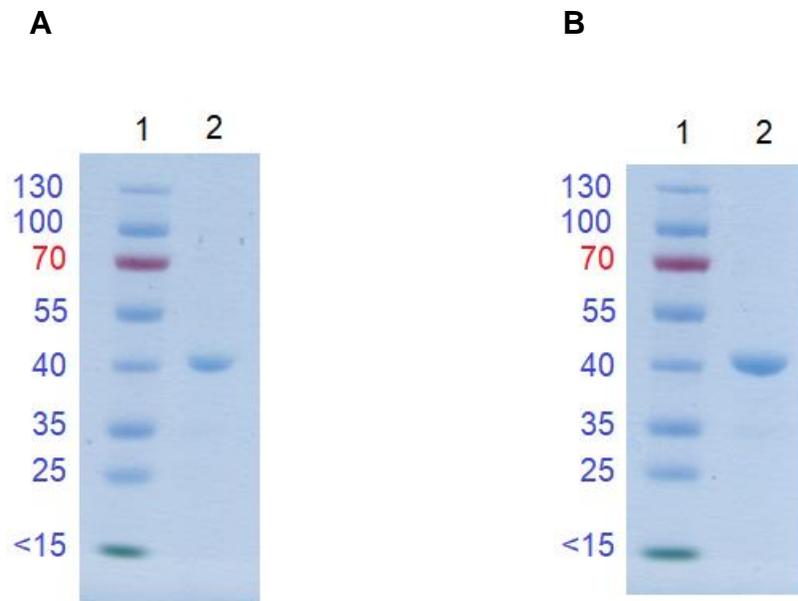


Figura 7. Geles de SDS-PAGE al 10 % de fracción de FtsZ. **A** Carril 1: Estándar de masa molecular Thermo Scientific #2661, carril 2: 0,29  $\mu$ g de proteína **B** Carril 1: Estándar de masa molecular Thermo Scientific #2661, carril 2: 0,58  $\mu$ g de proteína.

En el ensayo de Western blot de la figura 8 se observa una banda predominante alrededor de los 40 kDa y también pequeñas bandas de menor masa molecular, probablemente productos de degradación, lo cual se correlaciona con lo observado en los geles de SDS-PAGE (Fig. 7). También se observan dos bandas tenues de alta masa molecular sobre 70 kDa.

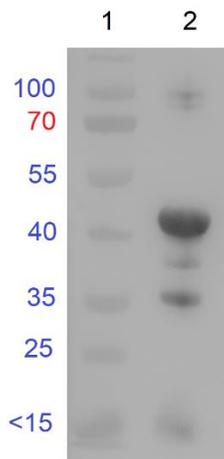


Figura 8 Western blot anti FtsZ marca Abcam. Carriles **1** Estándar de masa molecular Thermo Scientific #26616. **2** 2 µg de FtsZ purificada.

En el WB realizado con el anticuerpo anti FtsZ (Fig. 9) se observan las mismas bandas evidenciadas por el WB con el anticuerpo comercial (Fig. 8) excepto la banda de baja masa molecular menor a 15 kDa.

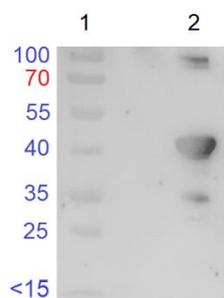


Figura 9 Western blot anti FtsZ monoclonal anti N-terminal. Carriles **1** Estándar de masa molecular Thermo Scientific #26616. **2** 2 µg de FtsZ purificada.

El análisis de los geles de SDS-PAGE y WB en conjunto, permite afirmar que la fracción purificada contiene principalmente FtsZ (> 90% de acuerdo con el análisis densitométrico). Las bandas de menor intensidad visibles principalmente en WB indican la posibilidad de que la muestra haya sufrido proteólisis durante el proceso de purificación y también una presencia mínima de agregados resistentes a SDS.

Una pureza sobre el 90 %, indicada por los geles de SDS-PAGE, nos permite utilizar esta purificación.

Para verificar que la proteína FtsZ se encuentra activa, se realizaron ensayos de polimerización, los cuales consisten en medir la dispersión de luz, que es proporcional a la formación de polímeros en solución. La polimerización es la actividad biológica de FtsZ, por lo que medir su capacidad de polimerizar es la mejor manera de medir si la proteína se encuentra biológicamente activa. Un parámetro que permite evaluar la capacidad de polimerización de FtsZ es determinar la concentración crítica. Este parámetro informa acerca de la concentración mínima requerida para la polimerización.

En la figura 10 A se observa que existe una dispersión de luz basal durante los primeros 300 segundos, la cual es estable durante este tiempo. A los 300 segundos se adicionó GTP a una concentración final 1 mM y se observa un aumento de la dispersión de luz proporcional a la concentración de FtsZ. A medida que pasa el tiempo, aproximadamente desde los 600 segundos la dispersión de luz baja para las mediciones con mayor concentración de FtsZ, para las concentraciones entre 10 y 12  $\mu\text{M}$ . En el caso de las concentraciones 5 y 7,5  $\mu\text{M}$  la dispersión de luz no varía durante el tiempo en que se realizó el ensayo, esto es concordante de acuerdo con lo reportado por Mukherjee y Lutkenhaus para concentraciones bajas de FtsZ<sup>68</sup>.

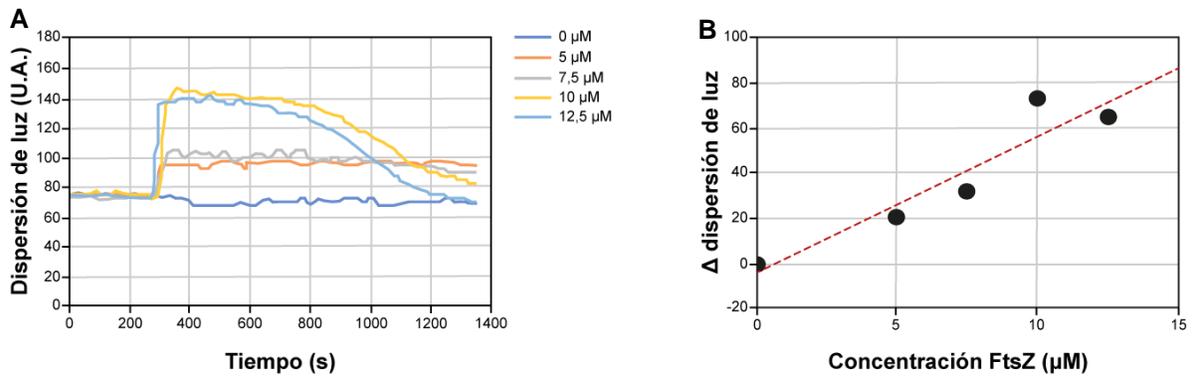


Figura 10: Determinación de la concentración crítica de FtsZ. **A:** Dispersión de luz de FtsZ al agregar GTP 1 mM (a los 300 segundos). Eje X: tiempo (s), eje Y Intensidad (U.A.). **B:** El eje Y es la diferencia de intensidades obtenidas en A y el eje X la concentración de FtsZ en  $\mu\text{M}$ .

En la figura 10 B se graficó la diferencia de intensidades antes e inmediatamente después de agregar GTP vs la concentración de proteína y se ajustó a una recta, esto permitió determinar el valor de la concentración crítica, la cual corresponde al valor en el cual la recta corta el eje x, para este caso la concentración crítica determinada fue de  $0,73 \mu\text{M}$ . La concentración crítica menor a  $1 \mu\text{M}$  indica una buena pureza y actividad y se encuentra dentro de lo documentado para FtsZ con actividad polimérica<sup>68–70</sup>.

Una vez purificada y caracterizada la FtsZ biológicamente activa, se procedió a purificar sZipA.

### 5.1.3 Purificación y caracterización de sZipA

ZipA es una proteína de 35 kDa que presenta un corrimiento electroforético anómalo y migra a los  $\sim 55 \text{ kDa}$ <sup>22,27</sup>. Su versión soluble, sZipA que carece de los primeros 25 aminoácidos que componen la hélice transmembrana de la proteína, presenta el

mismo corrimiento anómalo<sup>71</sup>. Se obtuvo una fracción enriquecida en una proteína de ~50 kDa (Fig. 11), de pureza > 90 % determinada por análisis densimétrico.

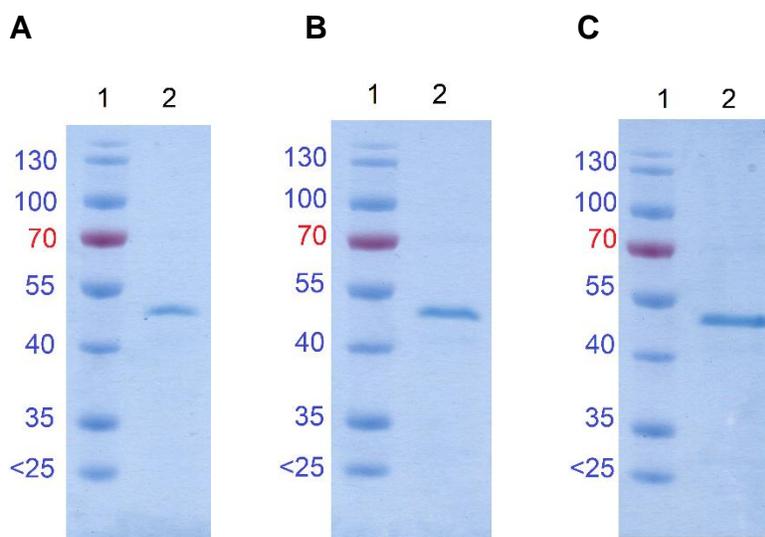


Figura 11 Geles SDS-PAGE 10 % sZipA purificada. **A** Carril 1: Estándar de masa molecular Thermo Scientific #26616, carril 2: 16 µg de proteína. **B** Carril 1: Estándar de masa molecular Thermo Scientific #26616. Carril 2: 23 µg de proteína. **C** Carril 1: Estándar de masa molecular Thermo Scientific #26616. Carril 2: 32 µg de proteína.

En las Fig. 11 B y C se observa solo la presencia de una banda en los geles a las tres cantidades de proteína cargada. Para corroborar que la banda presente correspondía a sZipA se hizo un WB con un anticuerpo policlonal anti-poli-histidina, pues sZipA tiene una cola de poli-histidina en el extremo N-terminal, en reemplazo de la hélice hidrófoba. En este WB (Fig. 12) se observa la presencia de una banda entre 55 y 40 kDa, que se correlaciona con lo visto en los geles de SDS-PAGE (Fig. 11). Además, también se nota la presencia de una banda de menor tamaño respecto a la banda principal de ~40 kDa, la cual muestra una muy menor intensidad, resultado concordante con lo visto en los geles de SDS-PAGE. El WB contra poli-histidina (Fig. 12) muestra la presencia de la proteína recombinante a la misma altura que lo evidenciado por SDS-PAGE y también se observa la presencia tenue

de una proteína de menor masa molecular, positiva para polihistidina, lo que podría indicar proteólisis de sZipA.

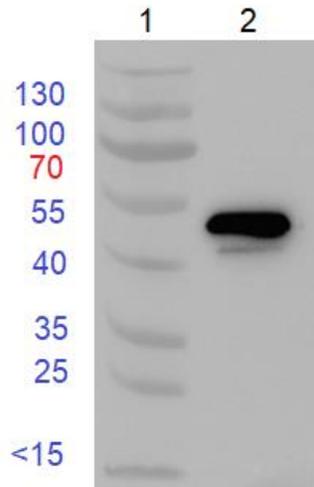


Figura 12 Western blot anti Poli-histidina **1.** Estándar de masa molecular Thermo Scientific #26616. **2.** ZipA purificada.

De esta manera se obtuvieron muestras de FtsZ y sZipA con más del 90% de pureza, verificado por análisis densimétrico de los geles de SDS-PAGE. Además, en el caso de FtsZ se obtuvo una proteína con actividad polimerizante. Con este objetivo alcanzado se procedió a caracterizar la interacción FtsZ-ZipA *in vitro* de acuerdo a los objetivos específicos 1 y 2.

## 5.2 Objetivo específico 1: Determinar $\Delta G^{\circ}$ , $\Delta H^{\circ}$ y $\Delta S^{\circ}$ de la asociación de FtsZ-ZipA

La calorimetría de titulación isotérmica (ITC) es una técnica bien descrita para determinar parámetros termodinámicos y es la metodología “*gold standard*” para estudiar interacciones proteína-ligando. se ha determinado la constante de disociación del complejo FtsZ-ZipA de varias maneras (tabla 5). El conocer la naturaleza de la interacción es relevante para saber qué tan favorecida está la interacción hacia la formación del complejo o hacia el estado disociado. Aparte de la determinación de  $K_D$  esta técnica permite la obtención de parámetros entrópicos y entálpicos que no se pueden obtener experimentalmente por otras metodologías. La determinación de los cambios de entalpía y entropía para la formación del complejo informa acerca de los factores que son relevantes para la asociación entre las dos proteínas. Esto aporta información acerca de la energética de la formación del complejo y de la naturaleza de las interacciones más relevantes, lo que podría ser determinante en el comportamiento dinámico de la interacción del anillo Z y ZipA. También, el conocer los principios energéticos que gobiernan la formación del complejo permite obtener una idea de cómo podría ser el comportamiento mecánico de la disociación.

Para determinar si la interacción FtsZ-ZipA se encuentra balanceada hacia una dominancia entrópica o entálpica, se tituló sZipA con una solución de FtsZ a 37 °C. Se definió como temperatura estándar los 37 °C. A continuación, se muestra el isotermograma de la titulación (Fig. 13)

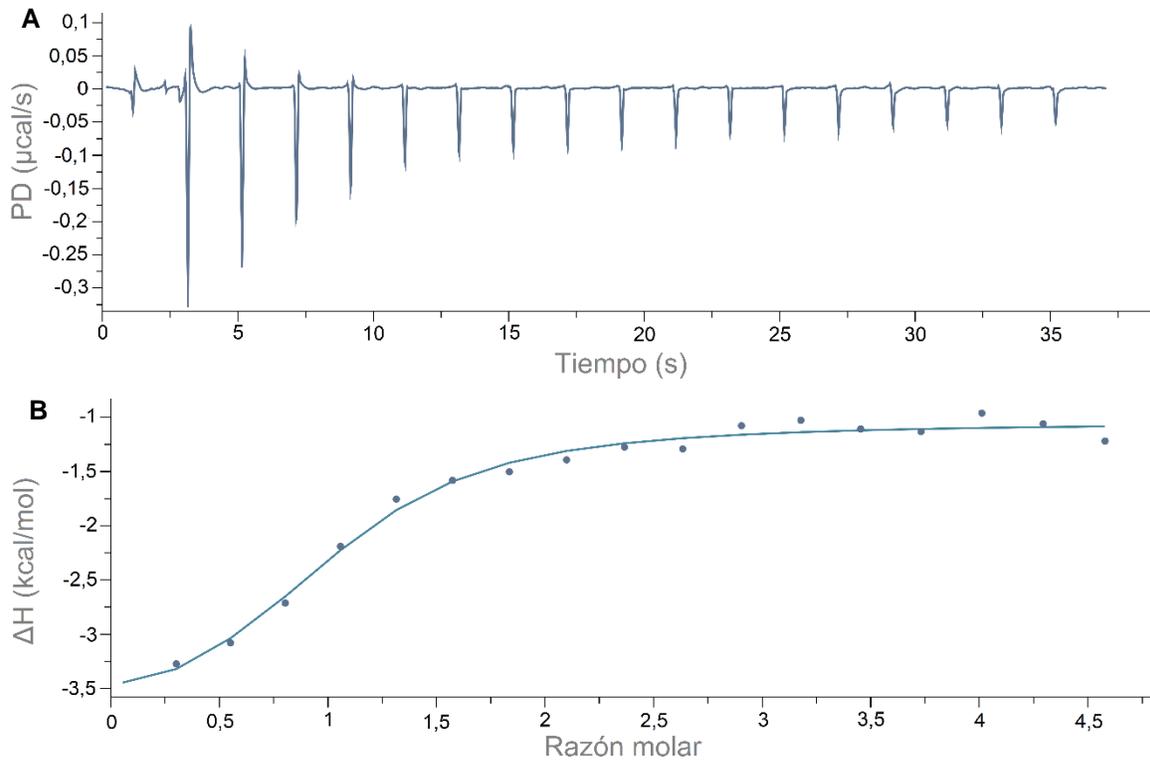


Figura 13 Isotermograma de la titulación de ZipA con FtsZ. **A.** Energía liberada durante la inyección de FtsZ PD (potencia diferencial) vs tiempo. **B** Cambio en la entalpía vs fracción molar.

A medida que FtsZ fue inyectada en el recipiente se observa una liberación de energía como calor, la cual va disminuyendo junto con el número de inyecciones. Esto es indicador de un proceso exotérmico, que es concordante con la inserción de la hélice CTP de FtsZ en el bolsillo hidrofóbico de sZipA. Luego del primer tercio de la curva se aprecia la saturación. Los datos se ajustaron a una estequiometría 1:1, lo que indica que un sitio de sZipA interactúa con 1 sitio de FtsZ. Los parámetros termodinámicos obtenidos se muestran en la tabla 1.

<b>Número de sitios</b>	0,966 ± 0,050
<b>K<sub>D</sub> (Molar)</b>	1,03*10 <sup>-6</sup> ± 0,344*10 <sup>-6</sup>
<b>ΔH<sup>0'</sup> (kcal/mol)</b>	-2,86 ± 0,31
<b>ΔG<sup>0'</sup> (kcal/mol)</b>	-8,50 ± 0,91
<b>-TΔS<sup>0'</sup> (kcal/mol)</b>	-5,63 ± 0,60

Tabla 1: Parámetros termodinámicos de la interacción FtsZ y sZipA obtenidos por medio de calorimetría de titulación isotérmica.

De estos resultados se deduce que la asociación entre FtsZ y sZipA a 37 °C es un proceso espontáneo, exotérmico, dominado entrópicamente y con un equilibrio moderadamente desplazado hacia la formación del complejo. Esta nueva información permitirá conocer como estos datos termodinámicos se ajustan a un carácter dinámico de la interacción. El aspecto dinámico de la interacción, se abordará a través del objetivo número 2, que permitirá determinar el tiempo de residencia de la interacción y cómo un posible rol de transmisión de fuerza a través de la interacción FtsZ-ZipA puede ser compatible con la dinámica de intercambio FtsZ-ZipA.

### **5.3 Objetivo específico 2: Determinar, el tiempo de residencia y la resistencia mecánica de FtsZ-ZipA**

Otro aspecto dinámico relevante, aparte del equilibrio entre el estado monomérico de FtsZ y ZipA y la formación del complejo FtsZ-ZipA, es el tiempo que dura esta interacción una vez establecida. Se ha determinado el tiempo de vida media de FtsZ y ZipA por metodologías *in multiplo*. Estos parámetros son medidas que dan cuenta del promedio de la población de macromoléculas, lo que puede enmascarar el comportamiento individual de estas<sup>72</sup>. Por este motivo para determinar el tiempo de residencia de la interacción FtsZ-ZipA se utilizó la técnica *in singulo* espectroscopía de fuerzas por pinza óptica. Las técnicas *in singulo* o de molécula individual se están haciendo cada vez más relevantes. Particularmente los estudios de espectroscopia de fuerzas por pinza óptica permiten estudiar el efecto de la fuerza en las interacciones intermoleculares, un factor que se encuentra presente en todos los procesos biológicos, por lo que analizar una interacción desde este punto de vista es imprescindible para entender el proceso a cabalidad. Así, por pinza óptica es posible determinar la fuerza a la que se rompe la interacción entre las proteínas, por lo que se podrá determinar el rol de ZipA en la transmisión de fuerza desde los protofilamentos de FtsZ hasta la membrana citosólica con la dinámica de intercambio de FtsZ-ZipA y la duración de esta interacción.

Para los experimentos con pinza óptica se requirió del uso de anticuerpos para unir las proteínas FtsZ y sZipA a las esferas de poliestireno. Una condición importante que debieron cumplir los anticuerpos es que su unión a la proteína de interés no interfiera con la interacción entre FtsZ y sZipA. De esta manera se utilizaron

anticuerpos que se unen al extremo N terminal de cada una de las proteínas. En el caso de sZipA se utilizó el anticuerpo Anti-polihistidina debido a que sZipA tiene en su secuencia una cola de polihistidina en su extremo N terminal. Para el caso de FtsZ se evaluó el uso de dos posibles anticuerpos, por medio de *slot blot* (Fig. 14).

### 5.3.1 Selección de anticuerpo anti FtsZ

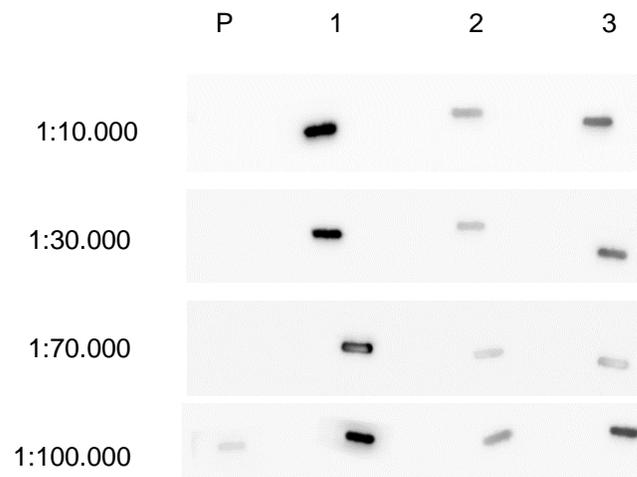


Figura 14: Slot blot de anticuerpos contra FtsZ de *E. coli*. P indica el anticuerpo policlonal anti FtsZ, 1 indica el anticuerpo monoclonal 1, 2 indica el anticuerpo monoclonal 2 y 3 indica una segunda preparación del anticuerpo monoclonal 2.

Se observó que los anticuerpos monoclonales presentaron una mayor señal a todas las diluciones en relación al anticuerpo policlonal. En general todos los anticuerpos monoclonales mostraron afinidad por FtsZ, sin embargo, el anticuerpo monoclonal 1 (desde ahora en adelante anti FtsZ) fue el que dio una señal más fuerte en todas las diluciones, por lo que fue el escogido para unir FtsZ a la esfera de poliestireno.

### 5.3.2 Determinación de la frecuencia de la interacción entre FtsZ-sZipA

Se realizó el ensayo de interacción entre: las esferas de poliestireno recubiertas con proteína G (Proteína G – Proteína G), esferas acopladas a anti FtsZ e incubada con FtsZ con esferas de poliestireno acopladas a anti-poli-histidina (FtsZ – 6xHis) y finalmente, entre esferas acopladas a anti FtsZ incubadas con FtsZ y esferas de poliestireno acopladas a anti-poli-histidina e incubadas con sZipA (FtsZ – sZipA). A partir del número total de ensayos se determinó la frecuencia de adhesión de cada tipo de pares de esferas (Fig. 15 y tabla 2).

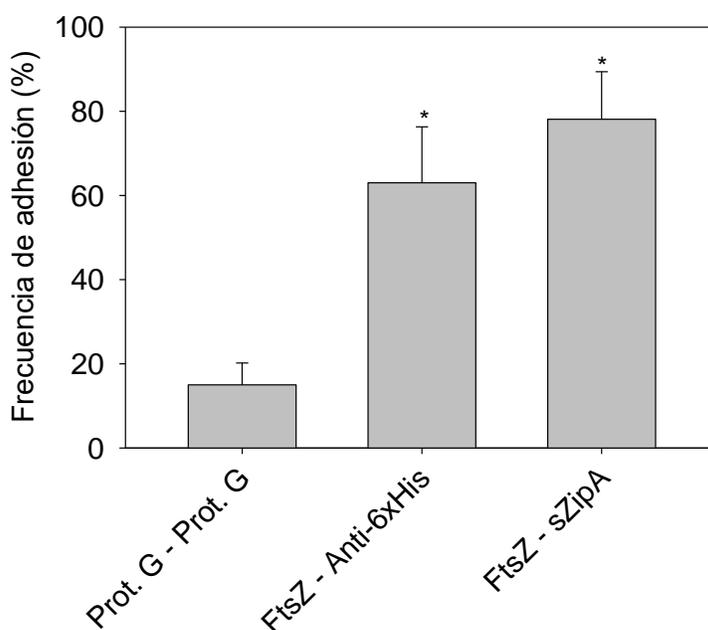


Figura 15: Frecuencia de adhesión (%) de los experimentos en Pinza Óptica. Primera barra: interacción Proteína G - Proteína G, Segunda barra: interacción anti 6xHis - FtsZ y tercera barra: interacción ZipA - FtsZ.

<b>Par de esferas</b>	<b>Proteína G Proteína G</b>	<b>FtsZ Anti 6xHis</b>	<b>FtsZ ZipA</b>
Cantidad de pares	3	6	4
Número de eventos	83	62	218
Frecuencia de adhesión (%)	15,0 ± 5,2	63,0 ± 13,3	78,1 ± 11,3

Tabla 2 Frecuencia de adhesión entre esferas usadas en los experimentos en Pinza Óptica

La interacción Proteína G – Proteína G tiene considerablemente menor número de interacciones que el resto de los pares. La frecuencia de adhesión entre los pares FtsZ- anti 6xHis y FtsZ – ZipA no fue estadísticamente significativa ( $P < 0,05$ ).

### **5.3.3 Determinación de la fuerza de ruptura entre FtsZ-sZipA.**

Se analizó la frecuencia de las interacciones en función de la fuerza de ruptura de estas (pN), tanto para el par FtsZ – Anti 6xHis (control) como del experimento FtsZ – ZipA (Fig. 15).

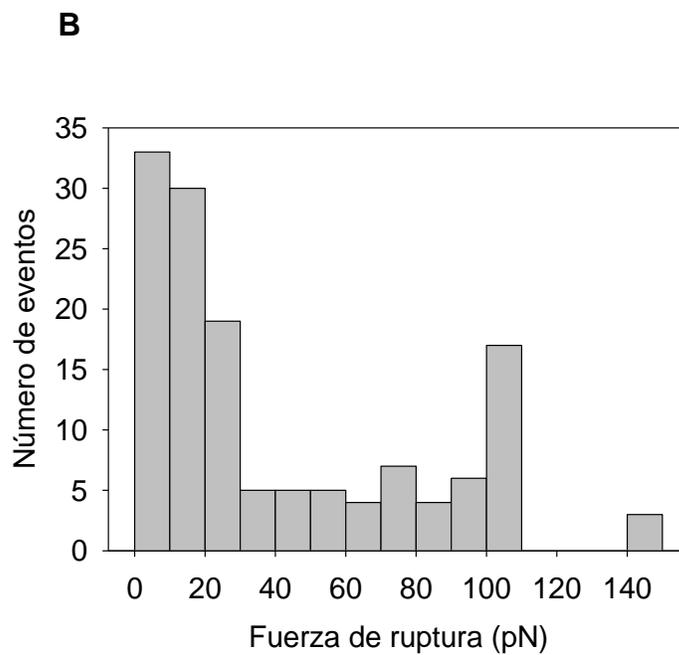
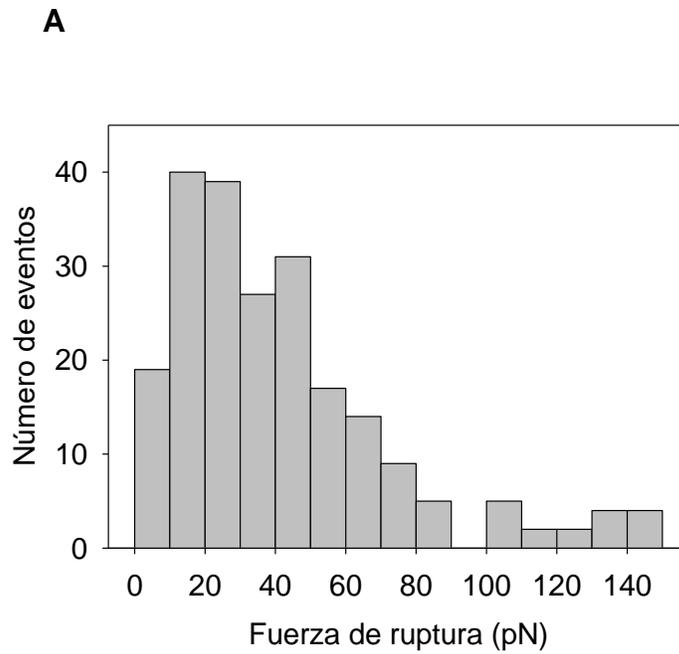


Figura 16 Histogramas de distribución de fuerzas de experimentos en pinza óptica. **A** Control de interacción anti 6xHis con FtsZ. **B** Interacción FtsZ-ZipA

La mayoría de las fuerzas de ruptura del control (Fig. 16 B) se concentran a magnitudes bajas (aproximadamente 20 pN) y también a altas (mayores a 100 pN),

entre las fuerzas de ruptura de 30 y 90 pN la frecuencia es baja. En el caso del experimento FtsZ – ZipA (Fig. 16 A) Se observa que las fuerzas de ruptura son abundantes desde las fuerzas más bajas, comienza a aumentar el número de eventos a medida que aumenta la fuerza, para decaer casi completamente cerca de los 90 pN y para nuevamente aumentar el número de eventos para fuerzas sobre 100 pN.

El histograma de las fuerzas de ruptura entre FtsZ ZipA fue sometido a una filtración (detallado en la metodología) para eliminar las interacciones no específicas.

Así se obtuvo un histograma de fuerzas de ruptura debido exclusivamente a la interacción FtsZ-sZipA (Fig. 17A) que da cuenta de los siguientes parámetros.

Fuerza (pN)	Número de eventos
3,0	15,5
18,4	33,3
33,8	35,3
49,4	16,8
64,6	9,2
80,0	1,3
95,4	0,1

Tabla 3. Parámetros del histograma de interacciones específicas FtsZ-sZipA.

Con esta información se realizó un ajuste Gaussiano lo que permitió obtener la fuerza de ruptura promedio de la interacción FtsZ-sZipA (Figura 17 B). Del ajuste se

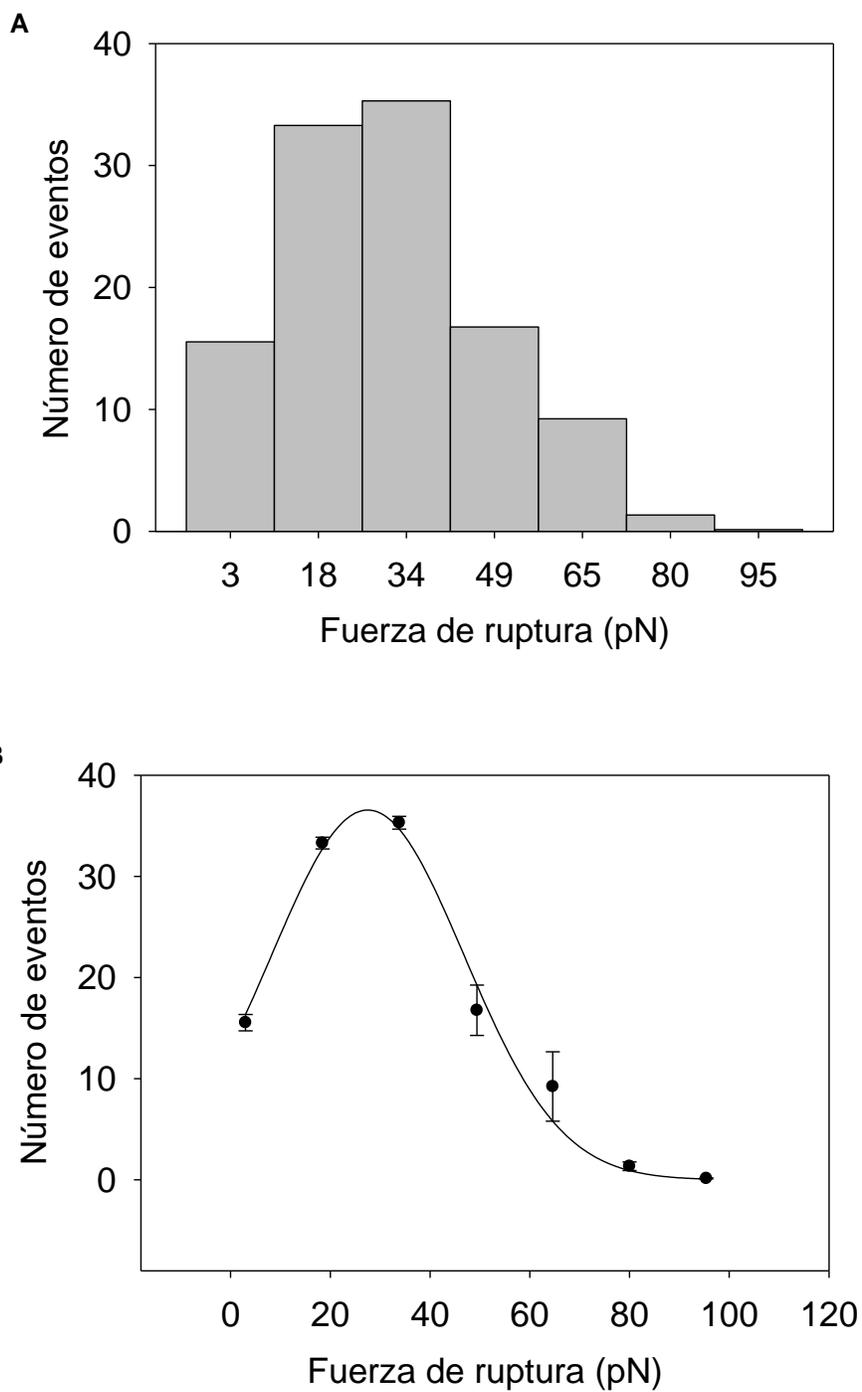


Figura 17 Fuerzas de ruptura entre FtsZ y sZipA por pinza óptica sin interacciones inespecíficas. A Histograma de fuerzas de ruptura entre FtsZ y ZipA.. B Ajuste Gaussiano de fuerzas de ruptura entre FtsZ y ZipA.

obtuvo un  $R^2$  de 0.9835 y la fuerza promedio obtenida fue  $27.51 \pm 1.15$  pN.

### 5.3.4 Determinación del tiempo de residencia, distancia al estado de transición y energía libre del estado de transición.

A partir del histograma filtrado (Fig. 17), utilizando el modelo de DHS se obtuvieron los tiempos de vida de la interacción FtsZ – ZipA, dependientes de la fuerza (Fig. 18), consecuentemente se pudo obtener  $k_{\text{off}}$ , también el  $\Delta G^\ddagger$  y la distancia al estado de transición ( $\ddagger$ ) (Tabla 4).

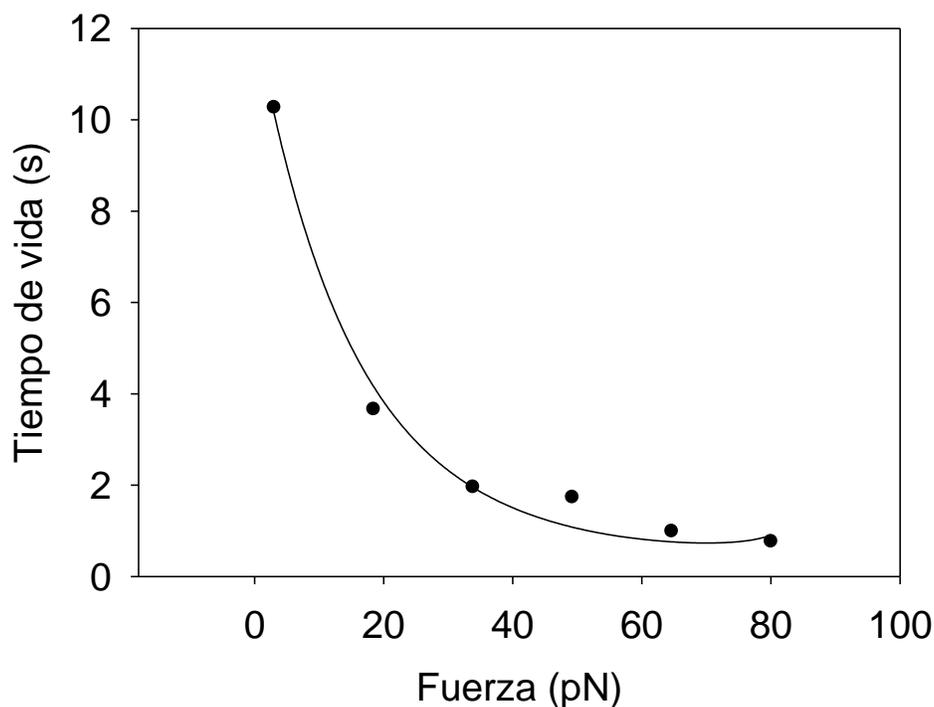


Figura 18 Gráfico de Fuerza de Ruptura vs tiempo de la interacción FtsZ-ZipA determinado por Pinza Óptica.

Alternativamente, por medio del modelo de CHS se determinaron los parámetros de la interacción además del coeficiente de ductilidad cinética, el cual da cuenta del grado de ductilidad o fragilidad (quebradizo) de la disociación (Tabla 3).

	DHS	CHS
Energía libre del estado de transición (pN nm)	16,57 ± 1,26	9,62 ± 3,15
Energía libre del estado de transición (kcal/mol)	2,40 ± 0,74	1,39 ± 0,46
Distancia al estado de transición (nm)	0,287 ± 0,029	0,247 ± 0,064
Tiempo de residencia a (s)	12,2 ± 0,7	10,20 ± 0,001
Constante cinética de disociación (s <sup>-1</sup> )	0,082 ± 0,005	0,098 ± 0,019
Coefficiente de ductilidad cinética	-	0,484 ± 0,121

Tabla 4 Resumen de los parámetros *in singulo* de la interacción FtsZ-ZipA obtenidos mediante los modelos DHS y CHS.

### 5.3.5 Probabilidad de ruptura de la interacción FtsZ-sZipA

Para la determinación de la fuerza que la interacción que FtsZ-ZipA es capaz de resistir antes de romperse se determinó la probabilidad de ruptura a distintas fuerzas (Fig. 19).

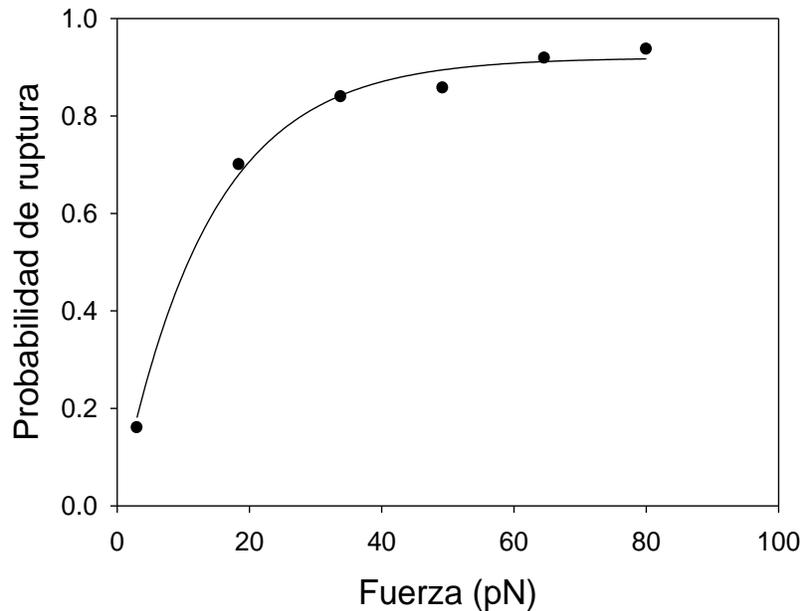


Figura 19: Probabilidad de ruptura de la interacción FtsZ-sZipA determinado por pinza óptica

La curva se ajustó a una ecuación exponencial de dos parámetros

$$f = a \cdot (1 - e^{-b \cdot x})$$

Donde f es la probabilidad de ruptura, x es fuerza en pN,  $a = 0,9198 \pm 0,0166$ ;  $b = 0,0731 \pm 0.0060$  y  $R^2 = 0,9939$

Se observa que a medida que aumenta la fuerza hay un incremento exponencial en la probabilidad de ruptura. Se correlacionó la probabilidad de ruptura con el tiempo de residencia a distintas fuerzas entre 0 y 80 pN

De esta manera se obtuvieron los parámetros termodinámicos y dinámicos de la disociación del complejo FtsZ-sZipA *in singulo* (Tabla 3). Además, también se obtuvo un parámetro estructural importante para la disociación del complejo como es la distancia al estado de transición y el coeficiente de ductilidad cinética. También

se estudió el comportamiento de la interacción a distintas fuerzas, de manera que se pudo obtener una correlación entre la probabilidad de ruptura de la interacción a una fuerza dada y cuánto tiempo dura esta interacción.

Hasta el momento se han obtenido una serie de parámetros que permiten caracterizar la interacción desde el punto de vista dinámico, termodinámico y desde su resistencia mecánica tales como tiempo de residencia,  $k_{off}$ ,  $\Delta G^{\circ}$ ,  $\Delta H^{\circ}$  y  $\Delta S^{\circ}$  en ausencia de fuerzas y el tiempo de residencia y la probabilidad de ruptura y su dependencia de la fuerza. Además, se han obtenido parámetros adicionales que otorgan información acerca del estado de transición y acerca del comportamiento dúctil del complejo. Con lo anterior ha sido posible hacer una correlación entre los tiempos de residencia y la resistencia mecánica, sin embargo, estos valores no se han correlacionado con los parámetros termodinámicos determinados en el objetivo 1. Se espera que haya una concordancia entre las medidas termodinámicas, dinámicas y de fuerza, y que sean coherentes con la dinámica del funcionamiento del divisoma, esto nos lleva a plantear el objetivo 3.

### **5.4 Objetivo específico 3: Correlacionar las medidas de fuerza con las medidas termodinámicas y dinámicas del complejo FtsZ-ZipA**

SMD es una técnica bioinformática que permite estudiar la disociación de un complejo. La disociación del complejo es inducida por el alejamiento de una de las macromoléculas a una velocidad constante. SMD permite obtener parámetros energéticos, de fuerza y también información acerca de la superficie de interacción durante toda la disociación. Por este motivo SMD es una técnica apropiada para hallar una correlación entre lo termodinámico y la resistencia mecánica.

#### **5.4.1 Ensamblaje del complejo FtsZ y ZipA**

Para realizar SMD es necesario contar con modelos de cada una de las proteínas interactuantes, por este motivo fue necesario generar un modelo del extremo C-terminal de FtsZ por estrategias de modelamiento comparativo y modelamiento *ab initio*. Posteriormente para garantizar que la estructura de partida del SMD fuera una estructura equilibrada energéticamente se hicieron dinámicas moleculares, que nos permitieron seleccionar la estructura de menor energía determinada por el FEL (*Free Energy Landscape* o diagrama de energía libre) (Fig. 20).

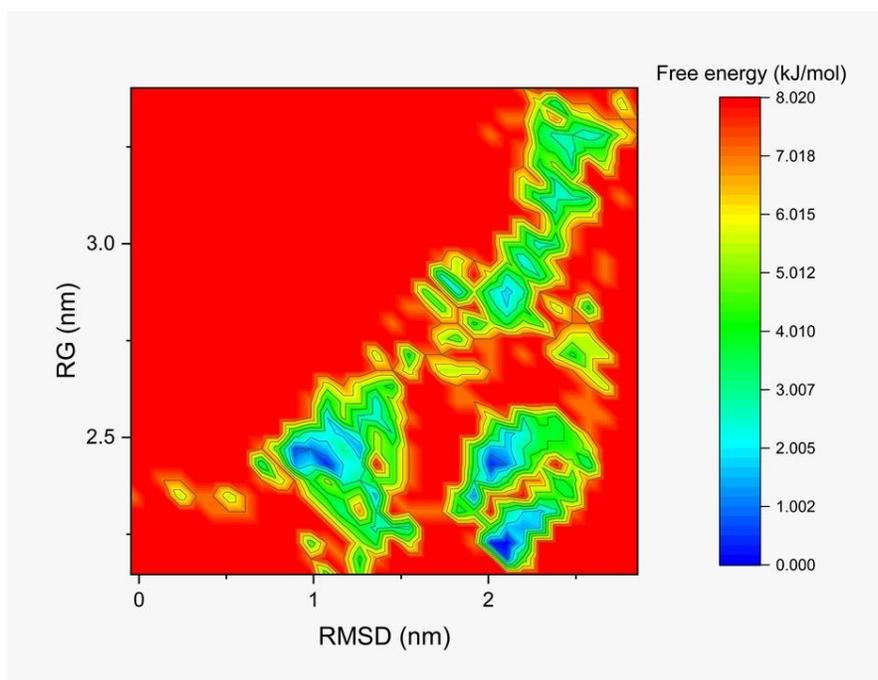


Figura 20 Diagrama de energía libre del modelo de FtsZ. RG es el radio de giro y RMSD es la *Root minimum square distance*. La escala de colores indica la magnitud de la energía libre, donde en azul se indican las más bajas y en rojo las más altas

Luego se ensambló el complejo tomando la estructura de menor energía del extremo C-terminal de FtsZ y se acopló a la cavidad del dominio C-terminal de ZipA.

#### 5.4.2 *Steered Molecular Dynamic* del complejo FtsZ-ZipA

Se llevó a cabo la SMD durante 1000 ps, con la cual se obtuvo un diagrama de la fuerza registrada durante el proceso de alejamiento del extremo C-terminal de FtsZ a lo largo del eje z. Posterior a esto se calculó la energía durante el mismo proceso utilizando las distancias de separación entre los centros de masas de ambas proteínas.

El gráfico de fuerza vs tiempo de las tres simulaciones (Figura 21 A) muestra un aumento de la fuerza a lo largo del tiempo hasta un primer máximo, posterior a esto

un valle y un segundo máximo de menor intensidad que el primero. En el gráfico de energía vs tiempo (Figura 21 B) se observa que la energía es máxima en el segundo máximo del gráfico de fuerza vs tiempo y que el primer máximo no se ve reflejado en este gráfico tan notoriamente. Los tiempos y magnitudes de fuerza de estos eventos se describen en la tabla 5.

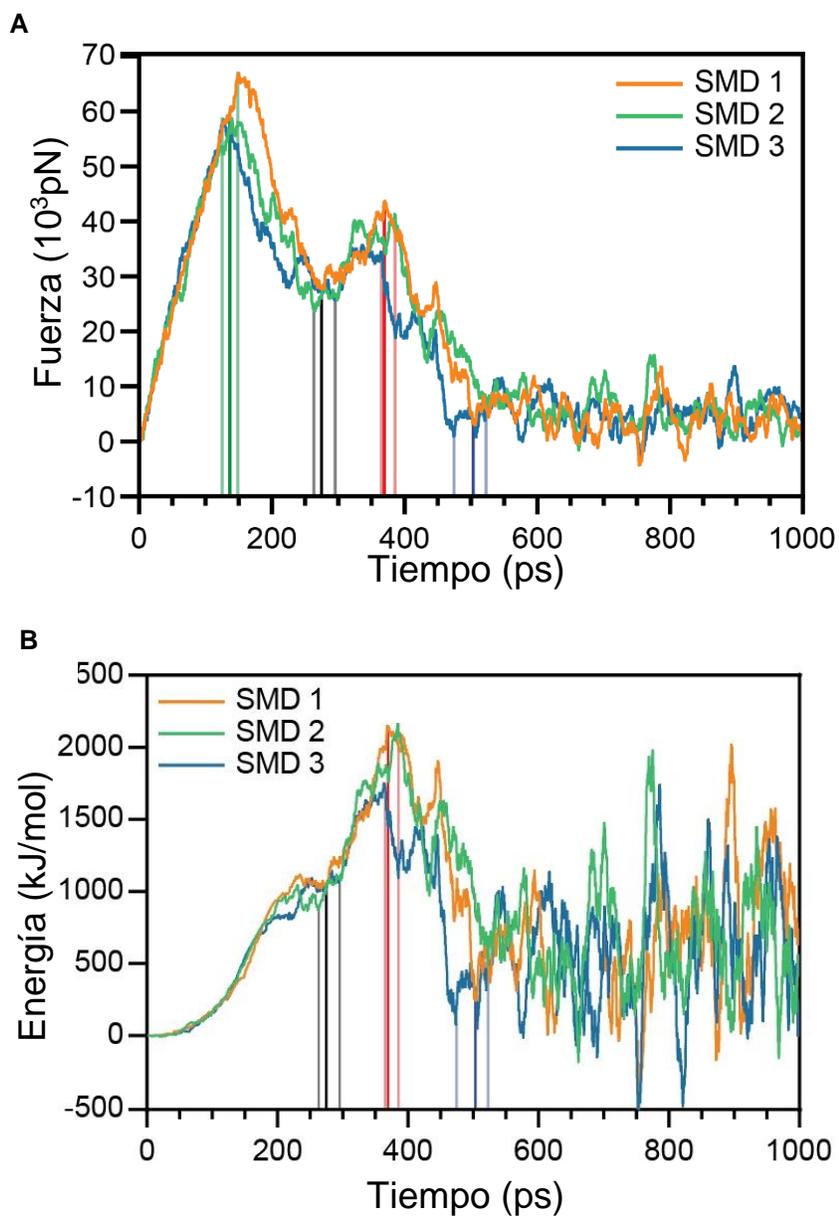


Figura 21 Trazas de fuerza y energía vs tiempo de la disociación de FtsZ-ZipA por SMD. **A.** Fuerza vs tiempo **B.** Energía vs tiempo de la disociación. Las líneas verdes paralelas al eje Y señalan el primer máximo de fuerza, las líneas negras paralelas al eje Y señalan el valle entre ambos máximos, las líneas paralelas al eje Y rojas señalan el estado de transición (segundo máximo de fuerza) y las líneas azules paralelas al eje Y señalan el estado final o disociado.

	Primer máximo	Valle	Segundo máximo (estado de transición)	Estado final (estado disociado)
Tiempo (ps)	136,7 ± 11,2	276,1 ± 16,4	371,1 ± 11,0	499,3 ± 24,5
Fuerza (10 <sup>3</sup> pN)	61,7 ± 4,8	25,7 ± 2,1	40,0 ± 4,7	4,0 ± 3,5
Energía (kJ/mol)	351,30 ± 71,23	1044,0 ± 25,1	1879,6 ± 143,6	25,9 ± 24,0

Tabla 5. Fuerza vs tiempo de los momentos más relevantes de la disociación del C-terminal de FtsZ y C-terminal de ZipA por SMD.

El estado de transición se define como el estado de mayor energía entre el estado unido y el estado disociado<sup>73</sup>. En la dinámica vemos que el estado de transición está a los 371 ± 11 ps de acuerdo a la figura 21 B y tiene una energía correspondiente a los 1879,143,6 kJ/mol. Es relevante mencionar que existe otro máximo de energía, pero de menor magnitud a los 376,1 ps (Figura 21 B), al cual se refiere como primer máximo. Posterior al estado de transición se registra una baja que es concordante con un estado de disociación ya que luego de este no se observa una tendencia en variaciones en la fuerza o energía y en las imágenes de la dinámica solo se observa el alejamiento del C-terminal de FtsZ. La energía del evento de separación es de 25,9 kJ/mol (Fig. 22)

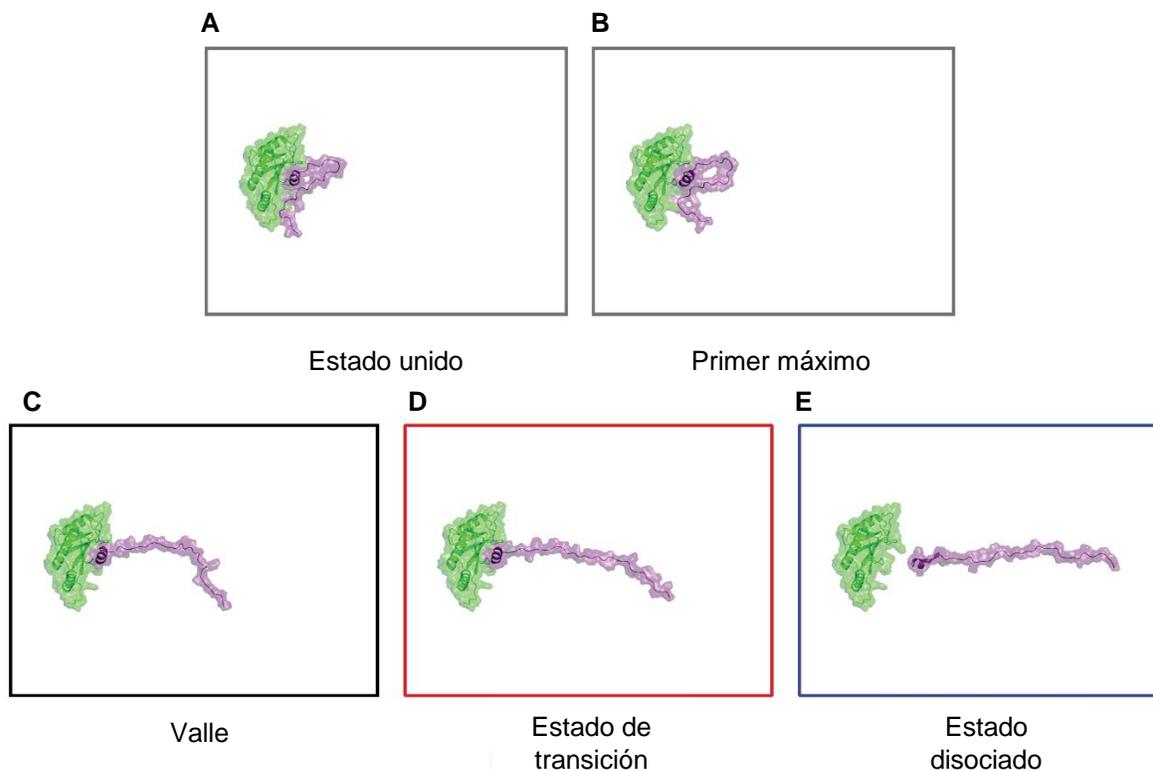


Figura 22. Imágenes del complejo FtsZ-ZipA en momentos clave durante la dinámica molecular SMD, a la izquierda en verde C-terminal de ZipA, a la derecha en morado C-terminal de FtsZ. **A.** Estado unido. **B.** Primer máximo. **C.** Valle **D** Estado de transición. **E** Estado disociado.

Al analizar las imágenes (Fig. 22) se observa que los eventos que ocurren desde el estado unido hasta el valle corresponden al estiramiento de la RID del C-terminal de FtsZ y que entre el estado de transición y el estado final ocurre la disociación entre la hélice C-terminal de FtsZ y el bolsillo hidrofóbico del C-terminal de ZipA. Para estudiar este fenómeno con más detalle se analizó la distancia entre los C-terminales de ambas proteínas durante la disociación.

#### 5.4.2.2 Distancias desde el estado basal al estado de transición y estado disociado.

Primeramente, se observa que todas las distancias se encuentran en el rango de los nm (Tabla 7). Es posible realizar un análisis comparativo entre las imágenes del

movimiento de las proteínas durante la dinámica (Fig. 22) con las distancias entre los centros de masa y las interacciones residuo-residuo más relevantes para la interacción FtsZ-ZipA (Fig. 23 y tabla 7). Respecto a lo anterior se observa que desde el primer máximo un avance entre las distancias entre los centros de masa. Al contrario no se observa durante esta fase un aumento en las distancias entre los residuos del sitio de interacción de ambas proteínas. Estas distancias comienzan a crecer luego del estado de transición.

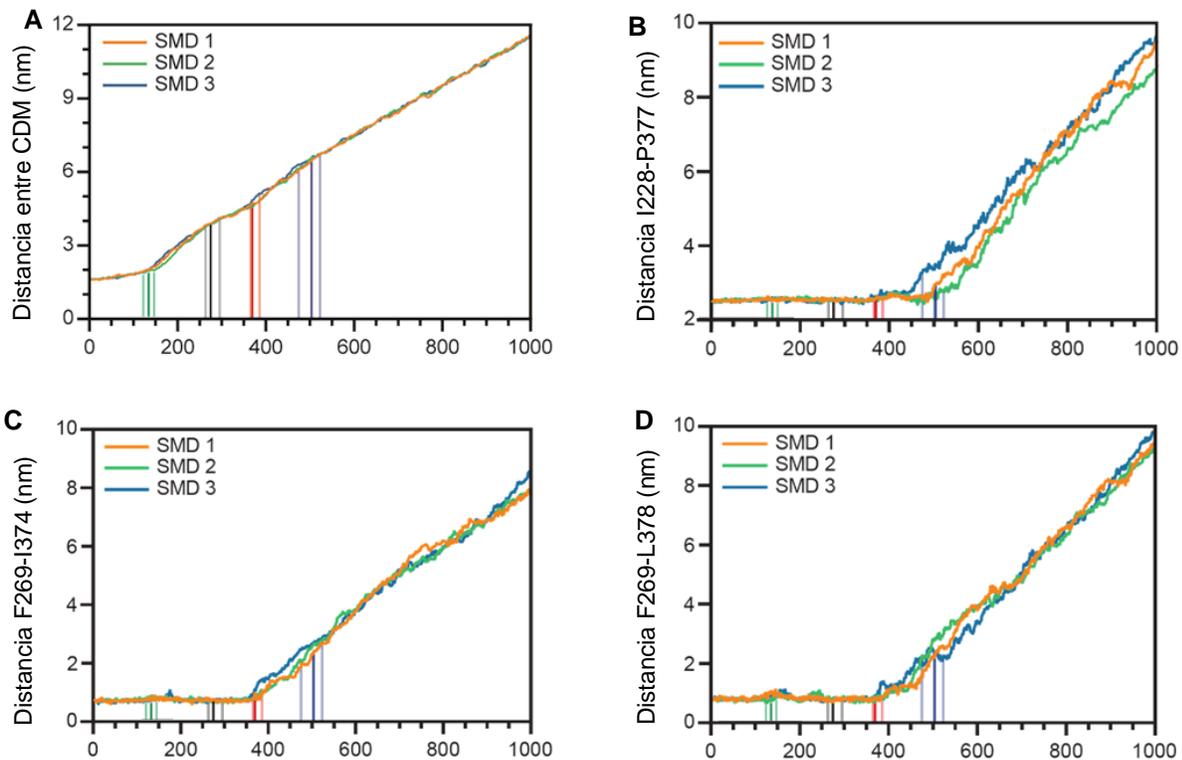


Figura 23. Distancia entre C-terminal ZipA y C-terminal FtsZ durante las simulaciones por SMD. **A** Distancia entre los centros de masa del C-terminal de ZipA y el C-terminal de FtsZ. **B** Distancia entre I228 de ZipA y P377 de FtsZ, **C** distancia entre F269-I374 de ZipA y FtsZ y **D** distancia entre F269-L378 de FtsZ, Las líneas verticales verdes señalan el primer máximo de fuerza, la negras el valle, las líneas rojas el segundo máximo y las líneas azules el estado final.

Se calcularon dos distancias al estado de transición, la primera considerando que el estado basal es el tiempo cero de la simulación y la otra considerando que el estado basal corresponde al valle del gráfico Fuerza vs tiempo (Fig 21 A y Tabla 6)

	Tiempo cero (nm).	Primer máximo (nm).	Valle (nm).	Estado de transición en relación al tiempo cero (nm).	Estado de disociación en relación al tiempo cero (nm).	Estado de transición en relación al valle (nm).	Estado de disociación en relación al valle (nm).
Centros de masa	1.75 ± 0.00	2.06 ± 0.05	3.97 ± 0.26	4.77 ± 0.07	6.52 ± 0.21	0.80 ± 0.26	2.55 ± 0.33
I228-P377	2,42 ± 0.	2,50 ± 0,03.	2,48 ± 0,05	2,50 ± 0.05	2,99 ± 0,36	0,02 ± 0.07	0,051 ± 0,31
F269-I374	0,61 ± 0,00.	0,64 ± 0,04.	0,60 ± 0,02.	0,70 ± 0,14.	2,50 ± 0,07.	0,10 ± 0,12.	1,90 ± 0,05.
F269-L378	0,62 ± 0,00.	0,70 ± 0,03	0,56 ± 0,03.	0,69 ± 0,00.	1,99 ± 0,23.	0,13 ± 0,07	1,43 ± 0,20.

Tabla 6 Distancia entre los centros de masa y aminoácidos más importantes para la interacción C-terminal ZipA y C-terminal FtsZ durante las simulaciones por SMD, considerando como estado inicial el tiempo cero de la dinámica y el valle.

Ya definido el estado de transición, queda por caracterizarlo estructuralmente. Al analizar el Área accesible al solvente.

#### 5.4.2.3 Determinación del área accesible al solvente

El área accesible al solvente permite evidenciar como las regiones C-terminal de FtsZ y de ZipA se van hidratando<sup>74</sup> a medida que ocurre la disociación (Fig. 24 y tablas 7 y 8). Tanto en la AAS total del complejo (Fig. 24 A) y de las proteínas individuales (Fig. 24 B y C) se observa que luego del estado de transición hay un aumento del área accesible al solvente lo cual es concordante con la hidratación de superficie anteriormente escondida (Fig. 22). En cuanto a diferencia de la AAS entre el estado basal y el estado de transición, se observa que la AAS del C-terminal de ZipA aumenta mucho más que la AAS del complejo y del C-terminal de FtsZ, lo que indica que hay una mayor hidratación. Además, estado disociado no se observa

cambio en la AAS lo que respalda que este punto estaría representando el estado de disociación.

El análisis por SMD permitió realizar una caracterización al estado de transición del complejo FtsZ-ZipA desde un punto de vista estructural. También mostró el comportamiento de este sistema frente a una disociación inducida por fuerzas, lo cual es un buen modelo que explica lo que podría ocurrir durante los experimentos de pinza óptica, en los cuales se induce la disociación del complejo al alejarlos uno del otro a velocidad constante, de manera similar a SMD. Por último, los valores de AAS permiten visualizar como la entropía del solvente es el principal factor termodinámico que rige el equilibrio de disociación/formación del complejo.

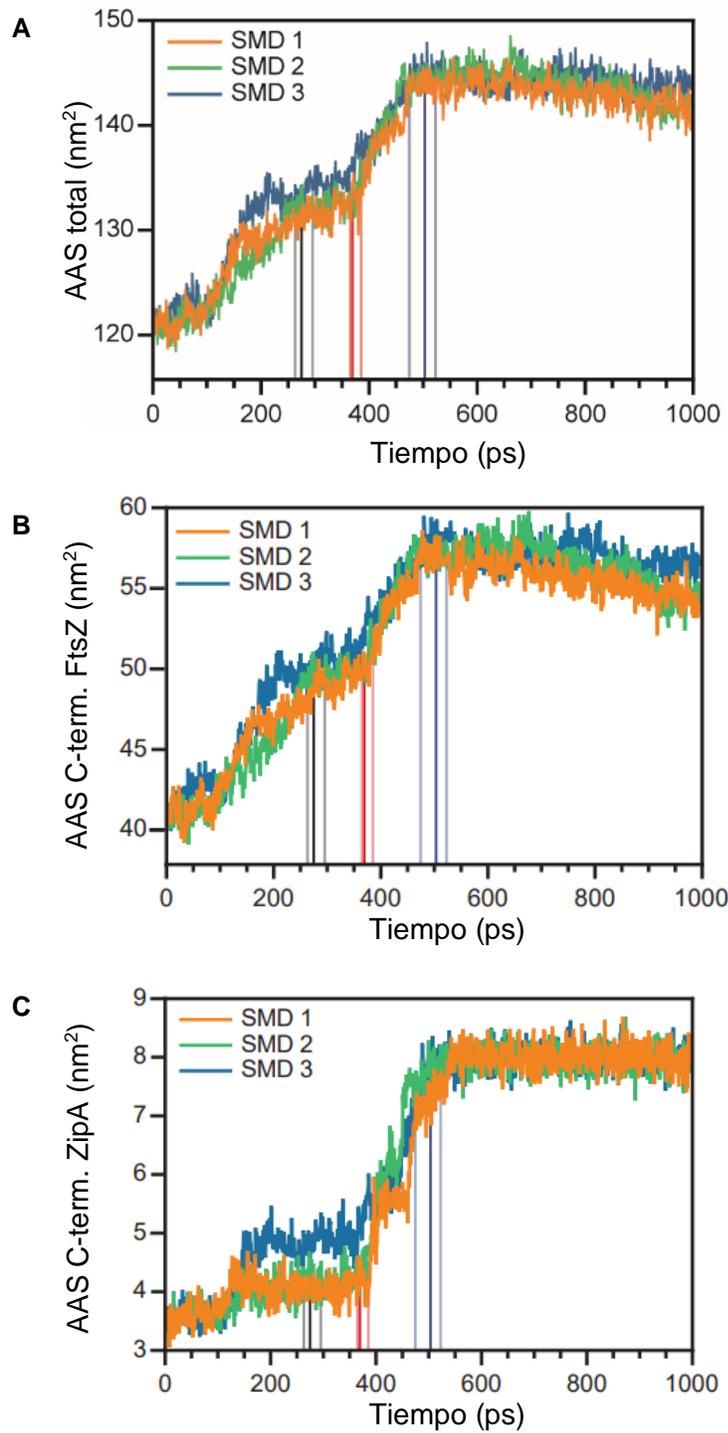


Figura 24. Área accesible al solvente de la disociación entre C-terminal de FtsZ y C-terminal de ZipA por SMD. **A** AAS del complejo completo. **B** AAS del C-terminal de FtsZ y **C** AAS del C-terminal de ZipA. Las líneas negras muestran el valle, las rojas el estado de transición y las azules el estado final.

	AAS Complejo C-terminal FtsZ C-terminal ZipA (nm <sup>2</sup> )	AAS FtsZ (nm <sup>2</sup> )	AAS ZipA (nm <sup>2</sup> )
Estado unido	122,1 ± 0,0	41,2 ± 0,0	3,7 ± 0,0
Primer máximo	125,9 ± 3,1	43,9 ± 0,1	3,8 ± 0,1
Valle	132,2 ± 1,5	49,8 ± 1,3	4,5 ± 0,4
Estado de transición	134,6 ± 1,8	50,3 ± 0,1	4,2 ± 0,3
Estado disociado	144,3 ± 1,5	56,8 ± 0,4	7,5 ± 0,5

Tabla 7 AAS Total del complejo durante la disociación por SMD

	Complejo C-terminal FtsZ C-terminal ZipA	C-terminal FtsZ	C-terminal ZipA
$\Delta AAS_{\text{Inicio} \rightarrow \text{Transición}} \text{ (nm}^2\text{)}$	12,5 ± 1,8	9,1 ± 0,1	0,5 ± 0,3
$\Delta AAS_{\text{Inicio} \rightarrow \text{Disociado}} \text{ (nm}^2\text{)}$	22,1 ± 1,5	15,6 ± 0,4	3,8 ± 0,5
$\Delta AAS_{\text{Valle} \rightarrow \text{Transición}} \text{ (nm}^2\text{)}$	2,4 ± 2,3	0,5 ± 1,4	-0,3 ± 0,3
$\Delta AAS_{\text{Talle} \rightarrow \text{Disociado}} \text{ (nm}^2\text{)}$	9,7 ± 1,4	7,0 ± 1,1	3,0 ± 0,7

Tabla 8  $\Delta AAS$  durante la disociación por SMD

## 6. DISCUSIÓN

La interacción FtsZ-ZipA es uno de los primeros eventos que ocurre durante el proceso de división celular, la formación de este complejo es imprescindible para el correcto ensamblaje y funcionamiento del divisoma<sup>18,33</sup>. A la fecha esta interacción se ha estudiado desde el punto de vista estructural<sup>29</sup>, funcional<sup>75</sup> y biofísico<sup>76</sup>, sin embargo un análisis termodinámico acabado, medidas *in singulo* de la dinámica y un estudio de la resistencia mecánica aún no han sido reportados. En esta tesis se realizó un estudio de una serie de parámetros utilizando metodologías *in singulo* e *in multiplo* que permitieron dar información en estas áreas menos exploradas de la interacción FtsZ-ZipA. Esto se hizo para dar respuesta a la hipótesis planteada en este trabajo, la cual fue investigar la dinámica de la interacción entre FtsZ y ZipA y determinar si esta se correlaciona con la dinámica del anillo Z y del divisoma y a su vez si esto es compatible con una resistencia mecánica suficiente para tolerar la fuerza ejercida por los protofilamentos de FtsZ.

Primeramente, se buscó comprender el carácter termodinámico de la interacción y descubrir cual es la naturaleza de la interacción FtsZ-ZipA, para ello se llevaron a cabo estudios de micro calorimetría.

Se determinó por medio de ITC que la constante de disociación del complejo FtsZ-ZipA es de  $1,03 \cdot 10^{-6}$  M. Este valor se encuentra en el rango bajo micromolar<sup>77</sup> en concordancia con algunas de las determinadas por otras metodologías (tabla 7). El valor de esta constante termodinámica indica que el equilibrio se encuentra desplazado hacia la formación del complejo.

Técnica	Condiciones experimentales	$K_D$ ( $M^{-6}$ )	Referencia
ELISA	Péptido FtsZ – ZipA soluble (23-328)	~0,1	Mosyak et. al 2000 <sup>18</sup>
Ultracentrifugación analítica	FtsZ-ZipA	~ 1	Tesis María Pilar López (CSIC)
ITC	sZipA y FtsZ, pH 7,4	1,03	Esta tesis
Anisotropía de fluorescencia	FtsZ-ZipA insertada en liposomas	1,39 ± 0,20	Tesis Alexis Órdenes (BEM)
Static light scattering	sZipA y FtsZ en ausencia de $Mg^{2+}$ pH 7,4	1,66	Martos et al 2010 <sup>74</sup>
Anisotropía de fluorescencia	FtsZ-ZipA solubilizada en detergente	1,72 ± 0,1	Tesis Alexis Órdenes (BEM)
Sedimentación al equilibrio	sZipA y FtsZ en ausencia de $Mg^{2+}$ pH 7,4	3,98	Martos et al 2010 <sup>18</sup>
Static light scattering	sZipA y FtsZ 5 mM $Mg^{2+}$ , pH 7,4	5,75	Martos et al 2010 <sup>74</sup>
SPR	Péptido C-terminal FtsZ (367-383) Dominio- C-terminal de ZipA (185-328) fusionado con proteína M185	7	Kenny et. al 2003 <sup>18</sup>
Sedimentación al equilibrio	sZipA y FtsZ 5 mM $Mg^{2+}$ pH 7,4	7,94	Martos et al 2010 <sup>74</sup>
SPR	Péptido C-terminal FtsZ (367-383) Dominio- C-terminal de ZipA(185-328) fusionado con proteína M185	~20	Mosyak et. al 2000 <sup>73</sup>
ITC	Péptido C-terminal de FtsZ, Dominio- C-terminal de ZipA(185-328) fusionado con proteína M185	~35	Mosyak et. al 2000 <sup>18</sup>
Intensidad de fluorescencia	ZipA y FtsZ, pH 6,0	43 ± 20	Kuchibhatla et. al 2011 <sup>73</sup>
Intensidad de fluorescencia	ZipA y FtsZ, pH 6,8	65 ± 6	Kuchibhatla et. al 2011 <sup>73</sup>
Intensidad de fluorescencia	ZipA y FtsZ, pH 8,0	85 ± 10	Kuchibhatla et. al 2011 <sup>74</sup>

Tabla 9: Referencias de constante de disociación del complejo FtsZ-ZipA.

Se observan valores que son al menos un orden de magnitud mayores y que se pueden explicar por la baja sensibilidad de las metodologías empleadas, por las condiciones de los experimentos o por el largo de los péptidos o proteínas utilizadas.

También se obtuvo el número de sitios de interacción  $0,9660 \pm 0,0057$  que indica que en ZipA existe un sitio de interacción para FtsZ, confirmando lo propuesto por otros autores<sup>18,36</sup>. El valor de  $\Delta G^{\circ}$  obtenido es de  $-8,50 \pm 0,91$  kcal/mol, este valor negativo indica que la interacción ocurre de manera espontánea a la temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$  a la cual fue realizada la medición y que es la temperatura del nicho ecológico de *E. coli*. El valor de  $\Delta G^{\ddagger}$  fue determinado por pinza óptica, y fue de  $16,57 \pm 1,26$  pN nm que traducido a kcal/mol es  $2,4 \pm 0,74$ . Este valor indica que hay una barrera energética coherente entre el estado unido y estado disociado, aun así es importante destacar que las medidas en pinza óptica se realizaron a temperatura ambiente  $23^{\circ}\text{C}$ , que limita el análisis comparativo con la energía libre determinada por ITC.

El  $\Delta H^{\circ}$  de la interacción es de  $-2,86$  kcal/mol, esto significa que al ocurrir la unión entre FtsZ y ZipA hay una liberación de energía en forma de calor. Este cambio en la entalpía se puede explicar por la formación de interacciones no covalentes, como Van der Waals, puentes de hidrógeno e interacciones dipolares. En el caso de las proteínas FtsZ y ZipA se sabe que la naturaleza de la interacción es debido a un efecto hidrofóbico<sup>18,36</sup>. La excepción a la predominante interacción hidrofóbica es la dupla Arg305 y Tyr371 de ZipA y FtsZ respectivamente, aunque no sea la más relevante para la interacción entre las proteínas<sup>18</sup>, que establecen una interacción electrostática. Además, hay dos puentes de hidrógeno formados entre los esqueletos peptídicos de aminoácidos de FtsZ como ZipA que también contribuyen a la interacción<sup>78</sup>. Así, al unirse FtsZ y ZipA la formación de estas interacciones contribuirá en el cambio de entalpía. También la salida de moléculas de agua unidas

a las superficies hidrofóbicas expuestas de las proteínas por separado, podrían formar puentes de hidrógeno con otras moléculas del solvente. De allí que la formación de todas estas interacciones es lo que explicaría un cambio negativo en la entalpía, de este modo, la unión de la hélice C-terminal de FtsZ al bolsillo hidrofóbico del dominio C-terminal de ZipA concuerda con un proceso exotérmico dado por un cambio de entalpía negativo. En cuanto a la temporalidad de la formación de la interacción, los parámetros entálpicos y entrópicos no permiten proponer un mecanismo. Sin embargo se ha descrito que las interacciones electrostáticas pueden establecerse a una distancia de 4 a 6 Å. Teniendo esto en consideración, una posibilidad para la temporalidad de formación de la interacción entre FtsZ-ZipA es que debido al efecto hidrofóbico y la cercanía entre las proteínas, la unión entre sea uno de los primeros eventos en ocurrir, lo cual permitiría la atracción y acercamiento entre las proteínas, de manera que la hélice de FtsZ se enfrente a ZipA en una orientación y distancia tal que se establezca la interacción favorecida por el ocultamiento de las superficies hidrofóbicas.

Al analizar el balance entrópico-entálpico ( $\Delta H^\circ$  de -2,86 kcal/mol vs  $-T\Delta S^\circ$  -5,63 kcal/mol) de la interacción entre estas dos proteínas, la entalpía no alcanza a dominar la termodinámica de la interacción, por lo que lo más relevante en la formación del complejo FtsZ-ZipA es el cambio de entropía. En general el cambio de entropía que surge de la interacción entre dos proteínas tiene varios componentes, lo cual está descrito por la siguiente ecuación:

$$\Delta S = \Delta S_{\text{solv}} + \Delta S_{\text{conf}} + \Delta S_{\text{r/t}}$$

Donde  $\Delta S_{\text{solv}}$  es el cambio de entropía del solvente debido al ocultamiento de las superficies y consecuente liberación de solvente (generalmente muy positivo).  $\Delta S_{\text{conf}}$  es el cambio de la entropía conformacional o libertad conformacional (puede contribuir positiva o negativamente dependiendo de los grados de libertad). Finalmente,  $\Delta S_{r/t}$  es la pérdida de grados de libertad traslacionales (t) y rotacionales (r) al formarse el complejo, lo cual reduce el número de partículas en solución y contribuye de forma desfavorable a la entropía de unión<sup>79</sup>. Debido a que el valor de  $\Delta S^\circ$  para la formación del complejo FtsZ-ZipA es positivo, y sumado a la información estructural y análisis entálpico, es posible que el solvente contribuya en gran manera al valor de  $\Delta S^\circ$  total. Esta posible explicación se respalda por el trabajo de Yadav et al<sup>80</sup> quienes por medio de simulaciones describieron un modelo que permite explicar algunos aspectos del efecto hidrofóbico desde la termodinámica. En este trabajo se describe que la solvatación de compuestos hidrofóbicos se debe a cambios de entropía conformacional del solvente. Proponen además que las moléculas de agua que solvatan la región hidrofóbica adoptan una estructura descrita como *crustwater*. El *crustwater* es una disposición rígida y coordinada de las moléculas de agua concordante con una estructura tipo clatrato.

El análisis de AAS permitió también confirmar la importancia del rol del solvente durante la etapa de disociación del complejo. A medida que las proteínas se van disociando, aumenta su exposición al solvente. Esto puede resultar evidente para la hélice C-terminal de FtsZ, sin embargo, también indica que el bolsillo hidrofóbico de ZipA se encontraría expuesto al solvente en un estado disociado. Por análisis del AAS por SMD se logró determinar la diferencia de AAS entre estado unido y

disociado esta fue de  $\sim 850 \text{ \AA}^2$  valor que se encuentra dentro de lo reportado para la interacción proteína-proteína aunque es comparativamente bajo en relación a otras interacciones proteína-proteína<sup>81</sup>. Esto tiene sentido al considerar que una pequeña región de FtsZ como es el PCT es lo que se inserta en el bolsillo hidrofóbico de ZipA.

Un parámetro estructural que también permitió resolver el análisis por SMD es la distancia al estado de transición. A diferencia de pinza óptica, en el gráfico de energía vs tiempo se observa un máximo solapado con el lado izquierdo del estado de transición. Esto podría representar la presencia de un intermediario en el proceso de disociación. Otra explicación posible es que la RID del C-terminal de FtsZ al encontrarse menos expuesta al solvente en el estado unido y esta al ser tirada a lo largo de la caja de agua, habría cierta energía involucrada en el estiramiento de la RID. En cuanto al análisis de distancias, se determinaron dos distancias al estado de transición. Es importante considerar que desde el inicio de la dinámica hasta el valle hay un estiramiento de la RID de FtsZ evidenciado por el máximo de fuerza durante la dinámica. Además, en ese tramo de la dinámica no hay una separación considerable entre los residuos de FtsZ y ZipA se propone que la segunda distancia al estado de transición es la más representativa del proceso de la separación del C-terminal del bolsillo hidrofóbico de ZipA, en consecuencia, el valle del gráfico fuerza vs tiempo podría señalar el estado unido. Es importante notar que las distancias desde el estado unido al estado de transición entre FtsZ-ZipA se encuentran en el rango de los  $0,2 \pm 0,07$  a  $0,80 \pm 0,26$  nm. Este concepto se entiende como la distancia que habría que separar a FtsZ de ZipA desde el estado unido al estado de

transición. Los valores determinados por SMD concuerdan plenamente con la distancia al estado de transición determinada por Pinza Óptica  $0,29 \text{ nm} \pm 0,03$ . Además al comparar esta magnitud con otras obtenidas también por pinza óptica, pero para otros complejos se observa que esta se encuentra dentro de los mismo valores;  $0,42 \text{ nm}$  Fibronectina / $\alpha 5\beta 1$  integrina<sup>64</sup>,  $0,01 \text{ nm}$  PpaF-Sec62<sup>82</sup> y  $0,5 \text{ nm}$  Thy-1/ $\alpha v\beta 3$ <sup>83</sup>. Estructuralmente esta distancia puede corresponder a la ruptura de una o varias interacciones, posiblemente del tipo Van der Waals<sup>10</sup>. De acuerdo a Friddle<sup>84</sup> y Robeson et al (enviado),  $\Delta x^{\ddagger ap}$  es proporcional a  $\Delta x^{\ddagger ver}/N$ , donde  $\Delta x^{\ddagger ap}$  es la distancia aparente al estado de transición,  $\Delta x^{\ddagger ver}$  es el valor verdadero del estado de transición y N es el número total de interacciones en dicho estado. Por un lado, considerando la naturaleza hidrofóbica de la interacción se asume que  $\Delta x^{\ddagger ver}$  es  $0,15 \text{ nm}$ , la distancia equivalente a un radio de Van der Waals promedio entre H, O, C y N y el  $\Delta x^{\ddagger ap}$  es  $0,29$ , la magnitud determinada por pinza óptica, entonces la cantidad de interacciones entre FtsZ y ZipA en el estado de transición es solo una, la cual se encuentra en proceso de alejamiento. Por otro lado, si se considera como  $\Delta x^{\ddagger ap}$   $0.80 \pm 0.26 \text{ nm}$ , la distancia al estado de transición obtenida por SMD entonces el valor de N también arroja que habría una interacción.

Es posible entonces plantear que la diferencia entre el estado unido y el estado disociado pueda deberse a la ruptura de las asociaciones hidrofóbicas, de manera bastante cooperativa debido a las semejanzas entre los valores de distancia al estado de transición<sup>36</sup>. Esto puede verse apoyado por el valor del coeficiente de ductilidad cinética, el cual para la interacción FtsZ-sZipA tiene un valor intermedio entre quebradizo y dúctil. A la fecha este concepto es relativamente nuevo y una

mayor interpretación biológica no ha sido propuesta. Sin embargo, una posible explicación para la componente quebradiza de este parámetro podría ser una cooperatividad en la asociación/disociación del complejo. Así, la ruptura cooperativa de las interacciones hidrofóbicas causaría la entrada de agua al sitio de la interacción que llevaría posteriormente a la disociación del complejo. Es probable que el proceso inverso, de asociación también ocurra de manera análoga, es decir, que una vez que la hélice C-terminal de FtsZ esté lo suficientemente cerca, la asociación con ZipA sea bastante cooperativa. Esta asociación y disociación sería bastante dinámica, de acuerdo a lo discutido previamente respecto al valor de la  $K_D$ . Queda por averiguar el carácter dinámico de la interacción en cuanto a la duración de la asociación de las proteínas una vez formado el complejo.

Los estudios en pinza óptica permitieron obtener el tiempo de residencia de la interacción FtsZ-ZipA, el cual es de  $12,2 \pm 0,7$  segundos de acuerdo al ajuste al modelo de DHS. Esto quiere decir que cada vez que FtsZ y ZipA se unen, esta interacción dura alrededor de 12 segundos. Se ha determinado el tiempo de recambio de FtsZ en el anillo Z (FtsZ-ZipA-FtsA) por medio de FRAP, el cual es de 8-9 segundos<sup>64</sup>. Mas aún el valor determinado en este trabajo de Tesis es comparable con los valores de los procesos envueltos en la dinámica de funcionamiento del anillo Z. Así, el tiempo de recambio *in vivo* es de 9 s, el tiempo de recambio para la hidrólisis de GTP *in vitro* es de 8 s, el tiempo de desensamblaje de un protofilamento GDP es de 5 s y el reensamblaje es de 7 s<sup>85</sup>. Si bien el tiempo de residencia determinado en este estudio es un parámetro determinado *in singulo* y el tiempo de recambio de FtsZ es un parámetro *in multiplo*, se puede observar que

los tiempos se encuentran dentro de la misma magnitud, lo cual tiene sentido debido a que ambos dan cuenta de la etapa de inicio del proceso biológico de división y ocurrirían de manera paralela. A su vez la  $k_{off}$  del proceso de paso del complejo FtsZ-ZipA a FtsZ y ZipA por separado es de  $8,1719 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$  por el modelo. Este parámetro en comparación con otras interacciones determinadas *in singulo* son de similar magnitud,  $\sim 0,051 \text{ s}^{-1}$  para el par de proteínas Thy-1-  $\alpha\beta 3^{81}$  y  $0,012 \text{ s}^{-1}$  para las proteínas Fibronectina /  $\alpha 5\beta 1$  integrina<sup>86</sup>. Al comparar este parámetro con otras interacciones de proteínas determinadas *in multiplo* con varias proteínas con sus respectivos inhibidores<sup>83</sup> resultaron del orden  $10^{-3} - 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  esta información está en acuerdo con las magnitudes regularmente obtenidas para interacciones proteína-ligando. Es importante mencionar que la  $k_{off}$  es dependiente del tamaño de las partículas interactuantes, así como también de los cambios conformacionales que estas deben sufrir al momento de establecer la interacción, por lo anterior tiene sentido que la  $k_{off}$  de un complejo proteína-proteína sea mayor que la de un complejo enzima ligando<sup>37</sup>. Así, se puede concluir que la dinámica de FtsZ-ZipA es compatible con lo evidenciado para la dinámica de recambio del anillo Z y del divisoma.

Finalmente, queda por responder si la resistencia mecánica del complejo FtsZ-ZipA es compatible con la dinámica del complejo.

El determinar la resistencia mecánica del complejo FtsZ-ZipA es vital para el proceso de septación que produce las dos nuevas células hijas. Hasta el momento se desconoce cuál es el origen de esta fuerza y también su magnitud exacta. El rol de FtsZ en la generación de esta fuerza ha sido propuesto, sin embargo, hasta el

momento no se han realizado medidas directas de fuerza con FtsZ, solo estimaciones matemáticas en base a medidas experimentales de imagen. Estas determinaciones han permitido obtener la fuerza que podría generarse por la torción y giro de los protofilamentos de FtsZ. Osawa et al<sup>87</sup>., trabajaron con una mutante de FtsZ que en su C-terminal contiene la hélice anfipática de FtsA que es capaz de adherirse a la membrana citosólica<sup>40</sup>. Reportaron que en liposomas y en presencia de GTP esta proteína mutante es capaz de generar una deformación en la membrana, como una septación incipiente. Luego ellos determinaron la magnitud de esta fuerza la cual es de aproximadamente 45 pN<sup>88</sup>. Posterior a eso González de Prado et al.<sup>43</sup>, en base a lo reportado por Osawa et al<sup>87</sup>., determinaron matemáticamente que, al considerar la torción y giros de los protofilamentos, la fuerza podría llegar a magnitudes cercanas a los 70 pN. También se ha determinado que la fuerza requerida no solo para deformar la membrana, sino que para generar la invaginación es de alrededor de 400 pN. Se desconoce si los protofilamentos de FtsZ podrían generar una fuerza de tal magnitud. Es un hecho interesante que en estos experimentos y cálculos no se haya considerado el rol de las proteínas anclas de FtsZ a la membrana, lo cual es sumamente relevante, pues la fuerza generada por FtsZ debe ser transducida hacia la membrana únicamente a través de las interacciones con ZipA y FtsA en el caso de *E. coli*, por lo que es vital conocer si es posible transducir fuerzas de las magnitudes estimadas a través del complejo FtsZ-ZipA. En cuanto a las proteínas ancla ZipA podría tener un rol más protagónico que FtsA en la transmisión de fuerzas ya que a diferencia de ZipA se ha descrito que FtsA forma minianillos, estructuras que podrían antagonizar su interacción con FtsZ.

Se determinó el tiempo de interacción entre las proteínas a distintas fuerzas, por lo que dada una fuerza se puede determinar cuál es la probabilidad de que esta se mantenga o se rompa y cuánto tiempo duraría. En el caso de 45 pN la interacción duraría 1,25 s y su probabilidad de ruptura es 0,89. Para 70 pN duraría 0,73 s con una probabilidad de ruptura de 0,91. Esto primeramente permite caracterizar la interacción FtsZ-ZipA como *slip bond*, es decir que a medida que hay un aumento de la fuerza se observa una disminución del tiempo de interacción<sup>88</sup>. Además, para las fuerzas de 45 y 70 pN, fuerza que en teoría los protofilamentos de FtsZ serían capaces de generar, es muy probable que la interacción tenga una alta probabilidad de disociarse y de durar por poco tiempo. De esta manera se entiende que el comportamiento de la interacción FtsZ-ZipA es altamente dinámico, lo cual va muy de acuerdo con la noción del comportamiento del divisoma y el proceso llamado *treadmilling*. Así, puede verse que es muy poco probable que una única interacción FtsZ-ZipA sea capaz de transmitir fuerzas en el rango de 40-70 pN, sin embargo, entre 7 a 8 interacciones FtsZ-ZipA distribuidas a lo largo de un protofilamento de FtsZ podrían resistir una fuerza en este rango con un 50 % de probabilidad de ruptura, considerando que al aplicar más de una fuerza si tienen la misma dirección y sentido estas se pueden sumar y generar fuerza resultante<sup>89</sup>. Por lo anterior es posible que, de ser generadas las fuerzas teorizadas, estas sean transmitidas a la membrana a través de ZipA, de esta manera generando una deformación (Fig. 25). En cuanto a una fuerza suficiente para la septación de 400 pN se estima que 43 interacciones FtsZ-ZipA puedan resistir la transmisión, muy probablemente estas interacciones podrían estar distribuidas en varios protofilamentos de FtsZ que pueden estar interactuando lateralmente entre ellos. Queda por ver si los

protofilamentos serían capaces de generar una fuerza de tal magnitud. Existe una propuesta en la cual la fuerza generada por los protofilamentos de FtsZ es suficiente para causar una deformación inicial de la membrana citosólica, a su vez el divisoma ya ensamblado y funcional puede sintetizar peptidoglicano el cual iría ocupando estos nuevos espacios generados por la invaginación de la membrana<sup>38</sup>. Así la fuerza generada por los protofilamentos sería la fuerza inicial y la fuerza generada por la síntesis de peptidoglicano sería responsable de la estrangulación.

## 7. CONCLUSIONES

El valor de la constante de disociación permite concluir que la formación del complejo se encuentra moderadamente favorecida y dominada entrópicamente. Los estudios *in singulo* indican que el tiempo de residencia del complejo FtsZ-ZipA es dinámico en concordancia con los tiempos registrados para el divisoma. Por lo que se puede concluir que la interacción es termodinámicamente favorable y permite la dinámica del proceso en las condiciones estudiadas. Además, para pasar desde el estado unido al estado de transición hay una distancia que es concordante con el análisis de AAS. Finalmente, una única interacción FtsZ-ZipA no es capaz de resistir la fuerza ejercida por los protofilamentos de FtsZ, sin embargo, varias ZipA ancladas a un protofilamento de FtsZ serían capaces de transducir la fuerza generada por la torción y curvatura de los protofilamentos, esto es compatible con la mecánica y dinámica de funcionamiento del divisoma. Por lo anterior se concluye que la formación del complejo FtsZ-ZipA es un proceso en el cual el intercambio dinámico y la resistencia mecánica son compatibles con su función en el divisoma.

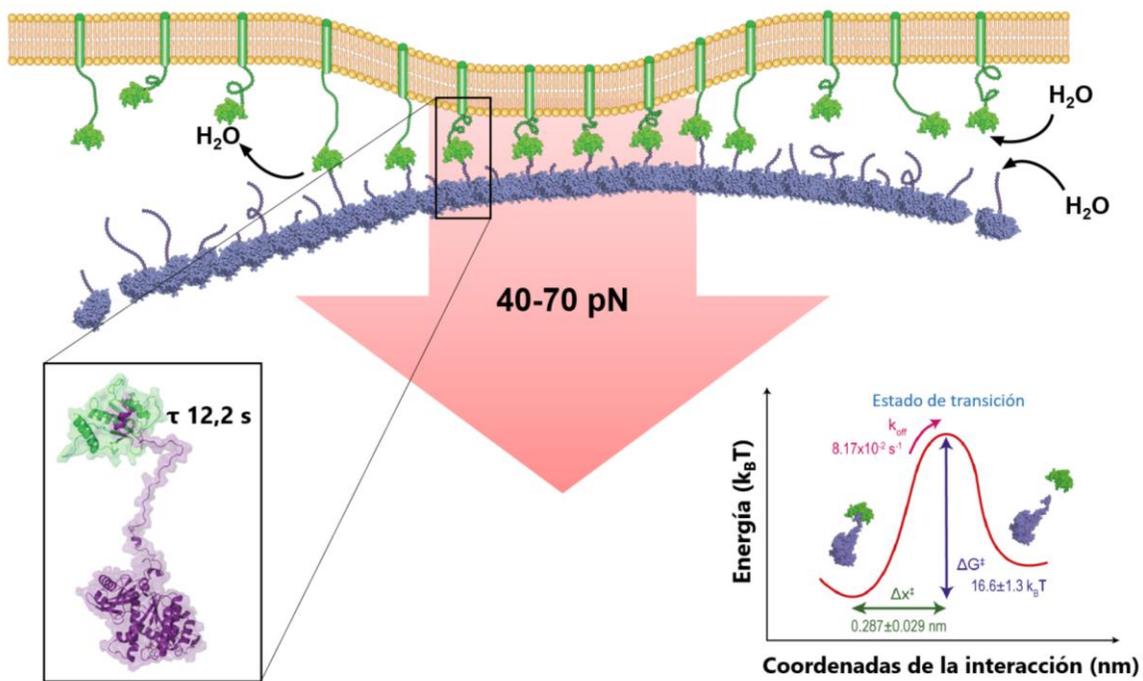


Figura 25. Esquema de la interacción FtsZ-ZipA de acuerdo a la literatura y a los hallazgos obtenidos en esta tesis.

## 8. PROYECCIONES

Aún queda mucho por investigar respecto a la fuerza involucrada en la división celular. Un blanco interesante de trabajo sería estudiar la interacción entre FtsZ y FtsA, la otra proteína ancla a la membrana citosólica de *Escherichia coli*. Al sumar ese estudio al presente, se podría validar o descartar definitivamente un mecanismo por el cual FtsZ tenga un rol relevante en la generación de la fuerza de constricción. También, el medir directamente por medio de pinza óptica la fuerza generada por los protofilamentos de FtsZ, permitiría validar las determinaciones matemáticas y computacionales, por lo que realizar mediciones de fuerza de FtsZ en presencia GTP permitiría realizar esta determinación. Finalmente, en cuanto a la caracterización de la interacción entre FtsZ y ZipA, determinar la capacidad calórica del complejo, por medio de calorimetría permitiría corroborar lo estudiado por SMD y otorgaría una valiosa información acerca del comportamiento térmico del complejo FtsZ-ZipA.

## 9. REFERENCIAS

1. Adams DW, Errington J (2009) Bacterial cell division: Assembly, maintenance and disassembly of the Z ring. *Nat. Rev. Microbiol.* 7:642–653.
2. Booth S, Lewis RJ (2019) Structural basis for the coordination of cell division with the synthesis of the bacterial cell envelope. *Protein Sci.* 28:2042–2054.
3. den Blaauwen T, Andreu JM, Monasterio O (2014) Bacterial cell division proteins as antibiotic targets. *Bioorg. Chem.* 55:27–38.
4. Du S, Lutkenhaus J (2017) Assembly and activation of the *Escherichia coli* divisome. *Mol. Microbiol.* 105:177–187.
5. RayChaudhuri D, Park JT (1992) *Escherichia coli* cell-division gene *ftsZ* encodes a novel GTP-binding protein. *Nature* 359:251–254.
6. Vicente M, Rico AI (2006) The order of the ring: assembly of *Escherichia coli* cell division components. *Mol. Microbiol.* 61:5–8.
7. Schumacher MA, Ohashi T, Corbin L, Erickson HP (2020) High-resolution crystal structures of *Escherichia coli* FtsZ bound to GDP and GTP. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Commun.* 76:94–102.
8. Gilson PR, Beech PL (2001) Cell division protein FtsZ: Running rings around bacteria, chloroplasts and mitochondria. *Res. Microbiol.* 152:3–10.
9. Löwe J, Amos LA (1998) Crystal structure of the bacterial cell division protein FtsZ. *Nature* 391:203–206.
10. Romberg L, Levin PA, Drive OB (2003) Assembly Dynamics of the Bacterial Cell Division Protein FtsZ: Poised at the Edge of Stability. *Annu Rev Microbiol* 57:125–154.
11. Stricker J, Maddox P, Salmon ED, Erickson HP (2002) Rapid assembly dynamics of the *Escherichia coli* FtsZ-ring demonstrated by fluorescence recovery after photobleaching. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99:3171–3175.
12. Errington J, Daniel RA, Scheffers D-J (2003) Cytokinesis in Bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67:52–65.
13. Anderson DE, Gueiros-Filho FJ, Erickson HP (2004) Assembly Dynamics of FtsZ Rings in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* and Effects of FtsZ-Regulating Proteins Assembly Dynamics of FtsZ Rings in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* and Effects of FtsZ-Regulating Proteins. *J. Bacteriol.* 186:5775–5781.
14. Chen Y, Erickson HP (2005) Rapid in vitro assembly dynamics and subunit turnover of FtsZ demonstrated by fluorescence resonance energy transfer. *J. Biol. Chem.* [Internet] 280:22549–22554. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M500895200>
15. Bisson-Filho AW, Hsu Y-P, Squyres GR, Kuru E, Wu F, Jukes C, Sun Y, Dekker C, Holden S, VanNieuwenhze MS, et al. (2017) Treadmilling by FtsZ filaments drives peptidoglycan synthesis and bacterial cell division. *Science* 355:739–743.
16. Mingorance J, Tadros M, Vicente M, González JM, Rivas G, Vélez M (2005) Visualization of single *Escherichia coli* FtsZ filament dynamics with atomic force microscopy. *J. Biol. Chem.* 280:20909–20914.
17. Haney SA, Glasfeld E, Hale C, Keeney D, He Z, De Boer P (2001) Genetic analysis of the *Escherichia coli* FtsZ-ZipA interaction in the yeast two-hybrid system. Characterization of FtsZ residues essential for the interactions with ZipA and with FtsA. *J. Biol. Chem.* 276:11980–11987.

18. Mosyak L, Zhang Y, Glasfeld E, Haney S, Stahl M, Seehra J, Somers WS (2000) The bacterial cell-division protein ZipA and its interaction with an FtsZ fragment revealed by X-ray crystallography. *EMBO J.* 19:3179–3191.
19. Wang X, Huang J, Mukherjee A, Cao C, Lutkenhaus J (1997) Analysis of the interaction of FtsZ with itself. *J. Bacteriol.* 179:5551–5559.
20. Lutkenhaus J, Pichoff S, Du S (2012) Bacterial cytokinesis: From Z ring to divisome. *Cytoskeleton* 69:778–790.
21. Egan AJF, Vollmer W (2013) The physiology of bacterial cell division. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1277:8–28.
22. Hale CA, De Boer PAJ (1997) Direct binding of FtsZ to ZipA, an essential component of the septal ring structure that mediates cell division in *E. coli*. *Cell* 88:175–185.
23. Król E, van Kessel SP, van Bezouwen LS, Kumar N, Boekema EJ, Scheffers DJ (2012) *Bacillus subtilis* SepF binds to the C-terminus of FtsZ. *PLoS One* 7.
24. Ohashi T, Hale CA, De Boer PAJ, Erickson HP (2002) Structural evidence that the P/Q domain of ZipA is an unstructured, flexible tether between the membrane and the C-terminal FtsZ-binding domain. *J. Bacteriol.* 184:4313–4315.
25. Hale CA, De Boer PAJ (1999) Recruitment of ZipA to the septal ring of *Escherichia coli* is dependent on FtsZ and independent of FtsA. *J. Bacteriol.* 181:167–176.
26. Liu Z, Mukherjee a, Lutkenhaus J (1999) Recruitment of ZipA to the division site by interaction with FtsZ. *Mol. Microbiol.* 31:1853–1861.
27. Hale CA, De Boer PAJ (2002) ZipA is required for recruitment of FtsK, FtsQ, FtsL, and FtsN to the septal ring in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 184:2552–2556.
28. Pazos M, Peters K, Casanova M, Palacios P, VanNieuwenhze M, Breukink E, Vicente M, Vollmer W (2018) Z-ring membrane anchors associate with cell wall synthases to initiate bacterial cell division. *Nat. Commun.* 9:5090.
29. Chen Y, Huang H, Osawa M, Erickson HP (2017) ZipA and FtsA\* stabilize FtsZ-GDP minoring structures. *Sci. Rep.* [Internet] 7:3650. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41598-017-03983-4>
30. Pazos M, Natale P, Vicente M (2013) A specific role for the ZipA protein in cell division: Stabilization of the FtsZ protein. *J. Biol. Chem.* 288:3219–3226.
31. Hale CA, Rhee AC, De Boer PAJ (2000) ZipA-induced bundling of FtsZ polymers mediated by an interaction between C-terminal domains. *J. Bacteriol.* 182:5153–5166.
32. RayChaudhuri D (1999) ZipA is a MAP-Tau homolog and is essential for structural integrity of the cytokinetic FtsZ ring during bacterial cell division. *EMBO J.* 18:2372–2383.
33. Moy FJ, Glasfeld E, Mosyak L, Powers R (2000) Solution structure of ZipA, a crucial component of *Escherichia coli* cell division. *Biochemistry* 39:9146–9156.
34. Huang KH, Durand-Heredia J, Janakiraman A (2013) FtsZ ring stability: of bundles, tubules, crosslinks, and curves. *J. Bacteriol.* 195:1859–1868.
35. Ordenes San Martín A (2006) Expresión, Purificación y Caracterización de la interacción entre ZipA y FtsZ de *Escherichia coli*.
36. Moreira IS, Fernandes PA, Ramos MJ (2006) Detailed microscopy study of the full ZipA:FtsZ interface. *PROTEINS Struct. Funct. Bioinforma.* 63:811–821.
37. Osawa M, Erickson HP (2018) Turgor pressure and possible constriction mechanisms in bacterial

division. *Front. Microbiol.* 9:1–7.

38. Mingorance J, Rivas G, Vélez M, Gómez-Puertas P, Vicente M (2010) Strong FtsZ is with the force: Mechanisms to constrict bacteria. *Trends Microbiol.* 18:348–356.

39. Osawa M, Anderson DEA, Erickson HP, Paez A, Mateos-Gil P, Hörger I, Mingorance J, Rivas G, Vicente M, Vélez M, et al. (2009) Simple modeling of FtsZ polymers on flat and curved surfaces: correlation with experimental in vitro observations. *EMBO J.* [Internet] 21:3476–3484. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2009.277>

40. Osawa M, Anderson DA, Erickson HP (2008) Reconstitution of contractile FtsZ rings in liposomes. *Science* 320:792–794.

41. Hörger I, Campelo F, Hernández-Machado A, Tarazona P (2010) Constricting force of filamentary protein rings evaluated from experimental results. *Phys. Rev. E - Stat. Nonlinear, Soft Matter Phys.* 81:1–9.

42. Paez A, Mateos-Gil P, Hörger I, Mingorance J, Rivas G, Vicente M, Vélez M, Tarazona P (2009) Simple modeling of FtsZ polymers on flat and curved surfaces: correlation with experimental in vitro observations. *PMC Biophys.* 2:1–16.

43. González de Prado Salas P, Hörger I, Martín-García F, Mendieta J, Alonso Á, Encinar M, Gómez-Puertas P, Vélez M, Tarazona P (2014) Torsion and curvature of FtsZ filaments. *Soft Matter* 10:1977–1986.

44. Krupka M, Rowlett VW, Morado D, Vitrac H, Schoenemann K, Liu J, Margolin W (2017) *Escherichia coli* FtsA forms lipid-bound minirings that antagonize lateral interactions between FtsZ protofilaments. *Nat. Commun.* 8:15957.

45. Blaszczyk M, Jamroz M, Kmiecik S, Kolinski A (2013) CABS-fold: Server for the de novo and consensus-based prediction of protein structure. *Nucleic Acids Res.* 41:406–411.

46. Kolinski A (2004) Protein modeling and structure prediction with a reduced representation. *Acta Biochim. Pol.* 51:349–371.

47. Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76:4350–4354.

48. Burnette WN (1981) “Western blotting”: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated Protein A. *Anal. biochem* 112:195–203.

49. Laskowski RA, Rullmann JAC, MacArthur MW, Kaptein R, Thornton JM (1996) AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. *J. Biomol. NMR* 8:477–486.

50. Laskowski RA, MacArthur MW, Moss DS, Thornton JM (1993) PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Crystallogr.* 26:283–291.

51. Chen VB, Arendall III WB, Headd JJ, Keedy DA, Immormino RM, Kapral GJ, Murray LW, Richardson JS, Richardson DC (2010) MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 66:12–21.

52. Studer G, Rempfer C, Waterhouse AM, Gumienny R, Haas J, Schwede T (2020) QMEANDisCo—distance constraints applied on model quality estimation. *Bioinformatics* 36:1765–1771.

53. Abraham MJ, Murtola T, Schulz R, Páll S, Smith JC, Hess B, Lindahl E (2015) Gromacs: high performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX* 1–2:19–25.

54. Sali A, Blundell TL (1993) Comparative Protein Modelling by Satisfaction of Spatial Restraints. *J. Mol. Biol.* 234:779–815.
55. Kagami LP, das Neves GM, Timmers LFSM, Caceres RA, Eifler-Lima VL (2020) Geo-Measures: a PyMOL plugin for protein structure ensembles analysis. *Comput. Biol. Chem.* 87:107322.
56. MM B (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 7:248–254.
57. Walker JM (1994) The Bicinchoninic Acid (BCA) assay for protein quantitation. *Methods Mol Biol* 0:5–8.
58. Montecinos-Franjola F, Ross JA, Sánchez SA, Brunet JE, Lagos R, Jameson DM, Monasterio O (2012) Studies on the dissociation and urea-induced unfolding of FtsZ support the dimer nucleus polymerization mechanism. *Biophys. J.* 102:2176–2185.
59. Li G, Zheng X, Zhang Z (2006) Electrogenerated chemiluminescence (ECL) determination of ephedrine with a self-assembly multilayer Ni(II)-polyluminol modified electrode. *Microchim. Acta* 154:153–161.
60. Concha-Marambio L, Maldonado P, Lagos R, Monasterio O, Montecinos-Franjola F (2017) Thermal adaptation of mesophilic and thermophilic FtsZ assembly by modulation of the critical concentration. *PLoS One* 12:1–20.
61. Burgos-Bravo F, Figueroa NL, Casanova-Morales N, Quest AFG, Wilson CAM, Leyton L (2018) Single-molecule measurements of the effect of force on Thy-1/ $\alpha$ v $\beta$ 3-integrin interaction using nonpurified proteins. *Mol. Biol. Cell* 29:326–338.
62. Sánchez WN, Robeson L, Carrasco V, Figueroa NL, Burgos-Bravo F, Wilson CAM, Casanova-Morales N (2022) Determination of protein–protein interactions at the single-molecule level using optical tweezers. *Q. Rev. Biophys.* 55.
63. Smith SB, Cui Y, C. B Optical-Trap Force Transducer That Operates by Direct Measurement of Light Momentum. In: *Biophotonics*. Vol. 55. ; 2003. pp. 134–162.
64. Burgos-Bravo F, Figueroa NL, Casanova-Morales N, Quest AFG, Wilson CAM, Leyton L (2017) Single-molecule measurements of the effect of force on Thy-1/ $\alpha$ v $\beta$ 3-integrin interaction using non-purified proteins. *Mol. Biol. Cell:mbc.E17-03-0133*.
65. Jesse D (2012) Struts, springs and crumple zones: protein structures under force. Dr. Diss. Univ. Calif. Berkeley, Berkeley, CA. [Internet]. Available from: <https://escholarship.org/uc/item/98384265>
66. Goldman DH, Kaiser CM, Milin A, Righini M, Tinoco I, Bustamante C (2015) Mechanical force releases nascent chain-mediated ribosome arrest in vitro and in vivo. *Science* 348:457–460.
67. Cossio P, Hummer G, Szabo A (2016) Kinetic ductility and force-spike resistance of poroteins from Single-molecule force spectroscopy. *Biophys. J.* 111:832–840.
68. Mukherjee A, Lutkenhaus J (1999) Analysis of FtsZ assembly by light scattering and determination of the role of divalent metal cations. *J. Bacteriol.* 181:823–832.
69. Mukherjee A, Lutkenhaus J (1998) Dynamic assembly of FtsZ regulated by GTP hydrolysis. *EMBO J.* 17:462–469.
70. Montecinos-Franjola F, James NG, Concha-Marambio L, Brunet JE, Lagos R, Monasterio O, Jameson DM (2014) Single tryptophan mutants of FtsZ: Nucleotide binding/exchange and conformational transitions. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* [Internet] 1844:1193–1200. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2014.03.012>
71. Navajas MPL (2007) Interacción de las proteínas de división celular FtsZ y ZipA de *Escherichia coli*: caracterización bioquímica, biofísica y estructural.

72. Bustamante C (2008) In singulo biochemistry: When less is more. *Annu. Rev. Biochem.* 77:45–50.
73. Laidler KJ, King MC (1983) The development of transition-state theory. *J. Phys. Chem.* 87:2657–2664.
74. Fersht AR Chemical catalysis. In: *Structure and mechanism in protein science.* ; 1998. p. 173.
75. Monterroso B, Alfonso C, Zorrilla S, Rivas G (2013) Combined analytical ultracentrifugation, light scattering and fluorescence spectroscopy studies on the functional associations of the bacterial division FtsZ protein. *Methods* 59:349–362.
76. Kenny CH, Ding W, Kelleher K, Benard S, Dushin EG, Sutherland AG, Mosyak L, Kriz R, Ellestad G (2003) Development of a fluorescence polarization assay to screen for inhibitors of the FtsZ/ZipA interaction. *Anal. Biochem.* 323:224–233.
77. Kastiris PL, Moal IH, Hwang H, Weng Z, Bates PA, Bonvin AMJJ, Janin J (2011) A structure-based benchmark for protein-protein binding affinity. *Protein Sci.* 20:482–491.
78. Du X, Li Y, Xia YL, Ai SM, Liang J, Sang P, Ji XL, Liu SQ (2016) Insights into protein–ligand interactions: mechanisms, models, and methods. *Int. J. Mol. Sci.* 17:144.
79. Chen J, Sawyer N, Regan L (2013) Protein-protein interactions: general trends in the relationship between binding affinity and interfacial buried surface area. *Protein Sci.* 22:510–515.
80. Yadav AK, Bandyopadhyay P, Coutsias EA, Dill KA (2022) Crustwater: modeling hydrophobic solvation. *J. Phys. Chem. B* 126:6052–6062.
81. Li F, Redick SD, Erickson HP, Moy VT (2003) Force measurements of the  $\alpha 5\beta 1$  integrin-fibronectin interaction. *Biophys. J.* 84:1252–1262.
82. Robeson L (2020) Explorando la interacción entre el péptido señal de translocación reticular y el translocón Sec61 mediante espectroscopía de fuerza a nivel de molécula individual.
83. Creighton TE *Proteins: Structures and molecular properties.* 1993.
84. Friddle RW, Noy A, De Yoreo JJ (2012) Interpreting the widespread nonlinear force spectra of intermolecular bonds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109:13573–13578.
85. Erickson HP (2001) The FtsZ protofilament and attachment of ZipA - Structural constraints on the FtsZ power stroke. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13:55–60.
86. Muñoz E, Sabín J, Rial J, Pérez D, Ennifar E, Dumas P, Piñeiro Á (2019) Thermodynamic and Kinetic Analysis of Isothermal Titration Calorimetry Experiments by Using KinITC in AFFINImeter. *Methods Mol. Biol.* [Internet] 1964:225—239. Available from: [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9179-2\\_16](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9179-2_16)
87. Osawa M, Erickson HP Calculation of the minimum force needed to constrict a liposome in vitro , and the force that can be generated by FtsZ protofilament bending in bacteria . :1–4.
88. Barsegov V, Thirumalai D (2005) Dynamics of unbinding of cell adhesion molecules: Transition from catch to slip bonds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102:1835–1839.
89. Hewitt PG *Vectores.* In: *Física conceptual.* ; 1995. p. 76.