

UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACEUTICAS



**“Caracterización Biofísica de las interacciones de FtsEX,  
un transportador ABC en el divisoma de *Escherichia coli*”**

**Presentada a la Universidad de Chile  
para optar al Grado de Doctor en Bioquímica**

**Por:**

**Daniel Maturana Middleton**

**Director de Tesis  
Dr. Octavio Monasterio**

**Co-Director de Tesis  
Dra. Rosalba Lagos**

**SANTIAGO- CHILE  
2016**

**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

**INFORME DE APROBACIÓN  
TESIS DE DOCTORADO**

Se informa a la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Residencia presentada por el candidato:

**DANIEL MATURANA MIDDLETON**

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Residencia como requisito para optar al Grado de Doctor en Bioquímica, en el examen de defensa de Tesis rendido el día.....de ..... de 2016.

**Directores de Tesis:**

Dr. Octavio Monasterio O

\_\_\_\_\_

Dra. Rosalba Lagos

\_\_\_\_\_

**Comisión Informante:**

Dra. María Antonieta Valenzuela

\_\_\_\_\_

Dra. Ana María Jabalquinto

\_\_\_\_\_

Dra. Cecilia Rojas

\_\_\_\_\_

## **Agradecimientos.**

Lo primero es Agradecer a mi esposa Maca, ella siempre ha estado al lado apoyándome en todas las decisiones de mi vida. También a mi niña Antonia que su misión es hacernos reír y ponernos felices. Y claramente a mi niña Jacinta, que aunque no entiende mucho tiene una sonrisa que te hace sentir mejor.

Un agradecimiento especial a mis padres que siempre me han apoyado y ayudado a seguir adelante con los estudios y la vida. Claramente un saludo especial a mi mamá y mi suegra que nos han ayudado mucho en todo lo necesario, siempre han estado presentes y dispuestas.

Me gustaría agradecer a todos los tutores y colegas que he tenido ya que ellos han ayudado mucho a formar lo que soy ahora. Especialmente a Viviana Órdenes y Cecilia Vergara que me guiaron, enseñaron y presionaron en el pregrado. También para mis compañeros del CMM como Juanu, Palbo Moreno, Andres Aravena, Rodrigo Assar, Marko Budinich, María Paz Cortes y Alejandro Maass, ellos me apoyaron y enseñaron todo lo que se de computación y de análisis de datos. Además me ayudaron a desarrollar la parte de negocios que es muy necesaria en estos tiempos.

Finalmente me gustaría a gradecer a la gente del BEM, en especial a Cesar Díaz, Felipe Montecinos, María Jose Gallardo, Pouchouq, Alexis, Cristian Escobar los que me enseñaron y ayudaron cuando llegué al laboratorio. Su ayuda fue invaluable tanto en el área experimental, teórica y de la vida. Tampoco olvidaré las tardes tecno minimal de Cesar y Felipe. Un agradecimeinto especial a Macarena Collao y Don Pedro, los que son el alma del laboratorio y son capaces de solucionar cualquier necesidad de los estudiantes. Y por supuesto un agradecimiento especial a los Profesores que dan todo el apoyo, la presión y las enseñanzas.

## **Financiamiento**

Esta tesis se realizó en el laboratorio de Biología Estructural y Molecular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile.

El trabajo fue financiado por los proyectos FONDECYT 1095121 y FONDECYT 1130711.

Cabe destacar el apoyo brindado por CONICYT a través de las Becas para Estudios de Doctorado entre los años 2009 y 2013, Beca de Apoyo de Tesis 2012 y Beca de asistencia a Eventos en el extranjero 2011. También a la Universidad de Chile por la beca de pasantías cortas en el extranjero.

## Índice de Materias.

<b>ÍNDICE DE MATERIAS</b> .....	<b>V</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>IX</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<b>XII</b>
<b>LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS</b> .....	<b>XIII</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>XV</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>XVIII</b>
<b>1 INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>21</b>
1.1 DIVISOMA.....	21
1.1.1 Sistema Min.....	22
1.1.2 Sistema de oclusión del nucleoide.....	24
1.2 ETAPA TEMPRANA DEL ENSAMBLAJE DEL DIVISOMA.....	24
1.2.1 Formación del anillo Z.....	24
1.2.2 Anclaje del anillo Z a la membrana por medio de ZipA y FtsA.....	25
1.2.3 Estabilización del anillo.....	26
1.2.4 Hipótesis sobre el mecanismo de constricción del anillo Z.....	26
1.2.5 FtsEX.....	28
1.3 MADURACIÓN DEL DIVISOMA.....	29
1.3.1 FtsK y la segregación del DNA.....	30
1.3.2 FtsQLB: conexión entre el citoplasma y el periplasma.....	30
1.3.3 Translocación del precursor del PG al periplasma.....	32
1.3.4 Biosíntesis de las cadenas de glicanos y la incorporación en el PG preexistente.....	33
1.3.5 Hidrólisis de peptidoglicano y división celular.....	34
1.4 RED DE INTERACCIÓN DEL DIVISOMA.....	38
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>40</b>
<b>OBJETIVOS GENERALES</b> .....	<b>40</b>

<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS.</b>	<b>40</b>
<b>2 MATERIALES Y MÉTODOS.</b>	<b>41</b>
2.1 REACTIVOS.	41
2.2 MEDIOS DE CULTIVO BACTERIANO.	42
2.3 CEPAS BACTERIANAS Y DNA PLASMIDIAL.	42
2.4 PURIFICACIÓN DE DNA PLASMIDIAL.	42
2.5 ELECTROFORESIS DE DNA EN GELES DE AGAROSA.	43
2.6 PREPARACIÓN DE CÉLULAS DE <i>E. COLI</i> ELECTRO COMPETENTES.	43
2.7 ELECTRO TRANSFORMACIÓN DE <i>E. COLI</i> .	44
2.8 PURIFICACIÓN DEL DOMINIO PERIPLASMÁTICO DE FtsX, ccENVc Y ENVc.	44
2.9 PURIFICACIÓN DE FtsA.	45
2.10 PURIFICACIÓN DE CUERPOS DE INCLUSIÓN DE FtsA Y FtsE.	46
2.11 SOLUBILIZACIÓN DE CI.	47
2.12 APAGAMIENTO DINÁMICO DE LA FLUORESCENCIA INTRÍNSECA DE XLOOP.	47
2.13 ENTRECruzAMIENTO QUÍMICO DE XLOOP Y ccENVc.	48
2.14 ELECTROFORESIS EN GELES DE ACRILAMIDA EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES (SDS-PAGE).	48
2.15 ELIMINACIÓN DEL TAG H-SUMO POR DIGESTIÓN CON SUMO PROTEASA.	49
2.16 WESTERN BLOT.	49
2.17 ACTIVIDAD ATPÁSICA.	49
2.18 DISPERSIÓN DE LUZ EN 90° PARA DETERMINAR LA AGREGACIÓN DE FtsE.	50
2.19 SOLUBILIZACIÓN DE FtsEX DESDE MEMBRANAS.	51
2.20 INTERACCIÓN DE LAS PROTEÍNAS DETERMINADA POR TERMOFORESIS EN MICRO ESCALA (MST).	52
2.21 MARCAJE DE LAS PROTEÍNAS XLOOP Y ccENVc CON LA SONDA NT.647-NHS.	53
2.22 MARCAJE DE FtsE DESNATURADA CON LA SONDA Cy.5 MONO-MALEIMIDA.	53
2.23 ESPECTROSCOPIA DE DICROÍSMO CIRCULAR.	53
<b>3 RESULTADOS.</b>	<b>55</b>
3.1 PURIFICACIÓN DE FtsA.	55
3.1.1 Dicroísmo circular de FtsA purificada desde CI.	58

3.2	ACTIVIDAD ATPÁSICA DE LAS PREPARACIONES DE FTSA. ....	59
3.3	PURIFICACIÓN DE FTSE.....	59
3.3.1	Purificación desde Cl.....	60
3.3.2	Expresión y purificación de FtsE con chaperoninas. ....	62
3.3.3	Purificación de FtsE en presencia de lauroil sarcosinato de sodio.....	65
3.3.4	Dicroísmo circular de FtsE en presencia de sarkosyl.....	67
3.3.5	Replegamiento desde urea 8 M. ....	69
3.3.6	Replegamiento de FtsE seguido por dispersión de luz. ....	70
3.3.7	Dicroísmo circular de FtsE replegada en amortiguador acetato pH 5. ..	72
3.3.8	Replegamiento de FtsE seguido por fluorescencia intrínseca. ....	72
3.4	CARACTERIZACIÓN DE LAS INTERACCIONES DE FTSE CON ATP Y CON FTSZ.....	74
3.4.1	Interacción de ATP con FtsE determinada por termoforesis en micro escala. ....	75
3.4.2	Interacción de FtsE con FtsZ determinada por termoforesis en micro escala. ....	75
3.5	PURIFICACIÓN DE FTSX.....	77
3.5.1	Toxicidad de FtsX inducida por su sobreexpresión.....	78
3.5.2	Solubilización de FtsX.....	80
3.5.3	Purificación por afinidad a una columna de níquel.....	81
3.6	DOMINIO PERIPLASMÁTICO DE FTSX. ....	83
3.6.1	Apagamiento de la fluorescencia intrínseca del dominio periplasmático (Xloop) de FtsX.....	84
3.6.2	Dicroísmo circular del dominio periplasmático de FtsX (Xloop). ....	84
3.7	INTERACCIÓN DEL DOMINIO PERIPLASMÁTICO DE FTSX (XLOOP) Y EL DOMINIO “COILED- COIL” DE ENV C (CCENV C). ....	86
3.7.1	Caracterización de la interacción entre ccEnvC y Xloop determinada por termoforesis en micro escala.....	88
3.8	CARACTERIZACIÓN DE LA INTERACCIÓN DE XLOOP Y FTSQ. ....	92
3.8.1	Interacción del dominio periplasmático de FtsX (Xloop) y FtsQ determinada por termoforesis en micro escala.....	92

<b>4</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>94</b>
4.1	SOBREEXPRESIÓN, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS.....	96
4.1.1	FtsA.....	96
4.1.2	FtsE.....	97
4.1.3	FtsX.....	102
4.1.4	Caracterización del dominio periplasmático de FtsX.....	104
4.2	CARACATERIZACIÓN DE LA RED DE INTERACCIÓN DEL XLOOP.....	105
4.3	MODELO DE ACCIÓN DE FTSEX.....	108
<b>5</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>111</b>
<b>6</b>	<b>PROYECCIONES .....</b>	<b>111</b>
	<b>ANEXO I.....</b>	<b>113</b>
	<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>116</b>

## Índice de Figuras.

<b>Figura 1.</b> Esquema del divisoma de <i>Escherichia. coli</i> .....	<b>22</b>
<b>Figura 2.</b> Localización del anillo Z con el sistema Min y la oclusión del nucleoloide ....	<b>23</b>
<b>Figura 3.</b> Mecanismo propuesto para la generación de la fuerza de constricción del anillo Z anclado a la membrana mediante FtsA. ....	<b>28</b>
<b>Figura 4.</b> Estructura cristalográfica de FtsK de <i>P. aeruginosa</i> .....	<b>30</b>
<b>Figura 5.</b> Complejos de FtsQ/FtsB/FtsL obtenidos mediante dinámica molecular ....	<b>32</b>
<b>Figura 6.</b> Presencia de los factores LytM en la división celular.....	<b>37</b>
<b>Figura 7.</b> Esquema que describe la coordinación de la síntesis e hidrólisis del peptidoglicano.....	<b>38</b>
<b>Figura 8.</b> Red de las interacciones descritas experimentalmente para las proteínas de divisoma de <i>E. coli</i> . ....	<b>39</b>
<b>Figura 9.</b> Gel SDS de la purificación de 6xHis-FtsA soluble mediante una columna de afinidad a níquel. ....	<b>55</b>
<b>Figura 10.</b> Gel SDS de los sobrenadantes de la lisis por ultrasonido de bacterias que sobreexpresan FtsA, en presencia de sarkosyl. ....	<b>56</b>
<b>Figura 11.</b> Gel SDS de FtsA purificada por cromatografía de afinidad a níquel desde cuerpos de inclusión solubilizados en sarkosyl. ....	<b>57</b>
<b>Figura 12.</b> Espectro de dicroísmo circular en el UV lejano de FtsA obtenida desde CI en presencia de sarkosyl. ....	<b>58</b>
<b>Figura 13.</b> Actividad ATPásica de FtsA soluble sin sarkosyl y solubilizada de CI con sarkosyl. ....	<b>60</b>
<b>Figura 14.</b> Gel SDS de la purificación y solubilización de los cuerpos de inclusión de FtsE. ....	<b>61</b>
<b>Figura 15.</b> Gel SDS de la purificación de FtsE en condiciones denaturantes.....	<b>62</b>
<b>Figura 16.</b> Co -expresión de FtsE con la chaperonina GroE.....	<b>63</b>
<b>Figura 17.</b> Gel SDS y western blot de la purificación de FtsE soluble desde bacterias que co-expresan la chaperonina GroE.....	<b>64</b>

<b>Figura 18.</b> Gel SDS de las fracciones soluble y no soluble de la lisis en concentraciones crecientes de sarkosyl. ....	<b>66</b>
<b>Figura 19.</b> Efecto de sarkosyl sobre la solubilidad de FtsE en la lisis bacteriana.....	<b>67</b>
<b>Figura 20.</b> Gel SDS de la purificación de FtsE soluble a partir de la lisis en presencia de sarkosyl. ....	<b>68</b>
<b>Figura 21.</b> Espectro de dicroísmo circular en el UV lejano de FtsE soluble en presencia de sarkosyl. ....	<b>69</b>
<b>Figura 22.</b> Replegamiento de FtsE en distintas condiciones seguido por dispersión de luz .....	<b>71</b>
<b>Figura 23.</b> Espectro de dicroísmo circular en el UV lejano de FtsE replegada en amortiguador acetato pH 5. ....	<b>73</b>
<b>Figura 24.</b> Espectros de fluorescencia intrínseca de FtsE replegada por dilución rápida a distintas concentraciones de urea. ....	<b>74</b>
<b>Figura 25.</b> Isoterma de unión de FtsE marcada con una sonda fluorescente con ATP o ADP. ....	<b>76</b>
<b>Figura 26.</b> Isoterma de unión de FtsZ a FtsE marcada con la sonda fluorescente Cy.5. ....	<b>77</b>
<b>Figura 27.</b> Curvas de crecimiento de E. coli al sobreexpresar FtsX o FtsEX.....	<b>78</b>
<b>Figura 28.</b> Western Blot de las proteínas totales al sobreexpresar FtsE y FtsX en E. coli con diferentes concentraciones de IPTG. ....	<b>79</b>
<b>Figura 29.</b> Gel SDS y western blot de la solubilización de FtsE y FtsX con diferentes detergentes. ....	<b>81</b>
<b>Figura 30.</b> Gel SDS y western blot de la purificación de FtsE y FtsX solubilizadas en detergente colato de sodio. ....	<b>82</b>
<b>Figura 31.</b> Gel SDS de la purificación de FtsE y FtsX solubilizadas en detergente DDM. ....	<b>83</b>
<b>Figura 32.</b> Gráfico de Stern-Volmer para el apagamiento de la fluorescencia intrínseca de Xloop por acrilamida. ....	<b>85</b>
<b>Figura 33.</b> Espectro de dicroísmo circular en el UV lejano de Xloop.....	<b>86</b>
<b>Figura 34.</b> Gel SDS del entrecruzamiento de Xloop y ccEnvC.....	<b>87</b>

<b>Figura 35.</b> Isoterma de unión del dominio ccEnvC marcado con una sonda fluorescente, al dominio Xloop. ....	<b>88</b>
<b>Figura 36.</b> Isoterma de oligomerización del dominio Xloop marcado con una sonda fluorescente. ....	<b>89</b>
<b>Figura 37.</b> Isoterma de unión del dominio ccEnvC marcado con una sonda fluorescente, al dominio Xloop. ....	<b>90</b>
<b>Figura 38.</b> Ciclo de interacción entre ccEnvC y Xloop.....	<b>91</b>
<b>Figura 39.</b> Isoterma de unión de FtsQ marcado con FITC, al dominio Xloop.....	<b>93</b>
<b>Figura 40.</b> Sub-red de interacción de FtsEX en el divisoma.....	<b>95</b>
<b>Figura 41.</b> Sub-red de interacciones de FtsEX en el divisoma.....	<b>109</b>

## Índice de Tablas.

<b>Tabla 1.</b> Reactivos utilizados en esta tesis. ....	<b>41</b>
<b>Tabla 2.</b> Cepas de <i>E. coli</i> utilizadas en este trabajo y su genotipo.....	<b>42</b>
<b>Tabla 3.</b> Plasmidios utilizados y/o generados en este trabajo.....	<b>43</b>
<b>Tabla 4.</b> Separación de FtsE y GroEL mediante la incubación y repurificación en distintas condiciones en la columna de afinidad. ....	<b>65</b>
<b>Tabla 5.</b> Replegamiento de FtsE desde 8M urea. ....	<b>70</b>
<b>Tabla 6.</b> Constantes de disociación determinadas mediante MST.....	<b>91</b>

## Lista de Símbolos y Abreviaturas.

ABC : “ATP binding cassette” (Casete de unión a ATP)

ADP : Adenosina di-fosfato

ATP : Adenosina tri-fosfato

*B. henselae*: *Bartonella henselae*

*B. subtilis* : *Bacillus subtilis*

BSA : Albumina de suero bovino

BCIP : 5-bromo-4-cloro-3'-indolil fosfato

CI : Cuerpos de inclusión

*C. crescentus* : *Caulobacter crescentus*

CMC : Concentración micelar crítica

DDM : n-Dodecil- $\beta$ -D-maltopiranosido

DMF : Dimetil formamida

DNA : Ácido deoxiribonucleico

DTSSP : 3-3'-ditiobis[sulfosuccinimidilpropionato]

DTT : Ditiotreitól

*E. coli* : *Escherichia coli*

EDTA : Ácido Etilendiaminotetraacético

Fts : “filament-forming temperatura-sensitive” (formadora de filamentos sensible a temperatura)

GDP : Guanosina di-fosfato

GFP : “Green fluorescent protein” (proteína fluorescente verde)

GTP : Guanosina tri-fosfato

IPTG : Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido

Kd : Constante de disociación

MST : Termoforesis en micro escala

*M. tuberculosis* : *Mycobacterium tuberculosis*

NBT : Cloruro de Azul-Nitro tetrazolio

NMR : Resonancia magnética nuclear

PG : Peptido glicano

PCR : “Polymerase chain reaction” (reacción de polimerasa en cadena)

SUMO : “Small Ubiquitin-like Modifier” (Modificador pequeño similar a Ubiquitina)

*S. pneumoniae* : *Streptococcus pneumoniae*

*S. aureus* : *Staphylococcus aureus*

TCEP : Tris-(2-Carboxietil)fosfina

TFE : Trifluoroetanol

## Resumen.

El denominado divisoma bacteriano es un complejo multiproteico que consta de, al menos, 12 proteínas esenciales, las cuales se reclutan de forma secuencial e interdependiente para llevar a cabo el proceso de segregación de los cromosomas, citoquinesis y separación de las células hijas.

La temporalidad y secuencialidad en la formación del divisoma se ha estudiado extensamente y se ha descrito que ocurre en dos etapas. Primero ocurre la polimerización de FtsZ para formar el anillo Z, el que se estabiliza y ancla a la membrana mediante FtsA y ZipA, esta es la fase temprana y da origen al proto anillo. La fase tardía consiste en el reclutamiento del resto de las proteínas (FtsEX > FtsK > FtsQLB > FtsW > FtsI > FtsN) por el proto anillo, el cual actúa como andamio de toda la maquinaria. Una vez que este complejo multi proteico esta ensamblado, comienza el proceso de división bacteriana.

Para comprender a cabalidad este complejo, es necesario conocer las interacciones existentes entre sus componentes. Al recopilar la información publicada sobre estas interacciones, nos damos cuenta que su descripción ha sido, principalmente, de forma cualitativa mediante técnicas genéticas y algunas bioquímicas, sin embargo, la información sobre las afinidades y cooperatividad de las interacciones en el proceso de ensamblaje del divisoma es casi inexistente. La escasa información que existe se explica por la dificultad en la purificación de los componentes del divisoma.

En este trabajo se caracterizaron, de forma cuantitativa, las interacciones presentes en una sub red del divisoma, específicamente en la red de interacciones de FtsEX. Según los datos publicados hasta la fecha, FtsEX interactúa con FtsZ, FtsA, FtsQ y EnvC, además se sabe que la unión y hidrólisis de ATP de FtsE es esencial para la división bacteriana. Se eligió FtsEX pues es un punto clave en el ensamblaje del divisoma, al ser la primera proteína en ser reclutada que actúa como un conector entre el citoplasma y el periplasma. Para efectuar esta caracterización mediante técnicas biofísicas se hizo necesario establecer protocolos de purificación y caracterización de las proteínas a ser estudiadas, para luego estudiar las interacciones.

La purificación de FtsE se realizó en condiciones desnaturantes, pues el 100 % de esta aparece como cuerpos de inclusión. Distintas metodologías para obtener FtsE soluble se probaron sin éxito, por lo que se continuó trabajando en condiciones desnaturantes. El replegamiento de FtsE se estudió mediante dilución rápida y diálisis al equilibrio en distintas condiciones de pH, fuerza iónica, aditivos, etc. La única condición donde se obtuvo FtsE soluble fue en amortiguador acetato 50 mM pH 5. El replegamiento se siguió por dicroísmo circular, fluorescencia y dispersión de luz y todo indicó que FtsE adquirió estructura terciaria. Para corroborar la funcionalidad de FtsE, se estudió su interacción con ATP y ADP mediante termoforesis en micro escala. Se obtuvo isothermas de unión con ambos nucleótidos con constantes de disociación de 579 y 1394  $\mu\text{M}$ , respectivamente. También se estudió la interacción de FtsE y FtsZ, la cual está descrita por co-purificación. Esta interacción se ajustó mejor a la ecuación de Hill con una constante de disociación de 9,1  $\mu\text{M}$  y un coeficiente de Hill de 2,2. Estos resultados indican que FtsE ha adquirido, al menos, cierto grado de estructura que le permite interactuar con el resto de los componentes del divisoma.

Se intentó una serie de estrategias para la sobreexpresión y purificación de FtsX obteniéndose resultados promisorios. La optimización de la sobreexpresión mediante el clonamiento de FtsE río arriba de FtsX y la sobreexpresión por el método de autoinducción disminuyó la toxicidad de FtsX. La solubilización de FtsX se logró con los detergentes CHAPS, colato y DDM. En la purificación en presencia del detergente DDM, se obtuvo una alta pureza, con un único contaminante.

Finalmente se caracterizó la interacción entre el dominio periplasmático de FtsX (Xloop) con EnvC (Regulador de amidasas de la división celular), FtsQ y con ella misma. Estos resultados indican que EnvC interactúa con el monómero de Xloop y con el dímero de Xloop, con afinidades altas,  $K_d$  de 106 y 328 nM respectivamente. Además Xloop interactúa con FtsQ con una afinidad menor,  $K_d$  de 4  $\mu\text{M}$ .

Finalmente, los resultados obtenidos en este trabajo asocian FtsEX en la regulación de las amidasas involucradas en la remodelación del peptidoglicano en la división celular, mediante un secuestro de EnvC a la zona del septo. La alta afinidad observada en la interacción Xloop - ccEnvC sugiere que es un complejo estable, probablemente, se forme el complejo FtsEX/EnvC previo a la formación del divisoma. FtsE se reclutaría

mediante la interacción con FtsZ y además estabilizaría el anillo Z. Por otro lado, la interacción de Xloop con FtsQ es de menor afinidad con respecto a su interacción con EnvC sugiriendo una interacción menos estable por esta última. Sin embargo, cabe destacar que las concentraciones locales, en el proceso de división celular, pueden variar considerablemente ya que la mayoría de las Fts's son reclutadas al mismo sitio, aumentando su concentración local. Este podría ser un sistema de control que utilizaría FtsEX para regular a las amidasas, mediante la interacción con otros componentes del divisoma, como podría ser el caso de FtsQ.

## **Abstract.**

The so-called bacterial divisome is a multiprotein complex consisting of at least 12 essential proteins, which are recruited sequentially and interdependent to carry out the process of chromosome segregation, cytokinesis and separation of the daughter cells.

The timing and sequencing in the formation of divisome has been studied extensively and has been reported to occur in two stages. First occurs FtsZ polymerization to form the Z ring, which is stabilized and membrane anchor through ZipA and FtsA, this is the early stage and gives rise to the proto ring. The late stage involves the recruiting of other proteins (FtsEX> FtsK> FtsQLB> FtsW> FtsI> FtsN) to the proto ring, which acts as a scaffold of all machinery. Once this multi-protein complex is assembled, it begins the process of bacterial division.

To fully understand this complex, it is necessary to know the interactions between its components. In compiling the information published on these interactions, we realize that the description has been mainly qualitatively by genetic and biochemical techniques. However, information on the affinities and cooperativity of interactions in the assembly process are almost nonexistent. This lack of information is explained by the difficulty in purifying divisome components.

In this work, the interactions from a sub network of the divisome assembly were characterized quantitatively, specifically on the network centered on FtsEX. According to data published to date, FtsEX interacts with FtsZ, FtsA, FtsQ and EnvC, it is also known that the binding and hydrolysis of ATP by FtsE is essential for bacterial division. FtsEX was chosen because it is a key point in the assembly of the divisome, being the first protein to be recruited, and it can act as a connector between the cytoplasm and the periplasm. To perform this characterization by biophysical techniques, it became necessary to establish purification protocols for these proteins, and then study the interactions.

Purification of FtsE was performed on denatured conditions, as 100% of this protein is expressed as inclusion bodies. Different methodologies for FtsE expression as

soluble were tested without success, so work continued on denatured conditions. FtsE refolding was studied by rapid dilution and equilibrium dialysis under different conditions of pH, ionic strength, additives, etc. The only condition, where soluble FtsE was obtained, was 50 mM acetate buffer pH 5. Refolding was monitored by circular dichroism, fluorescence and light scattering, proven that FtsE did acquire tertiary structure. To corroborate the functionality of FtsE, its interactions with ATP and ADP were measured by MicroScale Thermophoresis. Binding isotherms were obtained with both nucleotides with dissociation constants of 579 and 1394  $\mu\text{M}$ , respectively. The interaction of FtsE and FtsZ, which was previously described by co-purification, was also studied. This interaction was best fitted to the Hill equation with a dissociation constant of 9.1  $\mu\text{M}$  and a Hill coefficient of 2.2. These results indicate that FtsE did acquire tertiary structure that lets it interact with the other components of divisome.

A number of strategies for overexpression and purification of FtsX were attempted, yielding promising results. Cloning FtsE upstream of FtsX and overexpression by the method of auto-induction diminished FtsX toxicity. FtsX solubilization was achieved with the detergents CHAPS, cholate and DDM. Purification in the presence of detergent DDM gave the best result with a single contaminant protein.

Finally the interaction between the periplasmic domain of FtsX (Xloop) with EnvC (regulator of cell division amidases), FtsQ and with itself was studied. These results indicate that EnvC interacts with Xloop monomer and dimer, with high affinities,  $K_d$  106 nM and 328 nM respectively. Furthermore, Xloop interacts with FtsQ with lower affinity,  $K_d$  4  $\mu\text{M}$ .

Finally, the results obtained in this work showed that FtsEX recruits and regulates the amidases involved in the remodeling of peptidoglycan in cell division, by a sequestration EnvC to the area of the septum. The high affinity interaction observed between Xloop - ccEnvC suggests that a stable complex FtsEX / EnvC is formed prior to the recruitment of the divisome. FtsE is recruited by interacting with FtsZ and also stabilize the ring Z. It was also showed that Xloop interacts with FtsQ with lower affinity with respect to its interaction with EnvC suggesting a less stable complex. However, it is noteworthy that the local concentration of the proteins from the divisome can vary considerably, since most Fts's are recruited to the same site,

increasing their local concentration. This could be a control system on how FtsEX regulate amidases activities, increasing the concentration of FtsQ to compete for the Xloop which will release EnvC to activate the amidases.

# 1 Introducción.

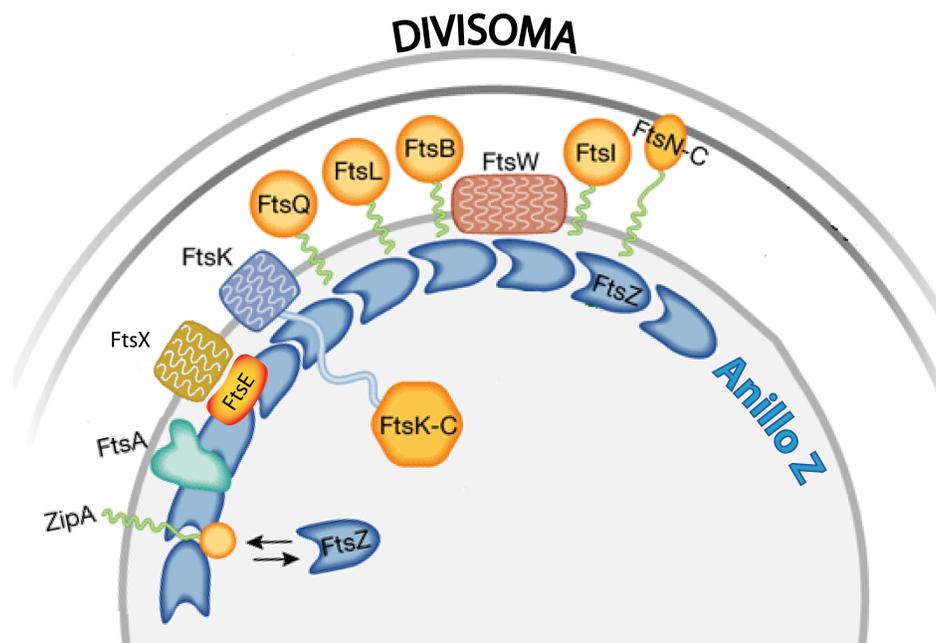
## 1.1 Divisoma.

El proceso de fisión binaria de una célula madre en dos células hijas ocurre con la participación de un complejo supramolecular llamado divisoma (figura 1). Estudios genéticos han permitido la identificación de muchos genes que actúan en la maquinaria de división (Ricard & Hirota, 1973). Esta maquinaria está compuesta de al menos 12 proteínas, las cuales están involucradas en varios procesos fisiológicos como la segregación del cromosoma, invaginación de las membranas, síntesis del peptidoglicano en el sitio de división celular (septo) y la separación de las células hijas. Todas estas funciones requieren un alto grado de regulación espacio-temporal para poder mantener la integridad física de la célula (Aarsman *et al.*, 2005; van der Ploeg *et al.*, 2013).

El primer paso de la división es la polimerización de FtsZ para formar el anillo contráctil (llamado anillo Z). Su estabilización y anclaje a la membrana plasmática ocurre principalmente a través de ZipA, ZapA-D y FtsA (Huang *et al.*, 2013; Osawa & Erickson, 2013). La formación del anillo Z está regulado espacial y temporalmente por el sistema de oclusión del nucleóide y el sistema MinCDE (Huang *et al.*, 2013).

El segundo paso es la maduración del divisoma mediante el reclutamiento secuencial e interdependiente de proteínas o complejos proteicos (FtsEX, FtsK, FtsQ, FtsB, FtsL, FtsW, FtsI, FtsN, AmiA/B/C) involucradas en la estabilización del divisoma, degradación y síntesis septal de peptidoglicano y, eventualmente, la separación de las células hijas.

La polimerización de FtsZ es un paso clave en la división bacteriana, pues provee y dirige la fuerza de constricción (Li *et al.*, 2013). Dos sistemas especializados controlan este evento, temporal y espacialmente. El sistema Min restringe la polimerización de FtsZ a la mitad longitudinal de la bacteria y el sistema de oclusión del nucleóide permite la segregación de los cromosomas entre las células hijas (Thanbichler, 2010). Ambos mecanismos provocan un posicionamiento preciso del anillo contráctil, con menos de 3% de desviación relativa (figura 2) (Blaauwen, 2013; Trueba, 1982).

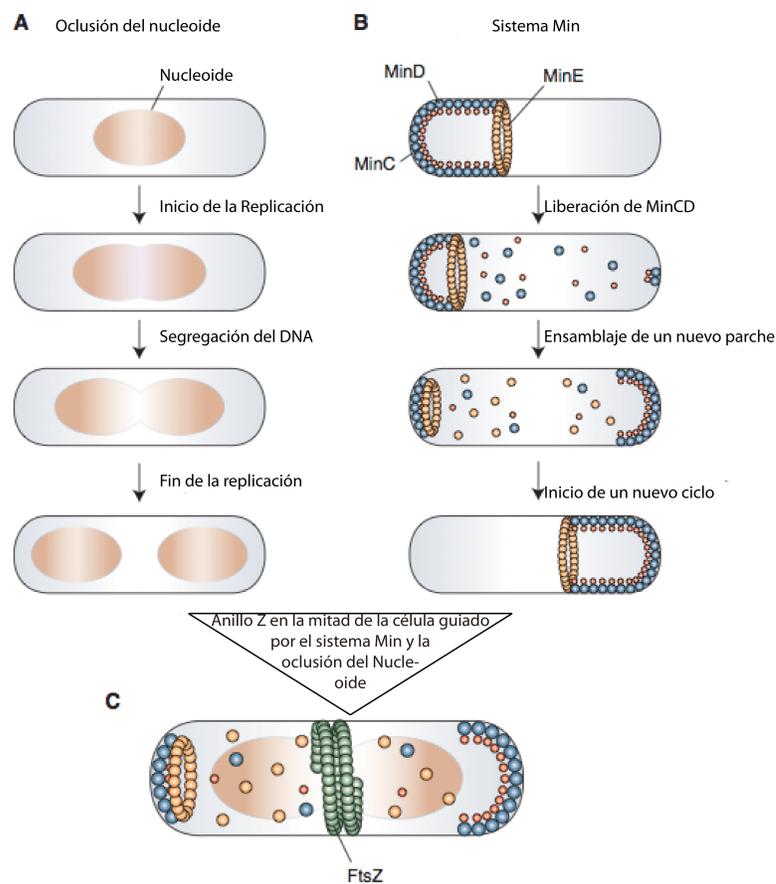


**Figura 1. Esquema del divisoma de *E. coli*.** Adaptado de Vicente & Löwe (2003).

### 1.1.1 Sistema Min.

El sistema Min, mediante la generación de un gradiente de concentración de inhibidores de la polimerización de FtsZ, controla el posicionamiento del anillo Z en la mitad de la célula. Este gradiente posee una mayor concentración en los polos que disminuye hacia la mitad de la célula. En *Escherichia coli*, para generar este gradiente, se genera una oscilación de polo a polo del antagonista de la polimerización de FtsZ, MinC. Esta proteína posee dos dominios y ambos interactúan con FtsZ. El dominio N-terminal inhibe la polimerización de FtsZ y el dominio C-terminal interrumpe las interacciones laterales entre los polímeros de FtsZ y también interactúa con MinD (Hu & Lutkenhaus, 2000; Shiomi & Margolin, 2007). La oscilación se genera por la formación del trímero MinD<sub>2</sub> MinE. MinD es una ATPasa homóloga a ParA, que se une a la membrana en forma dimérica en presencia de ATP (Hu *et al.*, 2002). Al unirse a MinE, se estimula la actividad ATPásica de MinD. La forma MinD-ADP sufre cambios conformacionales, que disocian el dímero y provocan la liberación de la membrana. La

iteración entre unión y liberación a la membrana genera el fenómeno de oscilación (Di Ventura *et al.*, 2013). MinC también interactúa con MinD y se deja llevar por este sistema de oscilación. Fusiones GFP-Min revelaron este patrón particular entre las tres proteínas (Fu *et al.*, 2001; Hu & Lutkenhaus, 1999; Raskin & de Boer, 1999). Se ha propuesto que el gradiente de concentración de MinD está relacionado con la segregación de los cromosomas. De hecho, MinD se une al DNA y podría arrastrar a los cromosomas desde el centro hacia los polos (Di Ventura *et al.*, 2013).



**Figura 2. Localización del anillo Z con el sistema Min y la oclusion del nucleoide.** Adaptado de Thanbichler (2010).

En *Bacillus subtilis*, la proteína MinE no está presente. El complejo MinCD se recluta a la membrana mediante DivIVA, la cual posee una hélice anfipática. Esta proteína se

une a membranas con curvatura negativa, tal como los polos y los sitios de división celular (Lenarcic *et al.*, 2009).

### **1.1.2 Sistema de oclusión del nucleoide.**

La ausencia del sistema Min lleva a la localización errónea del anillo contráctil y genera “minicells” anucleadas. Sin embargo, los anillos Z formados se localizan en regiones libres de DNA, lo que relaciona de manera directa al nucleoide con un segundo mecanismo para prevenir el ensamblaje de la maquinaria de división (Bi & Lutkenhaus, 1993).

La búsqueda de mutaciones letales, en un fondo genético defectuoso en el sistema Min, llevó a la identificación del primer factor del sistema de oclusión del nucleoide, SlmA (Bernhardt & de Boer, 2005). Esta proteína une sitios específicos del DNA, los que se encuentran distribuidos en el cromosoma. Después de unir el DNA, SlmA oligomeriza formando agregados que previenen la polimerización de FtsZ (Tonthat *et al.*, 2011; 2013).

La existencia del sistema Min y del sistema de oclusión del nucleoide remarcan la importancia que tiene la correcta localización del anillo Z. Este paso, altamente regulado en tiempo y espacio, es el punto de partida en la formación del complejo macromolecular responsable de la división bacteriana.

## **1.2 Etapa temprana del ensamblaje del divisoma.**

### **1.2.1 Formación del anillo Z.**

FtsZ es una proteína altamente conservada en bacterias, cloroplastos y mitocondrias primitivas. La estructura cristalográfica de FtsZ de diferentes organismos muestra la presencia de dos dominios globulares conectados por una hélice central. El dominio N-terminal adopta un plegamiento Rossmann que une GTP. FtsZ es una proteína homóloga a la tubulina y su polimerización es dependiente de GTP. Su polimerización en la mitad longitudinal de la bacteria es considerada el primer paso de la división

bacteriana, donde los monómeros se asocian en forma “cabeza-cola” para formar los polímeros.

La estructura del anillo Z ha sido estudiado por diversas técnicas de microscopía. La organización no se comprende en su totalidad pero se ha sugerido que es una estructura altamente dinámica formada por protofilamentos de FtsZ solapados mediante interacciones laterales (Chen & Erickson, 2005; Fu *et al.*, 2010; Loose & Mitchison, 2013). Recientemente (Loose & Mitchison, 2013) a logrado describir la dinámica de los polímeros en presencia de FtsA y en presencia de membranas, los resultados demuestran una polimerización dinámica, probablemente por “treadmilling”, con un intercambio de monómeros a lo largo del polímero.

### **1.2.2 Anclaje del anillo Z a la membrana por medio de ZipA y FtsA.**

La formación del anillo Z depende de la polimerización de FtsZ, pero también de su anclaje a la membrana mediante la interacción con FtsA y ZipA. El ensamblaje de FtsZ en forma de anillo ocurre en presencia de FtsA o ZipA, pero no en ausencia de ambas (Pichoff & Lutkenhaus, 2002).

FtsA es una proteína altamente conservada y pertenece a la superfamilia de las Actina/HSP70/hexoquinasas. Esta se localiza en la mitad longitudinal de la bacteria de forma dependiente de FtsZ (Pichoff & Lutkenhaus, 2002). El anclaje del anillo Z a la membrana es mediado por la interacción directa de FtsA con el dominio C-terminal de FtsZ y la presencia de una hélice anfipática en el lado opuesto de FtsA, que le permite la interacción con la membrana (Din *et al.*, 1998; Ma & Margolin, 1999). La razón FtsZ/FtsA es importante para la correcta división de la bacteria. Cuando se sobreexpresa FtsZ la división se bloquea. Este bloqueo puede liberarse al sobreexpresar FtsA. La razón FtsZ/FtsA normal está en el orden de 100:1 (Dewar *et al.*, 1992). La estructura cristalográfica de FtsA de *Thermotoga marítima* muestra que esta tiene un plegamiento parecido a la actina. FtsA también está involucrada en el reclutamiento de las proteínas tardías FtsI y FtsN, se ha demostrado una interacción directa entre FtsA y FtsN (Busiek *et al.*, 2012; Corbin *et al.*, 2004; Rico *et al.*, 2004).

ZipA es una proteína bitópica solo presente en gama proteobacterias (de Boer, 2010). Esta proteína promueve la formación de manojos de protofilamentos de FtsZ y modula su estado oligomérico (RayChaudhuri, 1999). La interacción entre FtsZ y ZipA es la más conocida a través de NMR y de la estructura cristalográfica de ZipA y el dominio C-terminal de FtsZ, el cual forma una hélice y una hebra beta a lo largo de un surco hidrofóbico presente en ZipA (Mosyak *et al.*, 2000; Moy *et al.*, 2000). Finalmente, se puede agregar que ZipA es necesaria para el reclutamiento de las proteínas tardías como FtsK, FtsQ, FtsL y FtsN (Hale & de Boer, 2002).

### **1.2.3 Estabilización del anillo.**

La estabilización del anillo Z, en la etapa temprana, es mediada por 4 proteínas no esenciales, ZapA, ZapB, ZapC y ZapD, las que interactúan directamente con FtsZ (Huang *et al.*, 2013). Estas cuatro proteínas no están presentes en todo el reino bacteria. Las gamaproteobacterias poseen todas las Zap, mientras que las betaproteobacterias solo poseen ZapD (Natale *et al.*, 2013).

ZapA promueve la estabilidad del anillo Z mediante la formación de manojos de protofilamentos de FtsZ y estudios *in vitro* sugieren que ZapA compite con MinC en *E. coli* (Dajkovic *et al.*, 2008; Gueiros-Filho & Losick, 2002). ZapB es un estabilizador del anillo Z de manera dependiente de ZapA. Experimentos *in-vitro* muestran que ZapB co-sedimenta con FtsZ solo en presencia de ZapA, sugiriendo que ZapA forma un puente para la interacción (Galli & Gerdes, 2012).

### **1.2.4 Hipótesis sobre el mecanismo de constricción del anillo Z.**

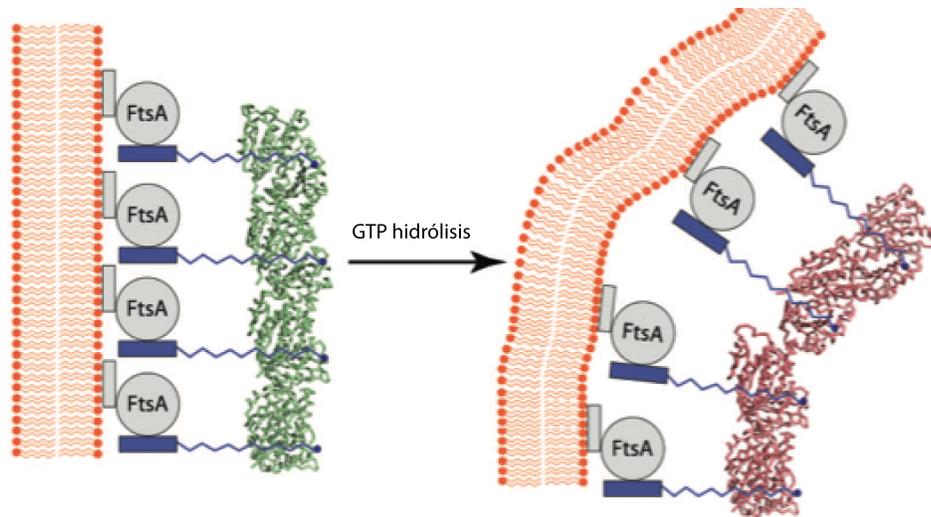
Se cree que el anillo de FtsZ es el componente principal capaz de generar la fuerza para la constricción de la membrana. Esta hipótesis ha sido apoyada por la reconstitución de FtsZ anclada a la membrana de liposomas, en los cuales se ha visto constricción (Osawa *et al.*, 2008). Se ha propuesto dos modelos para explicar la habilidad contráctil del anillo Z (Erickson, 2009).

El modelo deslizante se basa en la formación de protofilamentos de FtsZ que rodean todo el perímetro de la célula, y los dos extremos interactúan por uniones laterales. El

aumento de uniones laterales es termodinámicamente favorable lo que induce la condensación del protofilamento, generando la fuerza de constricción. Las proteínas involucradas en la formación y estabilización del anillo Z (FtsA, ZipA, proteínas Zap) pueden modular el ambiente local generando una variedad de fuerzas contráctiles. Modelos computacionales reafirman la hipótesis que el movimiento de desplazamiento entre los protofilamentos son suficientes para generar la fuerza contráctil necesaria para la división celular (Lan *et al.*, 2009). La hidrólisis de GTP no actuaría de forma directa en la generación de la fuerza de constricción, pero facilitaría el intercambio durante la condensación.

El modelo de curvatura propone que los protofilamentos de FtsZ pueden estar en una conformación recta o curva de manera dependiente de la hidrólisis de GTP. Al estar anclado a la membrana el anillo, este cambio de conformación genera una fuerza sobre la membrana. Experimentos de microscopía electrónica muestran la curvatura del anillo Z *in vitro* (Chen *et al.*, 2012; Huecas & Andreu, 2004; Lu *et al.*, 2000). La reciente estructura cristalina de FtsZ de *Micobacterium tuberculosis* (MtbFtsZ) unida a GTP muestra una curvatura de cerca de 50° entre dos moléculas de MtbFtsZ adyacentes. Esta observación da para pensar en un mecanismo “bisagra” donde dos FtsZ unidas a GTP, en una conformación recta, provocan la hidrólisis de GTP induciendo un movimiento de apertura. Los autores sugieren que este mecanismo, junto al anclaje por FtsA constituyen un andamio que provee la fuerza para guiar la constricción de la membrana figura 3 (Li *et al.*, 2013).

Recientemente (Loose & Mitchison, 2013) ha mostrado, *in-vitro*, que la dinámica del anillo Z no es consistente con el modelo de desplazamiento, y sugiere que el reordenamiento global de los filamentos de FtsZ, le permite al anillo adaptarse a los cambios en el diámetro de la bacteria, y funcionar como andamio para la maquinaria de síntesis de la pared celular hacia el interior, generándose la fuerza para la constricción.



**Figura 3. Mecanismo propuesto para la generación de la fuerza de constricción del anillo Z anclado a la membrana mediante FtsA.** Adaptado de Li *et al.* (2013).

### 1.2.5 FtsEX.

FtsE es una ATPasa que junto a la proteína de membrana FtsX forman un transportador ABC, el que está involucrado en el ensamblaje y estabilidad de FtsZ en el sitio de división celular. En *E. coli*, la fusión FtsX-GFP muestra que su localización depende de FtsZ, FtsA y/o ZipA, pero es independiente de las proteínas tardías (Schmidt *et al.*, 2004). Mediante estudios de co-inmuno precipitación se determinó que FtsE interactúa con FtsZ (Corbin *et al.*, 2007). Además se ha visto que el reclutamiento de FtsK, FtsQ y FtsI es dependiente de la presencia de FtsEX (Schmidt *et al.*, 2004). Otra evidencia muestra que la unión y/o hidrólisis de ATP de FtsE es esencial para que ocurra la división celular, aunque no afecta la asociación de las proteínas del divisoma (Arends *et al.*, 2009).

Recientemente se ha establecido otro papel para FtsEX en *E. coli*. FtsX interactúa con el factor LytM llamado EnvC, el cual activa a las amidasas de la división celular AmiA y AmiB, las que están involucradas en el rompimiento del peptidoglicano durante la separación de las células hijas (Uehara *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2011a). Una vía de

activación similar se ha observado en la bacteria Gram positiva *Streptococcus pneumoniae*, donde FtsEX interactúa con una denominada peptidoglicano hidrolasa PcsB (Sham *et al.*, 2011).

El complejo FtsEX en *B. subtilis* también es necesario para la actividad hidrolasa de la endopeptidasa CwlO. Sin embargo, esta última no está involucrada en la división celular sino que en el proceso de elongación.

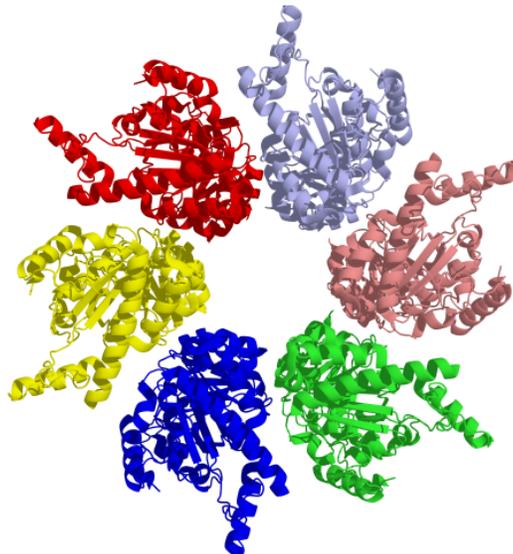
Estos resultados sugieren que FtsEX es un activador de hidrolasas involucradas en el metabolismo de peptidoglicano, además se encuentra ampliamente conservado y actúa en diferentes contextos fisiológicos dependiendo de la especie bacteriana. Si bien esta es una de las funciones de FtsEX no es necesariamente la única. Es importante notar que los estudios de FtsE y FtsX ha sido hechos *in vivo* debido a la casi nula solubilidad de FtsE y la toxicidad de la sobreexpresión de FtsX.

### **1.3 Maduración del divisoma.**

Una vez que se ha formado el anillo Z se observa un retraso para que se ensamble el divisoma completo y comience la división en *E. coli*, *B. subtilis* y *C. crescentus* (Aarsman *et al.*, 2005; Gamba *et al.*, 2009). Durante este periodo, un grupo de proteínas responsables para la síntesis del septo de peptidoglicano (en el sitio de división) y de la separación de las células hijas, son reclutadas de manera secuencial a la mitad de la célula de manera interdependiente. Esta segunda fase lleva a la formación de una maquinaria de división celular funcional. La transición entre los modos de síntesis de peptidoglicano (elongación y división) es progresivo y estudios recientes proponen una interacción directa entre ambas maquinarias para promover la división celular (van der Ploeg *et al.*, 2013). Las proteínas involucradas en la maduración serán descritas en el orden que son reclutadas.

### 1.3.1 FtsK y la segregación del DNA.

FtsK es una proteína multidominio, involucrada en la separación y segregación del cromosoma, proceso que es esencial para la división celular (Yu *et al.*, 1998). La estructura de FtsK es altamente conservada en bacterias. En *E. coli*, el dominio N-terminal consiste de 4 segmentos transmembrana, esenciales para la división y la localización del septo, también posee un dominio conector, rico en prolinas, y finalmente un dominio C-terminal. Este dominio es una ATPasa del tipo RecA que actúa como una maquinaria de translocación del DNA. La estructura de FtsK de *Pseudomonas aeruginosa* muestra un hexámero de FtsK que forma un anillo por el cual el DNA puede ser translocado de manera dependiente de ATP (figura 4).



**Figura 4.** Estructura cristalográfica de FtsK de *P. aeruginosa*. Vista superior del hexámero de FtsK, (pdb: 2IUU).

### 1.3.2 FtsQLB: conexión entre el citoplasma y el periplasma.

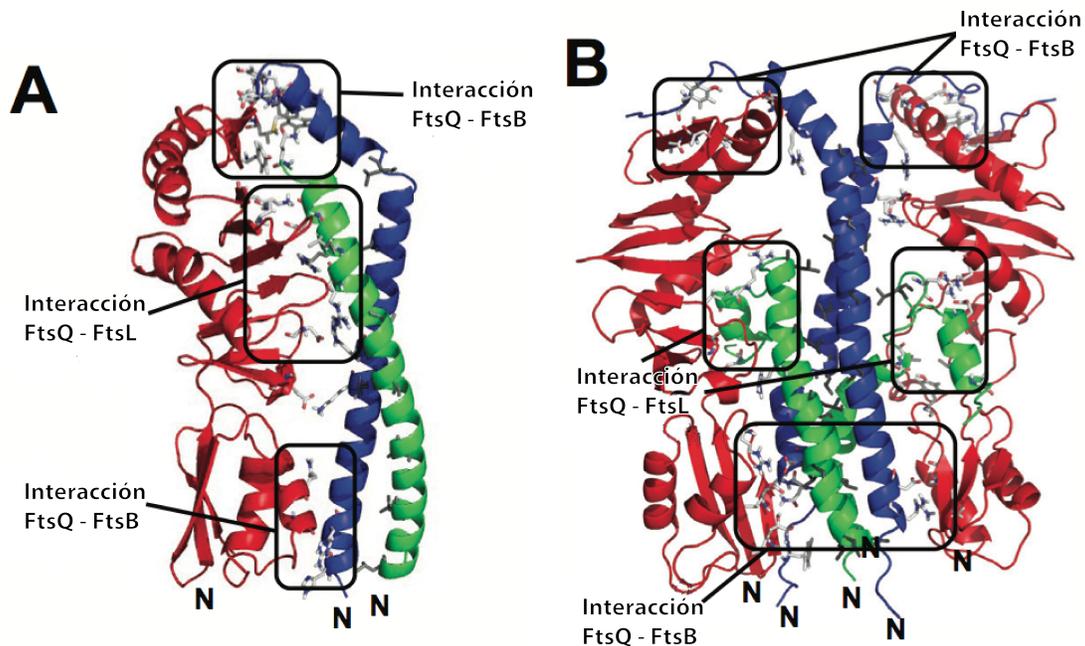
FtsQ, FtsL y FtsB se ensamblan en un complejo (FtsQLB) de manera independiente de los otros miembros del divisoma (Buddelmeijer & Beckwith, 2004). Estas tres proteínas son bitópicas, con un dominio periplasmático mayor y uno citoplasmático menor. Estudios de doble híbridos muestran que FtsQ interactúa con ella misma y con

FtsA, FtsX, FtsK, FtsL y FtsB (Karimova *et al.*, 2005) y con proteínas involucradas en la síntesis del peptidoglicano (FtsW, FtsI, FtsN).

La estructura del dominio periplasmático de FtsQ muestra 2 dominios característicos denominados  $\alpha$  y  $\beta$  (van den Ent *et al.*, 2008). El dominio  $\alpha$ , adyacente a la membrana citoplasmática, tiene un motivo POTRA (“polypeptide transport associated”) cuya segunda hebra  $\beta$  es esencial para la localización en la mitad de la célula. El dominio  $\beta$  se encuentra en el C-terminal de la proteína y es esencial para el reclutamiento de FtsL, FtsB y FtsW (Chen *et al.*, 2002; van den Ent *et al.*, 2008).

FtsB y FtsL están involucradas en el reclutamiento de las últimas proteínas del divisoma y se cree que participan en la estabilización del anillo Z (Gonzalez & Beckwith, 2009). Se cree que FtsB y FtsL interactúan mediante motivos de “cierre de leucinas” presentes en los dominios periplasmáticos (Robichon *et al.*, 2011).

La estequiometría del complejo no es conocida, sin embargo la modelación computacional sugiere dos modelos: Un hexámero 2:2:2 o un trímero 1:1:1 (figura 5). Los estudios estructurales en FtsQ muestran la formación de dímeros apoyando el modelo hexamérico del complejo (van den Ent *et al.*, 2008; Villanelo *et al.*, 2011), sin embargo los estudios por entrecruzamiento no muestran la presencia de la forma dimérica de FtsQ (van den Berg van Sapperoea *et al.*, 2013), y si confirman las zonas de interacción entre FtsQ, FtsL y FtsB. Estudios realizados en el laboratorio mediante termoforesis en microescala no muestran oligomerización de FtsQ (datos no publicados).



**Figura 5. Complejos de FtsQ/FtsB/FtsL obtenidos mediante dinámica molecular.** **A.** Modelo trimérico 1:1:1, FtsQ rojo, FtsB azul y FtsL verde. **B.** Modelo heaxamérico 2:2:2. Las posible zonas de interacción entre cada polipéptido se han resaltado. Adaptado de Villanelo *et al.* (2011).

### 1.3.3 Translocación del precursor del PG al periplasma.

El precursor del peptidoglicano (el lipidII) es sintetizado en el citoplasma, mediante las proteínas Mur y MraY, una vez sintetizado debe ser translocado al periplasma para entregar el sustrato a la maquinaria de síntesis. La proteína FtsW se ha clasificado como la flipasa de la división celular en *E. coli* (Mohammadi *et al.*, 2011). El gen que codifica para FtsW se encuentra en el cluster *dcw* que incluye a los genes de MraY y MurG. A su vez, FtsW interactúa con varias proteínas del divisoma (FtsQ, FtsL, FtsN, PBP3 y PBP1B) y es necesaria para el reclutamiento de PBP3 (sintetasa de peptidoglicano) (Alexeeva *et al.*, 2010; Di Lallo, 2003; Karimova *et al.*, 2005).

La topología de FtsW de *E. coli* indica la presencia de 10 segmentos transmembrana (Lara & Ayala, 2002). El “loop” entre los segmentos TM7 y TM8 parece ser de gran

importancia para el funcionamiento de FtsW. El “loop” entre los segmentos TM9 y TM10 está involucrado en la interacción con PBP3 y PBP1B (Fraipont *et al.*, 2011).

FtsW es miembro de las proteínas SEDS (“shape, elongation, división and sporulation”) al igual que RodA y SpoVE, las que están involucradas en elongación de *E. coli* y esporulación de *B. subtilis*, respectivamente (Ikeda *et al.*, 1989). Estas corresponderían a las flipasas en estos procesos fisiológicos.

#### **1.3.4 Biosíntesis de las cadenas de glicanos y la incorporación en el PG preexistente.**

Como se mencionó antes, FtsW interactúa con PBP3 y PBP1B en *E. coli*. Estas dos proteínas son las responsables de la polimerización de la cadena de glicanos y de su incorporación a la pared de peptidoglicano en el sitio de división celular.

PBP3 es una proteína bitópica y esencial. Posee una zona periplasmática grande que posee dos dominios, el C-terminal que posee la actividad DD-trans-peptidasa que cataliza el entrecruzamiento del peptidoglicano. En *E. coli* el segmento transmembrana es necesario para su localización en la mitad de la célula, su dimerización y la interacción con FtsW (Fraipont *et al.*, 2011).

PBP1B posee los dominios DD-transpeptidasa y transglicosilasa. La estructura de PBP1B sugiere que la cadena de glicanos sintetizada por el dominio transglicosilasa es el sustrato para el dominio transpeptidasa (Sung *et al.*, 2009).

FtsN es una de las últimas proteínas reclutadas al sitio de división celular. Esta es una proteína bitópica y esencial de la división, se piensa que aumenta la estabilidad del divisoma (Rico *et al.*, 2010). La región periplasmática de FtsN posee 3 hélices  $\alpha$  seguidas por una región desestructurada que conecta con el dominio SPOR (no esencial), localizado en el C-terminal. Este dominio SPOR de FtsN puede interactuar con el peptidoglicano.

### **1.3.5 Hidrólisis de peptidoglicano y división celular.**

Se ha visto que las hidrolasas de peptidoglicano están presentes en varios procesos bacterianos como son el crecimiento, recambio del peptidoglicano, esporulación y germinación, ensamblaje de los sistemas de secreción, pili y flagelo (Vollmer *et al.*, 2008). La siguiente sección se enfoca en las hidrolasa de peptidoglicano del septo, su regulación y su papel en el proceso de división celular en *E. coli*.

#### **1.3.5.1 Amidasas periplasmáticas de *E. coli*, papel clave en la separación celular,**

Las amidasas AmiA, AmiB y AmiC pertenecen a la familia amidasa\_3 que consiste en Zn<sup>+2</sup>-metalo-enzimas. Estas cortan el enlace amida entre el grupo lactil del ácido N-acetilmurámico y la L-Alanina del pentapéptido, cortando el entrecruzamiento del peptidoglicano. AmiA y AmiC son translocadas al periplasma mediante la vía de transporte "twin-arginine" (Tat), mientras que AmiB es translocada mediante la vía de la maquinaria Sec. Su importancia en la división celular ha sido demostrada mediante estudios genéticos, una triple mutante de las amidasas presentó un fenotipo de collar de perlas, donde el 90 a 100% de las células no pudieron efectuar la fisión binaria (Heidrich *et al.*, 2001). Un fenotipo similar pero menos marcado se observa con la mutante simple de amiA o amiC con un 5-10 % y 20-30 % de formación de collar de perlas, respectivamente (Heidrich *et al.*, 2001).

AmiC y AmiB son reclutadas al sitio de división celular de manera dependiente de FtsN debido a la presencia de un dominio AMIN (Peters *et al.*, 2011), el cual se encuentra presente en proteínas involucradas en el metabolismo de la pared celular y en el transporte de estructuras como el pilis tipo IV de bacterias Gram negativas (de Souza *et al.*, 2008). Consistente con la presencia de este dominio en AmiB y AmiC, AmiA, que no posee el dominio AMIN, se encuentra dispersa en el periplasma (Bernhardt & de Boer, 2003).

### 1.3.5.2 Regulación de las amidasas del septo: Factores LytM.

Otras proteínas que contienen un dominio LytM (lysostaphin/peptidasa M\_23) están involucradas en la hidrólisis del peptidoglicano. Proteínas que poseen el dominio LytM presentan diversas actividades en distintas bacterias, en *Staphylococcus aureus*, rompen el puente peptídico de la penta glicina mientras que el factor LytM gp13 del fago  $\phi 29$  de *B. subtilis* presenta una actividad D,D-endopeptidasa que rompe el entrecruzamiento del peptidoglicano de *B. subtilis* (Firczuk *et al.*, 2005).

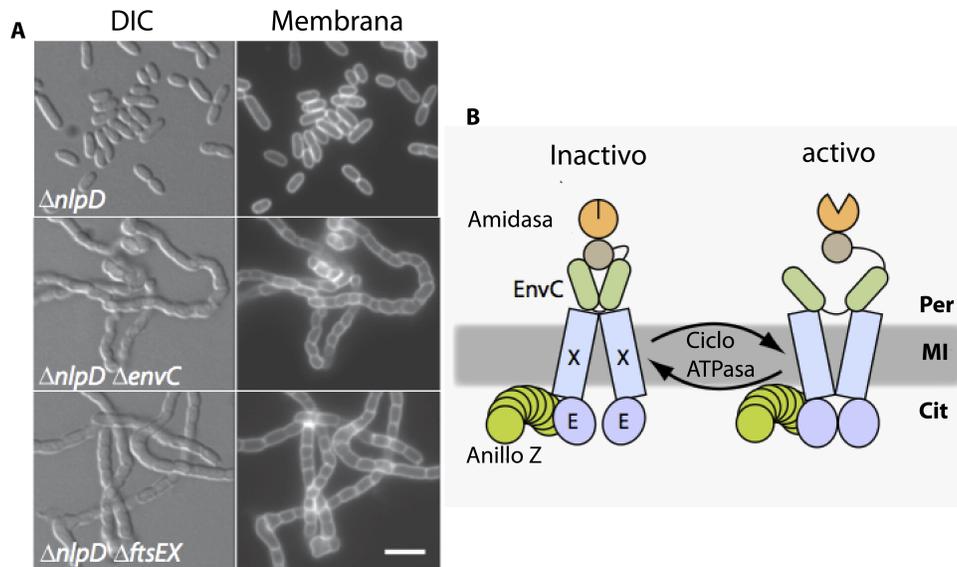
En *E. coli*, cuatro proteínas con dominio LytM se han identificado (EnvC, NlpD, YebA y YgeR). Mutantes por delección de estas proteínas generan fenotipos de collar de perlas, con un efecto preponderante en la mutación doble *envC-nlpD*. Tanto EnvC como NlpD se localizan en el sitio de división, apoyando un posible rol en la división celular (Uehara *et al.*, 2009). Interesantemente, estas dos proteínas no presentan actividad hidrolítica del peptidoglicano *in-vitro*. Mediante alineamiento de secuencias se determinó que tanto EnvC como NlpD no poseen los residuos para la coordinación de  $Zn^{+2}$  en el sitio activo. En cambio, estas activan las tres amidasas mencionadas anteriormente: AmiA y AmiB por EnvC y AmiC por NlpD (Uehara *et al.*, 2010). Un mayor entendimiento del mecanismo de activación de las amidasas se obtuvo con la estructura de AmiB de *Bartonella henselae*, esta muestra la presencia de una hélice  $\alpha$  que obstruye el sitio activo (Yang *et al.*, 2012).

Mediante estudios por mutaciones puntuales se comprobó que las mutaciones localizadas en esta hélice  $\alpha$  provocan una activación constitutiva de la amidasa, provocando la lisis celular. Esto sugiere la presencia de un cambio conformacional de esta zona, mediada por el factor LytM, para exponer el sitio activo al sustrato (Yang *et al.*, 2012). La estructura de EnvC de *E. coli* corroboró la ausencia de los residuos críticos involucrados en la coordinación del zinc catalítico. Sin embargo, se demostró que algunos residuos vecinos del sitio activo no funcional son críticos para la división celular y para activar a la amidasa AmiB *in vitro* (Peters *et al.*, 2013).

La localización de EnvC es mediada por un dominio “coiled-coil” en el extremo N-terminal de esta, que interactúa con el dominio periplasmático de la proteína

temprana FtsX (Yang *et al.*, 2011a), a diferencia de AmiB, la cual requiere del reclutamiento de FtsN para su correcta localización en el sitio de división celular. Además se vió que la actividad ATPásica de FtsE es un requisito para la división celular (Yang *et al.*, 2011a). Se sabe que FtsE interactúa con FtsZ (Corbin *et al.*, 2007), toda esta evidencia sugiere fuertemente una coordinación entre la constricción, citoplasmática, del anillo Z y la hidrólisis periplásmica del peptidoglicano (Yang *et al.*, 2011a) (figura 6).

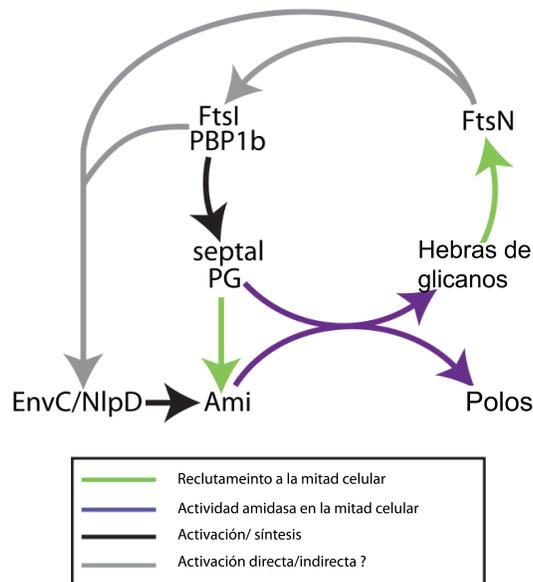
El segundo factor LytM, NlpD, es una lipoproteína anclada a la membrana externa. Además del dominio LytM posee, en el extremo N-terminal, un motivo LysM que une el peptidoglicano (Buist *et al.*, 2008). La localización de NlpD depende directamente de FtsN y, al igual que la pareja EnvC – AmiB, es reclutada antes que su pareja AmiC (Peters *et al.*, 2011). La importancia en la activación de las amidasas mediante los factores LytM, EnvC y NlpD, es apoyada por la obtención de fenotipos iguales en la doble mutante  $\Delta envC \Delta nlpD$  y en la triple mutante  $\Delta amiA \Delta amiB \Delta amiC$  (Uehara *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2011a).



**Figura 6. Presencia de los factores LytM en la división celular. A.** Estudio mutacional de EnvC, NlpD y FtsEX. Imágenes de microscopía de las distintas mutantes y de las membranas. **B.** Modelo propuesto para el complejo FtsEX-EnvC-Ami con la regulación de las amidasas. Adaptado de Yang *et al.* (2011a).

### 1.3.5.3 Regulación de la hidrólisis del peptidoglicano en la formación del septo.

Además de la presencia de FtsN y FtsEX, la localización de AmiB y AmiC, en el sitio de división celular, requiere de la síntesis del septo de peptidoglicano (Peters *et al.*, 2011). El tratamiento de las células con cephalaxina, un inhibidor de PBP3, no tiene efecto en el reclutamiento de FtsN, EnvC ni NlpD, sin embargo, AmiB y AmiC no son reclutadas. De esta forma se ha sugerido un modelo de regulación, por el cual la acumulación de FtsN en el sitio de división promueve una leve síntesis de peptidoglicano, mediante las proteínas PBP3 y/o PBP1B reclutadas por FtsN. Este peptidoglicano es hidrolizado por las amidasas, generando hebras de glicanos sin puente peptídico. Estos glicanos unen el dominio SPOR de FtsN, la cual se acumula en el sitio de división celular y estimula la síntesis del peptidoglicano septal (Peters *et al.*, 2011). De esta forma la generación del sustrato de las amidasas agrega otro nivel de control en la hidrólisis del peptidoglicano en la división, figura 7.



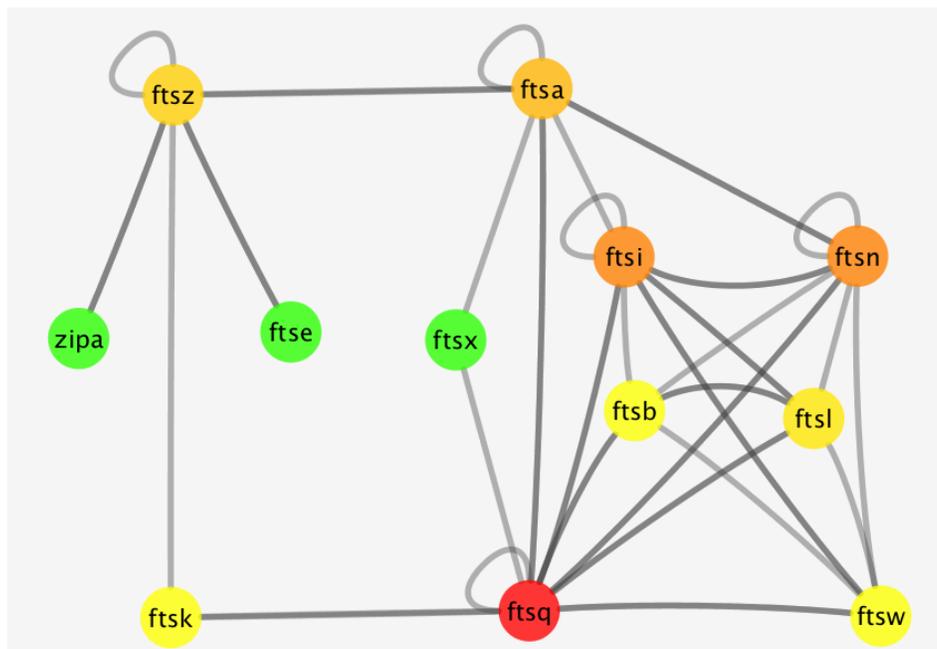
**Figura 7. Esquema que describe la coordinación de la síntesis e hidrólisis del peptidoglicano.** Adaptada de Peters *et al.* (2011).

#### 1.4 Red de interacción del divisoma.

Se han realizado un gran número de trabajos *in vivo* e *in vitro* para comprender la red de interacciones proteína-proteína existente en el divisoma de *E. coli*. Esta información, más los estudios de localización, han sido necesarios para comprender la cronología de los eventos que llevan a la formación y maduración del divisoma. Al parecer, el ensamblaje y maduración de esta maquinaria es conservada en los distintos organismos. Tanto en *E. coli* como en *B. Subtilis* se observa un ensamblaje en dos pasos, con un retraso del reclutamiento de las proteínas tardías en comparación a la formación del anillo Z (Gamba *et al.*, 2009). Incluso se ha comprobado la interacción cruzada entre varias de estas proteínas entre *Streptococcus pneumoniae* y *E. coli* (Di Lallo, 2003; Maggi *et al.*, 2008).

Estas redes de interacción (figura 8) se han descrito, principalmente, mediante estudios genéticos o con técnicas *in vivo*, mediante el uso de doble híbridos, las cuales no entregan una caracterización cuantitativa de las interacciones. Incluso, varias de

estas metodologías sufren de diversos falsos positivos debido a la presencia de las proteínas nativas. Para dilucidar el ensamblaje de esta maquinaria, es necesario caracterizar de manera cuantitativa las interacciones directas de sus componentes, como también la cooperatividad entre ellas.



**Figura 8. Red de las interacciones descritas experimentalmente para las proteínas del divisoma de *E. coli*.** Colores corresponden al número de interacciones descrita por ese nodo (escala de colores desde rojo (9 interacciones), naranja oscuro (7 interacciones), naranja (6 interacciones), naranja claro (5 interacciones), amarillo (2 interacciones) hasta verde (1 interacción)). Datos obtenidos de la base de datos IntAct (Orchard *et al.*, 2014).

## Hipótesis.

“La proteína FtsEX es un transportador ABC, donde FtsX está involucrada en la interacción con las proteínas tempranas del *divisoma* por su dominio N-terminal y con las tardías mediante el dominio periplasmático”

## Objetivos Generales.

- Caracterizar las zonas de interacción entre FtsEX y las proteínas tempranas y tardías del *divisoma*.
- Caracterizar la unión de FtsE con ATP, ADP y FtsZ.

## Objetivos Específicos.

1. Sobreexpresar y purificar FtsE, FtsX, FtsA
2. Caracterizar las interacciones:
  - FtsX-FtsQ.
  - FtsX-EnvC.
  - FtsX-FtsX.
  - FtsE-FtsZ.
3. Caracterizar la unión FtsE –ATP, -ADP.
4. Generar FtsX trunca en la primera, segunda y ambas hélices amphipáticas del extremo N-terminal

## 2 Materiales y métodos.

### 2.1 Reactivos.

Todas las soluciones se prepararon con agua nanopura (resistividad de 18,2  $\mu\Omega/\text{cm}^2$ ).

Los reactivos usados y sus fabricantes se indican en la tabla 1.

**Tabla 1. Reactivos utilizados en esta tesis.**

Reactivo	Fabricante
Amonio heptamolibdato tetrahidro ( $\text{MnNH}_4$ ) Cloruro de Sodio ( $\text{NaCl}$ ) Cloruro de Calcio ( $\text{CaCl}_2$ ) Oxalato de verde malaquita Acetato de Sodio Urea Cloruro de Magnesio ( $\text{MgCl}_2$ ) Bisulfito de Sodio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ )	Merck
TCEP (Tris(2-carboxietil)fosfano) DTT (DL-Dithiotreitol) Adenosina 5'-trifosfato (ATP) CHAPS (3-[(3-Cholamidopropil) dimetilamonio] - 1 - propano sulfonato) N-Lauroil-Sarcosinato (Sarkosyl) Tween-20 Colato de Sodio	Sigma
Coctel inhibidor de proteasas libre de EDTA Imidazol	Roche
DDM (n=dodecil-beta-D-maltosido)	Anatrace
Mant-ATP	Molecular Probes
Cy5 Mono Reactive Dye	Pierce
NT.647 NHS reactive dye MST buffer	Nanotemper Technologies GmbH
Tris (Tris(hidroximetil)aminometano) Ampicilina IPTG (Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranósido)	US Biological

## 2.2 Medios de Cultivo Bacteriano.

**Medio líquido LB.** Bactotripton 1%, extracto de levadura 0,5%, NaCl 0,5%, pH 7,0.

**Medio líquido ZY.** Bactotripton 1%, Extracto de levadura 0,5%.

**Medio líquido ZYM-5052.** Al medio ZY se le adicionó Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 25 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 25 mM, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50 mM, MgSO<sub>4</sub> 2 mM, metales 0,5X, glucosa 0,05%, glicerol 0,5% y  $\alpha$ -lactosa 0,2%

**Medio líquido MDG.** Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 25 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 25 mM, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50 mM, MgSO<sub>4</sub> 2 mM, metales 0,2X, glucosa 0,5% y aspartato 0,25%.

**Medio sólido.** Placas LB agar. Las placas se prepararon utilizando medio LB y agar al 1,5%.

Las bacterias fueron crecidas en placas o en medio líquido suplementados con el antibiótico específico.

## 2.3 Cepas bacterianas y DNA plasmidial.

Las cepas bacterianas y los plasmidios utilizados y generados en esta tesis se describen en la tabla 2 y 3, respectivamente.

**Tabla 2. Cepas de *E. coli* utilizadas en este trabajo y su genotipo.**

Cepa	Genotipo	Fuente/ Referencia
<i>E. coli</i> XL1Blue	RecA-, endA1, gyrA96, thi1, hsdR-17, relA1, lacq, $\Delta$ M15, Tn10	Stratagene
<i>E. coli</i> K12		
<i>E. coli</i> Bl21	F-ompT, r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup>	Novagen
<i>E. coli</i> C41	F- ompT hsdSB (rB- mB-) gal dcm	Novagen
<i>E. coli</i> C43	F- ompT hsdSB (rB- mB-) gal dcm	Novagen

## 2.4 Purificación de DNA plasmidial.

Las células de *E. coli* transformantes, se crecieron en 10 mL de medio LB, suplementado con antibiótico, hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> de 0,8. El cultivo se centrifugó a 15000 x g durante 10 minutos y las células se suspendieron y lavaron en 1 mL de Tris HCl 20 mM, pH 8,0. El DNA plasmidial se obtuvo empleando el kit "E.Z.N.A. Plasmid DNA Mini Kit I" de OMEGA, siguiendo las instrucciones del fabricante.

**Tabla 3. Plasmidios utilizados y/o generados en este trabajo.**

<b>Plasmidio</b>	<b>Características</b>	<b>Fuente/ Referencia</b>
pCA24N FtsE	Plasmido que porta el gen de FtsE fusionado a 6 histidinas	(Kitagawa <i>et al.</i> , 2005)
pCA24N FtsX	Plasmido que porta el gen de FtsX fusionado a 6 histidinas	(Kitagawa <i>et al.</i> , 2005)
pMFV12	Plasmido que porta el gen de FtsA fusionado a 6 histidinas	(Yim <i>et al.</i> , 2000)
pCA25N FtsE	Derivado de pCA24N FtsE, con resistencia a ampicilina	Este trabajo
pCA25N FtsEX	Derivado de pCA25N FtsE, con FtsX rió abajo de FtsE.	Este trabajo
pDY138	Plasmido que porta el dominio periplasmático de FtsX fusionado a 10 histidinas	(Yang <i>et al.</i> , 2011a)
pDY151	Plasmido que porta el dominio “coiled-coil” de EnvC fusionado a H-SUMO	(Yang <i>et al.</i> , 2011a)
pGROELS	Plasmido que porta los genes GroEL y GroES bajo el promotor Ara	(Kerner <i>et al.</i> , 2005)

## **2.5 Electroforesis de DNA en geles de agarosa.**

Los productos de PCR, el DNA plasmidial y los fragmentos de digestión de DNA, se separaron electroforéticamente en geles de agarosa al 1% o 2% (dependiendo del tamaño) en amortiguador TAE 1X (tris-HCl 40 mM pH 8,1, ácido acético glacial 20 mM, EDTA 2 mM). Los geles se solidificaron en presencia de Gel Red. La electroforesis se llevó a cabo bajo un potencial eléctrico entre 70 y 100 V. Las bandas de DNA se visualizaron por fluorescencia en un transiluminador de luz UV.

## **2.6 Preparación de células de *E. coli* electro competentes.**

Se inoculó 500 mL de medio SOB con 5 mL de cultivo en fase exponencial de un clon de una cepa de *E. coli* crecida en medio LB. Las células se crecieron a 37 °C con agitación moderada hasta una OD<sub>600</sub> de 0,75, y se colocaron en tubos fríos y se centrifugaron por 15 minutos a 10.000 x g a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante, y se

suspendieron las células con vortex en un mismo volumen de glicerol 10% v/v estéril y frío. Este procedimiento de centrifugación y lavado se repitió dos veces más, con la precaución de no contaminar las células. Después se eliminó el sobrenadante, y se resuspendieron las células con las pocas gotas de sobrenadante que quedaron en el tubo. La suspensión celular se ajustó a un volumen tal que al medir la OD<sub>600</sub> de una dilución 1:100, se obtuviera un valor entre 2 a 2,5. Se repartió la suspensión celular en alícuotas de 60 µL, se congelaron en metanol a -80 °C y se almacenaron a -80 °C hasta el momento de su uso.

## **2.7 Electro transformación de *E. coli*.**

Se mezcló 40 µL de células electrocompetentes con 1-2 µL de DNA plasmidial, en cubetas de electroporación de 2 mm. Se utilizó un electroporador GenePulser Xcell (BioRad) con un voltaje de 2,5 kV. Y una capacitancia de 25 µF y una resistencia de 200 ohm. Inmediatamente después de la electroporación, las células se pasaron a 1 mL de medio SOC y se incubaron por 1 hora a 37 °C, y se sembraron en agar-LB suplementado con antibiótico, y se incubaron por 12-14 horas para obtener colonias, que se sometieron posteriormente a la prueba de sobreexpresión.

## **2.8 Purificación del dominio periplasmático de FtsX, ccEnvC y EnvC.**

La cepa de *E. coli* BL21 transformada con el plasmidio pDY138 para expresar el dominio periplasmático de FtsX (Xloop), con el plasmidio pDY151 para la proteína H-SUMO-ccEnvC o con el plasmidio pTU101 para la proteína H-SUMO-EnvC. La proteína se indujo con lactosa de acuerdo al protocolo de (Studier, 2005). Brevemente, las bacterias se crecieron a 30° C por 16 horas en 400 mL de medio ZYM-5052 con el antibiótico necesario. Las bacterias se colectaron mediante centrifugación a 5.000 rpm por 50 minutos en una centrífuga Sorvall RC3-B. El precipitado bacteriano se suspendió en 50 mL de amortiguador A (Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 250 mM y glicerol 10%) y se efectuaron 6 ciclos de sonicación de 20 segundos con salida de 6 (50 watts en sonicador Misonix 3000) con un minuto de intermedio. Los restos celulares se

removieron por centrifugación a 50.000 x g por 2 horas. Se extrajo el sobrenadante y se incubó con 5 mL de resina Ni-NTA (ProBond, invitrogen) durante 1 hora a 4°C con agitación suave. Posteriormente, la suspensión resina-muestra se cargó en una columna de 10 mL (BioRad). La columna se lavó secuencialmente con 30 mL de las soluciones en amortiguador A con la adición de 25, 50, 100 y 250 mM de imidazol. Para los lavados con 100 y 250 mM imidazol se recolectaron fracciones de 1 volumen de columna. Las fracciones que poseen la proteína de interés se dializaron en amortiguador A y se almacenaron en alícuotas a -80 °C. El mismo procedimiento se utilizó para las proteínas ccEnvC, EnvC y el dominio periplasmático de FtsX (Xloop)

## **2.9 Purificación de FtsA.**

Un cultivo de 2 L de *E. coli* C41, transformada con pMFV12 (para sobreexpresar FtsA) se incubó a 37 °C con agitación hasta alcanzar una OD<sub>600</sub> de 0,5 y se indujo con IPTG 0,5 mM por 3 hrs. Las células se colectaron por centrifugación, a 7000 x g por 40 minutos, a 4 °C. El precipitado se lavó con amortiguador TN (Tris-HCl 20 mM pH 8, NaCl 100 mM) y luego se almacenó a -80 °C. Así, se obtuvieron aproximadamente 1,5 g de precipitado bacteriano.

Para purificar, se suspendió completamente el precipitado en 40 mL de amortiguador A (Tris-HCl 25 mM pH 8, NaCl 500 mM, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 10 mM) suplementado con una pastilla de cóctel de inhibidores de proteasas sin EDTA, y PMSF 0,1 mM. Para lisar las células se utilizó un sonicador Misonix 3000, con una sonda de 1 cm de diámetro, se aplicaron 6 pulsos de 20 segundos con salida de 6 (50 Watts), con pausas de 1 minuto, en hielo. El extracto se centrifugó en una ultracentrífuga Sorval refrigerada, a 100.000 x g por 90 minutos. El sobrenadante se sometió a una cromatografía de afinidad a Ni<sup>+2</sup>, en una columna de resina ProBond. Se cargó 4 mL de resina ProBond en una columna de vidrio (1,2 x 10 cm), se equilibró en amortiguador A, luego se tomó la resina y se colocó en un vaso de precipitado junto con el extracto crudo y se incubaron a 4 °C por 40 minutos con agitación suave. Se cargó la mezcla en la columna de vidrio, y se lavó con amortiguador A suplementado con concentraciones crecientes de imidazol (50,

100 y 200 mM), utilizando 4 volúmenes de columna para cada lavado (aprox. 20 mL), a flujo de 1 mL/min. usando una bomba peristáltica EconoPump (BioRad).

Se recolectaron fracciones de 1 volumen de columna. Para determinar en cuales fracciones eluyó FtsA, las muestras se analizaron por SDS-PAGE utilizando tinción con fluorescamina. Se juntaron las fracciones que contenían la proteína y se dializaron por 12 hrs a 4 °C en amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 500 mM, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 10 mM, sacarosa 1 M, DTT 2,5 mM, ATP 0,1 mM y MgCl<sub>2</sub> 2mM; para ello se utilizaron bolsas de diálisis de celulosa regenerada de un “cut-off” de 12-14 kDa, previamente tratadas de acuerdo a lo descrito (Green & Sambrook, 2012).

La proteína se cuantificó por el método de Bradford (BioRad) usando BSA como estándar, la pendiente de la curva de calibración para BSA y para FtsA fue la misma, de manera que las cuantificaciones realizadas con este ensayo son confiables. No se concentró la proteína para evitar su agregación. La proteína se congeló con metanol frío a -80 °C, y se almacenó a -80 °C para su posterior uso.

## **2.10 Purificación de Cuerpos de inclusión de FtsA y FtsE.**

Un cultivo de 2 L de *E. coli* C41, transformada con pMFV12 (para sobreexpresar FtsA) o con pCA25NFtsE (para sobreexpresar FtsE) se incubó a 37 °C con agitación hasta alcanzar una OD<sub>600</sub> de 0,6 y se indujo con IPTG 0,5 mM por 3 hrs. Las células se colectaron por centrifugación, a 7.000 x g por 40 minutos a 4 °C. El precipitado se lavó con a amortiguador TN (Tris-HCl 20 mM pH 8, NaCl 100 mM). Se suspendió el precipitado en buffer 40 mL de amortiguador TN. Se agregó 250 µL de lisozima (10 mg/mL), Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 10 mM, PMSF 10 mM, DTT 1 mM, y se incubó durante 1 hora en hielo con agitación ocasional. A la mezcla se le agregó 200 µL de ácido desoxicólico 10 % y se incubó a 37 °C durante 20 minutos. Finalmente se agregó 250 µL de DNAsa (4 mg/mL) y MgCl<sub>2</sub> 10 mM, se incubó a 25 °C con agitación constante durante 1 hora. Esta mezcla se sonicó con 8 pulsos de 20 segundos con 1 minuto entre cada pulso, manteniendo la preparación en hielo. El extracto se centrifugó a 13.000 x g durante 30 minutos a 4 °C. El precipitado obtenido se suspendió en amotiguador de lisis II (Tris-

HCl 50 mM pH 8, EDTA 10 mM, NaCl 100 mM y Triton X-100 1%) y se centrifugó a 10.000 x g durante 10 minutos, este lavado se repitió 3 veces.

El precipitado obtenido se suspendió y lavó con 10 mL de agua nanopura y luego se centrifugó a 10.000 x g durante 10 minutos, este lavado se repitió 3 veces.

### **2.11 Solubilización de CI.**

La solubilización de los CI se hizo con agentes denaturantes como urea o detergente sarkosyl. Brevemente, Los CI purificados se suspendieron parcialmente en una solución 8 M urea o 10 % sarkosyl. En el caso de la urea, se incubó con agitación suave durante 12 horas a 4 °C. En el caso de sarkosyl, los CI purificados fueron resuspendidos en una solución de sarkosyl 10 % con agitación alta durante 12 horas, a 4 °C. La suspensión final fue clarificada mediante centrifugación a 50.000 x g durante 1 hora, el sobrenadante se recuperó y se prosiguió con la purificación.

### **2.12 Apagamiento dinámico de la fluorescencia intrínseca de Xloop.**

Las muestras se midieron en un espectrofluorímetro Perkin-Elmer LS 50, en una cubeta de cuarzo de 500 µL a una temperatura controlada de 25 °C, se excitó a 295 nm, y se registró el espectro de emisión entre 310 y 420 nm, con un ancho de banda de los monocromadores de 8 nm para la excitación y la emisión. Para el apagamiento se utilizó amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 100 mM. El Xloop se agregó a una concentración de 7 µM, se midió la intensidad de fluorescencia a 348 nm (que es el máximo de emisión del triptófano), luego se agregó 2 uL de la solución del apagador 5 M (2 µM final), se agitó por inversión 3 veces, se incubó por 2 minutos y se midió nuevamente la intensidad de fluorescencia. Se procedió de esta forma, hasta alcanzar una concentración de apagador de 0,4 M (se consideró el cambio de volumen).

Como apagador se utilizó acrilamida (2-propenamida, masa molecular de 71,08 g/mol, no posee carga). La solución madre (5 M) de esta, se filtro con un filtro de 0,2 µm. Se utilizó triptófano 14 µM, como control de la sonda completamente expuesta al solvente.

### **2.13 Entrecruzamiento químico de Xloop y ccEnvC.**

Para determinar si las proteínas Xloop y ccEnvC purificadas interactúan, se hizo un experimento de entrecruzamiento químico con DTSSP. El DTSSP es un agente entrecruzante homobifuncional (tiene dos grupos reactivos idénticos), que reacciona con grupos amina primarias en proteínas. Además posee un enlace S - S en el conector, el que se puede romper con agentes reductores. Si dos proteínas interactúan, al agregar DTSSP, van a quedar covalentemente unidas, este complejo se puede observar por SDS-PAGE. Además al tratar el entrecruzamiento con DTT, el agente entrecruzante se rompe y se vuelve a obtener las proteínas libres.

La reacción se realizó en 50  $\mu\text{L}$  con 15  $\mu\text{M}$  de cada una de las proteínas. La concentración de agente entrecruzante se varió desde 4 a 20 mg/mL. Se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos y luego se detuvo la reacción agregando un exceso de Tris. De cada muestra se tomó 16  $\mu\text{L}$  y se mezcló con 6  $\mu\text{L}$  de amortiguador de carga, 10  $\mu\text{L}$  se cargaron directamente al gel, mientras que 10  $\mu\text{L}$  se trataron con DTT y alta temperatura, luego se cargaron en el gel.

### **2.14 Electroforesis en geles de acrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).**

Los geles se prepararon en dos fases: una separadora que consiste en acrilamida/bisacrilamida al 12% en amortiguador Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, SDS 0,1% y una fase concentradora de acrilamida/bisacrilamida al 4% en amortiguador Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, SDS 0,1%. A cada una de las soluciones se les adicionó persulfato de amonio y TEMED para inducir la polimerización. Se utilizó el amortiguador de corrida Tris-HCl 20 mM, glicina 150 mM, SDS 1% pH 8,3. A las muestras se les adicionó amortiguador de carga 6X (Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, SDS 10%,  $\beta$ -mecaptoetanol 10 mM, glicerol 30% y azul de bromofenol 0,02%), la mezcla se calentó a 95 °C por 10 minutos y se cargaron en el gel.

Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie (0,25 g de azul de Coomassie brillante en 90 ml de metanol:agua (1:1 v/v) y 10 ml de ácido acético glacial) durante dos horas con agitación constante y se destiñó con la solución de desteñido (50 % de metanol, 10 % ácido acético), o por tinción con nitrato de plata.

### **2.15 Eliminación del tag H-SUMO por digestión con SUMO proteasa.**

Para eliminar el “tag” H-SUMO de ccEnvC, la proteína se incubó durante 4 horas a 30 °C con 1 U de sumo proteasa (Invitrogen) por cada mg de proteína en amortiguador de corte 1X. La proteasa y el “tag” se removieron mediante el paso de la muestra por una resina Ni-NTA. La fracción que no se retuvo en la resina contenía la proteína de interés, sin el “tag”.

### **2.16 Western blot.**

Una vez terminada la corrida electroforética en gel SDS-PAGE, las muestras se transfieren durante 2 horas a una membrana de nitrocelulosa en el amortiguador de transferencia (Tris-HCl 20 mM pH 8,0, glicina 150 mM y metanol 20%) a 100 V a -20°C. Después, la membrana se incubó en solución de bloqueo (leche descremada al 5% disuelta en TTBS 1X) durante toda la noche. Se lavó 3 veces con 10 mL de TTBS 1X. Se incubó la membrana con el anticuerpo correspondiente en solución de bloqueo durante 1 hora. Posteriormente se lavó la membrana 3 veces con TTBS 1X. Finalmente se incubó por 1 hora con el anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa alcalina en solución de bloqueo. La membrana se lavó 3 veces en TTBS 1X y se reveló con 1,7 mg/mL de NBT y 0,8 mg/mL de BCIP en 10 mL de FAL 1X. Finalmente la reacción se detuvo lavando la membrana con abundante agua destilada.

### **2.17 Actividad ATPásica.**

La concentración de fosfato inorgánico producto de la hidrólisis de ATP se determinó cuantitativamente por el método colorimétrico de verde de malaquita. Un volumen de 13 mL de la solución colorante para éste método se compone de 10 mL de verde de

malaquita 1,32 mM en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3,1 M; 2,5 mL de heptamolibdato de amonio al 15% en agua y 0,5 mL de Tween 20 al 11% en agua. Estas soluciones stock se mantuvieron a temperatura ambiente y la mezcla se preparó al momento de la determinación.

Un volumen de 160 µL de las muestras cuya concentración de Pi se desea determinar, se depositó en pocillos de placas ELISA mantenidas en hielo. Luego se agregó 40 µL de la solución colorante y se agitó a una potencia de 750 RPM durante 2 minutos, para que la solución de cada pocillo alcanzara una absorbancia estable. Posteriormente se midió la absorbancia a 630 nm en un equipo Epoch de Biotek.

Se preparó una curva de calibración de 11 puntos por dilución seriada al 75 % a partir de una solución 450 µM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Es decir, a partir de la solución 450 µM de Pi se tomo  $\frac{3}{4}$  del volumen y se agregó a  $\frac{1}{4}$  de agua, y así sucesivamente. De modo que, la curva de calibración cubriera un rango de concentraciones desde 450 a 25 µM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, más un blanco libre de Pi. En todo el rango de concentraciones la absorbancia fue directamente proporcional a la concentración de Pi (no mostrado). Las muestras para la curva de calibración se guardaron a -20 °C y se agregaron a cada una de las placas de ELISA para ser analizadas, dado que el colorante se prepara cada vez que se hace el experimento.

Se tomaron 30 µL de las soluciones para la curva de calibración y de las mezclas de reacción de hidrólisis de ATP catalizadas por FtsA, y se agregaron 770 µL de ácido perclórico 0,32 M. Dado que existe hidrólisi ácida del ATP por el ácido perclórico, las soluciones se mantuvieron en hielo hasta el momento en que se agregaron los 160 µL de colorante a los pocillos de la placa de ELISA.

### **2.18 Dispersión de luz en 90° para determinar la agregación de FtsE.**

La dispersión de luz se midió en un espectrofluorimetro Perkin-Elmer LS50 con una cubeta de cuarzo de 500 µL. FtsE purificada desde CI se replegó mediante dilución rápida y se midió la dispersión de luz. Brevemente, 5 µL de FtsE en 6 M urea se diluyó en 500 µL de amortiguador y se incubó en hielo durante 1 hora. De esta forma, la concentración de urea disminuye rápidamente a 11 mM, concentración a la cual no

provoca un efecto desnaturante. La muestra se traspasó a la cubeta e incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. La dispersión de luz se midió durante 10 minutos y el valor final corresponde al promedio de los 10 minutos medidos.

### **2.19 Solubilización de FtsEX desde membranas.**

La cepa de *E. coli* C43 se transformó con el plasmidio pCA25NFtsEX para expresar FtsE y FtsX. La proteína se indujo con lactosa de acuerdo al protocolo de (Studier, 2005). Brevemente, las bacterias se crecieron a 30 °C por 16 horas en 400 mL de medio ZYM-5052 con el antibiótico necesario. Las bacterias se colectaron mediante centrifugación a 5.000 rpm por 50 minutos en una centrífuga Sorvall RC3-B. El precipitado bacteriano se suspendió en 50 mL de amortiguador A (Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 250 mM) y se efectuaron 6 ciclos de sonicación de 20 segundos con una salida de 6 (50 watts en sonicador Misonix 3000) con un minuto de intermedio. La preparación se centrifugó a 10.000 x g durante 30 minutos para eliminar células no lisadas y agregados grandes. El sobrenadante se ultracentrifugó a 120.000 x g durante 1 hora, a 4 °C. El sobrenadante se eliminó y se suspendió el precipitado en 5 mL de amortiguador PBS por cada gramo de precipitado. Se repitió este lavado 3 veces. Finalmente se suspendió el precipitado en 1 mL de amortiguador PBS por cada gramo de precipitado. Esta suspensión está enriquecida en membranas y fue el material de inicio para la solubilización con los distintos detergentes. La cuantificación se hizo mediante el método de Bradford (BioRad). Esta suspensión se diluyó hasta una concentración 20 mg/mL en amortiguador S (Tris-HCl 20 mM pH 8, NaCl 100 mM, glicerol 15%, 5 mM TCEP, y se agregó igual volumen de detergente a una concentración 10 veces la CMC, disuelto en amortiguador S, para finalmente obtener una mezcla de 10 mg/mL de proteína con 5 veces la CMC del detergente. Esta solución se incubó a 4 °C durante 2 o 12 horas (12 horas para el detergente DDM, 2 horas para los demás detergentes) con agitación leve. Finalmente se clarificó la preparación mediante centrifugación a 200.000 x g durante 1 hora a 4°C, el sobrenadante se rescató y analizó mediante SDS-PAGE. La mezcla obtenida se cargó en una columna de afinidad a Ni<sup>2+</sup> con un flujo de 0,1 mL/min. Posteriormente se lavó la columna con

amortiguador S, al cual se le suplementó con una concentración creciente de imidazol (40, 60, 100 y 150 mM). Las eluciones a 100 y 150 mM de imidazol se recolectaron en fracciones de 1 volumen de columna y se analizaron por SDS-PAGE para seleccionar las fracciones con proteína.

## **2.20 Interacción de las proteínas determinada por termoforesis en micro escala (MST).**

Para los estudios de MST se procedió al marcaje, de una de las proteínas, con las sondas fluorescentemente NT.647-NHS (NanoTemper GmbH) o Cy.5-maleimida (GE Healthcare). La concentración de proteína fluorescente utilizada varió para cada caso, cumpliendo siempre con una dilución tal que la concentración de proteína fue menor a la  $K_d$  y una concentración suficiente para obtener una intensidad de fluorescencia sobre las 400 U.A. De esta forma aseguramos que la curva de unión no estuviese afectada por la dilución del ligando y que las mediciones estuvieran en el rango recomendado por el equipo. Como la concentración de proteína no marcada o “ligando” depende de la  $K_d$  de la interacción, lo importante es que la concentración mayor sea de aproximadamente 20 veces mayor a la  $K_d$  y que se logre una dilución suficiente para estar en una relación sub-estequiometrica con el receptor. De esta forma se logran los platos de saturación y la señal basal. Para cubrir este rango de concentraciones se realizó una dilución seriada 1:1 del “ligando” en 16 tubos. A cada tubo se le agregó un volumen constante de la proteína fluorescente, se dejó incubar a temperatura ambiente y luego se cargaron los capilares (NanoTemper GmbH). Para cada estudio de interacción se analizó la termoforesis con el instrumento Monolith NT.115 (NanoTemper GmbH) utilizando tres potencias de MST, los análisis se realizaron en la potencia de MST menor, con el cual se obtuvo señal. Los ajustes y análisis se hicieron con el programa NT análisis software (Nanotemper GmbH) utilizando las ecuaciones internas del equipo.

### **2.21 Marcaje de las proteínas Xloop y ccEnvC con la sonda NT.647-NHS.**

A las proteínas Xloop y ccEnvC se les cambió el amortiguador mediante diálisis o filtración, utilizando como amortiguador final carbonato 50 mM pH 8. De esta forma se eliminaron todas las aminos reactivas que se encontraban en el amortiguador de almacenaje (regularmente se utilizó Tris). Además se utilizó un pH en el cual, todos los residuos lisinas tengan sus grupos  $\epsilon$  amina en un estado reactivo. La concentración de proteína se mantuvo entre 2 y 20  $\mu$ M y se agregó la sonda, diluída en el mismo amortiguador, a una razón molar 3:1 de sonda:proteína. La mezcla se incubó 30 minutos a temperatura ambiente, en oscuridad y luego se separó la sonda libre de la proteína mediante cromatografía de exclusión molecular. En columnas PD-10 (GE Healthcare). La cuantificación de la proteína marcada y su grado de marcaje (DOL) se midieron mediante absorbancia a 280 y 650 nm.

### **2.22 Marcaje de FtsE desnaturada con la sonda Cy.5 Mono-maleimida.**

La proteína FtsE, denaturada en amortiguador D (Tris-HCl 50 mM, urea 5 M, TCEP 5 mM), se diluyó hasta una concentración de 1 mg/mL. A esta preparación se le agregó 50  $\mu$ L de la sonda disuelta en DMF y se incubó la reacción durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación ocasional, luego se incubó toda la noche a 4 °C. La sonda libre y la proteína marcada se separaron mediante cromatografía de exclusión molecular PD-10 (GE Healthcare). La cuantificación de la proteína marcada y su DOL se midió mediante absorbancia a 280 y 650 nm utilizando los datos entregados por la compañía.

### **2.23 Espectroscopia de dicroísmo circular.**

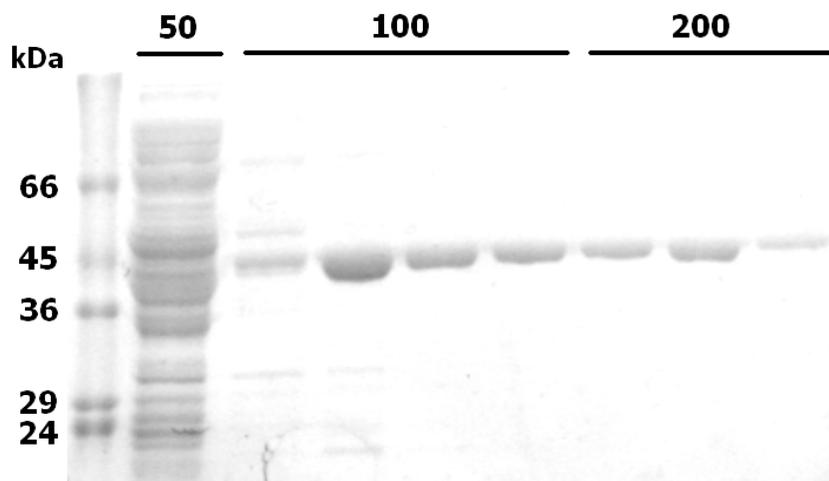
Los espectros de dicroísmo circular se registraron en un espectropolarímetro Jasco J-600. Las muestra se colocaron en una cubeta de 1 mm de paso óptico. Se hicieron cinco barridos por muestra en el UV-lejano (190 nm hasta 260 nm). Xloop y FtsA se incubaron a temperatura ambiente en amortiguador fosfato 100 mM pH 7,5 y FtsE se incubó en amortiguador acetato 50 mM pH 5,5, durante 10 minutos. A partir de los

espectros de dicroísmo circular se calculó la elipticidad residuo promedio usando el software del equipo.

### 3 Resultados.

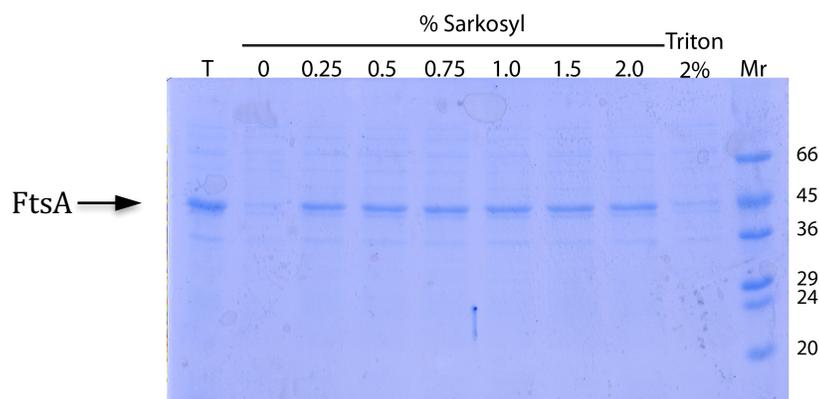
#### 3.1 Purificación de FtsA.

FtsA se purificó a partir de su expresión en *E. coli* BL21 con una marca de 6 histidinas en el extremo N-terminal. La sobre expresión de FtsA produjo una fracción soluble y otra fracción insoluble, como cuerpos de inclusión. Ambas fracciones se separaron mediante centrifugación y se sometieron a distintos pasos de purificación. El primer paso de purificación para la obtención de FtsA desde la fracción soluble, se hizo mediante una columna de afinidad a níquel. Como se observa en la figura 9, FtsA se retuvo en la resina y se observan dos fracciones que eluyen a 100 mM y a 200 mM imidazol. Por cada litro de cultivo se obtuvo ~1,5 mg de proteína con un 90 % de pureza observada mediante densitometría de geles teñidos con azul de coomasie (no mostrado).



**Figura 9. Gel SDS de la purificación de 6xHis-FtsA soluble mediante una columna de afinidad a níquel.** En cada carril se cargó 10 uL de cada una de las fracciones obtenidas en la cromatografía. Los valores indicados en la parte superior de la figura corresponden a la concentración de imidazol (mM) de la fracción eluída, mientras que los valores a la izquierda corresponden a los estándares de masa molecular.

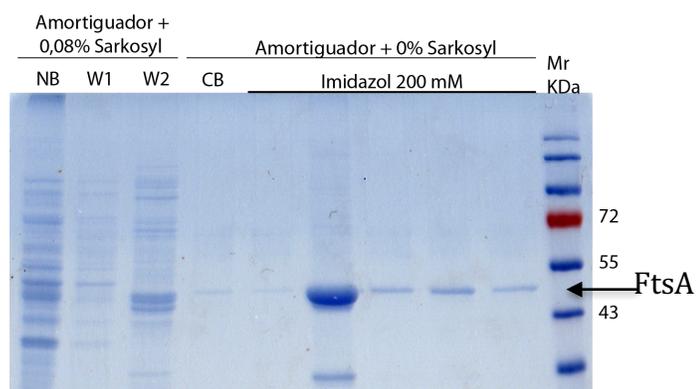
En una segunda etapa, FtsA se purificó a partir de cuerpos de inclusión mediante un procedimiento recientemente descrito (Tao *et al.*, 2010). Este método se basa en la solubilización de los cuerpos de inclusión mediante el detergente lauroil sarcosinato de sodio (sarkosyl), Este detergente se utiliza desde las primeras etapas de purificación o a partir de cuerpos de inclusión purificados. Así, en la etapa de lisis celular se deben probar diferentes concentraciones, pues la concentración de detergente a utilizar depende de la proteína que se purifica, por lo cual primero se determinó la concentración mínima que solubiliza el mayor porcentaje de proteína. Como se observa en la figura 10, al aumentar la concentración de sarkosyl no se produjo en la lisis un aumento en el porcentaje de FtsA soluble.



**Figura 10. Gel SDS de los sobrenadantes de la lisis por ultrasonido de bacterias que sobreexpresan FtsA, en presencia de sarkosyl.** El precipitado celular se suspendió en amortiguador TEN con detergente y se lisaron las bacterias mediante sonicación. (T) corresponde al lisado bacteriano, los otros carriles muestran las proteínas del sobrenadante luego de centrifugar el lisado celular en presencia de distintas concentraciones de detergente. Porcentaje de Sarkosyl y de Triton corresponde a la concentración final de detergente en la lisis bacteriana. Los valores de la derecha corresponden a la masa molecular de los estándares.

Al observar que el detergente no aumentaba el rendimiento de la proteína soluble se probó su efecto sobre cuerpos de inclusión purificados. Los cuerpos de inclusión (CI) se solubilizaron con el detergente durante 24 horas con agitación. Se observó que los

CI en 10% de detergente se disolvieron casi en su totalidad al obtener un 95% de FtsA soluble. Una vez disueltos los CI se diluyó la muestra 10 veces y luego se dializó para disminuir la concentración del detergente a 0,08% y de este modo utilizar la columna de afinidad a metales, pues este detergente interfiere con la unión.



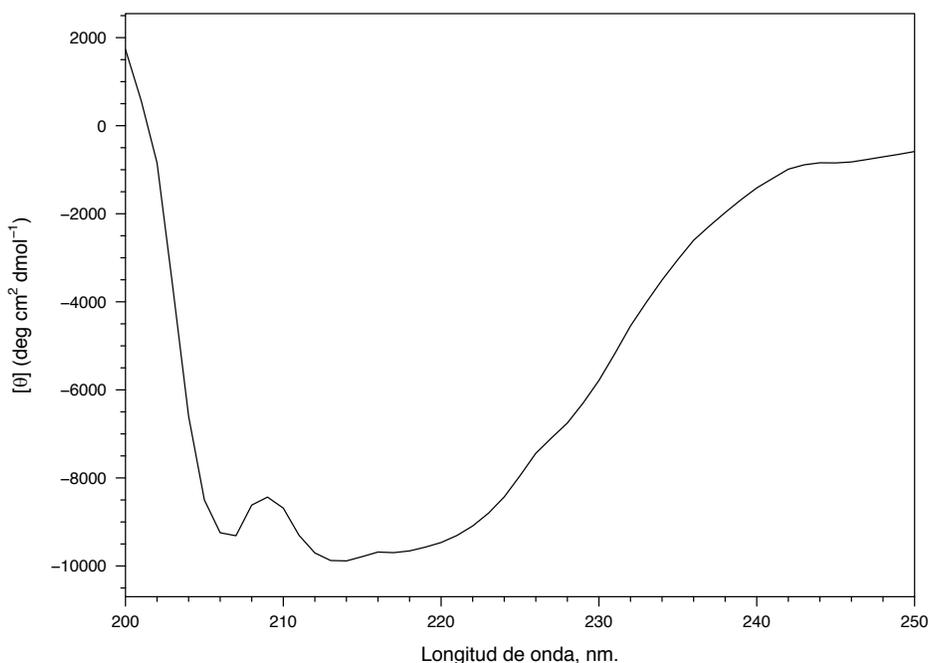
**Figura 11. Gel SDS de FtsA purificada por cromatografía de afinidad a níquel desde cuerpos de inclusión solubilizados en sarkosyl.** Los CI solubilizados con 10% sarkosyl, se purificaron por cromatografía de afinidad y tanto la carga como el lavado, con 30 mM imidazol, se hizo con 0,08% sarkosyl. La proteína retenida se lavó con 10 volúmenes de columna con amortiguador sin sarkosyl y se eluyó la proteína con 200 mM imidazol. **NB** corresponde a lo que eluyó en el frente, **W1** es la fracción del lavado sin imidazol en amortiguador con 0,08% sarkosyl. **W2** es la fracción del lavado con 30 mM imidazol en amortiguador con 0,08% sarkosyl. **CB** corresponde a la fracción del lavado con 10 volúmenes de columna para eliminar el detergente. Las siguientes cinco fracciones corresponden a la elución de FtsA en amortiguador sin sarkosyl y con 200 mM imidazol, cada fracción corresponde a un volumen de columna en orden secuencial.

Como se observa en la figura 11, la mayor parte de FtsA se retuvo en la resina en presencia de 0,08% de detergente. Para eliminar la unión inespecífica de proteínas contaminantes se lavó la columna con 5 volúmenes de imidazol 30 mM en presencia de detergente 0,08%. Posteriormente se lavó con 10 volúmenes de columna del mismo amortiguador sin detergente y luego se eluyó con 200 mM imidazol. Así, se

obtuvo una preparación de FtsA proveniente de cuerpos de inclusión con una mayor pureza, al eliminar proteínas de mayor masa molecular que podrían interferir en su funcionalidad como en la determinación de su actividad ATPásica.

### 3.1.1 Dicroísmo circular de FtsA purificada desde CI.

El contenido de estructura secundaria de FtsA purificada desde CI mediante la solubilización con sarkosyl se determinó a partir del espectro de dicroísmo circular en el UV lejano. En el espectro de dicroísmo circular (figura 12) se pueden observar un mínimo a 207, 213 y otro cercano a 222 nm. Las hélices alfa presentan mínimos característicos a 208 y 222 nm mientras que las hebras beta presentan un mínimo a 215 nm. Utilizando el servidor K2D3 (Louis-Jeune *et al.*, 2011) se determinó que este espectro corresponde a 29% alfa hélice y 18% hebra beta. Estos resultados conciben bien con los resultados obtenidos por Yim *et al.* (2000).



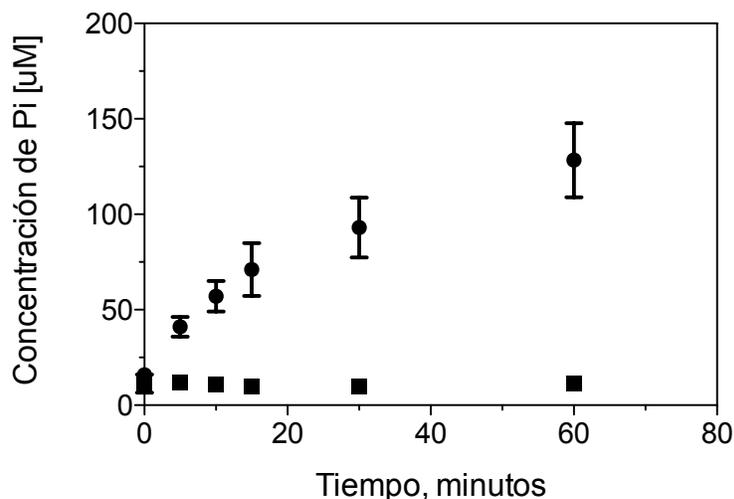
**Figura 12. Espectro de dicroísmo circular en el UV lejano de FtsA obtenida desde CI en presencia de sarkosyl.** FtsA purificada mediante la solubilización de los CI con sarkosyl se diluyó hasta una concentración de 60  $\mu\text{M}$  y se registró su espectro en un espectro polarímetro Jasco J-600.

### **3.2 Actividad ATPásica de las preparaciones de FtsA.**

En el laboratorio se ha determinado que la preparación de FtsA soluble posee actividad ATPásica sin embargo las proteínas contaminantes podrían ser las responsables de esta actividad si son enzimas que hidrolizan ATP (Gallardo, 2006; Weinstein, 2009). Por lo tanto este punto es de mucha importancia para entender el mecanismo de funcionamiento de FtsA. La preparación de FtsA proveniente desde cuerpos de inclusión muestra un alto estado de pureza y nos permitiría evaluar la actividad de hidrólisis de ATP de FtsA en ausencia de otras proteínas de mayor masa molecular. Por este motivo, se midió su actividad ATPásica, como se muestra en la figura 13. Los resultados muestran que esta preparación de FtsA soluble si posee actividad ATPásica, mientras que la preparación de FtsA proveniente desde cuerpos de inclusión no posee actividad ATPásica lo que nos sugiere que en esta última preparación la proteína ha perdido su actividad al formar los CI o que los contaminantes de la fracción soluble son responsables de la actividad.

### **3.3 Purificación de FtsE.**

FtsE es una proteína homóloga al dominio de unión de ATP de un transportador ABC. Esta proteína es esencial para la división bacteriana en un medio de cultivo con bajas concentraciones de sal. Su participación en la división bacteriana y su probable función se ha caracterizado mediante análisis genético, debido a que no se ha podido purificar. Diversos grupos han demostrado por mutaciones sitio dirigida la participación de ATP en su función, sin embargo, han fracasado en sus intentos de purificarla para caracterizar la unión del nucleótido *in vitro*. Describiremos el uso de diversas estrategias de purificación y sus resultados.



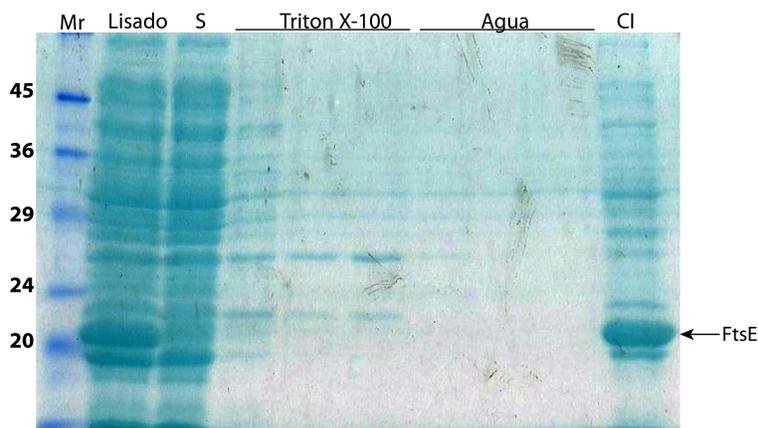
**Figura 13. Actividad ATPásica de FtsA soluble sin sarkosyl y solubilizada de CI con sarkosyl.** Curvas de progreso de FtsA purificada desde la fracción soluble en ausencia del detergente (●) y de FtsA solubilizada con sarkosyl desde cuerpos de inclusión (■). Para cada preparación, 2 µM de FtsA se incubó en amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 8,0, KCl 100 mM, EDTA 1 mM, DTT 2,5 mM y MgCl<sub>2</sub> 5 mM durante 5 minutos. La reacción se inició al agregar ATP 1 mM. 30 µL de muestra se utilizó para cada punto y se midió la concentración de Pi en la muestra mediante el método verde de malaquita. Valores promedio ± desviación estándar, n=3.

### 3.3.1 Purificación desde CI.

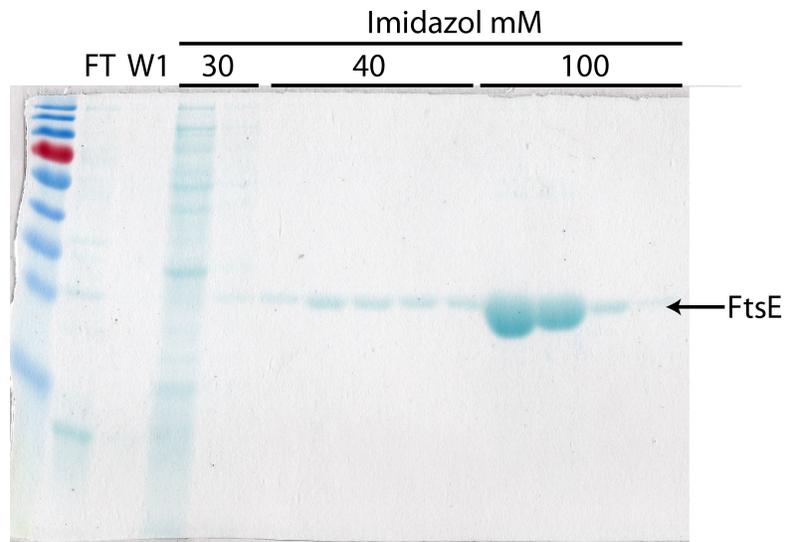
FtsE se purificó a partir de su expresión en *E. coli* BL21 con una marca de 6 histidinas en el amino terminal. La expresión de FtsE está controlada por el promotor T5, cuyo inductor es IPTG. Al sobreexpresar FtsE, la totalidad de esta formó CI, que se purificaron y solubilizaron en 8 M urea. La figura 14 muestra la purificación y solubilización de los CI de FtsE.

FtsE una vez solubilizada en urea se purificó en una columna de afinidad a níquel, manteniendo la concentración de urea a 8 M. La proteína se eluyó con un gradiente de imidazol y se determinó que FtsE eluye a 100 mM imidazol, mientras que la mayoría de los contaminantes eluyen a concentraciones menores, cercanas a 40 mM imidazol.

De esta forma, como se muestra en la figura 15, se obtuvo una preparación de FtsE de alta pureza y denaturada.



**Figura 14. Gel SDS de la purificación y solubilización de los cuerpos de inclusión de FtsE.** El precipitado obtenido al centrifugar a 10.000 g el lisado celular se lavó 3 veces con amortiguador de lisis que contiene 1% triton X-100 y 3 veces con agua, para eliminar el detergente restante. El precipitado final, enriquecido en CI, se solubilizó en urea 8 M durante toda la noche y luego se clarificó mediante centrifugación. **Lisado** corresponde al lisado celular total. **S** corresponde al sobrenadante de la centrifugación del lisado. **Tritón X-100** corresponde al sobrenadante del lavado con detergente, cada carril corresponde a un lavado con tritón X-100. **Agua** corresponde al sobrenadante de los lavados con agua, cada carril corresponde a un lavado con agua. **CI** corresponde a los cuerpos de inclusión solubilizados con urea 8 M y clarificados mediante centrifugación. La banda correspondiente a FtsE está señalada a la derecha y las masas moleculares de los estándares a la izquierda.

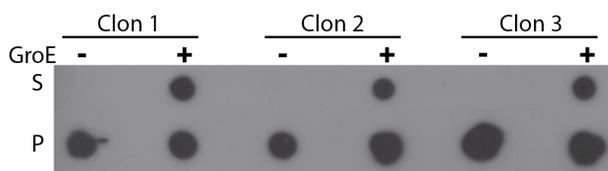


**Figura 15. Gel SDS-PAGE de la purificación de FtsE en condiciones denaturantes.** FtsE denaturada en 8 M urea se purificó mediante cromatografía de afinidad a níquel en condiciones denaturantes. Las fracciones obtenidas de la purificación se analizaron mediante electroforesis en gel denaturante. La columna se lavó con 5 volúmenes de amortiguador con 0, 30, 40 mM imidazol. FtsE se eluyó con 100 mM de imidazol. **FT** corresponde a la fracción que no se retuvo en la columna, **W1** corresponde al lavado sin imidazol, **30, 40, 100** corresponden a la concentración de imidazol de estas fracciones. La banda que corresponde a FtsE está señalada con una flecha.

### 3.3.2 Expresión y purificación de FtsE con chaperoninas.

La formación de los CI se explica debido a que FtsE ha sido clasificada dentro de un grupo de proteínas que requieren de forma obligatoria a la chaperonina GroE para plegarse (Fujiwara *et al.*, 2010). Es por esto que en este trabajo se llevó a cabo la co-expresión de FtsE y la chaperonina GroE. Para esto se transformó *E. coli* BL21 con dos vectores. Por un lado el vector que posee la secuencia de FtsE y por otro lado el vector que posee las secuencias de la chaperonina GroE (GroEL/S). Ambos vectores son compatibles y poseen sistemas de inducción distintos, así se controló de forma independiente la expresión de cada una de las proteínas. La expresión de FtsE está controlada por el promotor T5, mientras que la expresión de la chaperonina está bajo el promotor Ara. Se determinó que al inducir la expresión de la chaperonina, 30

minutos antes de inducir la expresión de FtsE, se aumentó el porcentaje de FtsE soluble (datos no mostrados). El efecto de la expresión de la chaperonina sobre el aumento de FtsE soluble se siguió mediante “inmunoblot”. Se estudiaron 3 clones co-transformados con ambos vectores, cada clon se creció y se separó en 2 matraces. En uno de ellos se indujo la expresión de la chaperonina 30 minutos antes de la inducción de la expresión de FtsE y en el otro no se indujo la expresión de la chaperonina. Como se observa en la figura 16, en todas las condiciones aparece FtsE en los CI, sin embargo, solo en las condiciones de co-expresión con la chaperonina se observó FtsE en la fracción soluble. Es importante remarcar que en ausencia de la chaperonina, el 100 % de FtsE se encuentra en los CI.

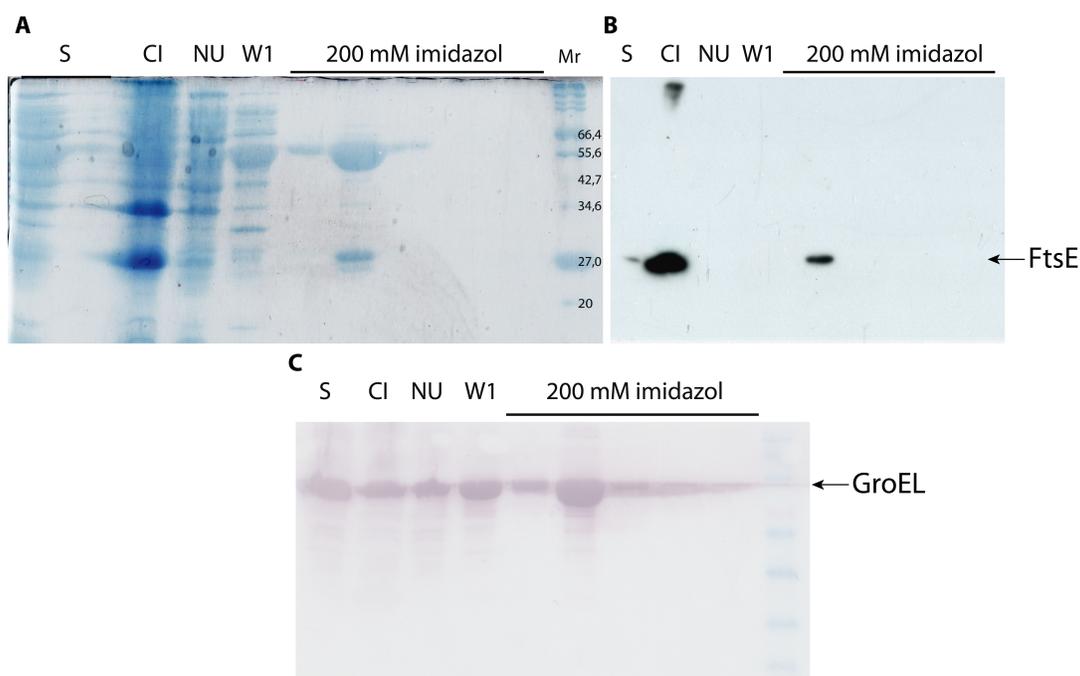


**Figura 16. Co -expresión de FtsE con la chaperonina GroE.** Inmuno “blot” de las fracciones solubles e insolubles obtenidas por centrifugación de un lisado de bacterias que co-expresan la chaperonina GroE y FtsE. **Clon 1, clon2 y clon 3** corresponden a 3 réplicas biológicas de la co-transformación. La inducción de la expresión de la chaperonina GroE se señala líneas con “+” y sin inducir con “-“. 50 uL del lisado se cargaron en una membrana de nitrocelulosa y se reveló con un anticuerpo anti-6His.

FtsE soluble, obtenida al co-expresar la chaperonina GroE, se purificó mediante cromatografía de afinidad a níquel. Como se observa en la figura 17, la totalidad de FtsE se retuvo en la columna y se eluyó a 200 mM imidazol. Sin embargo se observa un contaminante importante de masa molecular ~60 kDa. Mediante “Western Blot”, utilizando anticuerpos anti-His y anti-GroEL, se verificó que las bandas que migran a los ~27 kDa y ~60 kDa corresponden a FtsE y GroEL, respectivamente. La co-chaperonina GroES en cambio, no fue retenida en la resina.

La co-purificación de GroEL se explica por el reconocimiento de FtsE como sustrato y su unión a la superficie interna, hidrofóbica, del heptámero de GroEL. Para la

separación de estas proteínas se incubó la preparación en distintas condiciones. Como se muestra en la tabla 4, los ensayos se hicieron a pH 6,2 con ATP 1 mM, pH 8,0 con 0,5 y 5 mM ATP, y con agente cloruro de guanidinio 1 M. En ninguna de las condiciones ensayadas se separaron ambas proteínas, probablemente debido a una interacción de FtsE con la chaperonina, y al no estar presente la co-chaperonina GroES, el ciclo no se finalizó y FtsE no se liberó. Consecuente con esta hipótesis es el aumento de FtsE respecto a la chaperonina, en presencia de GdmCl, donde se liberaría por desestabilización del complejo formado por ambas proteínas.



**Figura 17. Gel SDS-PAGE y western blot de la purificación de FtsE soluble desde bacterias que co-expresan la chaperonina GroE.** Las fracciones obtenidas en la purificación de FtsE se cargaron en un gel desnaturalante y se tiñó con azul de Coomassie (A). Las muestras se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, la cual fue revelada con un anticuerpo anti-His (B) y con un anticuerpo anti-GroEL (C). S corresponde a la fracción soluble cargada en la columna, CI cuerpos de inclusión, NU fracción no retenida por la resina, W1 fracción del lavado sin imidazol y 200 mM imidazol corresponde a las fracciones eluidas a esta concentración de imidazol, cada carril corresponde a un volumen de columna. Mr estándares de masa molecular. En B y C, las flechas a la derecha corresponden a FtsE y GroEL, respectivamente.

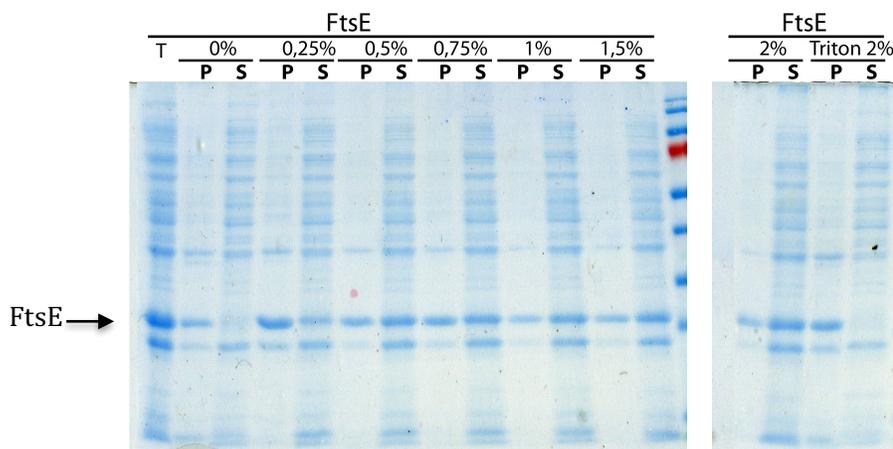
**Tabla 4. Separación de FtsE y GroEL mediante la incubación y repurificación en distintas condiciones en la columna de afinidad.**

<b>Condición lavado</b>	<b>lavado</b>		<b>elución</b>	
	GroEL	FtsE	GroEL	FtsE
Tris 50 mM pH 8,0 + 0,05 mM ATP	+++	+	+++	++
Tris 50 mM pH 8,0 + 5 mM ATP	+++	+	+++	+
Tris 50 mM pH 8,0 + GdmCl 1M	+++	-	++	++
Mes 50 mM pH 6,2 + 1 mM ATP	+++	-	+++	+

Los lavados se realizaron en 50 mM imidazol y la elución se realizó en 250 mM imidazol.

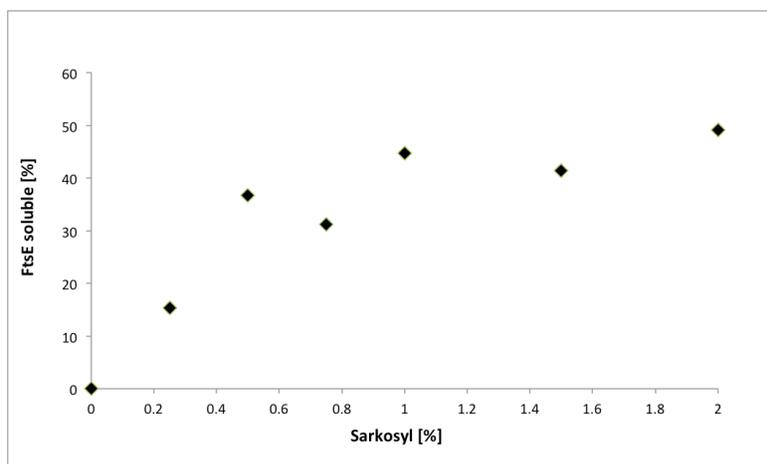
### **3.3.3 Purificación de FtsE en presencia de lauroil sarcosinato de sodio.**

Como ya se explicó para la purificación de FtsA el detergente Sarkosyl se puede utilizar de dos maneras, al lisar las bacterias o para disolver los CI. En el caso de FtsE se utilizó en la lisis celular, observándose un aumento en el rendimiento de FtsE soluble. De esta forma el detergente solubiliza FtsE en un estado semi plegado. Se probaron distintas concentraciones de detergente en el amortiguador de lisis, y mediante densitometría de bandas en un gel SDS teñido con azul de Coomassie, se determinó la mínima concentración de detergente necesaria para obtener un máximo de solubilidad de FtsE. Como se observa en la figura 18, el aumento de la concentración de Sarkosyl en el amortiguador generó un aumento en el porcentaje de FtsE soluble.



**Figura 18. Gel SDS-PAGE de las fracciones soluble y no soluble de la lisis en concentraciones crecientes de sarkosyl.** Las fracciones solubles e insolubles obtenidas al centrifugar el lisado celular en presencia del detergente sarkosyl se analizaron por electroforesis en un gel desnaturante. La fracción insoluble se suspendió en igual volumen que la fracción soluble. **T** corresponde al lisado previo a la centrifugación, **P** corresponde al precipitado y **S** a la fracción soluble. Los porcentajes corresponden a la concentración de sarkosyl en el amortiguador de lisis. La banda de FtsE se indica con una flecha en el borde izquierdo.

Al graficar el porcentaje de FtsE soluble (medido por densitometría) en función de la concentración de detergente (figura 19) se observó un incremento de FtsE soluble hasta un máximo de ~45%. Con esto se concluyó que la concentración mínima del detergente para obtener un máximo de FtsE soluble fue 1 %.



**Figura 19. Efecto de sarkosyl sobre la solubilidad de FtsE en la lisis bacteriana.**

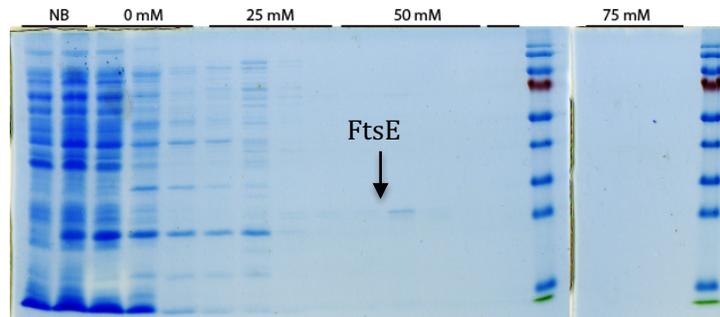
Porcentaje de solubilización de FtsE al lisar las bacterias en presencia de sarkosyl. Los porcentajes se calcularon mediante densitometría de la banda de FtsE en la fracción soluble y en el total del gel que se muestra en la figura 18.

FtsE solubilizada por este método se purificó mediante cromatografía de afinidad a níquel en presencia de detergente. Como se observa en la figura 20, FtsE en presencia de 0,1% sarkosyl se retuvo en la columna y eluyó en la fracción de 50 mM imidazol. Se obtuvo una muestra con alta pureza pero con bajo rendimiento.

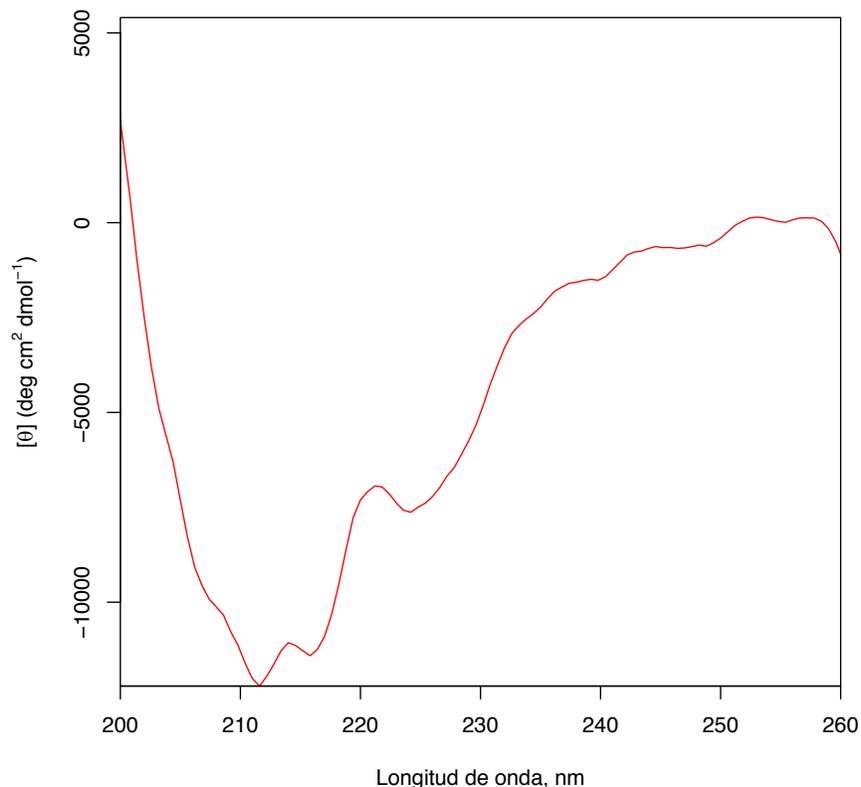
### 3.3.4 Dicroísmo circular de FtsE en presencia de sarkosyl.

FtsE purificada en presencia de sarkosyl se analizó mediante dicroísmo circular en el UV lejano para determinar su contenido de estructura secundaria.

Como se observa en la figura 21, el espectro de dicroísmo circular de FtsE presenta un mínimo a 224 nm, 216 nm y 212 nm. El mínimo a 224 nm es característico de la presencia de hélices alfa, mientras que el mínimo a 215 es característico de hebras beta. De esta forma se determinó que FtsE posee estructura secundaria, al analizar los datos mediante el servidor K2D3 (Louis-Jeune *et al.*, 2011) se obtiene un 37% de hélice alfa y un 26% de hebra beta, pero de ninguna manera se puede asegurar que este es el contenido de la estructura nativa y es FtsE funcional, por esta razón, probar su funcionalidad, como la unión de nucleótido a la proteína, que se mostrará más adelante.



**Figura 20. Gel SDS-PAGE de la purificación de FtsE soluble a partir de la lisis en presencia de sarkosyl.** Las fracciones de la purificación de FtsE soluble por afinidad a níquel de la muestra proveniente de la lisis en presencia de sarkosyl, se cargaron en un gel desnaturalante y tiñeron con azul de Coomasie. **NB** corresponde a la fracción no retenida por la resina, **0 mM**, **25 mM**, **50 mM** y **75 mM** corresponde a la concentración de imidazol en el amortiguador en las respectivas fracciones. Para eluir con imidazol se pasaron 5 volúmenes de columna para cada concentración.



**Figura 21. Espectro de dicroísmo circular en el UV lejano de FtsE soluble en presencia de sarkosyl.** FtsE soluble purificada mediante el método de lisis en presencia de sarkosyl se diluyó hasta una concentración de 50  $\mu\text{M}$  y se registró su espectro en un espectro polarímetro Jasco J-600.

### 3.3.5 Replegamiento desde urea 8 M.

El replegamiento de FtsE purificada desde cuerpos de inclusión se hizo mediante dilución rápida o diálisis al equilibrio seguido de ultracentrifugación. De esta forma se separaron agregados formados y proteínas solubles. Mediante un gel de poliacrilamida en condiciones denaturantes y tinción con azul de coomasie, se cuantificó por densitometría la cantidad de FtsE soluble y agregada.

El replegamiento se efectuó en diferentes condiciones, incluyendo una serie de aditivos generalmente utilizados (Dechavanne *et al.*, 2011; Yamaguchi *et al.*, 2013).

Como se muestra en la tabla 5, FtsE se mantuvo soluble con un pH cercano a 5 en amortiguador acetato.

**Tabla 5. Replegamiento de FtsE desde 8M urea.**

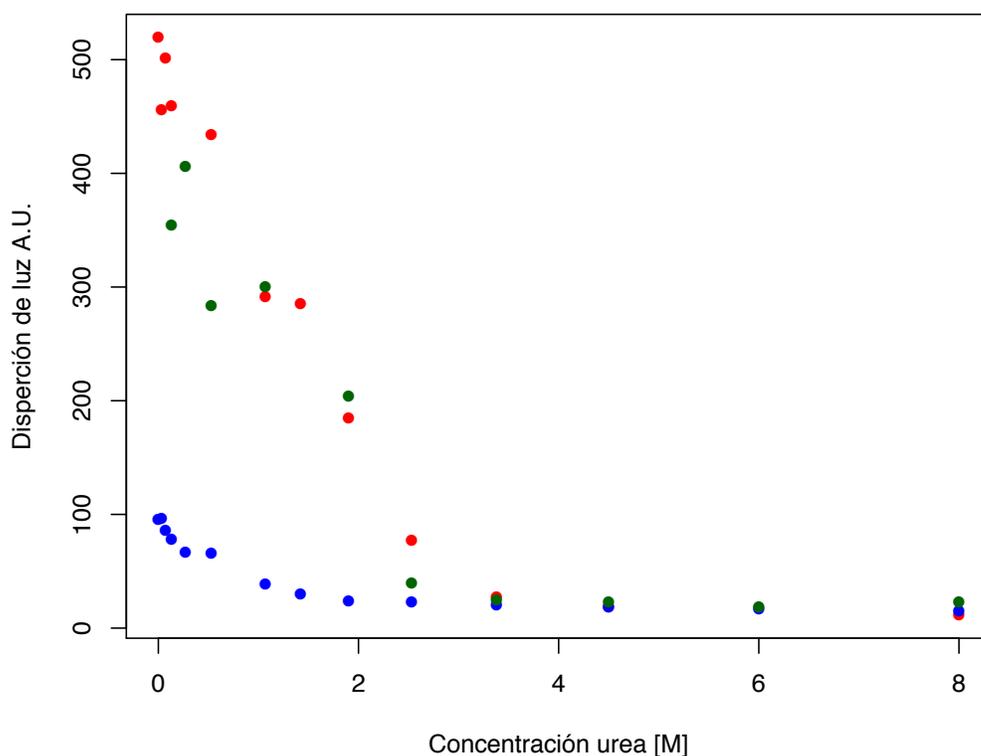
Condición <sup>a</sup>	[FtsE]final mg/mL	% Soluble <sup>b</sup>
ATP 10 mM	0,2	< 5%
Tween-20 0,1%	0,2	< 10%
Glicina 500 mM	0,2	< 10%
ATP 10 mM/Mg <sup>+2</sup> 5mM	0,2	< 5%
L-arginina 400 mM	0,2	< 5%
TFE 40%	0,2	< 5%
TRIS 500 mM	0,2	< 5%
Sin Aditivo	0,3 – 0.075	< 5%
Tween-20 0,1%	0,3 – 0.075	< 5%
“Buffer” TRIS pH 8,0	0,35	< 5%
“Buffer” fosfato pH 7,0*	0,35	< 5%
“Buffer” fosfato pH 6,0*	0,35	< 5%
“Buffer” acetato pH 5,0*	0,35	~ 60%
“Buffer” acetato pH 5,4*	0,35	~ 60%

El stock de FtsE solubilizado en urea se replegó por dilución rápida en las condiciones indicadas en la tabla. Para los casos que no se indique el amortiguador ni el pH, estos corresponden a Tris-HCl 50 mM pH 8. **(b)** El % soluble corresponde a la densitometría de la banda de la fracción soluble normalizada por la densitometría de la banda de la muestra previo el fraccionamiento. \* La concentración del amortiguador es de 50 mM en estos casos.

### 3.3.6 Replegamiento de FtsE seguido por dispersión de luz.

La dispersión de luz es una medición directa que nos permite monitorear la formación de agregados en una muestra. Así, mediante esta técnica, se siguió el replegamiento de FtsE hecho por dilución rápida. Las condiciones utilizadas fueron amortiguador Tris pH 7,5; amortiguador Tris pH 7,5 más detergente colato y amortiguador acetato pH

5,0. Como se observa en la figura 22, la dispersión de luz en amortiguador Tris pH 7,5 con o sin detergente, aumenta de forma exponencial al disminuir la concentración de urea bajo 3 M. En la condición de replegamiento en amortiguador acetato pH 5,0 la dispersión se mantiene baja hasta aproximadamente 2M urea y luego aumenta en forma exponencial. Si se compara la dispersión de luz en ausencia de urea, en las tres condiciones, se observa que a pH 5,0 es más baja que a pH 7,5. Esto se debe a que no ocurre la formación de agregados o que los agregados formados son de un tamaño considerablemente menor.



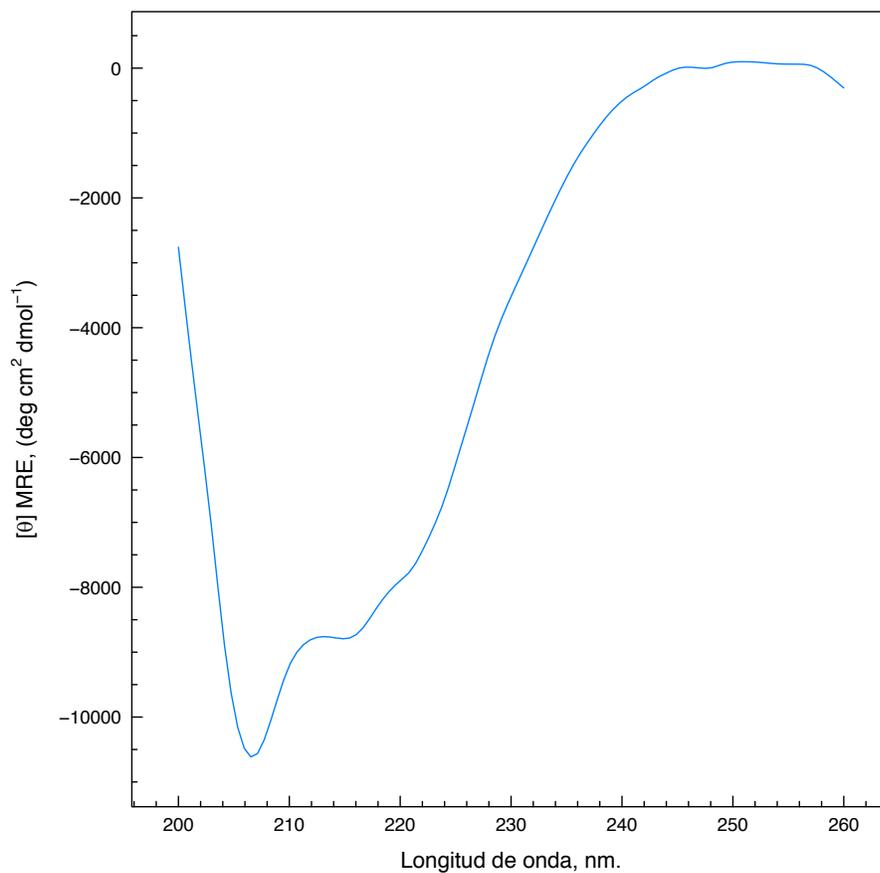
**Figura 22. Replegamiento de FtsE en distintas condiciones seguido por dispersión de luz.** Se siguió la dispersión de luz a 350 nm del replegamiento de FtsE a distintas concentraciones de urea mediante dilución rápida. Círculos rojos y verdes corresponden a amortiguador Tris-HCl pH 7,5 con colato 0,4 % o sin colato, respectivamente. Círculos azules corresponden a amortiguador acetato pH 5,0.

### **3.3.7 Dicroísmo circular de FtsE replegada en amortiguador acetato pH 5.**

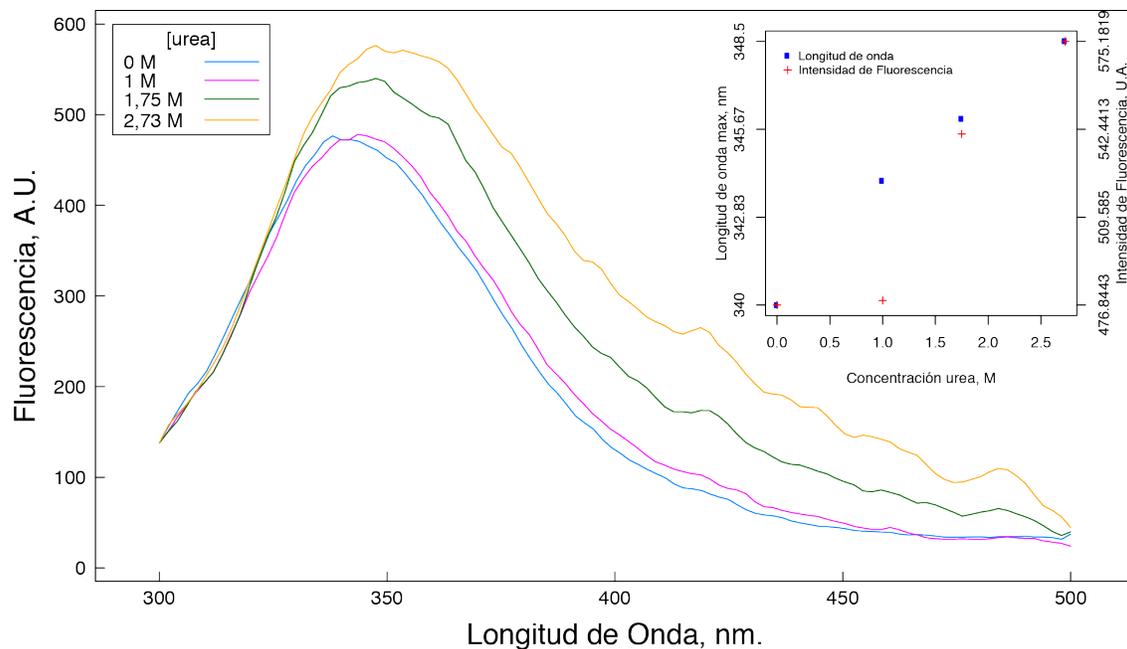
El contenido de estructura secundaria de FtsE replegada en amortiguador acetato se determinó a partir del espectro de dicroísmo circular en el UV lejano. En el espectro de dicroísmo circular (figura 23) se observan dos mínimos a 208 y a 222 característicos de alfa hélice y un mínimo a 215 característico de sabanas beta. Esta información confirma la presencia de estructuras hélice alfa y sabana beta en la proteína replegada. La forma de este espectro, en donde el mínimo a 208 nm es bastante más pronunciado al mínimo a 222 nm es característico de hélices  $3_{10}$  (Andersen *et al.*, 1996). Al analizar los datos de dicroísmo circular en el servidor K2D3 (Louis-Jeune *et al.*, 2011), se obtiene una composición de 13,54 % hélice  $\alpha$  y 27,35 hebra  $\beta$ .

### **3.3.8 Replegamiento de FtsE seguido por fluorescencia intrínseca.**

La proteína FtsE posee 1 triptófano, que se puede caracterizar por fluorescencia. Como se observa en la figura 24, las propiedades del espectro de fluorescencia del triptófano se alteraron a distintas concentraciones de urea. Se observan dos efectos al disminuir la concentración de urea, lo primero es un cambio en el máximo de fluorescencia, el cuál se desplaza hacia el azul 8 nm, y segundo se observa que la fluorescencia disminuye en un 26% (figura 24 inserto). Ambos parámetros se relacionan con el ambiente en el cual se encuentra el triptófano. El desplazamiento del máximo hacia el azul indica una disminución en la polaridad del ambiente del triptófano, mientras que la disminución de la fluorescencia indica un apagamiento de esta, posiblemente por la cercanía de un residuo cargado, lo cual es un reflejo de un cambio estructural de la proteína.



**Figura 23. Espectro de dicroísmo circular en el UV lejano de FtSE replegada en amortiguador acetato pH 5.** FtSE 50  $\mu\text{M}$  se replegó por diálisis en amortiguador acetato pH 5. La muestra se ultracentrifugó y diluyó hasta una concentración de 20  $\mu\text{M}$  en el mismo amortiguador. Su espectro de dicroísmo circular se obtuvo en un espectropolarímetro Jasco J-600.



**Figura 24. Espectros de fluorescencia intrínseca de FtsE replegada por dilución rápida a distintas concentraciones de urea.** La fluorescencia intrínseca de FtsE se medió excitando a 295 nm (exclusivamente triptofanos) y se analizaron los espectros entre 300 y 500 nm. Cada color corresponde a una concentración final de urea. En el inserto se muestra la diferencia del máximo de emisión y de la intensidad de fluorescencia respecto a la concentración de urea.

### 3.4 Caracterización de las interacciones de FtsE con ATP y con FtsZ.

FtsE corresponde al dominio de unión de ATP del sistema ABC conformado por FtsE y FtsX que está involucrado en el divisoma bacteriano. Su estudio *in-vitro* ha estado limitado por el problema de solubilidad de esta proteína, como se mencionó anteriormente. En este trabajo se encontró una condición experimental que nos permite tener a FtsE en solución, la cual además presenta estructura secundaria. Mediante la generación de mutantes puntuales de FtsE en los sitios de unión y/o hidrólisis de ATP se ha relacionado esta actividad con la correcta división bacteriana, sugiriendo que FtsE une ATP. La caracterización de la unión *in vitro* de ATP a FtsE se hizo mediante termoforesis en micro escala (MST).

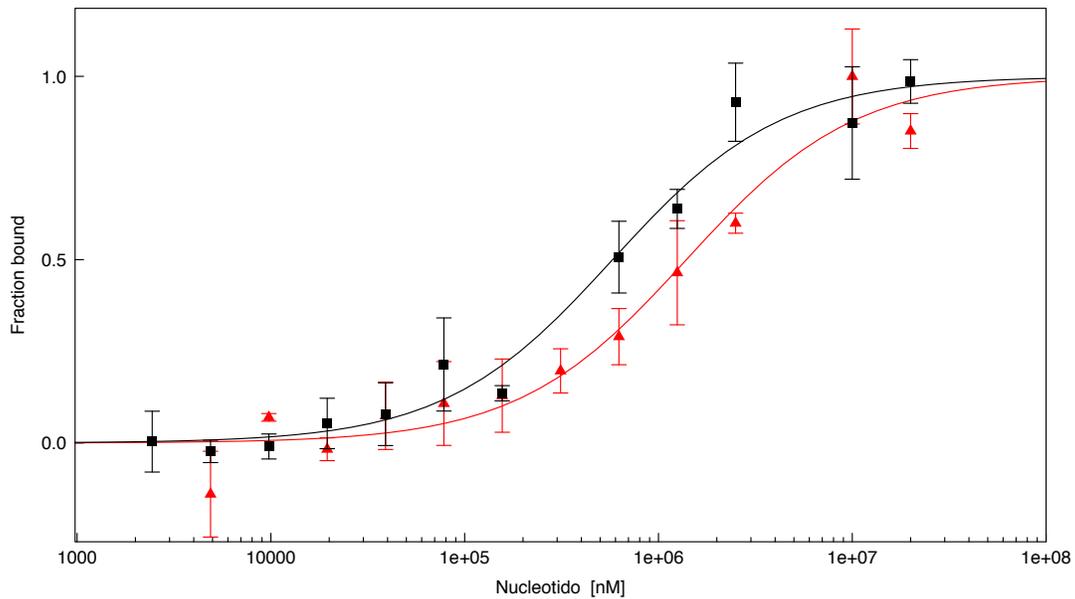
Como se mencionó anteriormente, el reclutamiento de FtsE al divisoma depende de FtsZ principalmente, existe evidencia de una interacción directa entre FtsZ y FtsE, la cual se determinó mediante co-purificación (Corbin *et al.*, 2007). La caracterización de la unión de FtsE y FtsZ se hizo mediante MST.

#### **3.4.1 Interacción de ATP con FtsE determinada por termoforesis en micro escala.**

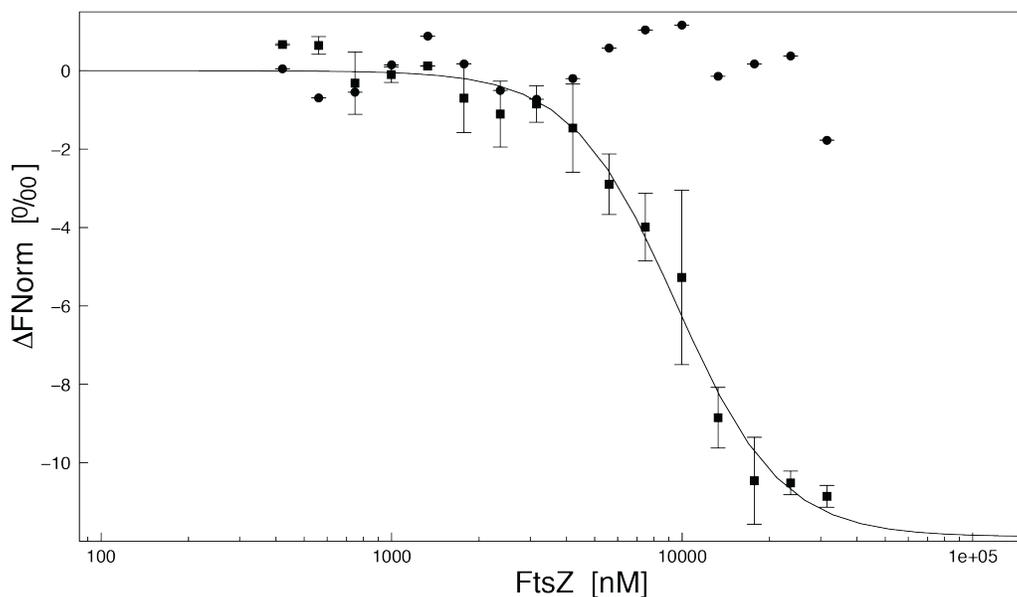
La caracterización de esta interacción se hizo mediante termoforesis en micro escala y con este propósito se marcó FtsE con la sonda fluorescente Cy.5 (GE healthcare). La concentración de FtsE marcada se mantuvo constante a 80 nM y se tituló con una dilución seriada 1:1 de ATP o ADP. Como se observa en la figura 25, FtsE se unió a ATP y a ADP con constantes de disociación  $579,6 \pm 102 \mu\text{M}$  y  $1394 \pm 310 \mu\text{M}$ , respectivamente.

#### **3.4.2 Interacción de FtsE con FtsZ determinada por termoforesis en micro escala.**

La interacción de FtsE y FtsZ se caracterizó mediante termoforesis en micro escala, con este propósito se marcó en la única cisteína que posee la proteína con la sonda fluorescente Cy5 (GE healthcare). La concentración de FtsE marcada se mantuvo constante a 100 nM y se tituló con FtsZ utilizando una dilución seriada de 1:3. De esta forma se logró tener varios puntos distribuidos a lo largo de toda la curva (figura 26). Los datos se ajustaron a la ecuación de Hill obteniéndose una constante de semisaturación ( $EC_{0,5}$ ) de  $9,1 \pm 1,1 \mu\text{M}$  con un coeficiente de Hill de 2,2. El valor del coeficiente de Hill nos indica que existe cooperatividad en la unión de FtsZ a FtsE, probablemente debido a la oligomerización de FtsZ que uniría mas favorablemente FtsE. Debido a que se ha descrito previamente que FtsZ es capaz de unir algunas sondas fluorescentes (Nova *et al.*, 2007), se realizó como control la interacción de un DNA marcado con Cy.5, también a 100 nM y en el mismo rango de concentraciones de FtsZ.



**Figura 25. Isotherma de unión de FtsE marcada con una sonda fluorescente con ATP o ADP.** La proteína FtsE marcada con Cy.5 se mantuvo constante a 80 nM mientras se diluyó en forma seriada el nucleótido. Se esperó hasta alcanzar el equilibrio y se midió la interacción por termoforesis. Se graficó la fluorescencia relativa normalizada versus la concentración de Xloop. Cada medida se realizó 3 veces y se graficó el promedio  $\pm$  la desviación estándar. (■) corresponde a los datos de unión con ATP y la línea negra al ajuste de los datos, (▲) corresponde a los datos de unión con ADP y la línea roja al ajuste de los datos.



**Figura 26. Isotherma de unión de FtsZ a FtsE marcada con la sonda fluorescente Cy.5.** La proteína FtsE marcada con Cy.5 (■) y el DNA marcado con Cy.5 (●) se mantuvieron constante a 100 nM y 80 nM, respectivamente, mientras se diluyó en forma seriada FtsZ. Se esperó hasta alcanzar el equilibrio y se midió la interacción por termoforesis. Se graficó la fluorescencia relativa normalizada versus la concentración de FtsZ. Cada medida se realizó 3 veces y se graficó el promedio  $\pm$  la desviación estándar.

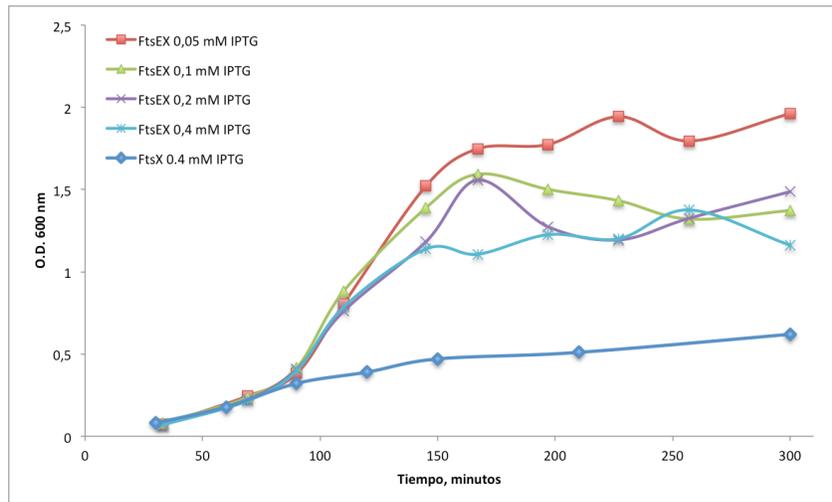
### 3.5 Purificación de FtsX.

La proteína FtsX corresponde estructuralmente al dominio transmembrana del transportador ABC formado por FtsEX. Experimentalmente se ha determinado que posee 4 hélices transmembrana y un dominio periplasmático entre las hélices 1 y 2 (Arends *et al.*, 2009). Esta topología no es la clásica de los transportadores ABC, sin embargo se ha observado en algunos transportadores ABC. En todos los casos, el dominio periplasmático característico cumple un papel fundamental en la actividad del complejo (Ito *et al.*, 2006). La caracterización genética de la división bacteriana le ha otorgado a FtsX un rol fundamental en el andamiaje de las proteínas tardías y en la separación de las dos células hijas mediante el control de la actividad proteolítica de algunas amidasas.

### 3.5.1 Toxicidad de FtsX inducida por su sobreexpresión.

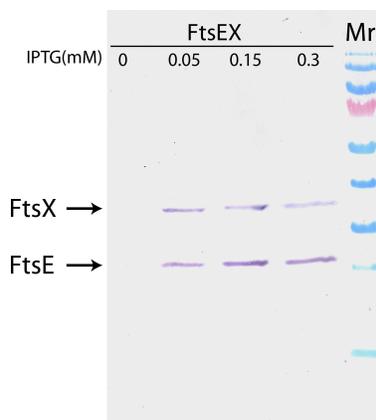
La expresión de FtsX en nuestro sistema de expresión está controlada por el promotor T5, el cual es inducible por IPTG.

Como se observa en la figura 27, la sobreexpresión de FtsX es tóxica para *E. coli*, pues disminuye notoriamente su crecimiento desde aproximadamente los 60 minutos posteriores a la inducción. Diversos autores han sugerido que su toxicidad disminuye al co-expresarse con su pareja FtsE, resultados que confirmamos de acuerdo a lo que se observa en la figura 27. La curva de crecimiento de *E. coli* muestra que al inducir la expresión de FtsX con 0,4 mM IPTG se produce un leve aumento de la D.O., con un delta de  $\sim 0,1$  unidades de absorbancia, mientras que en la curva de crecimiento de *E. coli* al inducirse la expresión de FtsEX con 0,4 mM IPTG muestra un crecimiento mayor, con un delta de  $\sim 0,5$  unidades de absorbancia. También se observó una correlación inversa entre la concentración de inductor y la D.O. máxima alcanzada.



**Figura 27. Curvas de crecimiento de *E. coli* al sobreexpresar FtsX o FtsEX.** Los cultivos se crecieron hasta una D.O. de 0,4 y luego se agregó IPTG a distintas concentraciones finales. La D.O. se siguió durante 5 horas. La línea azul corresponde a la sobreexpresión de FtsX con 0,4 mM IPTG. Las líneas roja, verde, violeta y celeste corresponden a la inducción de FtsEX con 0,05; 0,1; 0,2 y 0,4 mM IPTG, respectivamente.

Como se observa en la figura 28 tanto FtsE como FtsX se expresan con todas las concentraciones de inductor utilizadas y no así en la condición sin inductor. La intensidad de la banda correspondiente a FtsX disminuye al ir aumentando la concentración de inductor y no así con FtsE.



**Figura 28. Western Blot de las proteínas totales al sobreexpresar FtsE y FtsX en *E. coli* con diferentes concentraciones de IPTG.** Inmuno detección de las proteínas FtsE y FtsX presentes en el lisado celular de las sobreexpresión a distintas concentraciones del inductor. Los cultivos inducidos durante 3 horas se lisaron y cargaron en un gel SDS denaturante, se transfirieron las proteínas a una membrana de nitro celulosa y se reveló utilizando un anticuerpo anti-6His.

Debido al efecto negativo que se observó en las curvas de crecimiento y el bajo nivel de expresión de FtsX al inducir la expresión a distintas concentraciones de inductor, se probó el método de autoinducción para mejorar la expresión de FtsEX. Este método se basa en la utilización diferencial de tres fuentes de carbono por *E. coli*. Las tres fuentes de carbono que se utilizan son glucosa, lactosa y glicerol. Las bacterias primero consumen la glucosa que les permite llegar a D.O. altas (~40 unidades de absorbancia) con una represión del promotor T5. Posteriormente comienzan a utilizar la lactosa que les permite seguir creciendo, pero además genera el inductor natural del operador lac, induciéndose la expresión de las proteínas. Y finalmente utilizan glicerol para continuar creciendo. Este método permite obtener una inducción baja

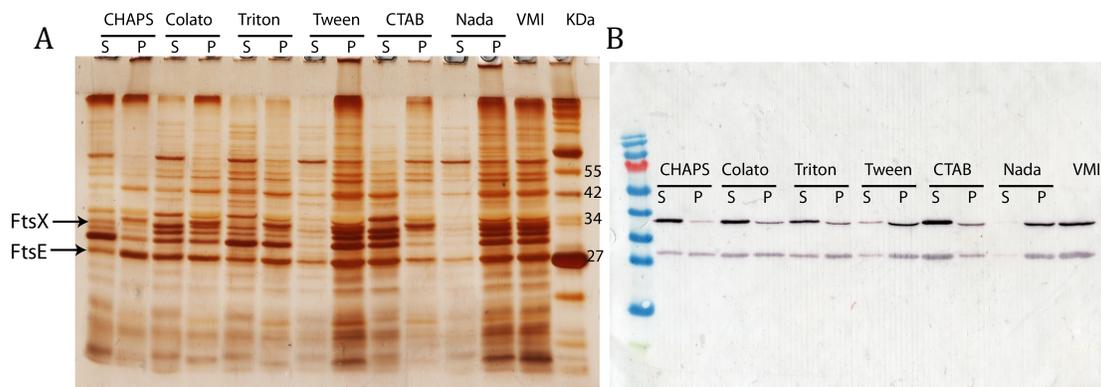
(asemejando la condición de baja concentración de inductor) pero en un gran número de bacterias, lo que lo hace un método adecuado para la mejor expresión de proteínas tóxicas como es FtsX. Mediante este método se aumentó la cantidad de proteína total 5 veces (datos no mostrados).

### **3.5.2 Solubilización de FtsX.**

Las proteínas de membrana, al estar inmersas en esta, requieren un paso previo para su purificación, el cual consiste en la solubilización de estas en micelas de detergente. Este tratamiento desplaza los lípidos y rompe las membranas, obteniéndose las proteínas en solución, rodeadas de detergente. Existe una diversidad de detergentes que son utilizados para estos fines, sin embargo no existe ninguna regla general para seleccionar *a priori* el detergente que aumenta la solubilidad de la proteína de interés, por lo que hay que probar distintos detergentes hasta seleccionar los mas apropiados. Por esto se probó una batería de detergentes: CHAPS, colato, triton X-100, tween20 y CTAB, a una concentración final de 10 veces la concentración micelar crítica (CMC) del detergente.

Como se observa en la figura 29, los detergentes CTAB, CHAPS y colato solubilizaron eficientemente tanto a FtsX como a FtsE. La efectividad de Tritón fue menor y Tween-20 prácticamente no tuvo efecto.

El detergente CTAB es de la familia de los detergentes catiónicos, un detergente duro y desnaturante. CHAPS es un detergente “switer iónico”, ampliamente utilizado para la solubilización de proteínas. El colato es un detergente aniónico derivado del colesterol. Tween-20 y triton X-100 son detergentes no iónicos que también han sido utilizados en la solubilización de proteínas de membrana, sin embargo la solubilización de FtsE y FtsX con Tween-20 no fue eficiente. Con estos resultados se continuó el trabajo tanto con CHAPS y colato. Además se probó el detergente n-dodecil- $\beta$ -d-maltosido (DDM) que es uno de los más utilizados en la solubilización y estudios de proteínas de membrana.

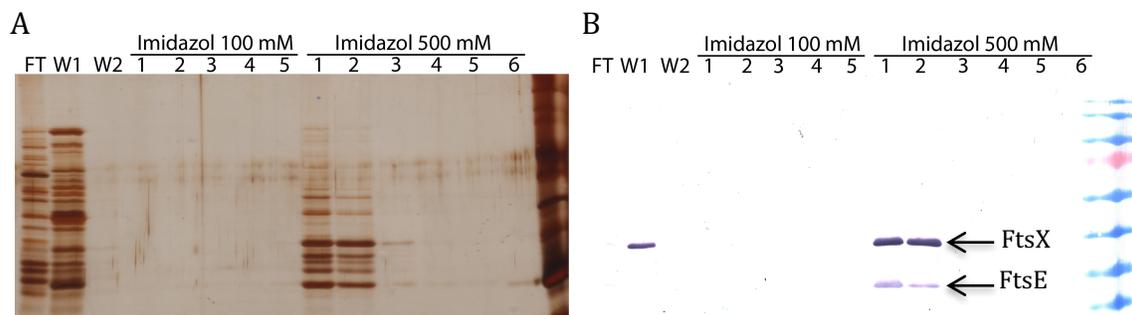


**Figura 29. Gel SDS-PAGE y western blot de la solubilización de FtsE y FtsX con diferentes detergentes.** Las fracciones de vesículas obtenidas desde las bacterias se incubaron con cinco detergentes diferentes (indicados en la figura) durante 16 horas. Posteriormente se ultracentrifugó por 1 hora y se analizó mediante geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalantes las proteínas totales presentes en la fracción soluble y el precipitado, teñido con nitrato de plata (A). Se hizo una inmunodetección con un anticuerpo anti-His para la detección de FtsE y FtsX en cada una de las condiciones (B). **S** corresponde a la fracción soluble y **P** al precipitado. **VMI** corresponde a las vesículas previo a la solubilización.

### 3.5.3 Purificación por afinidad a una columna de níquel.

FtsE y FtsX se purificaron mediante cromatografía de afinidad a níquel en los tres detergentes seleccionados anteriormente (CHAPS, colato y DDM). Se utilizó amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 200 mM adicionado más cada uno de los detergentes .

El detergente colato solubilizó en un alto porcentaje nuestras proteínas. Como se observa en la figura 30, FtsE y FtsX se retuvieron bien en la resina. Ambas proteínas eluyeron con 500 mM imidazol, sin embargo se observan varias contaminantes que co-eluyen, obteniéndose una baja pureza de FtsE y FtsX en esta preparación.

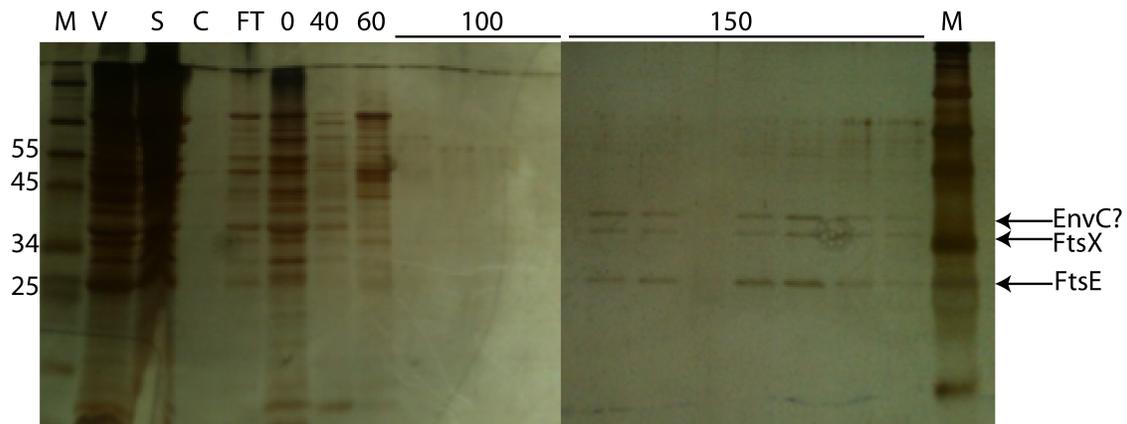


**Figura 30. Gel SDS-PAGE y western blot de la purificación de FtsE y FtsX solubilizadas en detergente colato de sodio.** La fracción soluble obtenida, al incubarse con colato la fracción de membranas del lisado celular, se cargó en una columna de afinidad a níquel y se eluyó con un gradiente discontinuo de imidazol. **FT** corresponde a lo que no se retuvo en la resina, **W1** al lavado con 25 mM imidazol, **W2** al lavado con 70 mM imidazol. Para las concentraciones de **100** y **500** mM imidazol se recolectaron 5 y 6 fracciones, respectivamente. **A**, muestra la tinción con plata y **B** el inmuno revelado con un anticuerpo anti-His.

La purificación en presencia del detergente CHAPS, con el cual se logra una buena solubilización de ambas proteínas es problemática. Al ser un detergente cargado, este interfiere en la unión de la cola de histidinas y el níquel de la resina, disminuyendo la retención de las proteínas en la columna. Se intentó mejorar esto mediante la dilución de la concentración de detergente, previo a la inyección de la muestra, sin embargo la eficiencia de retención no mejoró considerablemente. Y prácticamente toda la proteína eluyó en los primeros lavados (datos no mostrados).

La purificación de FtsE y FtsX en detergente DDM se hizo siguiendo la misma estrategia. La solubilización y la eficiencia de retención fueron altas y se logró obtener ambas proteínas con un contaminante mayoritario (figura 31).

Mediante un análisis de migración relativa de las proteínas se obtuvieron las siguientes masas moleculares para las tres bandas obtenidas en la elución, ~24 KDa, ~35 KDa y ~38 KDa, como se indica en la figura 31. Las dos primeras bandas corresponden a FtsE y FtsX (datos corroborados por espectrometría de masas), respectivamente, mientras que el contaminante de ~38 KDa tiene una masa muy similar a la proteína EnvC, la cual se sabe que interactúa con FtsX.



**Figura 31. Gel SDS-PAGE de la purificación de FtsE y FtsX solubilizadas en detergente DDM.** Las proteínas solubilizadas con el detergente DDM se purificaron mediante una cromatografía de afinidad a níquel utilizando un gradiente discontinuo de imidazol. Cada fracción se cargó en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturantes y se tiñó con plata. **M** corresponde a los marcadores de masa molecular, **V** corresponde a la fracción de membranas del lisado bacteriano, **S** corresponde a la fracción solubilizada, **C** y **FT** a las fracción que no se retuvo en la resina. **0**, **40**, **60** corresponden a los lavados con esas concentraciones de imidazol. **100** y **200** corresponden a las fracciones donde se eluyó las proteínas con esas concentraciones de imidazol.

### 3.6 Dominio periplasmático de FtsX.

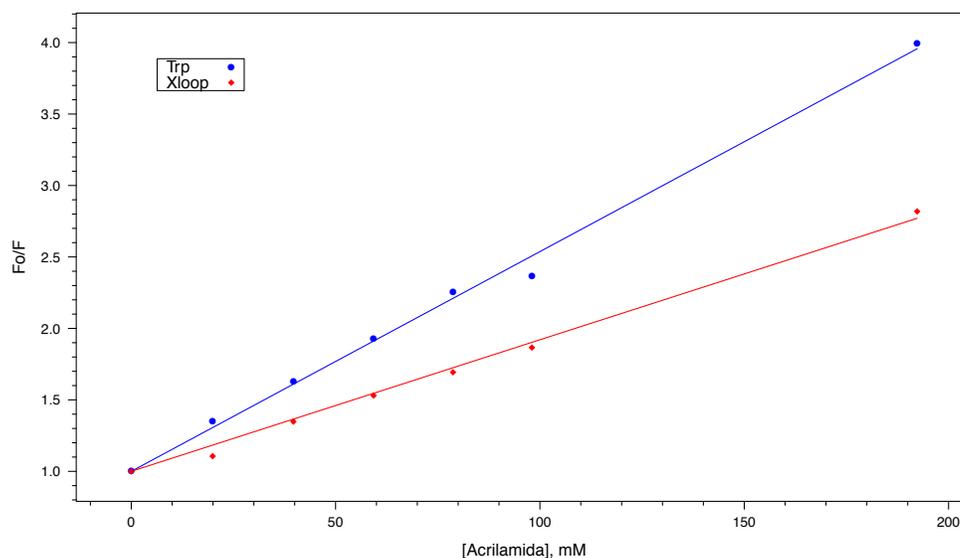
Para el estudio de las interacciones de FtsX y las proteínas tardías del divisoma, se trabajó con el dominio periplasmático de esta (Xloop), el cual se clonó y expresó como se describe en Materiales y Métodos. La probable estructura terciaria de este dominio se caracterizó por el apagamiento de la fluorescencia intrínseca de sus dos triptófanos y el contenido de estructura secundaria mediante dicroísmo circular.

### **3.6.1 Apagamiento de la fluorescencia intrínseca del dominio periplasmático (Xloop) de FtsX.**

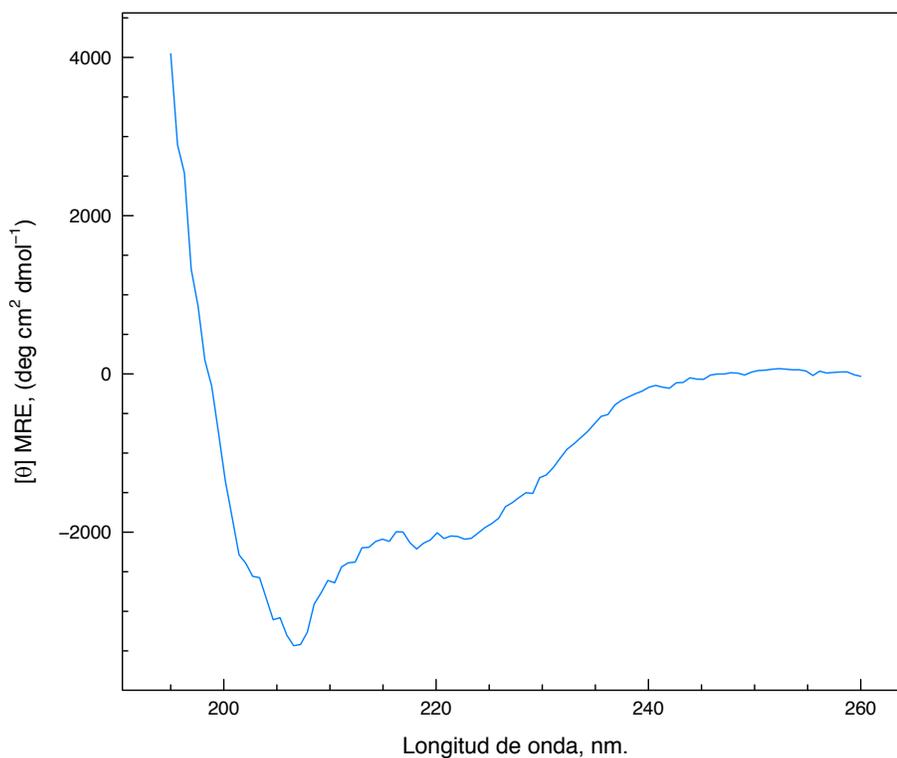
Este dominio de FtsX posee dos triptófanos, los cuales pueden estar expuestos o no al solvente dependiendo de su estructura terciaria. Para determinar el grado de exposición se utilizó acrilamida, una molécula sin cargas, para apagar la fluorescencia intrínseca de Xloop. Cuando los triptófanos se encuentran en la superficie, estos son apagados por acrilamida. Como se observa en la figura 32 la fluorescencia del dominio Xloop se va apagando a medida que se aumenta la concentración de acrilamida. La gráfica de Stern Volmer muestra una línea recta, propia de un apagamiento colisional, que indica que ambos triptófanos se encuentran expuestos en la superficie de la proteína. Las constantes de Stern-Volmer calculadas fueron 15,4 y 9,2 M<sup>-1</sup> para triptófano en solución y para los triptófano en Xloop, respectivamente. De esto se determinó que la constante de Stern-Volmer para triptófano en Xloop disminuyó un 41,3 % con respecto al triptófano en solución, sugiriendo que los triptófanos no se encuentran completamente expuestos.

### **3.6.2 Dicroísmo circular del dominio periplasmático de FtsX (Xloop).**

Para determinar el contenido de estructura secundaria de Xloop se registró el espectro en el UV lejano por dicroísmo circular. Como se observa en la figura 33, existe un mínimo de absorbancia a 208 y 222 nm, ambos característicos de estructura hélice alfa. Mediante el análisis de los datos en el servidor K2D3 (Louis-Jeune *et al.*, 2011) se determinó que hay un 16% de hélice alfa y un 11% de hebra beta.



**Figura 32. Gráfico de Stern-Volmer para el apagamiento de la fluorescencia intrínseca de Xloop por acrilamida.** Se midió el apagamiento de la fluorescencia de Xloop 7  $\mu$ M, y de triptófano 14  $\mu$ M (como control de sonda expuesta al solvente), en amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 7,5, 100 mM NaCl a 25  $^{\circ}$ C. Como apagador se utilizó acrilamida. Se excitó a 195 nm y se registró la emisión a 348 nm.



**Figura 33. Espectro de dicroísmo circular en el UV lejano de Xloop.** Xloop se dializó a equilibrio en amortiguador fosfato 20 mM pH 7,5. Se diluyó la muestra hasta una concentración 20  $\mu$ M de proteína y se midió el espectro de dicroísmo circular a 25 °C en un espectro polarímetro Jasco J-600.

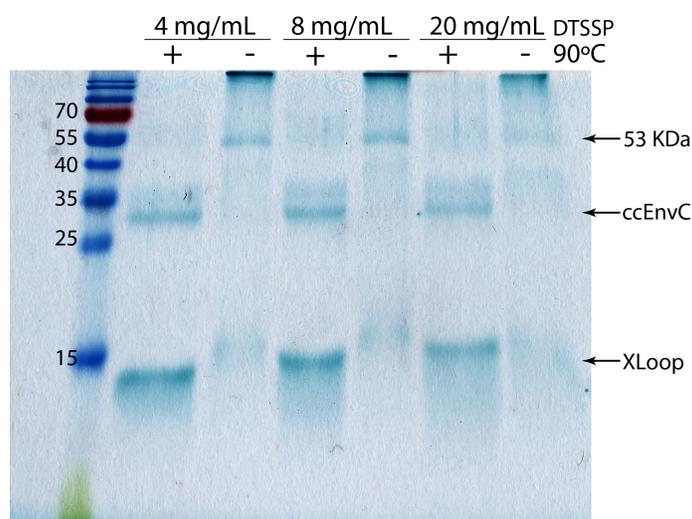
### 3.7 Interacción del dominio periplasmático de FtsX (Xloop) y el dominio “coiled-coil” de EnvC (ccEnvC).

La purificación del dominio ccEnvC se realizó de acuerdo al protocolo descrito por (Yang *et al.*, 2011b). El estudio de la interacción de estos dos dominios, importante para la división celular, se realizó mediante entrecruzamiento químico y por termoforesis en micro escala.

El entrecruzamiento químico se hizo para comprobar de manera rápida la interacción entre estas proteínas. El agente entrecruzante que se utilizó fue 3,3'-Dithiobis [sulfosuccinimidylpropionato] (DTSSP), el cual posee dos grupos reactivos con

aminas, separados por un enlazador que en el centro posee un enlace disulfuro. Este enlace disulfuro puede romperse con agentes reductores como DTT o TCEP.

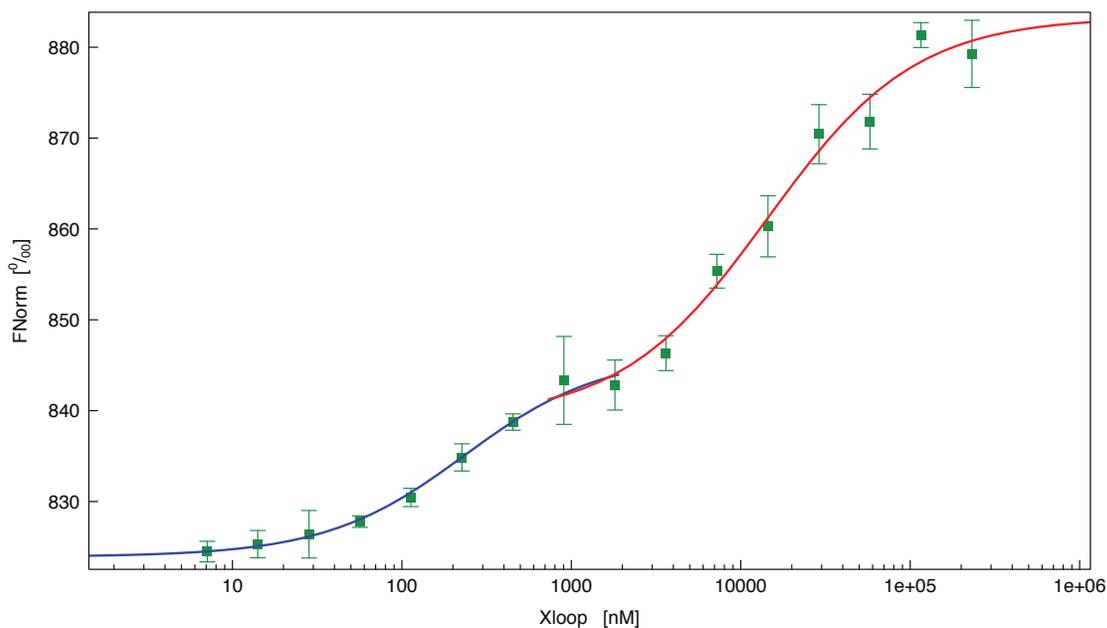
Como se observa en la figura 34, las bandas de ~15 kDa y de ~35 kDa, producto de la ruptura del puente disulfuro del agente entrecruzante, corresponden a Xloop y ccEnvC, respectivamente. Estas bandas no se observan en el complejo entrecruzado pero si una a 53 kDa y otra intensa que no ingresa al gel. Al sumar las masas moleculares de Xloop y ccEnvC se obtiene una masa de ~50 kDa, que se condice con la masa molecular experimental encontrada para el complejo entrecruzado.



**Figura 34. Gel SDS del entrecruzamiento de Xloop y ccEnvC.** Las proteínas Xloop y ccEnvC purificadas se mezclaron y entrecruzaron con el agente DTSSP a distintas concentraciones de entrecruzante, como se describe en Materiales y Métodos. Las muestras se separaron en dos, una de ellas se calentó a 90 °C durante 10 minutos (genera el rompimiento del entrecruzante) y la otra no. Las concentraciones de agente entrecruzante utilizado se indican en la parte superior de la figura. “+” y “-” corresponden a calentado y no calentado, respectivamente. En el extremo derecho se señalan las masas moleculares determinadas por un análisis de migración relativa.

### 3.7.1 Caracterización de la interacción entre ccEnvC y Xloop determinada por termoforesis en micro escala.

Al analizar la interacción de ccEnvC y Xloop mediante termoforesis en micro escala se observó la presencia de dos poblaciones de sitios (figura 35). En este experimento se mantuvo ccEnvC marcada a una concentración constante de 90 nM y se mezcló con Xloop desde los 400  $\mu$ M en diluciones seriadas de 1:1.

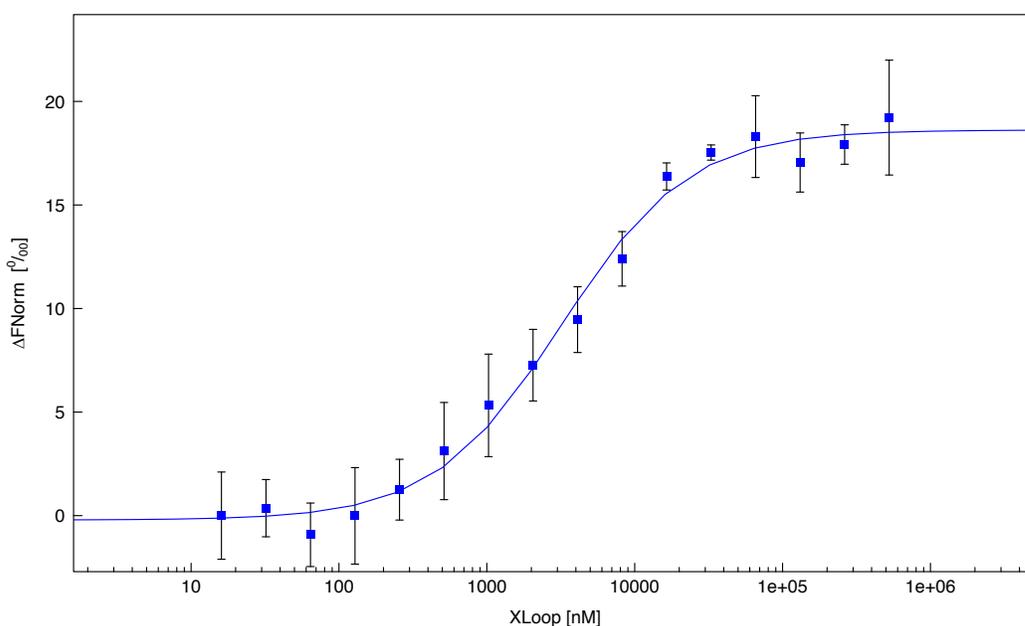


**Figura 35. Isotherma de unión del dominio ccEnvC marcado con una sonda fluorescente, al dominio Xloop.** La proteína ccEnvC marcada con NT.647 se mantuvo constante a 90 nM mientras se diluyó en forma seriada Xloop. Se esperó hasta alcanzar el equilibrio y se midió la interacción por termoforesis. Se graficó la fluorescencia relativa versus la concentración de Xloop. Cada medida se repitió 5 veces y se graficó el promedio  $\pm$  la desviación estándar.

La presencia de dos poblaciones de sitios sugiere que existen dos poblaciones de Xloop que unen ccEnvC en este rango de concentraciones, con diferentes afinidades, o que ccEnvC posee dos sitios de distinta afinidad para Xloop. Se sabe que los transportadores ABC actúan en forma dimérica, lo que coincide con la posibilidad de

dos poblaciones de Xloop (monómero y dímero). Por esta razón se analizó la oligomerización de Xloop en este rango de concentraciones.

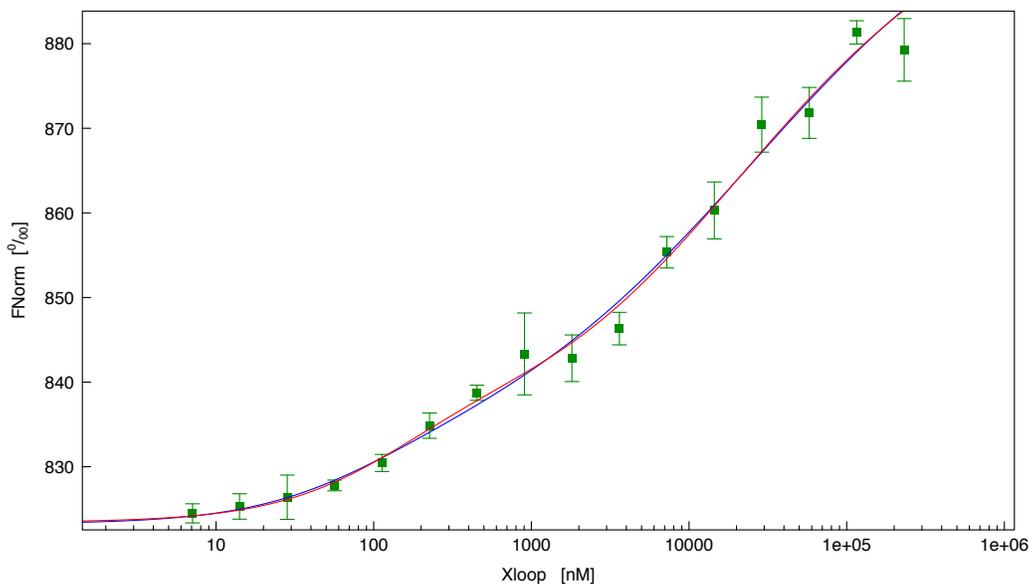
Xloop se marcó con NT.647 (nanotemper technologies GmbH) y se mantuvo constante a 50 nM. Se tituló con una dilución seriada 1:1 de Xloop sin marcar. Como se observa en la figura 36 existe una oligomerización de Xloop en el rango de concentraciones de más baja afinidad que con ccEnvC que se muestra en la isoterma de unión de la figura 35. La tendencia de un plató a altas concentraciones sugiere que no es la formación indefinida de monómeros, si no que la formación de un complejo estable y definido. La  $K_d$  para esta interacción es de  $1,6 \pm 0,5 \mu\text{M}$ .



**Figura 36. Isotherma de oligomerización del dominio Xloop marcado con una sonda fluorescente.** La proteína Xloop marcada con NT.647 se mantuvo constante a 50 nM mientras se diluyó en forma seriada Xloop sin marcar. Se esperó hasta alcanzar el equilibrio y se midió la interacción por termoforesis. Se graficó la fluorescencia relativa normalizada versus la concentración de Xloop. Cada medida se realizó 4 veces y se graficó el promedio  $\pm$  la desviación estándar.

Tomando en cuenta que el Xloop oligomeriza se procedió a ajustar diferentes modelos a la curva de interacción de ccEnvC y Xloop. Las posibilidades, como se mencionó

anteriormente, son que Xloop exista como dos poblaciones (esto está comprobado), o que ccEnvC una de manera secuencial 2 Xloop. Estos dos modelos se probaron para el ajuste de los datos experimentales (derivación en el Anexo I). Como se observa en la figura 37 ningún modelo representó de manera perfecta lo que está ocurriendo, ya que ninguno fue capaz de representar de manera correcta el plato existente entre ambas interacciones.



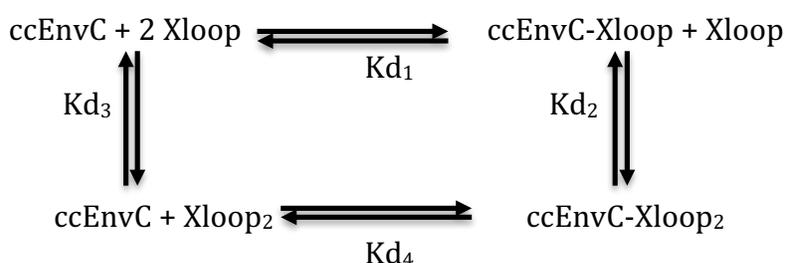
**Figura 37. Isotherma de unión del dominio ccEnvC marcado con una sonda fluorescente, al dominio Xloop.** La proteína ccEnvC marcada con NT.647 se mantuvo constante a 90 nM mientras se diluyó en forma seriada Xloop. Se esperó hasta alcanzar el equilibrio y se midió la interacción por termoforesis. Se graficó la fluorescencia relativa versus la concentración de Xloop. En azul se muestra el ajuste obtenido mediante el modelo facilitado mientras en rojo el ajuste del modelo mediado.

En la figura 38 se muestra el ciclo de interacciones con todas las especies posibles al seguir ambos modelos, es importante destacar que en este modelo ccEnvC solo posee un sitio para unir Xloop y un sitio para unir otra molécula de Xloop y es esta interacción la que se ve alterada en presencia o ausencia de ccEnvC.

Si este ciclo es el único que opera, deberíamos esperar que,

$$Kd_1 * Kd_2 = Kd_3 * Kd_4. \quad (\text{Ec. 1})$$

Los valores de las constantes obtenidos por ambos ajustes se muestran en la tabla 6. La constante  $Kd_3$  se determinó de forma independiente desde la isoterma de unión de Xloop con Xloop.



**Figura 38. Ciclo de interacción entre ccEnvC y Xloop.** Este ciclo muestra los posibles intermediarios en la formación del complejo y sus caminos. El camino que incluye a  $Kd_1$  y  $Kd_2$  se denominó facilitado, y el camino que incluye a  $Kd_3$  y  $Kd_4$  se denominó mediado.

**Tabla 6. Constantes de disociación determinadas mediante MST.**

	Modelo facilitado	Modelo Mediado	Oligomerización Xloop
<b>Kd<sub>1</sub></b>	106 ± 50 nM	103 ± 49 nM	-----
<b>Kd<sub>2</sub></b>	4967 ± 1022 nM	-----	-----
<b>Kd<sub>3</sub></b>	-----	-----	1600 ± 500 nM
<b>Kd<sub>4</sub></b>	-----	328 ± 110 nM	-----

Si tomamos estos valores y los introducimos en la Eq. 2 para  $Kd_1 * Kd_2$  y  $Kd_3 * Kd_4$  se obtiene que ambos productos son similares.

$$Kd_1 * Kd_2 / Kd_3 * Kd_4 = 1,003$$

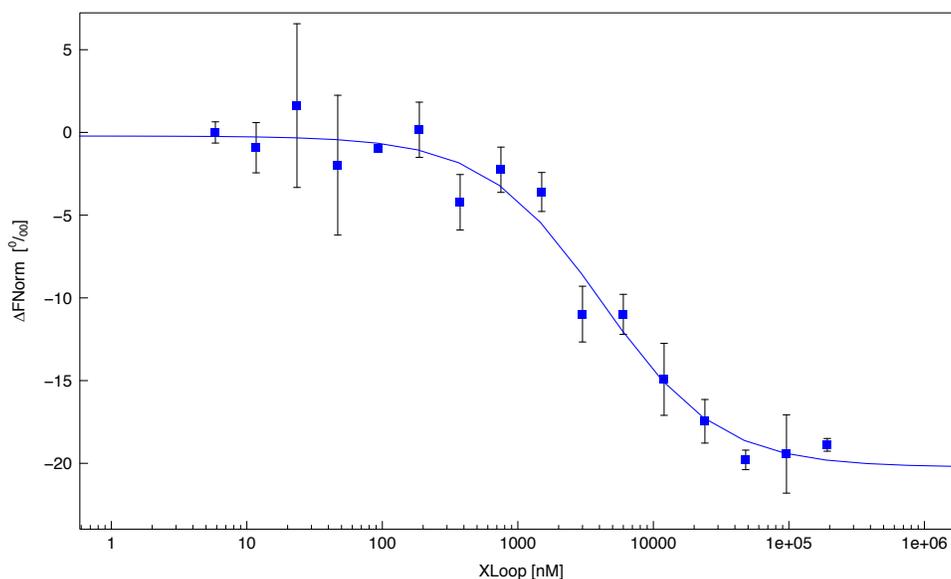
Finalmente, esto sugiere que ambos procesos ocurren y probablemente todas estas especies se encuentran presentes. Sin embargo, el camino favorable dependerá de la concentración de las distintas especies, así a bajas concentraciones de Xloop es probable que se forme ccEnvC-Xloop, pero al aumentar la concentración de Xloop se formará Xloop<sub>2</sub> y se favorecerá la formación de ccEnvC-Xloop<sub>2</sub>.

### **3.8 Caracterización de la interacción de Xloop y FtsQ.**

El reclutamiento de las proteínas al divisoma es de manera ordenada, como ya se comentó. El reclutamiento de las proteínas tardías FtsQ, FtsB y FtsL, requiere de el reclutamiento previo de FtsEX. Es por esto que durante la división se producirá la interacción de FtsX con FtsQ. FtsQ es una proteína principalmente periplasmática con una hélice transmembrana lo que sugiere que la interacción entre FtsX y FtsQ sea a través de sus dominios periplasmático y/o a través de las hélices transmembrana. En este trabajo se analizó la interacción del dominio periplasmático de FtsX y FtsQ en micelas mediante termoforesis en micro escala.

#### **3.8.1 Interacción del dominio periplasmático de FtsX (Xloop) y FtsQ determinada por termoforesis en micro escala.**

Para analizar la interacción entre el dominio periplasmático de FtsX y FtsQ se utilizó termoforesis en micro escala. FtsQ se marcó con FITC y se mantuvo a una concentración constante de 100 nM mientras se tituló con una dilución seriada 1:1 de Xloop. Se observó una curva de unión característica para estas dos proteínas con una Kd de  $4 \pm 1 \mu\text{M}$  (figura 39).



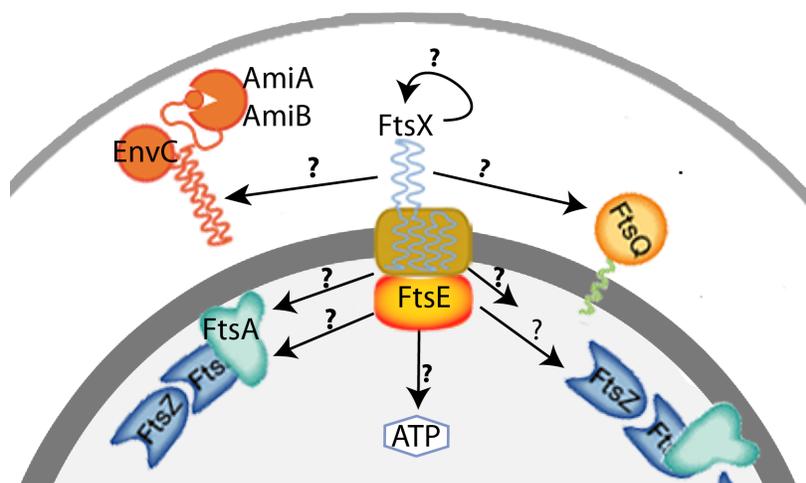
**Figura 39. Isotherma de unión de FtsQ marcado con FITC, al dominio Xloop.** La proteína FtsQ marcada con FITC se mantuvo constante a 100 nM mientras se diluyó en forma seriada Xloop. Se esperó hasta alcanzar el equilibrio y se midió la interacción por termoforesis. Se graficó la fluorescencia relativa normalizada versus la concentración de Xloop. Cada medida se realizó 4 veces y se graficó el promedio  $\pm$  la desviación estándar.

## 4 Discusión.

El trabajo desarrollado en esta tesis abordó la red de interacción de las proteínas que conforman el divisoma, desde un punto de vista cuantitativo. El divisoma es la maquinaria esencial para la división en las bacterias. Esta maquinaria está conformada por al menos 12 proteínas esenciales, las cuales se reclutan de forma secuencial al sitio de división celular. La formación del divisoma se ha separado en dos fases, llamadas temprana y tardía (Aarsman *et al.*, 2005). La fase temprana consiste en la formación del anillo Z debido a la polimerización de FtsZ, en la mitad longitudinal de la bacteria, y su anclaje a la membrana es mediada por las proteínas ZipA y FtsA. La segunda fase consiste en el reclutamiento del resto de las proteínas, de manera secuencial (FtsEX, FtsK, FtsQ, FtsLB, FtsW, FtsI y FtsN), al sitio de división celular. Las únicas proteínas que dependen exclusivamente de las proteínas tempranas son FtsEX y FtsK. Una diferencia importante de estas dos fases consiste en el localización de las proteínas. La primera fase ocurre solamente en el citoplasma, mientras que la segunda fase conecta las proteínas del citoplasma con las del periplasma a través de sus hélices transmembrana y sus dominios periplasmáticos, lo que a su vez se puede relacionar con el papel que juegan las dos fases en la sincronización y segregación del cromosoma (fase 1) y de la remodelación del peptidoglicano (fase 2).

Hasta el momento se conoce la secuencia de unión en la red de interacciones que ocurre entre las proteínas del divisoma de *E. coli* (figura 8). La mayoría de esta información proviene de estudios genéticos como doble híbrido o de algunos estudios bioquímicos como co-inmunoprecipitación, difracción de rayos X y co-purificación. Como se observa en la figura 8, las conexiones entre las proteínas son redundantes, con incluso algunos nodos, como el de FtsQ, que interactúa con al menos 8 otras proteínas. Para comprender la maquinaria del divisoma y su ensamblaje, no basta con el conocimiento de las posibles interacciones, si no que es necesario caracterizar de forma cuantitativa cada una de ellas. Para cumplir con este objetivo se necesita montar un proceso complejo y demorado, pues es necesario purificar los componentes y disponer de técnicas biofísicas que permitan obtener los parámetros

termodinámicos a través de experimentos *in vitro*. Con este propósito, este trabajo se enfocó en la caracterización termodinámica de una zona de la red de interacción, específicamente en la sub-red de interacción de FtsEX. Como se observa en la figura 40, FtsEX se encuentra mediando el paso entre la fase temprana y tardía del divisoma y es el primer complejo que conecta los procesos que ocurren en el citoplasma y los que ocurren en el periplásma. Esto hace que estas proteínas puedan ser un posible punto de control de la división bacteriana.



**Figura 40. Sub-red de interacción de FtsEX en el divisoma.** El transportador ABC conformado por FtsEX se encuentra en la conexión de la fase temprana y tardía de la formación del divisoma, además es la primera proteína que conecta los componentes del divisoma del citoplasma y del periplasma. Se ha descrito la interacción FtsE-FtsZ, FtsX-EnvC, FtsX-FtsQ y FtsX-FtsA de forma cualitativa que se indican con una flecha (Corbin *et al.*, 2007; Karimova *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2011a). Los símbolos de interrogación señalan las afinidades desconocidas en la red.

Para cumplir con este objetivo fue necesario establecer protocolos de purificación para FtsA, FtsE, FtsX y EnvC, y luego desarrollar los métodos para medir las interacciones.

Los resultados se presentaron en dos grandes secciones para facilitar la descripción de los experimentos. Del mismo modo, para facilitar la discusión del trabajo ésta se

dividió en secciones. En primer lugar, se describe la purificación y caracterización individual de cada una de las proteínas estudiadas. En segundo lugar, se describen las interacciones para cada una de estas y entre ellas. Por último se describe un modelo de cómo esta subred podría actuar en el divisoma y la importancia en el proceso de división.

#### **4.1 Sobreexpresión, purificación y caracterización de las proteínas.**

##### **4.1.1 FtsA.**

La proteína FtsA es una de las proteínas tempranas en la formación del divisoma, junto a FtsZ y ZipA (Aarsman *et al.*, 2005; Adams & Errington, 2009; Errington *et al.*, 2003; Lutkenhaus & Addinall, 1997). Estas tres proteínas forman el llamado anillo Z en *E. coli*, este es el primer complejo que se forma en la mitad longitudinal de *E. coli* y funciona como andamiaje de los demás componentes. FtsA es una proteína altamente conservada y tiene una función descrita como anclaje del anillo Z a la membrana y otra como andamio para los otros componentes del divisoma. FtsA tiene homología con el dominio ATPásico presente en actina, DnaK y hexoquinasas (Lutkenhaus & Addinall, 1997) y ha sido ubicada en esta familia de proteínas. Sin embargo, posee diferencias substanciales con actina, el principal es la topología y ubicación del segundo subdominio, el cual se encuentra en dirección opuesta en FtsA (van den Ent & Löwe, 2000). Los primeros estudios *in-vitro* de la proteína FtsA mostraron que esta unía ATP, y mediante mutaciones sitio dirigidas se determinaron los residuos importantes para esta unión (Sánchez *et al.*, 1994). Se ha estudiado FtsA de diversos organismos con resultados variados sobre la actividad ATPásica, por ejemplo con FtsA de *S. pneumoniae* no se detectó actividad ATPásica (Lara *et al.*, 2005), mientras que los estudios realizados en *B. subtilis* y *P. aeruginosa* muestran que FtsA posee actividad ATPásica (Feucht *et al.*, 2001; Paradis-Bleau *et al.*, 2005). En el laboratorio se estableció un protocolo de purificación de FtsA de *E. coli* en forma soluble, la cual si presenta actividad ATPásica (Gallardo, 2006; Weinstein, 2009). Sin embargo, esta preparación presenta contaminantes de mayor masa molecular, los cuales se han identificado mediante espectrometría de masa. Algunos de estos contaminantes también poseen actividad ATPásica, lo que ha puesto en duda que FtsA de *E. coli* sea la

responsable de la actividad ATPásica observada. Por otro lado, algunos grupos han establecido otro protocolo de purificación de FtsA de *E. coli* proveniente de cuerpos de inclusión, esta preparación en cambio, no poseen actividad ATPásica (Loose & Mitchison, 2013; Martos *et al.*, 2012). En este trabajo se implementó un nuevo método de purificación desde la fracción insoluble utilizando el detergente sarkosyl para la solubilización. Está descrito que este detergente puede solubilizar proteínas en un estado semi plegado (Frangioni & Neel, 1993; Frankel *et al.*, 1991; Tao *et al.*, 2010). Este protocolo permitió aumentar el rendimiento de la purificación en más de 4 veces, respecto a la purificación de FtsA soluble. El espectro de dicroísmo circular en el UV lejano de esta preparación es similar al de FtsA soluble, indicando que tiene estructura secundaria, y su contenido es similar a la FtsA soluble., sin embargo esta preparación de FtsA no presentó actividad ATPásica. Estos resultados no permitieron aclarar la disputa que existe sobre la actividad ATPásica de EcFtsA, sin embargo concuerdan con los datos presentados por (Martos *et al.*, 2012). También existe la posibilidad que FtsA requiera de alguna modificación post-traducciona para presentar actividad ATPásica, y que esta modificación esté presente en FtsA soluble y no en los cuerpos de inclusión. Existe evidencia que FtsA sufre una fosforilación en el residuo T215, y que esta fosforilación es necesaria para la unión de ATP (Sánchez *et al.*, 1994). Incluso se postula que la modificación afecta la localización de FtsA, impidiendo la interacción con la membrana citoplasmática, lo que condice con las diferentes fracciones estudiadas.

#### **4.1.2 FtsE.**

FtsE es una proteína esencial para la división bacteriana en condiciones de baja concentración de sal. Está descrita como el dominio de unión a ATP del transportador ABC del divisoma, el cual tiene como dominio transmembrana a FtsX. La función de este transportador en la división no está del todo clara. Los últimos estudios han asociado a este complejo con la regulación de las amidasas de la división celular AmiA/B mediante la regulación de EnvC (Sham *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2011a). Estos grupos sugieren que la actividad ATPásica de FtsE genera un cambio

conformacional en FtsX el cual activa a EnvC y esta, a su vez, activa a las amidasas AmiA/B en la zona de división. Además existe evidencia que la unión y/o hidrólisis de ATP por FtsE es esencial para que ocurra la división, aunque no se afecte la formación del divisoma con todos sus componentes (Arends *et al.*, 2009). Todos estos estudios se han hecho *in-vivo* debido a que FtsE es altamente insoluble, de hecho ha sido categorizada como dependiente obligatoria de la chaperonina GroE (Fujiwara *et al.*, 2010). En este trabajo se utilizaron varias metodologías de purificación para lograr estudiar a FtsE *in-vitro*. Por un lado se trabajó con la purificación en condiciones denaturantes de la proteína proveniente de cuerpos de inclusión y por otro con la co-expresión de la chaperonina GroE.

#### **4.1.2.1 Co-expresión de la chaperonina GroE y FtsE.**

GroE es una chaperonina conformada por la chaperonina molecular GroEL y la co-chaperonina GroES, esta asiste en el plegamiento de un gran número de proteínas (Kerner *et al.*, 2005). La forma activa de la chaperonina consiste en dos anillos heptaméricos de GroEL empacadas por la espalda que están reguladas por una tapa heptamérica de GroES. El mecanismo de acción de esta chaperonina consiste en la unión del sustrato no plegado mediante interacciones hidrofóbicas con la cavidad generada en el heptámero de GroEL, luego ocurre la unión de ATP y finalmente el heptámero de GroES cierra esta cavidad, aislando al sustrato del medio externo. A diferencia de otras chaperoninas, GroEL no utiliza fuerza para desplegar al sustrato, sino que este, mediante la exposición del núcleo hidrofóbico, interactúa con GroEL, además no se ha detectado cambios en los niveles de estructura secundaria del complejo GroEL-sustrato versus sustrato al ingresar el sustrato a la chaperonina. La forma de acción de la chaperonina GroE consiste en eliminar la vía de agregación (el sustrato está aislado), que compite con la de plegamiento. Varios estudios en proteínas sustrato de GroE se han llevado a cabo, comparando la tasa de replegamiento en un sistema libre o en presencia de chaperonina. Estos estudios han mostrado que la tasa de plegamiento aumenta en presencia de chaperonina y a su vez

la tasa de replegamiento en solución es inversamente proporcional a la concentración de proteína y el aumento de dispersión de luz, indicadores de agregación. La evidencia más clara consiste en la proteína DM-MBP, cuando esta es replegada en solución se genera dispersión de luz y su tasa de replegamiento es inversamente proporcional a la concentración de proteína. Si en el amortiguador se cambia los iones cloruros por iones acetato, la agregación desaparece y ahora la tasa de replegamiento en solución es igual a la tasa de replegamiento con la chaperonina, demostrando que la aceleración del replegamiento en el sistema con chaperonina se debe principalmente a la detención de la agregación y que el diagrama de energías es similar en solución y con chaperonina (Horwich & Fenton, 2009).

Como se mencionó anteriormente, FtsE ha sido clasificada dentro de una familia que requiere de forma obligada a la chaperonina GroE para su plegamiento en *E. coli* (Fujiwara *et al.*, 2010), además se ha descrito que el fenotipo filamentoso observado en una *E. coli* mutante para GroEL es debido a que no se genera FtsE activa, bloqueando la división celular (Fujiwara & Taguchi, 2007). Es por esto que se adoptó la estrategia de la co-expresión de FtsE-His y GroE para aumentar su solubilidad y de este modo hacer la caracterización *in-vitro*.

De esta forma se logró obtener un porcentaje de FtsE en la fracción soluble, sin embargo, esta fracción co-purificó con GroEL mientras que GroES no fue retenida por la columna. Esto condice con el modo de acción de la chaperonina GroE, en la cual los anillos de GroEL son los que capturan las proteínas sustrato mediante interacciones hidrofóbicas. No se logró determinar el porcentaje de FtsE unida a GroEL y libre, sin embargo, mediante densitometría de las bandas se observó aproximadamente, 13 veces más GroEL que FtsE. Es por esto que existen dudas sobre el estado de FtsE en esta fracción, teóricamente debería existir una fracción plegada y otra fracción unida con GroEL en estado desplegado.

Todos los intentos de separar FtsE y GroEL, incluyendo cambio de pH, presencia de ATP, detergentes, etc. no dieron resultado, probablemente debido a que GroES no se encuentra presente, lo que impide la continuación del ciclo de la chaperonina. Teóricamente, si se agrega GroES y ATP podríamos obtener FtsE plegada y soluble.

#### **4.1.2.2 Purificación y plegamiento de FtsE desde cuerpos de inclusión.**

FtsE-His proveniente de cuerpos de inclusión se purificó mediante cromatografía de afinidad a níquel lográndose una preparación con alta pureza. Luego se probaron una serie de condiciones para su replegamiento mediante dilución rápida o por diálisis al equilibrio. El replegamiento no es una reacción aislada, pues compite con otras reacciones como la agregación y el plegamiento erróneo. El replegamiento correcto depende de una serie de factores ambientales, que van desde la velocidad de eliminación del desnaturalante hasta la composición del amortiguador. A altas concentraciones de desnaturalante, las proteínas están desplegadas, bien solvatadas, y flexibles. Cuando adquieren la estructura, las proteínas se encuentran plegadas, rígidas y compactas. El factor más importante en el replegamiento es la concentración de la proteína, pues a altas concentraciones se favorecen las interacciones inter moleculares, lo que lleva a la agregación. Al utilizar concentraciones bajas de proteína, se desfavorece la interacción inter molecular, manteniendo las proteínas en solución, forzándolas a colapsar sobre si mismas adquiriendo estructura. Otro factor de importancia es la composición del amortiguador como el pH, fuerza iónica y agente amortiguador. En base a esto, el aumento del replegamiento se ve afectado por la presencia de aditivos que generan las condiciones ideales, donde la tasa de replegamiento se aumenta, la agregación se disminuye y el estado plegado nativo se estabiliza. Para FtsE se probaron una serie de condiciones, cambiando la fuerza iónica, detergentes, sustratos, y pH. De todas las condiciones probadas, solo se logró obtener FtsE soluble en condiciones de bajo pH. Específicamente se logró obtener a FtsE soluble en amortiguador acetato pH 5. Tomando en cuenta que FtsE tiene un punto isoeléctrico de 9,9, si se predice la carga de la proteína a cada pH se observa que a pH neutro su carga neta es relativamente baja, próxima a la neutralidad, lo que favorece las interacciones inter moleculares. Al disminuir el pH, la carga positiva de FtsE aumenta, lo que desfavorece las interacciones inter moleculares. Al analizar la secuencia se observa que FtsE posee un gran número de histidinas (10) y de ácido glutámico (10), ambos residuos tienen un grupo radical con pKa ácidos (histidina pKa

6 y ácido glutámico pKa 4,25). A pH 5 una mayor proporción de las histidinas tenderán a tener una carga positiva, mientras que una parte de los glutámicos tenderán a la neutralidad. También es importante la presencia de acetato, el cual es un anión que se encuentra ubicado cerca del sulfato en la serie de Hofmeister, su efecto podría aumentar las interacciones hidrofóbicas de moléculas no polares, induciendo la compactación de FtsE a una estructura globular. Esta proteína soluble se analizó mediante fluorescencia intrínseca, dicroísmo circular en el UV lejano y dispersión de luz. Los resultados de fluorescencia mostraron que a medida que disminuye el agente desnaturante se observa un desplazamiento del máximo de fluorescencia hacia el azul ( $\sim 8$  nm) y una disminución en el máximo de fluorescencia ( $\sim 26\%$  disminución). El corrimiento del máximo sugiere que el triptófano presente en FtsE se encuentra en un medio menos polar, mientras que el apagamiento sugiere la presencia de un entorno apagador, probablemente de residuos cargados o polares. Esto último puede explicarse por la presencia de apagamiento intramolecular del triptófano por residuos histidina, lisina o ácido glutámico. Los resultados de dicroísmo circular muestran que en estas condiciones, FtsE presenta estructura secundaria, principalmente hélice alfa y mediante dispersión de luz se observó que en estas condiciones no se forman grandes agregados. De todos estos resultados se concluye que FtsE ha tomado cierta estructura, que le permite permanecer en solución. Sin embargo, como no existe una caracterización bioquímica previa ni tampoco datos estructurales, no se puede asegurar que la estructura adquirida corresponda a la estructura nativa.

Mediante análisis de secuencia se ha concluido que FtsE tiene similitud a la familia de dominios de unión a ATP de un transportador ABC, por lo que FtsE debe unir ATP y ADP. Además estudios genéticos muestran que mutaciones en los residuos teóricamente importantes para la unión a ATP de FtsE tienen un efecto en la constricción del septo (Arends *et al.*, 2009). Mediante estudios de FRET y termoforesis en micro escala se comprobó y caracterizó la interacción de FtsE replegada con ATP y ADP. Los resultados de FRET muestran que el triptófano de FtsE está cercano del mant-ATP, debido a que ocurre el proceso de transferencia de energía dipolar entre ambas moléculas. Mediante al técnica de termoforesis en micro escala se determinaron las constantes de disociación de ATP y ADP por FtsE. Ambas constantes

están en el rango micromolar alto y existe una mayor afinidad por ATP. Estos datos concuerdan con lo esperado para una ATPasa, en donde hay unión preferencial de ATP. También se caracterizó la interacción de FtsE con FtsZ, previamente descrita *in-vivo* (Corbin *et al.*, 2007), mediante termoforesis en micro escala. Se detectó una interacción entre ambas proteínas con una constante de disociación de 9,5  $\mu$ M. Además se vio que esta interacción se ajustaba de mejor manera a la ecuación de Hill con un coeficiente de 2,44 lo que indica una cooperatividad positiva en esta interacción. Esta cooperatividad se concuerda con lo sugerido por (Corbin *et al.*, 2007) en donde la sobreexpresión de FtsZ con FtsEX aumenta la población de “minicells”, las cuales también han sido observadas al co-expresar FtsZ y FtsA. Estas “minicells” son producto de un aumento en la tasa de división debido a la estabilización del anillo Z por sobre la inhibición de la polimerización en los polos, mediante el sistema minCDE. De esta forma la interacción de FtsE con FtsZ estabiliza y favorece la polimerización de FtsZ.

#### **4.1.3 FtsX.**

Como se mencionó anteriormente, FtsX corresponde estructuralmente al dominio transmembrana del transportador ABC formado por FtsE y FtsX. Como se discutió anteriormente, la sobre expresión de FtsE no tiene efectos sobre la viabilidad de *E. coli*, sin embargo, la sobre expresión de FtsX muestra una toxicidad en el crecimiento de la bacteria. Este efecto sobre el crecimiento no es propio de FtsX, más bien, es un efecto comúnmente observado al sobre expresar proteínas de membrana (Wagner *et al.*, 2006). La toxicidad no está del todo clara, lo que imposibilitó un diseño racional del sistema, llevando a la necesidad de seguir una estrategia de “prueba y error”. Para el caso de FtsX se comenzó probando algunas deleciones producidas en su dominio periplasmático, sin obtener mejoras en la sobre vida (datos no mostrados). El segundo paso fue la construcción de un vector que permitiera la sobreexpresión de FtsX y FtsE simultáneamente, pues existe evidencia que esto disminuye la toxicidad (Arends *et al.*, 2009; Schmidt *et al.*, 2004). Esto fue corroborado en nuestro sistema, donde la sobre

expresión conjunta de FtsE y FtsX disminuyó la toxicidad respecto a la sobreexpresión de FtsX sola.

Si bien la toxicidad inducida por la sobre expresión de proteínas de membrana no es del todo comprendida, se ha postulado que se debe a una pérdida de la integridad de la membrana o a la saturación de la maquinaria de destinación y translocación, bloqueando la biogénesis de otras proteínas esenciales (Wagner *et al.*, 2007). Apoyando esta segunda hipótesis, se observó que existe una relación inversa entre concentración de inductor y crecimiento de las bacterias. Al disminuir la concentración del inductor, disminuyó el nivel de expresión y las bacterias crecieron más, esto puede estar relacionado a la no saturación el sistema de destinación y translocación. Con esta idea en mente, se utilizó el sistema de auto inducción dando excelentes resultados en el nivel de expresión de FtsX y FtsE.

La solubilización de FtsX se probó con los siguientes seis detergentes CHAPS, colato, Tween-20, Triton X-100, CTAB y DDM. En términos de solubilización los más efectivos fueron CTAB, CHAPS y colato seguido de DDM y Triton. Los tres primeros poseen cargas en la cabeza hidrofílica de la cadena, CTAB es un detergente catiónico que desnatura las proteínas, colato está incluido en la familia de los detergentes iónicos aunque no posee una carga, sus grupos polares están distribuidos en diferentes partes de la cadena y ha sido utilizado para la solubilización de membranas (Columbus *et al.*, 2006; Drew *et al.*, 2006; 2008; Eriks *et al.*, 2003; Hays *et al.*, 2010; Loll, 2003; Marek *et al.*, 2011), y finalmente CHAPS es un detergente zwitternionico que poseé carga positiva y negativa en la cabeza. DDM y triton X-100 son detergentes no iónicos, los que son considerados surfactantes medios y rompen interacciones proteína-lipido y lípido-lípido pero no proteína-proteína y la mayoría no desnatura las proteínas. Son altamente utilizados para solubilizar e aislar proteínas en la forma nativa y activa (Columbus *et al.*, 2006; Drew *et al.*, 2006; 2008; Eriks *et al.*, 2003; Hays *et al.*, 2010; Loll, 2003; Marek *et al.*, 2011).

La purificación de las proteínas solubilizadas se realizó en amortiguador con alguno de los detergentes CHAPS, colato o DDM obteniéndose buenos resultados con colato y DDM. Con ambos detergentes se logró obtener una fracción enriquecida en FtsX aunque no se logró una alta pureza.

#### 4.1.4 Caracterización del dominio periplasmático de FtsX.

La proteína FtsX, como se mencionó anteriormente, es integral de membrana. La topología de esta ha sido descrita anteriormente (Arends *et al.*, 2009). La región amino terminal se encuentra en el citoplasma, posee 4 hélices transmembrana y 1 dominio periplasmático entre el TMH1 y TMH2 de aproximadamente 140 residuos. Esta topología es conservada dentro de una familia de transportadores ABC que se denominan no-canónicos. Dentro de esta familia se encuentran el transportador LolCDE y MacAB, (Lin *et al.*, 2009; Narita, 2011). Tanto LolC, LolE y MacA poseen solo 4 hélices transmembrana con un dominio periplasmático de ~200 residuos entre las hélices transmembrana 1 y 2. Se sabe que este dominio periplasmático es funcionalmente importante para ambos transportadores. En el caso de FtsX se ha descrito que este dominio periplasmático interactúa con la proteína EnvC la cual a su vez regula la actividad de las amidasas AmiA y AmiB (Peters *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2011a; 2012). Se ha sugerido que de esta manera se controla la actividad de las amidasas, tanto espacial como temporalmente. El modelo sugerido incluye el reclutamiento de EnvC al sitio de división celular mediante la interacción con el dominio periplasmático de FtsX y la regulación de EnvC asociada a cambios conformacionales de FtsX debido a la hidrólisis de ATP por parte de FtsE. Como la purificación de FtsX en alta pureza para estudios *in-vitro* no se logró, se utilizó el dominio periplasmático de FtsX (Xloop) para caracterizar la interacción entre FtsX y EnvC, pues este debería ser el dominio funcional para la interacción. La purificación de este dominio se realizó siguiendo el protocolo descrito anteriormente (Yang *et al.*, 2011a). La caracterización de este dominio se hizo mediante dicroísmo circular y apagamiento intrínseco de la fluorescencia. Ambos resultados indican que el Xloop posee estructura secundaria y terciaria. Mediante dicroísmo se pudo observar que el Xloop posee un alto porcentaje de estructura hélice alfa y no estructurada. Mediante el apagamiento de la fluorescencia se determinó que los triptófanos presentes (2 triptófanos) se encuentran en ambientes similares y no expuestos..

## 4.2 Caracterización de la red de interacción del Xloop.

Como se mencionó anteriormente, el Xloop interactúa con el dominio “coiled-coil” de EnvC (ccEnvC). EnvC es una proteína de la familia de factores LytM, las cuales son metalo-endopeptidasas, sin embargo EnvC no posee actividad enzimática (Uehara *et al.*, 2010). Bacterias que poseen mutaciones en múltiple factores LytM, al igual que la triple mutante de las amidasas (AmiA/B/C) muestran un fenotipo similar, que consiste en cadenas largas de células que presentan constricción de la membrana interna pero permanecen conectadas por la pared de PG que interfiere con la invaginación de la membrana externa (Heidrich *et al.*, 2001; Priyadarshini *et al.*, 2007; Uehara *et al.*, 2009). Esta interacción fue descrita mediante técnicas de “pull-up” en donde se utilizó Xloop como receptor y ccEnvC como ligando (Yang *et al.*, 2011a). Estos fueron los primeros resultados que asocian a FtsX con el remodelamiento del peptidoglicano, situando a FtsEX como un punto de control importante en el proceso de división bacteriana. El modo de acción de FtsEX ha sido postulado por (Yang *et al.*, 2011a), con un modelo donde la unión e hidrólisis de ATP por FtsE genera un cambio conformacional en el dominio periplasmático de FtsX activando a EnvC, la cual activa de manera local a las amidasas AmiA y AmiB. Debido a que EnvC es un regulador de las amidasas, esta debe estar altamente regulada tanto en la expresión como en la localización, de hecho la sobreexpresión de EnvC provoca la lisis celular (Hara *et al.*, 2002). Incluso la inducción leve de una mutante de EnvC que no posee el dominio “coiled-coil” es extremadamente tóxica para la célula y se localiza de forma homogénea en el periplasma (Uehara *et al.*, 2010). Es por esto que debería haber una alta afinidad en la interacción de FtsX y EnvC para mantenerla compartimentalizada y regulada durante todo instante.

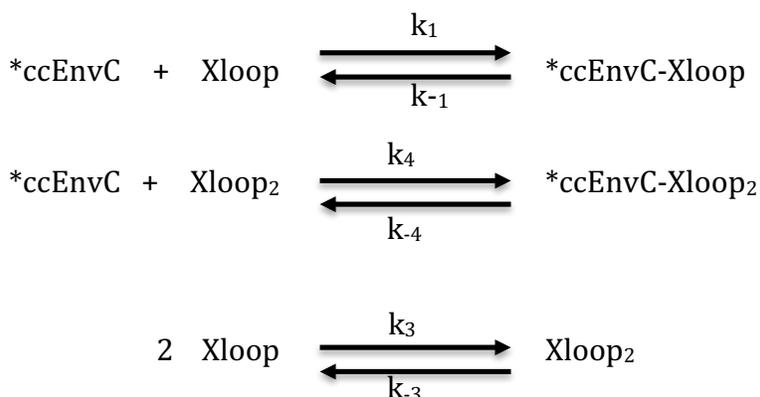
Por otra parte se ha sugerido que FtsX interactúa con FtsQ (Karimova *et al.*, 2005), proteína tardía de la división celular que forma un complejo con FtsL y FtsB, formando el llamado conector periplásmico del divisoma (Villanelo *et al.*, 2011), cuya función es desconocida, aunque se cree que actúa de anclaje de la maquinaria de síntesis de PG. FtsQ es una proteína bitópica con un pequeño dominio citoplasmático (24 residuos), una hélice transmembrana y un dominio periplasmático (227 residuos), el cual es

necesario y suficiente para la correcta localización de ésta en el divisoma (Chen *et al.*, 1999; 2002). La localización de FtsQ depende de FtsZ, FtsA, FtsK y FtsEX (Chen & Beckwith, 2001; Chen *et al.*, 1999; Schmidt *et al.*, 2004). Probablemente la dependencia de FtsZ y FtsA es de forma indirecta, pues el dominio periplasmático de FtsQ es suficiente para su localización. En cambio, FtsK y FtsEX presentan dominios periplasmáticos que les permitirían interactuar con FtsQ.

Los resultados obtenidos en este trabajo mediante la técnica de termoforesis en micro escala (MST) muestran de forma clara la existencia de una interacción directa entre el dominio periplasmático de FtsX (Xloop) con EnvC y con FtsQ.

La interacción del Xloop con ccEnvC presenta una curva de unión bifásica, indicando la presencia de dos poblaciones de Xloop que pueden interactuar con ccEnvC. Para comprender este comportamiento es necesario entender a cabalidad la técnica utilizada. La termoforesis en micro escala se basa en una propiedad física llamada termodifusión. La termodifusión corresponde al movimiento de las moléculas en un gradiente de temperatura, el cual depende del coeficiente de Soret (Dühr & Braun, 2006). Debido a que el coeficiente de Soret depende del tamaño, la carga y la entropía de hidratación, cualquier evento de unión que modifique estos parámetros presentara un cambio en la termodifusión. Para observar este cambio es necesario marcar de forma fluorescente una molécula y mantener su concentración constante mientras se agrega una concentración creciente de la otra molécula. El equipo registra el cambio de fluorescencia en la misma zona donde calienta mediante un laser IR. El cambio de la fluorescencia en esta zona se relaciona con la termodifusión. Este tipo de experimento nos permite seguir de manera específica a una de las moléculas. En el caso de la interacción Xloop – ccEnvC se marcó y se siguió a ccEnvC. Considerando el comportamiento bifásico observado se puede explicar debido a la existencia anterior de distintos complejos ccEnvC-Xloop ya sea porque ccEnvC posee más de un sitio de unión o porque existen dos poblaciones de Xloop. Se sabe que los transportadores ABC están formados por 4 subunidades, 2 dominios TM (FtsX) y 2 dominios ABC (FtsE), por lo cual es probable que el Xloop dimerice. Es por esto que se estudió también la oligomerización de Xloop al interactuar consigo mismo. Para esto se utilizó MST, se marcó Xloop y se tituló con Xloop sin marcar. En este experimento se

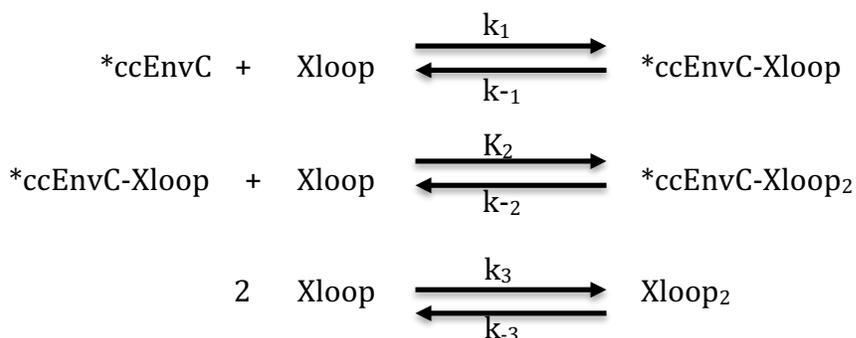
determinó que el Xloop interactúa consigo mismo sin formar grandes agregados y con una constante de disociación de 1,6  $\mu\text{M}$ . Tomado esto en consideración se procedió a ajustar los datos de la interacción ccEnvC-Xloop con los dos modelos desarrollados que se muestran en el Anexo I. Ambos modelos toman en cuenta la formación de dímeros de Xloop y más de un camino para formar ccEnvC-Xloop<sub>2</sub>. En el primer modelo utilizado hay competencia entre Xloop y Xloop<sub>2</sub> por ccEnvC, en este caso existen los equilibrios:



Donde  $k_i$  son constantes de velocidad y  $k_{-1}/K_1$ ;  $k_{-2}/K_2$ ;  $k_{-3}/K_3$  y  $k_{-4}/K_4$  las constantes de disociación  $K_1$ ,  $K_2$ ,  $K_3$  y  $K_4$  respectivamente.

En la curva de interacción ccEnvC – Xloop solo se observan las interacciones que involucren a la proteína marcada \*ccEnvC, por esto solo se observan dos transiciones y no tres.

El otro modelo probado supone que hay secuencialidad en la unión de Xloop a ccEnvC y consiste de los siguientes equilibrios:



Ambos modelos se ajustan de buena forma a los datos experimentales obteniéndose las constantes de disociación para todos los equilibrios. Esto es lo que se puede observar *in-vitro*, sin embargo, lo importante es analizar como esto podría estar operando *in-vivo*. Considerando estos equilibrios y la distinta información que existe para el modo de actuar de los transportadores ABC, probablemente FtsEX esté en forma de dímero, lo que podría desplazar el equilibrio a la formación de Xloop<sub>2</sub> para interactuar con EnvC. La interacción de ccEnvC con el monómero o el dímero de Xloop tiene K<sub>1</sub> de 150 y una K<sub>2</sub> de 300 nM, respectivamente. Esta es una interacción de alta afinidad la cual se condice con el modelo sugerido por (Uehara *et al.*, 2010), donde EnvC está anclada a FtsX. Otro factor importante es la actividad ATPásica de FtsE, lo cual puede generar un cambio conformacional en FtsX. Este cambio conformacional puede estar alterando ya sea la dimerización de Xloop o la afinidad de FtsX por EnvC, para de esta forma regular la actividad de las amidasas. Todas estas son preguntas que faltan por responder y que darían una idea de cómo este complejo puede regular a EnvC.

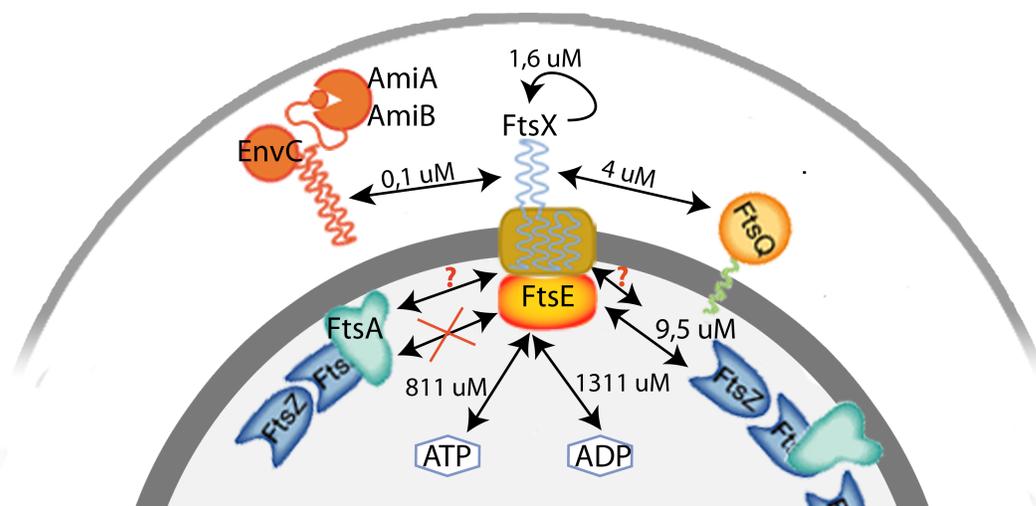
La interacción de FtsQ y Xloop también se analizó mediante MST. En este experimento se marcó y siguió a FtsQ. La isoterma de unión muestra un punto de inflexión, sugiriendo que FtsQ interactúa con una sola población de Xloop o la afinidad por ambas poblaciones de Xloop es similar. La constante de disociación para esta interacción es de 4 μM, aproximadamente un orden de magnitud mayor a la de ccEnvC – Xloop y en el mismo rango que otras interacciones entre proteínas del divisoma (Haney *et al.*, 2001; Szwedziak *et al.*, 2012). Esto se condice con lo sugerido por (Karimova *et al.*, 2005), que el ensamblaje del divisoma está guiado por la asociación cooperativa de las diferentes proteínas para formar una estructura dinámica y la estabilidad es otorgada por la multiplicidad de interacciones débiles entre los componentes.

### **4.3 Modelo de acción de FtsEX.**

El resumen de la información obtenida en este trabajo se presenta en la figura 41.

Como se observa en la figura 41, tenemos que FtsEX es un nodo central (“checkpoint”), que conecta y mantiene la maquinaria de hidrólisis y síntesis del PG. Diversos estudios han descrito la necesidad de que ambas maquinarias se encuentren coordinadas. Algunos autores sugieren que el divisoma debe poseer un sistema que prevenga la activación de las enzimas que hidrolizan el PG hasta que el resto de la maquinaria esté ensamblada, y así la síntesis de PG pueda ser coordinada de forma precisa con la hidrólisis de este (Uehara *et al.*, 2010).

La interacción entre FtsQ y FtsX podría funcionar como un conector, el cual controla la activación de la hidrólisis solo si la síntesis del PG está ocurriendo. Diversos estudios muestran resultados similares, por ejemplo (Heidrich *et al.*, 2001) sugiere que PBP3 y las amidasas deben estar en un mismo complejo multiproteico para ser controladas adecuadamente. Cuando se genera un desacoplamiento entre estas dos maquinarias aparece, en el septo, una estructura de anillos, con una alta densidad electrónica, la que puede corresponder a un septo incompleto debido de la detención de la invaginación. Esta detención ocurre debido a la ausencia de las amidasas generando un aumento en la densidad del PG (Priyadarshini *et al.*, 2007).



**Figura 41. Sub-red de interacciones de FtsEX en el divisoma.** El transportador ABC conformado por FtsEX permite la conexión de la fase temprana y tardía de la

formación del divisoma, además es la primera proteína reclutada que conecta la formación del divisoma en el citoplasma y en el periplasma. Se muestran las constantes de disociación de cada una de las interacciones determinadas en este trabajo.

## 5 Conclusiones

1. FtsA purificada desde cuerpos de inclusión, mediante el método con detergente sarkosyl, no posee actividad ATPásica.
2. FtsE requiere de la chaperonina GroELS para plegarse *in vivo*.
3. FtsE adquiere estructura funcional al ser replegada en amortiguadr acetato pH 5.
4. FtsE replegada en acetato pH 5, une preferentemente ATP que ADP y une FtsZ de forma cooperativa.
5. La sobreexpresión de FtsX es tóxica para las bacterias. La toxicidad disminuye al co-expresar su compañera FtsE.
6. FtsX es solubilizada por los detergentes CHAPS, colato de sodio y DDM.
7. El dominio periplasmático de FtsX es capaz de oligomerizar, probablemente forma dímeros. Tanto el monómero como el oligómero interactúa con EnvC.
8. FtsQ interacción con el dominio periplasmático de FtsX con una constante de disociación en el rango  $\mu\text{M}$
9. FtsEX es un componente esencial del divisoma bacteriano y es un punto de control para la síntesis e hidrólisis del PG
10. Por primera vez se logra obtener FtsE soluble para realizar una caracterización bioquímica *in-vitro*.

## 6 Proyecciones

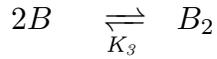
Este trabajo se enfocó en la descripción cuantitativa de las interacciones de una sub-red de interacciones del divisoma de *E. coli*. Es por esto que la proyección natural del trabajo consiste en la descripción completa de la red del divisoma, con el fin obtener información termodinámica de la maquinaria, lo que permitiría tener una comprensión mayor sobre la estabilidad y dinámica de este complejo. Esta información permitiría generar modelos matemáticos del divisoma para simular su formación y ayudar en el diseño de moléculas que bloqueen su formación. Este último

punto es de gran importancia debido a la necesidad de creación de nuevos antibióticos para contrarrestar la creciente resistencia a los antibióticos clásicos.

En esta línea se ha diseñado un péptido quimérico que posee una región del dominio periplasmático de FtsX y del dominio de captación de la microcina E492. De esta forma se desea utilizar la alta afinidad existente entre Xloop y EnvC para secuestrar este sistema de hidrólisis del PG. De esta forma, mediante la activación de la hidrólisis del PG en toda la superficie bacteriana se provoca la lisis celular. Ensayos con este péptido han mostrados resultados promisorios. Este péptido es capaz de inhibir la recuperación de esferoplastos de *E. coli in-vitro*. En estos momentos se están diseñando estrategias para aumentar las modificación post-traduccionales de este, con el fin de realizar estudios con bacterias patogénicas.

## Anexo I

Para la derivación de los modelos utilizados en el ajuste de los datos, se consideró siempre que Xloop (B) se encuentra en el equilibrio entre monómero y dímero, con una constante de disociación  $K_3$  de 1600 nM.



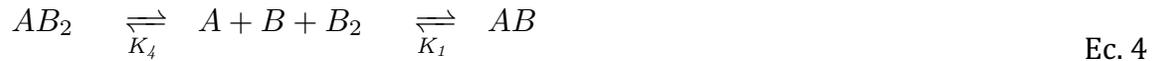
Ec. 1

Como la concentración de B es conocida, al igual que la constante de disociación  $K_3$ , se puede calcular la concentración de monómero y de dímero para cada concentración, utilizando las ecuaciones (2) y (3),

$$[B] = \frac{-K_d + \sqrt{K_d^2 + 8K_d[B_T]}}{4} \quad \text{Ec. 2}$$

$$[B_2] = \frac{4[B_T] + K_d - \sqrt{K_d^2 + 8K_d[B_T]}}{8} \quad \text{Ec. 3}$$

El modelo mediado consiste en una interacción competitiva del monómero y el dímero de Xloop (B) por EnvC (A),



donde,

$$K_1 = \frac{[A][B]}{[AB]} \quad \text{Ec.5}$$

$$k_4 = \frac{[A][B_2]}{[AB_2]} \quad \text{Ec.6}$$

Tomando en cuenta que existe una competencia por A, podemos sustituir las concentraciones de AB y  $AB_2$ ,

$$[AB] = [A_T] - [A] - [AB_2] \quad \text{Ec. 7}$$

$$[AB_2] = [A_T] - [A] - [AB] \quad \text{Ec. 8}$$

Reemplazando para  $K_1$  (Ec. 5) y reordenando obtenemos,

$$[A] = \frac{K_1[A_T] - K_1[AB_2]}{[B] + K_1} \quad \text{Ec. 9}$$

y si esto es reemplazado en la ecuación 6 y reordenamos obtenemos que,

$$\frac{[AB_2]}{[A_T]} = \frac{K_1[B_2]}{K_4[B] + K_1K_4 + K_1[B_2]} \quad \text{Ec. 10}$$

Reemplazando para [A] en función de K2 y reemplazando en la ecuación 5 obtenemos que,

$$\frac{[AB]}{[A_T]} = \frac{K_4[B]}{K_4[B_2] + K_1K_4 + K_4[B]} \quad \text{Ec. 11}$$

Utilizamos las ecuaciones 10 y 11 para ajustar los datos experimentales. Este modelo corresponde a la presencia de monómero y dímero de B y ambos unen A independientemente, por lo que existe una competencia por A.

$$Y = (\text{baseline} + (A1 * [AB]/[A_T]) + (A2 * [AB_2]/[A_T])) \quad \text{Ec. 12}$$

En la ecuación 12 *baseline* corresponde a la señal de termoforesis inicial, sin agregar ligando, A1 y A2 corresponde a las amplitudes de la señal debido a la formación de AB y AB<sub>2</sub>, respectivamente y K<sub>1</sub> y K<sub>4</sub> corresponde a las constante de disociación al equilibrio. El ajuste de los datos experimentales nos entrega los parámetros *baseline*, A1, A2, K<sub>1</sub> y K<sub>4</sub>,

Para el modelo facilitado en cambio, se asumió que existía una unión secuencial de Xloop (B) a EnvC (A), en donde se forma un intermediario, a AB, necesario para la unión de un segundo B. Además hay un equilibrio simultaneo de la dimerización de Xloop.



A partir de estos equilibrios podemos escribir las ecuaciones para K<sub>1</sub> y K<sub>2</sub>,

$$K_1 = \frac{[A][B]}{[AB]} \quad \text{Ec. 14}$$

$$K_2 = \frac{[AB][B]}{[AB_2]} \quad \text{Ec. 15}$$

La concentración de A total consiste en A libre, AB y AB<sub>2</sub>. Ahora la concentración total de B se puede describir de la siguiente manera,

$$[B_T] = [B] + 2[B_2] + \overset{0}{\cancel{[AB]}} + 2\overset{0}{\cancel{[AB_2]}} \quad \text{Ec. 16}$$

Como la concentración de A es muy baja en relación a las K<sub>d</sub>, la concentración de AB y AB<sub>2</sub> son despreciables.

Reemplazando en ec. 14 [B] y [A] y reordenando obtenemos,

$$\frac{[AB]}{[A_T]} = \frac{(2[B_2] - [B_T])([AB_2] - [A_T])}{K_1 + [B_T] - 2[B_2][A_T]} \quad \text{Ec. 17}$$

Por otro lado, si reemplazamos en la ecuación 15 para despejar [AB<sub>2</sub>],

$$\frac{[AB_2]}{[A_T]} = \frac{[B_T] - 2[B_2]}{K_2 + [B_T] - 2[B_2]} \quad \text{Ec. 18}$$

Utilizando las ecuaciones 17 y 18 se ajustó los datos experimentales a la siguiente ecuación,

$$Y = baseline + (A1 * \frac{[AB]}{[A_T]}) + ((A1 + A2) * \frac{[AB_2]}{[A_T]}) \quad \text{Ec. 19}$$

Al igual que el ajuste del otro modelo, los parámetros *baseline*, A1, A2, K<sub>1</sub> y K<sub>2</sub> fueron determinados.

## Referencias.

- Aarsman, M. E. G., Piette, A., Fraipont, C., Vinkenvleugel, T. M. F., Nguyen-Distèche, M. & Blaauwen, Den, T. (2005).** Maturation of the Escherichia coli divisome occurs in two steps. *Molecular Microbiology* **55**, 1631–1645.
- Adams, D. W. & Errington, J. (2009).** Bacterial cell division: assembly, maintenance and disassembly of the Z ring. *Nat Rev Micro* **7**, 642–653.
- Alexeeva, S., Gadella, T. W. J., Verheul, J., Verhoeven, G. S. & Blaauwen, Den, T. (2010).** Direct interactions of early and late assembling division proteins in Escherichia coli cells resolved by FRET. *Molecular Microbiology* **77**, 384–398.
- Andersen, N. H., Liu, Z. & Prickett, K. S. (1996).** Efforts toward deriving the CD spectrum of a 3(10) helix in aqueous medium. *FEBS Letters* **399**, 47–52.
- Arends, S. J. R., Kustus, R. J. & Weiss, D. S. (2009).** ATP-binding site lesions in FtsE impair cell division. *Journal of Bacteriology* **191**, 3772–3784.
- Bernhardt, T. G. & de Boer, P. A. J. (2003).** The Escherichia coli amidase AmiC is a periplasmic septal ring component exported via the twin-arginine transport pathway. *Molecular Microbiology* **48**, 1171–1182.
- Bernhardt, T. G. & de Boer, P. A. J. (2005).** SlmA, a nucleoid-associated, FtsZ binding protein required for blocking septal ring assembly over Chromosomes in E. coli. *Molecular Cell* **18**, 555–564.
- Bi, E. & Lutkenhaus, J. (1993).** Cell division inhibitors Sula and MinCD prevent formation of the FtsZ ring. *Journal of Bacteriology* **175**, 1118–1125.
- Blaauwen, Den, T. (2013).** Prokaryotic cell division: flexible and diverse. *Current Opinion in Microbiology* **16**, 738–744.
- Buddelmeijer, N. & Beckwith, J. (2004).** A complex of the Escherichia coli cell division proteins FtsL, FtsB and FtsQ forms independently of its localization to the septal region. *Molecular Microbiology* **52**, 1315–1327.
- Buist, G., Steen, A., Kok, J. & Kuipers, O. P. (2008).** LysM, a widely distributed protein motif for binding to (peptido)glycans. *Molecular Microbiology* **68**, 838–847.
- Busiek, K. K., Eraso, J. M., Wang, Y. & Margolin, W. (2012).** The early divisome protein FtsA interacts directly through its 1c subdomain with the cytoplasmic

- domain of the late divisome protein FtsN. *Journal of Bacteriology* **194**, 1989–2000.
- Chen, J. C. & Beckwith, J. (2001).** FtsQ, FtsL and FtsI require FtsK, but not FtsN, for co-localization with FtsZ during *Escherichia coli* cell division. *Molecular Microbiology* **42**, 395–413.
- Chen, J. C., Weiss, D. S., Ghigo, J. M. & Beckwith, J. (1999).** Septal localization of FtsQ, an essential cell division protein in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **181**, 521–530.
- Chen, J. C., Minev, M. & Beckwith, J. (2002).** Analysis of ftsQ mutant alleles in *Escherichia coli*: complementation, septal localization, and recruitment of downstream cell division proteins. *Journal of Bacteriology* **184**, 695–705.
- Chen, Y. & Erickson, H. P. (2005).** Rapid in vitro assembly dynamics and subunit turnover of FtsZ demonstrated by fluorescence resonance energy transfer. *J Biol Chem* **280**, 22549–22554.
- Chen, Y., Milam, S. L. & Erickson, H. P. (2012).** SulA inhibits assembly of FtsZ by a simple sequestration mechanism. *Biochemistry* **51**, 3100–3109.
- Columbus, L., Lipfert, J., Klock, H., Millett, I., Doniach, S. & Lesley, S. A. (2006).** Expression, purification, and characterization of *Thermotoga maritima* membrane proteins for structure determination. *Protein Sci* **15**, 961–975.
- Corbin, B. D., Geissler, B., Sadasivam, M. & Margolin, W. (2004).** Z-ring-independent interaction between a subdomain of FtsA and late septation proteins as revealed by a polar recruitment assay. *Journal of Bacteriology* **186**, 7736–7744.
- Corbin, B. D., Wang, Y., Beuria, T. K. & Margolin, W. (2007).** Interaction between cell division proteins FtsE and FtsZ. *Journal of Bacteriology* **189**, 3026–3035.
- Dajkovic, A., Lan, G., Sun, S. X., Wirtz, D. & Lutkenhaus, J. (2008).** MinC spatially controls bacterial cytokinesis by antagonizing the scaffolding function of FtsZ. *Curr Biol* **18**, 235–244.
- de Boer, P. A. J. (2010).** Advances in understanding *E. coli* cell fission. *Current Opinion in Microbiology* **13**, 730–737.
- de Souza, R. F., Anantharaman, V., de Souza, S. J., Aravind, L. & Gueiros-Filho, F. J. (2008).** AMIN domains have a predicted role in localization of diverse periplasmic protein complexes. *Bioinformatics* **24**, 2423–2426.
- Dechavanne, V., Barrillat, N., Borlat, F., Hermant, A., Magnenat, L., Paquet, M., Antonsson, B. & Chevalet, L. (2011).** A high-throughput protein refolding screen in 96-well format combined with design of experiments to optimize the refolding

conditions. *Protein Expression and Purification* **75**, 192–203.

**Dewar, S. J., Begg, K. J. & Donachie, W. D. (1992).** Inhibition of cell division initiation by an imbalance in the ratio of FtsA to FtsZ. *Journal of Bacteriology* **174**, 6314–6316.

**Di Lallo, G. (2003).** Use of a two-hybrid assay to study the assembly of a complex multicomponent protein machinery: bacterial septosome differentiation. *Microbiology* **149**, 3353–3359.

**Di Ventura, B., Knecht, B., Andreas, H., Godinez, W. J., Fritsche, M., Rohr, K., Nickel, W., Heermann, D. W. & Sourjik, V. (2013).** Chromosome segregation by the Escherichia coli Min system. *Molecular Systems Biology* **9**, 686.

**Din, N., Quardokus, E. M., Sackett, M. J. & Brun, Y. V. (1998).** Dominant C-terminal deletions of FtsZ that affect its ability to localize in Caulobacter and its interaction with FtsA. *Molecular Microbiology* **27**, 1051–1063.

**Drew, D., Lerch, M., Kunji, E., Slotboom, D.-J. & de Gier, J.-W. (2006).** Optimization of membrane protein overexpression and purification using GFP fusions. *Nat Methods* **3**, 303–313.

**Drew, D., Newstead, S., Sonoda, Y., Kim, H., Heijne, von, G. & Iwata, S. (2008).** GFP-based optimization scheme for the overexpression and purification of eukaryotic membrane proteins in Saccharomyces cerevisiae. *Nat Protoc* **3**, 784–798.

**Duhr, S. & Braun, D. (2006).** Why molecules move along a temperature gradient. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 19678–19682.

**Erickson, H. P. (2009).** Modeling the physics of FtsZ assembly and force generation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 9238–9243.

**Eriks, L. R., Mayor, J. A. & Kaplan, R. S. (2003).** A strategy for identification and quantification of detergents frequently used in the purification of membrane proteins. *Analytical Biochemistry* **323**, 234–241.

**Errington, J., Daniel, R. A. & Scheffers, D.-J. (2003).** Cytokinesis in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **67**, 52–65– table of contents.

**Feucht, A., Lucet, I., Yudkin, M. D. & Errington, J. (2001).** Cytological and biochemical characterization of the FtsA cell division protein of Bacillus subtilis. *Molecular Microbiology* **40**, 115–125.

**Firczuk, M., Mucha, A. & Bochtler, M. (2005).** Crystal structures of active LytM. *Journal of Molecular Biology* **354**, 578–590.

- Fraipont, C., Alexeeva, S., Wolf, B., van der Ploeg, R., Schloesser, M., Blaauwen, Den, T. & Nguyen-Distèche, M. (2011).** The integral membrane FtsW protein and peptidoglycan synthase PBP3 form a subcomplex in *Escherichia coli*. *Microbiology* **157**, 251–259.
- Frangioni, J. V. & Neel, B. G. (1993).** Solubilization and purification of enzymatically active glutathione S-transferase (pGEX) fusion proteins. *Analytical Biochemistry* **210**, 179–187.
- Frankel, S., Sohn, R. & Leinwand, L. (1991).** The use of sarkosyl in generating soluble protein after bacterial expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **88**, 1192–1196.
- Fu, G., Huang, T., Buss, J., Coltharp, C., Hensel, Z. & Xiao, J. (2010).** In vivo structure of the *E. coli* FtsZ-ring revealed by photoactivated localization microscopy (PALM). *PLoS ONE* **5**, e12682.
- Fu, X., Shih, Y. L., Zhang, Y. & Rothfield, L. I. (2001).** The MinE ring required for proper placement of the division site is a mobile structure that changes its cellular location during the *Escherichia coli* division cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**, 980–985.
- Fujiwara, K., Ishihama, Y., Nakahigashi, K., Soga, T. & Taguchi, H. (2010).** A systematic survey of in vivo obligate chaperonin-dependent substrates. *The EMBO Journal* **29**, 1552–1564.
- Fujiwara, K. & Taguchi, H. (2007).** Filamentous morphology in GroE-depleted *Escherichia coli* induced by impaired folding of FtsE. *Journal of Bacteriology* **189**, 5860–5866.
- Gallardo, R. (2006).** *Purificación de la proteína FtsA de Escherichia coli y caracterización de su actividad ATPásica*. Tesis de Doctorado, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Galli, E. & Gerdes, K. (2012).** FtsZ-ZapA-ZapB interactome of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **194**, 292–302.
- Gamba, P., Veening, J.-W., Saunders, N. J., Hamoen, L. W. & Daniel, R. A. (2009).** Two-step assembly dynamics of the *Bacillus subtilis* divisome. *Journal of Bacteriology* **191**, 4186–4194.
- Gonzalez, M. D. & Beckwith, J. (2009).** Divisome under construction: distinct domains of the small membrane protein FtsB are necessary for interaction with multiple cell division proteins. *Journal of Bacteriology* **191**, 2815–2825.
- Green, M. R. & Sambrook, J. (2012).** *Molecular Cloning*.

- Gueiros-Filho, F. J. & Losick, R. (2002).** A widely conserved bacterial cell division protein that promotes assembly of the tubulin-like protein FtsZ. *Genes & Development* **16**, 2544–2556.
- Hale, C. A. & de Boer, P. A. J. (2002).** ZipA is required for recruitment of FtsK, FtsQ, FtsL, and FtsN to the septal ring in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **184**, 2552–2556.
- Haney, S. A., 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.
- Hara, H., Narita, S., Karibian, D., Park, J. T., Yamamoto, Y. & Nishimura, Y. (2002).** Identification and characterization of the *Escherichia coli* envC gene encoding a periplasmic coiled-coil protein with putative peptidase activity. *FEMS Microbiology Letters* **212**, 229–236.
- Hays, F. A., Roe-Zurz, Z. & Stroud, R. M. (2010).** Overexpression and purification of integral membrane proteins in yeast. *Meth Enzymol* **470**, 695–707.
- Heidrich, C., Templin, M. F., Ursinus, A., Merdanovic, M., Berger, J., Schwarz, H., de Pedro, M. A. & Höltje, J. V. (2001).** Involvement of N-acetylmuramyl-L-alanine amidases in cell separation and antibiotic-induced autolysis of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* **41**, 167–178.
- Horwich, A. L. & Fenton, W. A. (2009).** Chaperonin-mediated protein folding: using a central cavity to kinetically assist polypeptide chain folding. *Q Rev Biophys* **42**, 83–116.
- Hu, Z. & Lutkenhaus, J. (1999).** Topological regulation of cell division in *Escherichia coli* involves rapid pole to pole oscillation of the division inhibitor MinC under the control of MinD and MinE. *Molecular Microbiology* **34**, 82–90.
- Hu, Z. & Lutkenhaus, J. (2000).** Analysis of MinC reveals two independent domains involved in interaction with MinD and FtsZ. *Journal of Bacteriology* **182**, 3965–3971.
- Hu, Z., Gogol, E. P. & Lutkenhaus, J. (2002).** Dynamic assembly of MinD on phospholipid vesicles regulated by ATP and MinE. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**, 6761–6766.
- Huang, K.-H., Durand-Heredia, J. & Janakiraman, A. (2013).** FtsZ ring stability: of bundles, tubules, crosslinks, and curves. *Journal of Bacteriology* **195**, 1859–1868.

- Huecas, S. & Andreu, J. M. (2004).** Polymerization of nucleotide-free, GDP- and GTP-bound cell division protein FtsZ: GDP makes the difference. *FEBS Letters* **569**, 43–48.
- Ikeda, M., Sato, T., Wachi, M., Jung, H. K., Ishino, F., Kobayashi, Y. & Matsuhashi, M. (1989).** Structural similarity among *Escherichia coli* FtsW and RodA proteins and *Bacillus subtilis* SpoVE protein, which function in cell division, cell elongation, and spore formation, respectively. *Journal of Bacteriology* **171**, 6375–6378.
- Ito, Y., Kanamaru, K., Taniguchi, N., Miyamoto, S. & Tokuda, H. (2006).** A novel ligand bound ABC transporter, LolCDE, provides insights into the molecular mechanisms underlying membrane detachment of bacterial lipoproteins. *Molecular Microbiology* **62**, 1064–1075.
- Karimova, G., Dautin, N. & Ladant, D. (2005).** Interaction network among *Escherichia coli* membrane proteins involved in cell division as revealed by bacterial two-hybrid analysis. *Journal of Bacteriology* **187**, 2233–2243.
- Kerner, M. J., Naylor, D. J., Ishihama, Y., Maier, T., Chang, H.-C., Stines, A. P., Georgopoulos, C., Frishman, D., Hayer-Hartl, M. & other authors. (2005).** Proteome-wide analysis of chaperonin-dependent protein folding in *Escherichia coli*. *Cell* **122**, 209–220.
- Kitagawa, M., Ara, T., Arifuzzaman, M., Ioka-Nakamichi, T., Inamoto, E., Toyonaga, H. & Mori, H. (2005).** Complete set of ORF clones of *Escherichia coli* ASKA library (a complete set of *E. coli* K-12 ORF archive): unique resources for biological research. *DNA Res* **12**, 291–299.
- Lan, G., Daniels, B. R., Dobrowsky, T. M., Wirtz, D. & Sun, S. X. (2009).** Condensation of FtsZ filaments can drive bacterial cell division. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 121–126.
- Lara, B. & Ayala, J. A. (2002).** Topological characterization of the essential *Escherichia coli* cell division protein FtsW. *FEMS Microbiology Letters* **216**, 23–32.
- Lara, B., Rico, A. I., Petruzzelli, S., Santona, A., Dumas, J., Biton, J., Vicente, M., Mingorance, J. & Massidda, O. (2005).** Cell division in cocci: localization and properties of the *Streptococcus pneumoniae* FtsA protein. *Molecular Microbiology* **55**, 699–711.
- Lenarcic, R., Halbedel, S., Visser, L., Shaw, M., Wu, L. J., Errington, J., Marenduzzo, D. & Hamoen, L. W. (2009).** Localisation of DivIVA by targeting to negatively curved membranes. *The EMBO Journal* **28**, 2272–2282.
- Li, Y., Hsin, J., Zhao, L., Cheng, Y., Shang, W., Huang, K. C., Wang, H.-W. & Ye, S. (2013).** FtsZ protofilaments use a hinge-opening mechanism for constrictive force

- generation. *Science* **341**, 392–395.
- Lin, H. T., Bavro, V. N., Barrera, N. P., Frankish, H. M., Velamakanni, S., van Veen, H. W., Robinson, C. V., Borges-Walmsley, M. I. & Walmsley, A. R. (2009).** MacB ABC transporter is a dimer whose ATPase activity and macrolide-binding capacity are regulated by the membrane fusion protein MacA. *J Biol Chem* **284**, 1145–1154.
- Loll, P. J. (2003).** Membrane protein structural biology: the high throughput challenge. *J Struct Biol* **142**, 144–153.
- Loose, M. & Mitchison, T. J. (2013).** The bacterial cell division proteins FtsA and FtsZ self-organize into dynamic cytoskeletal patterns. *Nat Cell Biol*.
- Louis-Jeune, C., Andrade-Navarro, M. A. & Perez-Iratxeta, C. (2011).** Prediction of protein secondary structure from circular dichroism using theoretically derived spectra. *Proteins*.
- Lu, C., Reedy, M. & Erickson, H. P. (2000).** Straight and curved conformations of FtsZ are regulated by GTP hydrolysis. *Journal of Bacteriology* **182**, 164–170.
- Lutkenhaus, J. & Addinall, S. G. (1997).** Bacterial cell division and the Z ring. *Annu Rev Biochem* **66**, 93–116.
- Ma, X. & Margolin, W. (1999).** Genetic and functional analyses of the conserved C-terminal core domain of Escherichia coli FtsZ. *Journal of Bacteriology* **181**, 7531–7544.
- Maggi, S., Massidda, O., Luzi, G., Fadda, D., Paolozzi, L. & Ghelardini, P. (2008).** Division protein interaction web: identification of a phylogenetically conserved common interactome between Streptococcus pneumoniae and Escherichia coli. *Microbiology (Reading, Engl)* **154**, 3042–3052.
- Marek, M., Milles, S., Schreiber, G., Daleke, D. L., Dittmar, G., Herrmann, A., Müller, P. & Pomorski, T. G. (2011).** The yeast plasma membrane ATP binding cassette (ABC) transporter Aus1: purification, characterization, and the effect of lipids on its activity. *J Biol Chem* **286**, 21835–21843.
- Martos, A., Monterroso, B., Zorrilla, S., Reija, B., Alfonso, C., Mingorance, J., Rivas, G. & Jiménez, M. (2012).** Isolation, characterization and lipid-binding properties of the recalcitrant FtsA division protein from Escherichia coli. *PLoS ONE* **7**, e39829.
- Mohammadi, T., van Dam, V., Sijbrandi, R., Vernet, T., Zapun, A. E., Bouhss, A., Bruin, M. D.-D., che, M. N.-D. E., Ben de Kruijff & Breukink, E. (2011).** Identification of FtsW as a transporter of lipid-linked cell wall precursors across the membrane. *The EMBO Journal* **30**, 1425–1432.

- Mosyak, L., Zhang, Y., Glasfeld, E., Haney, S., Stahl, M., Seehra, J. & Somers, W. S. (2000).** The bacterial cell-division protein ZipA and its interaction with an FtsZ fragment revealed by X-ray crystallography. *The EMBO Journal* **19**, 3179–3191.
- Moy, F. J., Glasfeld, E., Mosyak, L. & Powers, R. (2000).** Solution structure of ZipA, a crucial component of Escherichia coli cell division. *Biochemistry* **39**, 9146–9156.
- Narita, S.-I. (2011).** ABC transporters involved in the biogenesis of the outer membrane in gram-negative bacteria. *Biosci Biotechnol Biochem* **75**, 1044–1054.
- Natale, P., Pazos, M. & Vicente, M. (2013).** The Escherichia coli divisome: born to divide. *Environ Microbiol.*
- Nova, E., Montecinos, F., Brunet, J. E., Lagos, R. & Monasterio, O. (2007).** 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) induces bundling of Escherichia coli FtsZ polymers inhibiting the GTPase activity. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **465**, 315–319.
- Orchard, S., Ammari, M., Aranda, B., Breuza, L., Briganti, L., Broackes-Carter, F., Campbell, N. H., Chavali, G., Chen, C. & other authors. (2014).** The MIntAct project--IntAct as a common curation platform for 11 molecular interaction databases. *Nucleic Acids Research* **42**, D358–63.
- Osawa, M., Anderson, D. E. & Erickson, H. P. (2008).** Reconstitution of contractile FtsZ rings in liposomes. *Science* **320**, 792–794.
- Osawa, M. & Erickson, H. P. (2013).** Liposome division by a simple bacterial division machinery. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**, 11000–11004.
- Paradis-Bleau, C., Sanschagrín, F. & Levesque, R. C. (2005).** Peptide inhibitors of the essential cell division protein FtsA. *Protein Eng Des Sel* **18**, 85–91.
- Peters, N. T., Dinh, T. & Bernhardt, T. G. (2011).** A fail-safe mechanism in the septal ring assembly pathway generated by the sequential recruitment of cell separation amidases and their activators. *Journal of Bacteriology* **193**, 4973–4983.
- Peters, N. T., Morlot, C., Yang, D. C., Uehara, T., Vernet, T. & Bernhardt, T. G. (2013).** Structure-function analysis of the LytM domain of EnvC, an activator of cell wall remodelling at the Escherichia coli division site. *Molecular Microbiology* **89**, 690–701.
- Pichoff, S. & Lutkenhaus, J. (2002).** Unique and overlapping roles for ZipA and FtsA in septal ring assembly in Escherichia coli. *The EMBO Journal* **21**, 685–693.
- Priyadarshini, R., de Pedro, M. A. & Young, K. D. (2007).** Role of peptidoglycan

amidases in the development and morphology of the division septum in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **189**, 5334–5347.

**Raskin, D. M. & de Boer, P. A. (1999).** Rapid pole-to-pole oscillation of a protein required for directing division to the middle of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**, 4971–4976.

**RayChaudhuri, D. (1999).** ZipA is a MAP-Tau homolog and is essential for structural integrity of the cytokinetic FtsZ ring during bacterial cell division. *The EMBO Journal* **18**, 2372–2383.

**Ricard, M. & Hirota, Y. (1973).** Process of cellular division in *Escherichia coli*: physiological study on thermosensitive mutants defective in cell division. *Journal of Bacteriology* **116**, 314–322.

**Rico, A. I., García-Ovalle, M., Mingorance, J. & Vicente, M. (2004).** Role of two essential domains of *Escherichia coli* FtsA in localization and progression of the division ring. *Molecular Microbiology* **53**, 1359–1371.

**Rico, A. I., García-Ovalle, M., Palacios, P., Casanova, M. & Vicente, M. (2010).** Role of *Escherichia coli* FtsN protein in the assembly and stability of the cell division ring. *Molecular Microbiology* **76**, 760–771.

**Robichon, C., Karimova, G., Beckwith, J. & Ladant, D. (2011).** Role of leucine zipper motifs in association of the *Escherichia coli* cell division proteins FtsL and FtsB. *Journal of Bacteriology* **193**, 4988–4992.

**Sánchez, M., Valencia, A., Ferrándiz, M. J., Sander, C. & Vicente, M. (1994).** Correlation between the structure and biochemical activities of FtsA, an essential cell division protein of the actin family. *The EMBO Journal* **13**, 4919–4925.

**Schmidt, K. L., Peterson, N. D., Kustus, R. J., Wissel, M. C., Graham, B., Phillips, G. J. & Weiss, D. S. (2004).** A predicted ABC transporter, FtsEX, is needed for cell division in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **186**, 785–793.

**Sham, L.-T., Barendt, S. M., Kopecky, K. E. & Winkler, M. E. (2011).** Essential PcsB putative peptidoglycan hydrolase interacts with the essential FtsXSpn cell division protein in *Streptococcus pneumoniae* D39. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**, E1061–9.

**Sham, L.-T., Jensen, K. R., Bruce, K. E. & Winkler, M. E. (2013).** Involvement of FtsE ATPase and FtsX Extracellular Loops 1 and 2 in FtsEX-PcsB Complex Function in Cell Division of *Streptococcus pneumoniae* D39. *MBio* **4**.

**Shiomi, D. & Margolin, W. (2007).** The C-terminal domain of MinC inhibits assembly of the Z ring in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **189**, 236–243.

- Studier, F. W. (2005).** Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expression and Purification* **41**, 207–234.
- Sung, M.-T., Lai, Y.-T., Huang, C.-Y., Chou, L.-Y., Shih, H.-W., Cheng, W.-C., Wong, C.-H. & Ma, C. (2009).** Crystal structure of the membrane-bound bifunctional transglycosylase PBP1b from *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 8824–8829.
- Szwedziak, P., Wang, Q., Freund, S. M. & we, J. L. O. (2012).** FtsA forms actin-like protofilaments. *The EMBO Journal* **31**, 2249–2260.
- Tao, H., Liu, W., Simmons, B. N., Harris, H. K., Cox, T. C. & Massiah, M. A. (2010).** Purifying natively folded proteins from inclusion bodies using sarkosyl, Triton X-100, and CHAPS. *BioTechniques* **48**, 61–64.
- Thanbichler, M. (2010).** Synchronization of chromosome dynamics and cell division in bacteria. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **2**, a000331.
- Tonthat, N. K., Milam, S. L., Chinnam, N., Whitfill, T., Margolin, W. & Schumacher, M. A. (2013).** SlmA forms a higher-order structure on DNA that inhibits cytokinetic Z-ring formation over the nucleoid. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**, 10586–10591.
- Tonthat, N. K., Arold, S. T., Pickering, B. F., Van Dyke, M. W., Liang, S., Lu, Y., Beuria, T. K., Margolin, W. & Schumacher, M. A. (2011).** Molecular mechanism by which the nucleoid occlusion factor, SlmA, keeps cytokinesis in check. *The EMBO Journal* **30**, 154–164.
- Trueba, F. J. (1982).** On the precision and accuracy achieved by *Escherichia coli* cells at fission about their middle. *Archives of Microbiology* **131**, 55–59.
- Uehara, T., Dinh, T. & Bernhardt, T. G. (2009).** LytM-domain factors are required for daughter cell separation and rapid ampicillin-induced lysis in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **191**, 5094–5107.
- Uehara, T., Parzych, K. R., Dinh, T. & Bernhardt, T. G. (2010).** Daughter cell separation is controlled by cytokinetic ring-activated cell wall hydrolysis. *The EMBO Journal* **29**, 1412–1422.
- van den Berg van Saparoea, H. B., Glas, M., Vernooij, I. G. W. H., Bitter, W., Blaauwen, Den, T. & Luirink, J. (2013).** Fine mapping the contact sites of *Escherichia coli* cell division proteins FtsB and FtsL on FtsQ. *J Biol Chem* **288**, 24340–24350.
- van den Ent, F. & Löwe, J. (2000).** Crystal structure of the cell division protein FtsA

- from *Thermotoga maritima*. *The EMBO Journal* **19**, 5300–5307.
- van den Ent, F., Vinkenvleugel, T. M. F., Ind, A., West, P., Veprintsev, D., Nanninga, N., Blaauwen, Den, T. & Löwe, J. (2008)**. Structural and mutational analysis of the cell division protein FtsQ. *Molecular Microbiology* **68**, 110–123.
- van der Ploeg, R., Verheul, J., Vischer, N. O. E., Alexeeva, S., Hoogendoorn, E., Postma, M., Banzhaf, M., Vollmer, W. & Blaauwen, Den, T. (2013)**. Colocalization and interaction between elongasome and divisome during a preparative cell division phase in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* **87**, 1074–1087.
- Vicente, M. & Löwe, J. (2003)**. Ring, helix, sphere and cylinder: the basic geometry of prokaryotic cell division. In *EMBO Rep*, pp. 655–660. Presented at the EMBO reports.
- Villanelo, F., Ordenes, A., Brunet, J., Lagos, R. & Monasterio, O. (2011)**. A model for the *Escherichia coli* FtsB/FtsL/FtsQ cell division complex. *BMC Structural Biology* **11**, 28.
- Vollmer, W., Joris, B. & Charlier, P. (2008)**. Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases - Vollmer - 2008 - FEMS Microbiology Reviews - Wiley Online Library. *FEMS microbiology* **32**, 259-286.
- Wagner, S., Baars, L., Ytterberg, A. J., Klussmeier, A., Wagner, C. S., Nord, O., Nygren, P.-A., van Wijk, K. J. & de Gier, J.-W. (2007)**. Consequences of membrane protein overexpression in *Escherichia coli*. *Mol Cell Proteomics* **6**, 1527–1550.
- Wagner, S., Bader, M. L., Drew, D. & de Gier, J.-W. (2006)**. Rationalizing membrane protein overexpression. *Trends in Biotechnology* **24**, 364–371.
- Weinstein, D. (2009)**. *Determinación de la interacción de FtsA con FtsZ y su influencia sobre la actividad ATPásica de una preparación de FtsA*. Tesis para optar al grado de Ingeniero en Biotecnología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Yamaguchi, S., Yamamoto, E., Mannen, T. & Nagamune, T. (2013)**. Protein refolding using chemical refolding additives. *Biotechnol J* **8**, 17–31.
- Yang, D. C., Peters, N. T., Parzych, K. R., Uehara, T., Markovski, M. & Bernhardt, T. G. (2011a)**. An ATP-binding cassette transporter-like complex governs cell-wall hydrolysis at the bacterial cytokinetic ring. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**, E1052–60.
- Yang, D. C., Peters, N. T., Parzych, K. R., Uehara, T., Markovski, M. & Bernhardt, T. G. (2011b)**. An ATP-binding cassette transporter-like complex governs cell-wall

hydrolysis at the bacterial cytokinetic ring. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**, E1052–60.

**Yang, D. C., Tan, K., Joachimiak, A. & Bernhardt, T. G. (2012).** A conformational switch controls cell wall-remodelling enzymes required for bacterial cell division. *Molecular Microbiology* **85**, 768–781.

**Yim, L., Vandenbussche, G., Mingorance, J., Rueda, S., Casanova, M., Ruyschaert, J. M. & Vicente, M. (2000).** Role of the carboxy terminus of Escherichia coli FtsA in self-interaction and cell division. *Journal of Bacteriology* **182**, 6366–6373.

**Yu, X. C., Tran, A. H., Sun, Q. & Margolin, W. (1998).** Localization of cell division protein FtsK to the Escherichia coli septum and identification of a potential N-terminal targeting domain. *Journal of Bacteriology* **180**, 1296–1304.