

UCH-FC
Biotecnología
M244G
C.I



FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

CARACTERIZACIÓN DE LA POLIMERIZACIÓN Y ACTIVIDAD GTPASA DE FTSZ
DE *METHANOCOCCUS JANNASCHII* A DISTINTAS TEMPERATURAS

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

Por

Paula Andrea Maldonado Villavicencio

Director de Seminario de Título: Dr. Octavio Monasterio Opazo

Co-Directora: Dr. Rosalba Lagos Mónaco

Junio, 2010

Santiago – Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por la **SRTA. PAULA ANDREA MALDONADO VILLAVICENCIO**

“Caracterización de la polimerización y actividad GTPasa de FtsZ de *Methanococcus jannaschii* a distintas temperaturas”

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

Dr. Octavio Monasterio Opazo
Director Seminario de Título

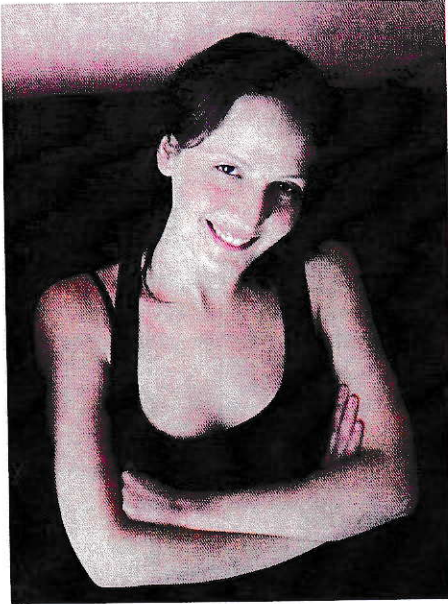
Comisión de Evaluación

Dr. Osvaldo Alvarez Araya
Presidente Comisión

Dr. Ricardo Cabrera Paucar
Evaluador



Santiago de Chile, noviembre de 2011.



Nací en Santiago, en la comuna de Recoleta un primero de agosto de 1985, después de aferrarme por todo un día al vientre de mi madre. Luego, me aferré al coche... hasta que tardíamente emprendí rumbo. Tuve una infancia llena de tardes de juego, callejeo, aseo doméstico e introversión. Ya en el pequeño colegio de la esquina de mi casa despertó en mí la curiosidad por saber qué había más adentro de todo, cuando una profesora empezó a enseñarnos de cosas llamadas átomos que formaban todo lo que nos rodeaba. Entré al Liceo N° 1 Javiera Carrera, donde transcurrió la mayor parte de mi adolescencia rodeada del ruido del centro de Santiago, de micros con frenos ruidosos, del permanente ruido de conversaciones incesantes característico de un colegio de niñas... aquí aprendí a tejer y bordar, también a hacer lámparas de yeso. Así, descubrí mi vocación por el hogar y decidí entrar a la Universidad de Chile a estudiar Ingeniería en Biotecnología Molecular para ser una dueña de casa ilustrada. Aún no me siento lo suficientemente ilustrada, así que seguiré trabajando arduamente por estar a la altura.

AGRADECIMIENTOS

A todos los integrantes del Laboratorio de Biología estructural y molecular, en especial a los Drs. Octavio Monasterio y Rosalba Lagos, que me recibieron en el laboratorio hace bastantes años cuando era una estudiante de tercer año y me dieron la oportunidad de aprehender el mundo de la investigación siendo muy joven.

A Felipe Montecinos, que me enseñó el trabajo de mesón y que compartió conmigo muchas anécdotas y peleas; a César Díaz que permanentemente me desafiaba a ser un “Bioquímico durooo”.

A todos mis compañeros de laboratorio: Alexis Órdenes, Luis Pouchuq, David Weinstein, Felipe Hurtado, Gissela Araya, Daniela Muñoz, Beatriz Gonzales, Jorge Flores, Mario F. H. Leiva, Felipe Villanelo, Yerko Escalona, Marisol Espinosa, María José Gallardo y Cristian Escobar, con quienes compartí celebraciones, conversaciones y, los ires y venires de la biología molecular, las proteínas y las bacterias. A todos Uds. Gracias.

A mi familia que me dio el cariño, la comprensión y un nido al que pertenecer toda mi vida. A mi hermano Felipe que fue un ejemplo en mi temprana niñez; a Ignacio que fue mi compañero; a Camila y Gonzalo que son los enanos que muchas veces me dan fuerzas para ser mejor por ellos. Gracias por la oportunidad y la potencialidad que me entregaron de ser quién quisiera ser, de estudiar y hacer lo que me gusta.

Finalmente, agradezco de forma especial a Óscar con quién he tenido interminables debates, el de las observaciones inteligentes, mi compañero de estudios durante pregrado, el que escucha todas las latas de mi trabajo.

A todos gracias.

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE CONTENIDO	v
ÍNDICE DE TABLAS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	iv
RESUMEN	VIII
INTRODUCCIÓN	1
FtsZ Y CITOQUINESIS BACTERIANA.....	1
CINÉTICA DE LA ACTIVIDAD GTPASA DE FtsZ.....	3
POLIMERIZACIÓN DE FtsZ.....	5
FtsZ Y LA ARQUEA <i>METHANOCOCCUS JANNASCHII</i>	7
INTERACCIONES HIDRÓFOBAS.....	8
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	10
OBJETIVO GENERAL.....	10
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	10
HIPÓTESIS.....	10
MATERIALES Y MÉTODOS	11
INDUCCIÓN DE CULTIVOS PARA PURIFICACIÓN.....	11
PURIFICACIÓN DE FtsZ.....	11
ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS (SDS-PAGE).....	12
CUANTIFICACIÓN DE MjFtsZ.....	13
POLIMERIZACIÓN <i>IN VITRO</i> (DISPERSIÓN DE LUZ).....	13
CONCENTRACIÓN CRÍTICA.....	13
ACTIVIDAD GTPASA.....	14
MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.....	15
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	16

RESULTADOS	18
PURIFICACIÓN DE MjFtsZ.....	18
DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN SATURANTE DE GTP.....	19
POLIMERIZACIÓN DE MjFtsZ DETERMINADA POR DISPERSIÓN DE LUZ.....	20
CONCENTRACIÓN CRÍTICA DE MjFtsZ.....	23
ACTIVIDAD GTPASA DE MjFtsZ.....	24
MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.....	29
ENERGÍAS DE ACTIVACIÓN DE LA ACTIVIDAD GTPASA Y LA DESPOLIMERIZACIÓN DE MjFtsZ.....	32
EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE ΔG^* , ΔH^* Y ΔS^* DE LA ACTIVIDAD GTPASA Y LA DESPOLIMERIZACIÓN DE MjFtsZ.....	35
DISCUSIÓN	40
RESUMEN DE RESULTADOS	52
CONCLUSIONES	54
BIBLIOGRAFÍA	55
ANEXO	59

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Concentración crítica de MjFtsZ a distintas temperaturas de polimerización	24
Tabla 2.	Efecto de la temperatura y la concentración de proteína sobre la actividad GTPasa.	28
Tabla 3.	k_{cat} de la actividad GTPasa de MjFtsZ a distintas temperaturas.	29
Tabla 4.	ΔG^* , ΔH^* y ΔS^* aparentes de la velocidad de despolimerización	38
Tabla 5.	ΔG^* , ΔH^* y ΔS^* aparentes de la actividad GTPasa	38
Tabla Suplementaria 1.	Velocidades de despolimerización	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de cintas de la estructura tridimensional de MjFtsZ (1FSZ).	2
Figura 2. Geles de la purificación de MjFtsZ.	18
Figura 3. Dependencia de la polimerización de MjFtsZ respecto a la concentración de GTP.	19
Figura 4. Polimerización y despolimerización de MjFtsZ a distintas temperaturas.	22
Figura 5. Dependencia de la concentración crítica de la temperatura.	23
Figura 6. Curvas de progreso de la actividad GTPasa de MjFtsZ a distintas concentraciones de proteína y temperatura.	27
Figura 7. Fotografías de polímeros de MjFtsZ obtenidas mediante microscopía electrónica.	31
Figura 8. Energía de activación para la actividad GTPasa de polimerización y la despolimerización de MjFtsZ a distintas temperaturas.	34
Figura Suplementaria 1. Determinación de la velocidad de despolimerización.	59
Figura Suplementaria 2. Valores de ΔG^* , ΔH^* y ΔS^* a altas y bajas temperaturas	60
Figura Suplementaria 3. ΔG^* y ΔS^* promedio calculado a altas y bajas temperaturas para valores de $\kappa(Q^*/Q)$ entre 0,01 y 100.	61

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA	Albúmina de suero de bovino
Cc	Concentración Crítica
Ea	Energía de activación
E_{aDes}	Energía de activación de despolimerización
E_{aGTPasa}	Energía de activación de la actividad GTPasa
EDTA	Ácido etilen diamino tetra acético
EcFtsZ	FtsZ de <i>Escherichia coli</i>
DEAE	Dietilaminoetil celulosa
FtsA	<i>Filamentous temperature sensitive A</i>
FtsZ	<i>Filamentous temperature sensitive Z</i>
GDP	Guanosina-5`-difosfato
GMPCPP	Guanilil-(α,β)-metilendifosfonato
GTP	Guanosina-5`-trifosfato
IPTG	Isopropil β -D-tiogalactopiranósido
k_{cat}	Constante catalítica
LB	Luria-Bertani
MA	Molibdato de amonio
MES	Ácido 4-morfolinoetanosulfónico
MjFtsZ	FtsZ de <i>Methanococcus jannaschii</i>
PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida
SDS	Dodecil sulfato de sodio
STEM	<i>Scanning transmission electron microscopy</i>
TRIS	Tris (hidróximetil) aminoetano (2-amino-2-(hidroximetil)propano-1,3-diol)

TX	Tritón X-100
VM	Verde de malaquita
Wt	<i>wild type</i> , tipo silvestre

RESUMEN

Durante la citoquinesis bacteriana, en el sitio de división se forma un polímero de FtsZ llamado el anillo Z cuya constricción contribuye a la división de la célula para dar origen a dos células hijas. Por esto, FtsZ es la primera proteína en ubicarse en el centro de la célula para reclutar el resto de las proteínas que dan origen al llamado *divisoma*. El uso de liposomas ha permitido determinar que FtsZ y la proteína que la ancla a la membrana, FtsA, son responsables directos en la constricción de la membrana. El mecanismo mediante el cual se genera esta fuerza motriz contempla la hidrólisis de GTP y otros eventos posteriores a la formación del anillo Z. Para entender la transducción de la energía química de la hidrólisis de GTP en energía mecánica se han realizado diversos experimentos sobre la inducción de la actividad GTPasa durante la polimerización y se ha analizado la morfología de los polímeros que se forman en *E. coli*. Sin embargo, no se conoce cómo este mecanismo opera a altas temperaturas en arqueas termófilas y tampoco cómo la despolimerización influye sobre la estabilidad de los polímeros, pues cuando el sitio de unión del nucleótido contiene GDP los polímeros se hacen inestables.

*Methanococcus jannaschii*¹ es una *archaea* extremófila que vive en condiciones de alta temperatura, presión y osmolaridad. Este organismo también utiliza FtsZ en el proceso de división celular. Se han hecho algunos estudios *in vitro* de la polimerización de FtsZ de *M. jannaschii* (MjFtsZ), sin embargo ninguno de éstos ha sido realizado en condiciones que se asemejen al ambiente celular de la proteína en el extremófilo. En el presente trabajo se caracterizó la polimerización de MjFtsZ, su actividad GTPasa y

¹Se usa la nomenclatura más antigua (*Methanococcus jannaschii*), pues en la literatura pertinente es el nombre más usado. *Methanocaldococcus jannaschii* es el nombre reciente que corresponde al género en que se agruparon varias termófilas metanógenas.

la morfología de los polímeros a distintas temperaturas en un intervalo entre 40 y 80 °C. Se determinó que a mayor temperatura la concentración crítica de la proteína disminuye, la actividad GTPasa aumenta y se forman manojos de polímeros. Notablemente, la dependencia de la constante de velocidad respecto a la temperatura en un gráfico de Arrhenius es bifásica para MjFtsZ. En consecuencia, MjFtsZ presenta dos energías de activación de despolimerización, una de 151,79 kJ/mol (36,28 kcal/mol) para temperaturas de despolimerización entre 40 y 62 °C y otra de 94,03 kJ/mol (22,47 kcal/mol) para temperaturas de despolimerización por sobre los 62 °C. La actividad GTPasa inducida por la polimerización presenta una energía de activación de 58,19 kJ/mol (13,9 kcal /mol) a temperaturas bajo 49 °C y una menor energía de activación de 19,65 kJ/mol (4,7 kcal/mol) para temperaturas de polimerización por sobre los 49 °C. Este fenómeno nunca antes se había reportado para FtsZ, lo que sugiere nuevos experimentos para caracterizar la cinética de la despolimerización.

INTRODUCCIÓN

FtsZ y citoquinesis bacteriana

El ciclo celular bacteriano es un proceso altamente coordinado, en el cual la replicación y separación del nucleoide ocurre durante la división celular con un alto grado de precisión y eficiencia. En la mayoría de las bacterias la división celular ocurre simétricamente alrededor del centro de la célula, entre los nucleoides particionados.

En la citoquinesis bacteriana, el primer evento en la formación del complejo de proteínas de división celular – divisoma – es la polimerización de FtsZ, para formar el anillo Z. Este anillo permite reclutar las proteínas del divisoma, determinar la síntesis y ubicación del septo, y su constricción permite la división celular. La correcta ubicación de FtsZ en el sitio de septación está regulada por el sistema de proteínas Min que forma gradientes en los polos de la célula, inhibiendo la polimerización de FtsZ en estos lugares, y mediante la oclusión del nucleoide se inhibe la polimerización de FtsZ cerca del nucleoide (Adams & Errington, 2009).

FtsZ es una proteína homóloga a tubulina de los eucariontes, se encuentra conservada a través de *eubacteria*, también está en *archaea* y participa activamente en la división de plastidios y mitocondrias de plantas del grupo *eukarya*. Además posee una estructura primaria altamente conservada entre bacterias y arqueas teniendo entre un 35% – 40% de identidad. FtsZ está formada por dos dominios independientes que se encuentran unidos por una hélice central (H7) de 23 residuos (Figura 1). El dominio amino tiene 189 aminoácidos entre los residuos 38 a 227, posee un plegamiento de tipo Rossman y constituye el sitio de unión del nucleótido. El dominio carboxilo se

extiende entre los residuos 228 a 356, es una sábana- β de cuatro hebras antiparalelas que está girada 90° respecto a la sábana- β del dominio GTPasa (Löwe & Amos, 1998). El dominio carboxilo posee el sitio de unión a proteínas que participan en la formación del anillo Z, tales como ZipA y FtsA.

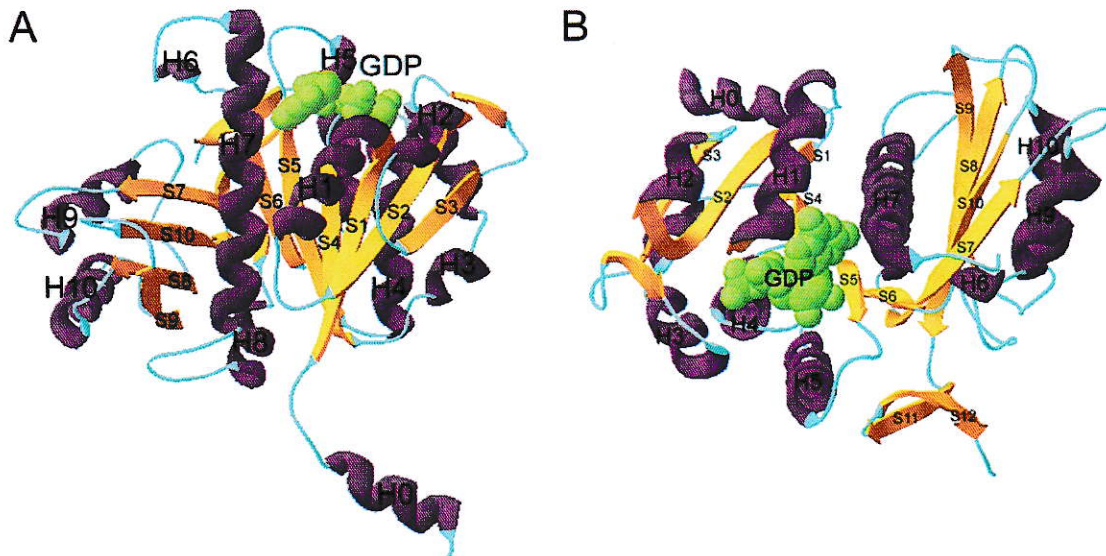


Figura 1. Esquema de cintas de la estructura tridimensional de MjFtsZ (1FSZ). **A.** Vista de los dominios amino y carboxilo; con esferas verdes se muestra la molécula de GDP, en morado las hélices y en amarillo las sábanas- β . **B.** Vista de MjFtsZ rotada en 90° respecto a la estructura de la figura 1A. El dominio amino posee un plegamiento tipo Rossmann, el cual presenta el sitio de unión a nucleótido, El lazo T4 presenta el llamado motivo de “firma de tubulina”, [SAG]GGTG[SA]G, el que junto con los otros lazos en contacto con el nucleótido distinguen a FtsZ y tubulina como una familia de GTPasas distinta a las GTPasas clásicas (Nogales y cols. 1998). El dominio carboxilo se encuentra unido al dominio amino por medio de una interface hidrófoba.

FtsZ es una proteína con actividad GTPasa, que requiere GTP y Mg^{2+} para la hidrólisis cuando se forman los polímeros, los cuales son desestabilizados y desensamblados al salir el fosfato inorgánico del sitio del nucleótido donde permanece el GDP unido (Bramhill y Thompson, 1994). El acoplamiento entre hidrólisis y desensamblaje de los polímeros de FtsZ confiere dinamismo al anillo Z. Al polimerizar, los monómeros de FtsZ se asocian de forma longitudinal (dominio carboxilo de un monómero con el

dominio amino del siguiente) para formar protofilamentos de FtsZ, similar a la unión de α y β -tubulina. La inserción del *loop* T7 del dominio carboxilo terminal de FtsZ en el sitio de unión a nucleótido del dominio amino terminal de la subunidad contigua permite la ubicación de los residuos catalíticos cerca del fosfato gamma, permitiendo que ocurra la hidrólisis del nucleótido, de modo que es necesaria la formación de un oligómero para tener actividad GTPasa. En particular, el sitio activo con actividad GTPasa de FtsZ se completa mediante la unión de dos residuos claves del *loop* T7 que complementan el dominio amino de unión a nucleótido de MjFtsZ: Asp235 y Asp238. Estos residuos están posicionados a una distancia que permite polarizar la molécula de agua para el ataque en la reacción de hidrólisis del fosfato- γ del GTP (Oliva y col., 2004). En consecuencia, la actividad GTPasa de FtsZ depende de la polimerización de FtsZ (Adams y Errington, 2009), por lo tanto FtsZ se autoensambla de una forma dependiente de nucleósido trifosfato.

Se ha propuesto que FtsZ provee la fuerza necesaria para la constricción del anillo Z en la división bacteriana, y que el mecanismo para proporcionar esta fuerza es la hidrólisis del nucleótido (Li y col., 2007; Lu y col., 2000). De hecho, mediante el uso de liposomas se demostró que FtsZ anclada a la membrana mediante un fragmento FtsA puede generar la fuerza necesaria para la constricción de la membrana (Osawa y col., 2008).

Cinética de la actividad GTPasa de FtsZ

Se ha observado la formación de polímeros en mutantes de FtsZ deficientes en la hidrólisis de GTP, indicando que la hidrólisis de GTP no es necesaria para el ensamblaje de filamentos de FtsZ (Mukherjee, A. y Lutkenhaus, J., 1994). Así, la

polimerización en presencia de GTP generaría la energía potencial necesaria para la constricción del anillo Z que se libera tras la hidrólisis del nucleótido y que genera trabajo mecánico al deformarse el polímero anclado a la membrana.

El polímero de FtsZ que contiene nucleótido en forma de GTP es recto, mientras que si el nucleótido unido está en forma de GDP los protofilamentos son curvos (Erickson, H y cols., 1996; Romberg y cols., 2001; Romberg y Mitchison, 2004). Esta remodelación de los polímeros es inducida por la transición entre los intermediarios de la hidrólisis de nucleótidos GDP y Pi, en consecuencia, la energía de la hidrólisis puede ser usada para desestabilizar una estructura previamente estable, el polímero recto, y así producir trabajo mecánico, al curvar el polímero. En estudios cinéticos se ha determinado que en estado estacionario, el 80% de las subunidades de polímero de FtsZ tiene unido GTP, y que el paso limitante de la actividad GTPasa es la hidrólisis de GTP, mientras que la liberación de fosfato inorgánico ocurre rápidamente después la hidrólisis de GTP (Romberg y Mitchinson, 2004). Por otra parte, mediante FRAP (*fluorescence recovering after photobleaching*) se observó que la velocidad de hidrólisis del GTP se correlaciona directamente con la velocidad de salida de las subunidades de FtsZ del anillo (Stricker y col., 2002), lo cual también sugiere que la hidrólisis es el paso limitante. En consecuencia, en estado estacionario la proteína forma filamentos rectos y la regulación de la hidrólisis de GTP durante el proceso de formación y constricción del anillo Z determina cambios estructurales del polímero.

El acoplamiento entre la hidrólisis de GTP y la salida de monómeros del polímero de FtsZ en un manojó podría ser usado para regular la división celular de dos formas: 1) Mediante la inhibición de la liberación del GDP, el polímero podría ocupar la energía de la hidrólisis para curvarse y producir fuerza durante la constricción del anillo, y 2) Las

interacciones laterales podrían aumentar la rigidez de los filamentos de FtsZ limitando así la curvatura y el desensamblado de los polímeros. Además, el desarme coordinado de tales manojos podría concertar la despolimerización de los filamentos durante la septación.

Polimerización de FtsZ

FtsZ polimeriza *in vitro* en varios tipos de estructuras, tales como sábanas, manojos, filamentos y *minirings* entre otras, dependiendo de las condiciones de polimerización utilizadas. Por ejemplo, en presencia de concentraciones altas de Ca^{2+} (5-10 mM), temperatura ambiente y pH 6,0, MjFtsZ polimeriza formando sábanas (Löwe y Amos, 1999) constituidas por filamentos simples de FtsZ cuyos monómeros se repiten longitudinalmente cada 40 Å, dentro de las cuales estos filamentos se ubican de forma antiparalela. También se ha observado que en presencia de DEAE dextrano, Mg^{2+} y a pH 7,2, FtsZ de *E. coli* (EcFtsZ) forma protofilamentos largos y rectos que se asocian en manojos o formando sábanas bidimensionales (Erickson y col., 1996). A pH 6,5 en cambio, estas sábanas son mucho más abultadas, formadas por 10 a 15 protofilamentos en paralelo. A pH 6 o 7 la EcFtsZ adsorbida en una monocapa lipídica catiónica forma sábanas de protofilamentos paralelos, algunos protofilamentos largos y rectos aislados, y *minirings*, que se forman en presencia de GTP y de GDP, pero son más abundantes en presencia de de GDP (Erickson y col., 1996).

EcFtsZ a altas concentraciones incubada en condiciones de polimerización, pH 6,5, magnesio y GDP, forma arcos y anillos en medio de grandes cantidades de proteína despolimerizada, lo que es consistente con la observación de polímeros de EcFtsZ curvos formados en presencia de lípidos catiónicos o DEAE dextrano. Al reemplazar

GDP por GTP en idénticas condiciones, se observa la formación de filamentos largos y rectos que tienden a formar manojos, mientras que a bajas concentraciones de proteína incubada en idénticas concentraciones se forman filamentos aislados de ancho uniforme y de largo variable, que corresponden a polímeros de una única hebra según la evidencia obtenida con STEM (*Scanning transmission electron microscopy*). Al utilizar GMPCPP, un análogo de GTP de hidrólisis lenta, en lugar de GTP, EcFtsZ forma polímeros largos y rectos (Romberg y *col.*, 2001). En suma, se ha observado que la formación de manojos y sábanas de protofilamentos aumenta a mayores concentraciones de FtsZ. Sin embargo, mediante criomicroscopía electrónica de soluciones vitrificadas sin soporte, se observa la formación de polímeros lineales de una única hebra a altas concentraciones de proteína (Huecas y *col.*, 2008). Y más aún, usando tomografía de criomicroscopía electrónica se observa la arquitectura del anillo Z *in vivo*, que parece consistir en un gran número de protofilamentos cortos que se solapan, en lugar de un anillo continuo de polímero (Li y *col.*, 2007).

Se ha determinado mediante experimentos de sedimentación, dispersión de luz (*light scattering*), ensayos de fluorescencia utilizando mutantes y ensayos de actividad GTPasa, que existe una concentración crítica de FtsZ bajo la cual no hay formación de polímeros (Chen y *col.*, 2005; Oliva y *col.*, 2003; Romberg y Mitchison, 2004). La existencia de una concentración crítica es característica de un mecanismo de polimerización cooperativo, que tiene una fase de activación, nucleación, elongación y un *plateau*. Y, en efecto, en estudios de cinética rápida se ha observado que la polimerización de FtsZ presenta una fase inicial de *lag* característica de una polimerización cooperativa, en que el mecanismo presenta tres etapas: una fase de activación del monómero una vez que se adiciona GTP (*lag*), en que habría un

intercambio de GDP por GTP en el monómero de FtsZ; una segunda etapa de nucleación del dímero y una tercera etapa de elongación del polímero (Chen y col., 2005; Huecas y col., 2008). Sin embargo, un mecanismo de polimerización cooperativo parece ser incompatible con la formación de los polímeros de un único filamento que se han observado mediante microscopía electrónica, pues en principio, la elongación por adición sucesiva de monómeros a un único filamento requiere una energía constante y equivalente a la energía de asociación de dos monómeros activados, lo que no es consistente con un mecanismo cooperativo de polimerización (Chen y col., 2005)

FtsZ y la arquea *Methanococcus jannaschii*

Methanococcus jannaschii es un organismo extremófilo que crece a presiones superiores a 200 atm, pH entre 5,2 – 7,0 con un óptimo a pH 6,0 y cuya temperatura óptima de crecimiento es de 85 °C. *M. jannaschii* es un organismo autótrofo, metanógeno y anaeróbico estricto, del dominio *archaea*, que como otros procariontes posee un citoesqueleto arcaico que permite la citoquinesis. MjFtsZ es clave en la constricción de la membrana que ocurre durante la citoquinesis de *M. jannaschii*. MjFtsZ es una proteína hipertermófila y halófila, activa a temperaturas superiores a los 55°C, que requiere concentraciones de sal por sobre los 0,3 M. Comparada con la proteína FtsZ mesófila de *E. coli*, MjFtsZ es mucho más termoestable. Muchas características favorecen la estabilidad térmica de las proteínas, tales como la eficiente densidad de empacamiento, interacciones hidrófobas, reducción de *loops*, unión de metales y formación de puentes salinos, entre otros. MjFtsZ posee varios residuos cargados que forman puentes y redes salinas, las cuales constituirían un elemento importante en la mantención de la estabilidad térmica de la proteína (Santander, 2004).

Interacciones hidrófobas

Las interacciones hidrófobas consisten en la unión de dos o más moléculas no polares, que al interactuar disminuyen la superficie de contacto con moléculas de agua. Las moléculas de agua en contacto con moléculas no polares, forman una red ordenada alrededor de éstas lo cual genera una disminución de la entropía. En consecuencia, la disminución de la superficie no polar genera una menor disminución de la entropía del sistema, lo cual es termodinámicamente favorable.

Las cadenas laterales no polares de las proteínas, por lo general, se ubican en el centro disminuyendo las interacciones con el medio polar que está en contacto con la superficie de la proteína. La abundancia relativa de residuos hidrófobos y superficies hidrófobas en proteínas termófilas es alta, lo cual sugiere a estas interacciones como un mecanismo de estabilización como indica la estimación de un aumento de la estabilidad en 1,3 kcal/mol por cada grupo metilo sepultado, en el plegamiento de proteínas (Pace, 1992).

Un ejemplo del rol de las interacciones hidrófobas, fue la construcción de una enzima adenilato quinasa quimérica entre *Methanococcus voltae* y *M. jannaschii* que tuvo un aumento de la estabilidad - respecto a la enzima mesófila -, debido a la formación de un núcleo hidrófobo más grande, que podría ser responsable de la estabilidad térmica de la adenilato quinasa de *M. jannaschii* (Haney y col., 1999). En la literatura se reportan varios ejemplos de proteínas termófilas que presentan interacciones hidrófobas que contribuyen a la estabilidad térmica y otras proteínas que no requieren este tipo de interacciones y presentan otras características como puentes salinos, unión de metales, *loops*, entre otros; que podrían explicar su estabilidad térmica. En

general, no hay evidencia disponible que confirme el rol estabilizador de un solo tipo o grupo de interacciones no covalentes que determine la estabilidad térmica de las proteínas.

Todos los trabajos previos que abordan la polimerización de MjFtsZ se han realizado a temperatura ambiente en presencia de Ca^{2+} ó, a 55 °C en condiciones estándar de polimerización, vale decir, en presencia de GTP, Mg^{2+} , K^+ y pH 6,5. Es decir, no se ha documentado un estudio detallado y sistemático de la proteína en condiciones fisiológicas, más cercanas a las condiciones presentes en el ambiente natural de *M. jannaschii* (alta salinidad y presión, y temperatura alrededor de 85 °C). En el presente trabajo se caracterizará la polimerización, despolimerización e hidrólisis de GTP de MjFtsZ a distintas temperaturas, cubriendo el rango de temperaturas en que vive *M. jannaschii*.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

La estabilidad de los polímeros de MjFtsZ depende de la hidrólisis de GTP y del carácter hidrófobo de las interacciones longitudinales y laterales.

OBJETIVO GENERAL

Demostrar que la hidrólisis de GTP, la formación de polímeros y la despolimerización de MjFtsZ varían en el rango de temperatura fisiológica de *Methanococcus jannaschii* (50- 90 °C).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar los parámetros de la polimerización de MjFtsZ a altas temperaturas.
2. Caracterizar la actividad GTPasa de MjFtsZ, velocidad de hidrólisis y actividad específica en condiciones similares a las fisiológicas.
3. Determinar el efecto de la temperatura en la morfología de los polímeros de MjFtsZ.
4. Determinar la energía de activación y analizar los parámetros termodinámicos de activación de la despolimerización y actividad GTPasa de MjFtsZ.

MATERIALES Y MÉTODOS

Inducción de cultivos para purificación

Una colonia aislada de BL21 con el plasmidio pHis17 (con el gen MJ0370) se inoculó en 5 ml de medio LB suplementado con 100 µg/mL de ampicilina, se dejó creciendo a 37°C con agitación toda la noche. 1 mL de este cultivo líquido se inoculó en 1 L de medio LB suplementado con 100 µg/mL de ampicilina, se dejó creciendo durante toda la noche a 37°C sin agitación. Al día siguiente se agitó a 37°C y 200 rpm hasta alcanzar una D.O._{600nm} 0,7, a continuación se indujo la expresión de la proteína con 0,4 mM IPTG durante 3 horas a 37°C con agitación, posteriormente se centrifugó a 4800 r.p.m. a 4°C durante 30 minutos (centrífuga Sorvall RC-3B, rotor H6000A). Se descartó el sobrenadante y el precipitado se suspendió en amortiguador A (Tris-HCl 50 mM pH 8,0; KCl 300 mM; glicerol 10%), luego se centrifugó a 7000 r.p.m. por 10 minutos a 4°C (centrífuga Sorvall RC-5B rotor SS34) y se repitió el proceso dos veces, finalmente el precipitado de bacterias húmedo se almacenó a -80°C.

Purificación de FtsZ

La purificación de MjFtsZ se hizo mediante cromatografía de afinidad. Se descongeló el precipitado equivalente a 2 L de cultivo bacteriano inducido y luego se suspendió en amortiguador A (Tris-HCl 50 mM pH 8,0; KCl 300 mM; glicerol 10%) en una preparación de 20 mL/L de cultivo y se agregó a esta suspensión media pastilla de cóctel inhibidor de proteasas libre de EDTA (ROCHE). La suspensión se trasvasó a un vaso de precipitados de vidrio y se sonicó para lisar las células en un sonicador Bradelin Sonoplus HD200 con una sonda de 1 cm de diámetro (6 pulsos de 45 Watts

durante 20 segundos con intervalos de espera de 1 minuto y un pulso final de 75 Watts durante 20 segundos, todo en hielo). A continuación el lisado celular se centrifugó a 100000 g/4°C/1h (34000 rpm/rotor T-880, 10 mL/tubo), el sobrenadante se transfirió a un vaso de precipitados, se ajustó la concentración de imidazol a 5 mM y se cargó directamente en una columna de afinidad (HiTrap Quelating 4 mL previamente lavada, regenerada y equilibrada con amortiguador A ajustado a una concentración de 5 mM de imidazol) a un flujo de 1 mL/min mediante una bomba peristáltica accesoria (todo el procedimiento se realizó manteniendo la proteína en hielo y la columna a 4°C). Una vez cargada la muestra en la columna, se hizo el primer lavado con 5 volúmenes de amortiguador A ajustado a 5 mM imidazol; y posteriormente se lavó 4 veces con 3 volúmenes de amortiguador A ajustado a distintas concentraciones de imidazol (20 mM, 50 mM, 200 mM y 500 mM de imidazol) a un flujo de 1 mL/min, obteniéndose 5 fracciones luego de todos los lavados. Mediante SDS-PAGE se determinó la fracción que contenía MjFtsZ, esta fracción se dializó toda la noche contra 2 L de amortiguador B (Tris-HCl 50 mM pH 8,0; KCl 300 mM; EDTA 1 mM; glicerol 10%) a 4°C, se concentró en un Centriprep 30K de *Amicon* hasta 2-3 mL de volumen final y se almacenó a -80°C.

Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE)

Las muestras de proteína purificada se disolvieron en 3 µL amortiguador de electroforesis (Tris-HCl 50 mM pH 6,8; SDS 2% (p/v); β-mercaptoetanol 5% (v/v); Azul de Bromofenol 0,01% (p/v); glicerol 10% (v/v)) y 5 µL de fluoroescamina. Se usó un gel resolutivo de acrilamida al 12% aplicando una diferencia de potencial de 100V durante 1,5 horas a menos que se detalle una diferencia.

Cuantificación de MjFtsZ

Se determinó la concentración de MjFtsZ mediante el método de Bradford de acuerdo a las instrucciones dadas por el fabricante Bio-Rad. BSA se utilizó como proteína estándar para construir una curva de calibración que se comparó con MjFtsZ.

Polimerización *in vitro* (dispersión de luz)

La polimerización de MjFtsZ se siguió por dispersión de luz a 90° en un espectrofluorímetro PerkinElmer LS-50 con una longitud de onda de excitación y emisión de 350 nm, un ancho espectral de emisión y excitación de 4,0 nm y se usó un filtro atenuador de 1%, excepto en experimentos a 40°C donde se usó un filtro atenuador de 4%. Las lecturas se hicieron con intervalos de 1 s. durante aproximadamente 2500 s.

La polimerización de MjFtsZ se hizo en un volumen final de 0,5 mL a pH 6,5 en amortiguador de reacción, el que contenía: MES 50 mM pH 6,5; KCl 300 mM, MgCl₂ 5 mM. La reacción se inició con la adición de una concentración final de GTP 1 mM y los experimentos se realizaron utilizando temperaturas desde 40 a 80°C. El portacubetas se temperó con un baño termostático regulado y regulable, la temperatura se midió en la cubeta mediante una termocupla acoplada a un sistema de medición marca Bailey Instruments modelo BAT 8.

Concentración crítica

Ésta se calculó según se ha descrito anteriormente (Mukherjee y Lutkenhaus, 1999), al graficar la diferencia máxima promedio de dispersión de luz - luego de agregar GTP - en función de las diferentes concentraciones de proteína utilizadas. En este gráfico el

punto de intersección de la recta con la abscisa corresponde al valor de concentración crítica. La diferencia máxima de dispersión se determina al restar el valor inicial de dispersión de luz (línea base) del valor máximo de dispersión en presencia de GTP. La concentración de proteína MjFtsZ utilizada para los ensayos de polimerización varió desde 1 μM a 15 μM . (0,04 mg/mL a 0,6 mg/ml)

Actividad GTPasa

La velocidad de la reacción de hidrólisis del fosfato gamma del GTP se determinó por el método colorimétrico de Lanzetta *y col.* (1979) con verde de malaquita y también se usó una modificación de este método (Geladopoulos, T.P. *y col.*, 1991; Sontag C.A. *y col.*, 2005). Utilizando ambos métodos, se midió la concentración de fosfato inorgánico producido durante la polimerización, debido a la hidrólisis de GTP.

Para determinar hidrólisis del fosfato *gamma* del GTP, se usó una mezcla de reacción que contenía: amortiguador de reacción (MES-KOH 50 mM pH 6,5; MgCl_2 5 mM; KCl 300 mM), MjFtsZ y agua nanopura. Antes de iniciar la reacción, esta mezcla se incubó durante 10 minutos en un baño termostático a 40°C, 60°C y 80°C, respectivamente. La reacción se inició agregando GTP hasta una concentración inicial de 1 mM. El fosfato libre se midió por los dos métodos. En el primero se tomaron 40 μL de la mezcla de reacción que se detuvo con 10 μL de ácido perclórico 7% (v/v) (correspondiente a una concentración final de 1,4% (v/v) de ácido perclórico) a los: 0, 1, 2, 3, 4, 5 y 7 minutos después de iniciada la reacción. Estos 50 μL de mezcla de reacción con ácido perclórico se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos y, posteriormente se agregaron 850 μL de la solución colorante que es una mezcla triple (VM-MA-TX) que contiene: una mezcla de verde de malaquita (VM) 0,045% p/v

con molibdato de amonio (MA) 4,2% p/v en HCl 3 N, en una proporción 3:1 (VM: MA), y 100µL de solución tritón X-100 (TX) 0,02% v/v por cada 5 mL de mezcla VM-MA. Inmediatamente después se agregaron 100 µL de citrato de sodio 34% p/v, la mezcla se puso en hielo y posteriormente se midió la absorbancia a una longitud de onda de 630 nm. La curva de calibración se hizo en cuadruplicado utilizando fosfato mono potásico en un rango de 0 a 20 nanomoles de fosfato.

En el segundo método se utilizó una mezcla diferente de colorante que contenía: 1,04 mM verde de malaquita en H₂SO₄ 2,4 M; molibdato de amonio 24,01 mM y tritón X-100 0,17% v/v. La composición de la mezcla de reacción fue la misma y se detuvo a los tiempos indicados con ácido perclórico. Esta mezcla de reacción se equilibró, antes de agregar GTP, durante 3 minutos en un baño termostático a 40, 45, 50, 55, 65, 70 y 80 °C, cuando se probó el efecto de la temperatura.

La reacción se inició agregando GTP hasta una concentración inicial de 1 mM. El fosfato libre se midió tomando 20 µL de mezcla de reacción para temperaturas bajo los 70 °C ó 10 µL para las temperaturas de 70 y 80 °C, y la reacción se detuvo completando a 800 µL con ácido perclórico frío, a una concentración final de 0,3 M, a 0 y 3 minutos después de iniciada la reacción y se mantuvo en hielo, posteriormente se agregaron 200 µL de solución colorante y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 630 nm. La curva de calibración se hizo en duplicado utilizando fosfato mono potásico en un rango de 0 a 10 nanomoles de fosfato.

Microscopía electrónica

Las muestras para microscopía electrónica se prepararon con polímeros de MjFtsZ obtenidos en las diferentes condiciones experimentales. La polimerización de MjFtsZ

se siguió mediante dispersión de luz a 90° y se hizo en las mismas condiciones indicadas en la sección titulada: Polimerización *in vitro* (dispersión de la luz). Se utilizó una concentración final de MjFtsZ de 7 μM (0,28 mg/mL) y temperaturas de 40, 50, 60, 70 y 80°C en cada experimento. Una vez alcanzada la máxima dispersión de luz, se tomó una muestra de 10 μL y se depositó en un trozo de *parafilm* previamente ubicado sobre un *termoblock* temperado a 40, 50, 60, 70 y 80°C, según la temperatura a la cual se realizó la polimerización. Sobre la muestra se ubicó una grilla de cobre de 400 *mesh* cubierta con un film y carbón y se esperó 2 minutos, luego se depositó la grilla sobre una gota de 50 μL de agua nanopura previamente ubicada sobre el *parafilm* a la temperatura correspondiente e inmediatamente se retiró el exceso de líquido con el vértice de un papel filtro. La grilla se tiñó depositándola sobre una gota de 50 μL de acetato de uranilo 2% previamente ubicada sobre el mismo *parafilm* temperado, se esperó 1,5 minutos y el exceso de colorante se secó con el vértice de un papel filtro. Las grillas se observaron en un microscopio electrónico Jeol 100 con un aumento de 20.000x.

Análisis Estadístico

Los gráficos, ajustes y pruebas estadísticas se hicieron con el programa GraphPad Prism v5.0. Para las comparaciones se realizaron pruebas estadísticas T de *Student* de dos colas no pareadas con corrección de *Welch*. Los *p values* < 0,05 se consideraron significativos.

La varianza de la división $\frac{A \pm a}{B \pm b} = C \pm c$ se calcula (Box G. E: y col., 2008) así:

$$(1) \quad \sigma_C^2 = \theta_A^2 \sigma_A^2 + \theta_B^2 \sigma_B^2$$

Donde:

$$(2) \quad \theta_A = \frac{\partial C}{\partial A} = \frac{1}{B}$$

$$(3) \quad \theta_B = \frac{\partial C}{\partial B} = \frac{-A}{B^2}$$

Se reemplaza (2) y (3) en (1), y se obtiene que la varianza de la división es:

$$(4) \quad \sigma_C^2 = \frac{1}{B^2} a^2 + \frac{A^2}{B^4} b^2$$

Donde a y b son las varianzas de A y B . Por lo tanto el error de la división $\frac{A \pm a}{B \pm b} = C \pm c$ es:

$$(5) \quad \sigma_C = \sqrt{\frac{1}{B^2} \left(a^2 + \frac{A^2 b^2}{B^2} \right)}$$

Para la división $\frac{A \pm a}{B} = C \pm c$ el error es:

$$(6) \quad \sigma_C = \sqrt{\frac{1}{B^2} a^2} = \frac{a}{B}$$

Se utilizan las expresiones (5) y (6), según corresponde para calcular el error de la división.

RESULTADOS

Purificación de MjFtsZ

La proteína se purificó utilizando una columna quelante de níquel que se basa en la formación de un complejo de coordinación entre la cola de histidina y el níquel presente en la resina. La proteína se eluyó con un gradiente de concentración creciente de imidazol en un intervalo de 5 a 500 mM. En la figura 2A se muestra un gel SDS-PAGE de la purificación de MjFtsZ, se observa que en el cuarto lavado, a una concentración de imidazol de 200 mM, eluye la mayor parte de la proteína (carril 6). En el carril 8 se observa la migración electroforética de la proteína concentrada. Se observan otras bandas que desaparecen al cargar 10 μ g de la proteína (figura 2B), por lo tanto se puede decir que hay principalmente productos de degradación y otras proteínas en muy baja concentración que no deberían afectar los ensayos.

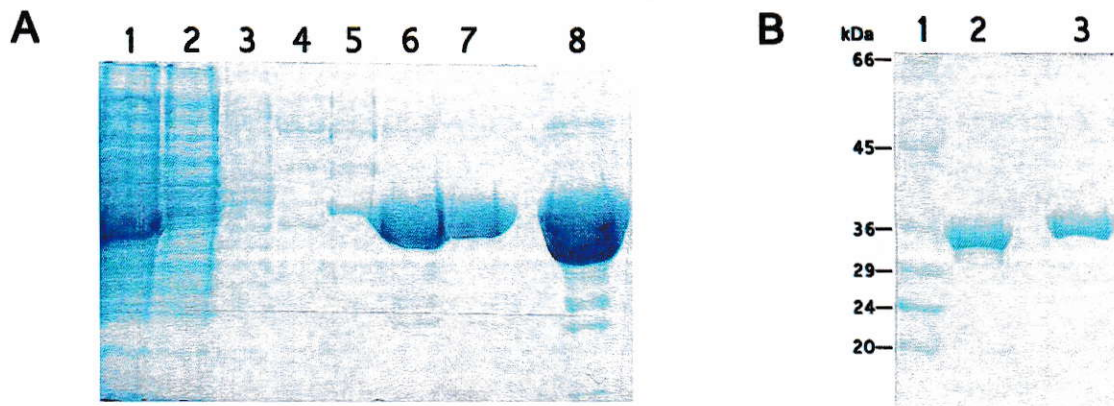


Figura 2. Geles de la purificación de MjFtsZ. **A.** SDS-PAGE de la purificación de MjFtsZ de la etapa de cromatografía de afinidad: 1. Sobrenadante después del lisado y centrifugado a 34000 rpm; 2. Muestra del eluido luego de cargar la columna con el lisado celular; 3. Muestra del lavado 1 con amortiguador A más imidazol 5 mM; 4. Muestra del lavado 2 con amortiguador A más imidazol 20 mM; 5. Muestra del lavado 3 con amortiguador A más imidazol 50 mM; 6. Muestra del lavado 4 con amortiguador A más imidazol 200 mM; 7. Fracción completa del lavado 4 después de dializar toda la noche contra amortiguador B; 8. Muestra concentrada de MjFtsZ. En los carriles 3-8 todas las muestras son del eluido inicial. **B.** SDS-PAGE de las proteínas purificadas. 1 Estándar SDS VII, en la figura se indica la masa molecular (kDa). 2. 10 μ g de EcFtsZ. 3. 10 μ g de MjFtsZ.

Determinación de la concentración saturante de GTP

Se determinó el curso temporal de la polimerización mediante la dispersión de luz de los polímeros de MjFtsZ a pH 6,5. La polimerización se indujo con distintas concentraciones de GTP desde 30 μM a 2 mM (figura 3A). Los polímeros de FtsZ dispersan luz, pero una vez que el GTP es hidrolizado los polímeros de FtsZ se desensamblan y, en consecuencia, disminuye la dispersión de luz. En la figura 3A, se observa una rápida polimerización que alcanza un máximo que depende de la concentración de GTP. Este máximo no aumenta en forma proporcional a concentraciones por sobre 150 μM de GTP, pues se mantiene relativamente constante dentro del error experimental. En la figura 3B se graficaron los máximos de dispersión de luz en función de la concentración de GTP. En el gráfico se observa que a concentraciones de GTP de 500 μM y 1 mM se alcanza el máximo de dispersión de luz, por lo tanto, se usó una concentración de 1 mM de GTP en los siguientes experimentos.

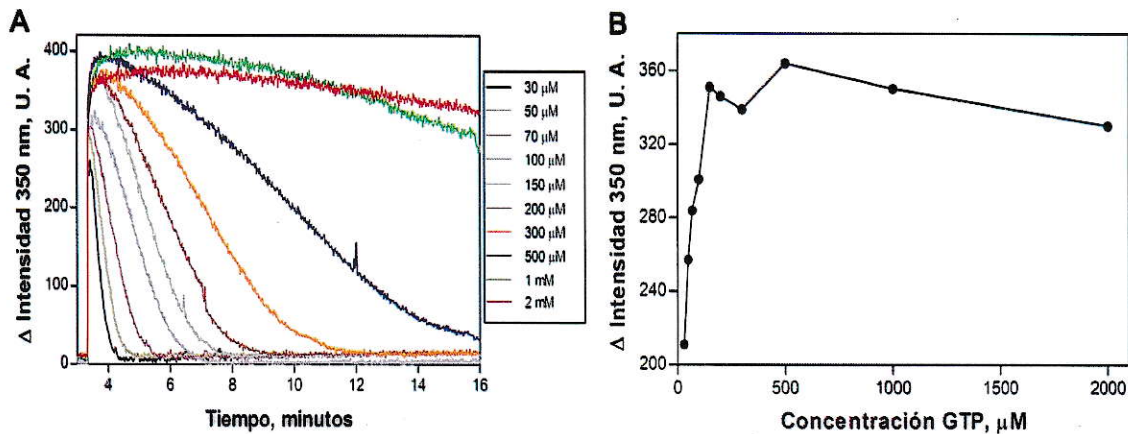


Figura 3. Dependencia de la polimerización de MjFtsZ respecto a la concentración de GTP. Se siguió la polimerización de 10 μM MjFtsZ mediante dispersión de luz a 90° en amortiguador de polimerización (MES-KOH 50 mM pH 6,5; KCl 300 mM; MgCl_2 5 mM) a 60°C inducida con distintas concentraciones de GTP. En **A** se grafica la dispersión de luz a 90° en unidades arbitrarias en función del tiempo; en colores se indica la concentración de GTP utilizada. En **B** se grafica el valor de la intensidad máxima de dispersión de luz (menos la línea base) en función de la concentración de GTP.

Polimerización de MjFtsZ determinada por dispersión de luz

Una solución con polímeros de FtsZ dispersa más luz mientras mayor es el largo y ancho de los polímeros. Esta dispersión de luz se detectó a través del tiempo en un espectrofluorímetro, que le asignó un valor de intensidad de luz dispersa respecto a la luz incidente, en unidades arbitrarias. En consecuencia, la dispersión de luz permitió seguir la polimerización y despolimerización de MjFtsZ en el tiempo. Ambos eventos se siguieron después de la inducción de la polimerización de MjFtsZ con 1 mM de GTP a distintas temperaturas y concentraciones de proteína. En la figura 4 se observa que al agregar GTP la proteína polimeriza rápidamente, demorando en promedio alrededor de 3 segundos en llegar al máximo de polimerización, por lo tanto no es posible determinar la velocidad de polimerización. Notablemente, a una misma concentración de proteína, mientras mayor es la temperatura, mayor es el máximo de dispersión de luz. Una vez que MjFtsZ alcanza el máximo de polimerización, se observa que la fase estacionaria de polimerización es muy breve. El aumento del máximo de dispersión podría explicarse por un cambio en la morfología de los filamentos (largo y/o ancho).

La rapidez de despolimerización aumenta con el aumento de temperatura y de concentración de proteína. Se observa que a 60 °C por sobre 10 μ M de proteína, aparece una segunda fase de despolimerización muy rápida que se repite a temperaturas mayores. La mitad de la despolimerización – 50% del valor del máximo de dispersión de luz – se alcanza en un rango entre los 12 y 41 minutos, dependiendo de la temperatura y concentración de proteína. A mayor temperatura y concentración de proteína la mitad de la despolimerización se alcanza al menor tiempo.

Las discontinuidades del trazo, corresponden a un aumento breve de la dispersión de luz debido a la formación de burbujas de gas en la solución donde está polimerizando la proteína. Dada la alta temperatura a la que se encontraba la solución el gas disuelto en el líquido se expandía y se formaban burbujas de gas conforme transcurría el tiempo. Como se puede notar a mayor temperatura de reacción, más discontinuidades presentan los trazos.

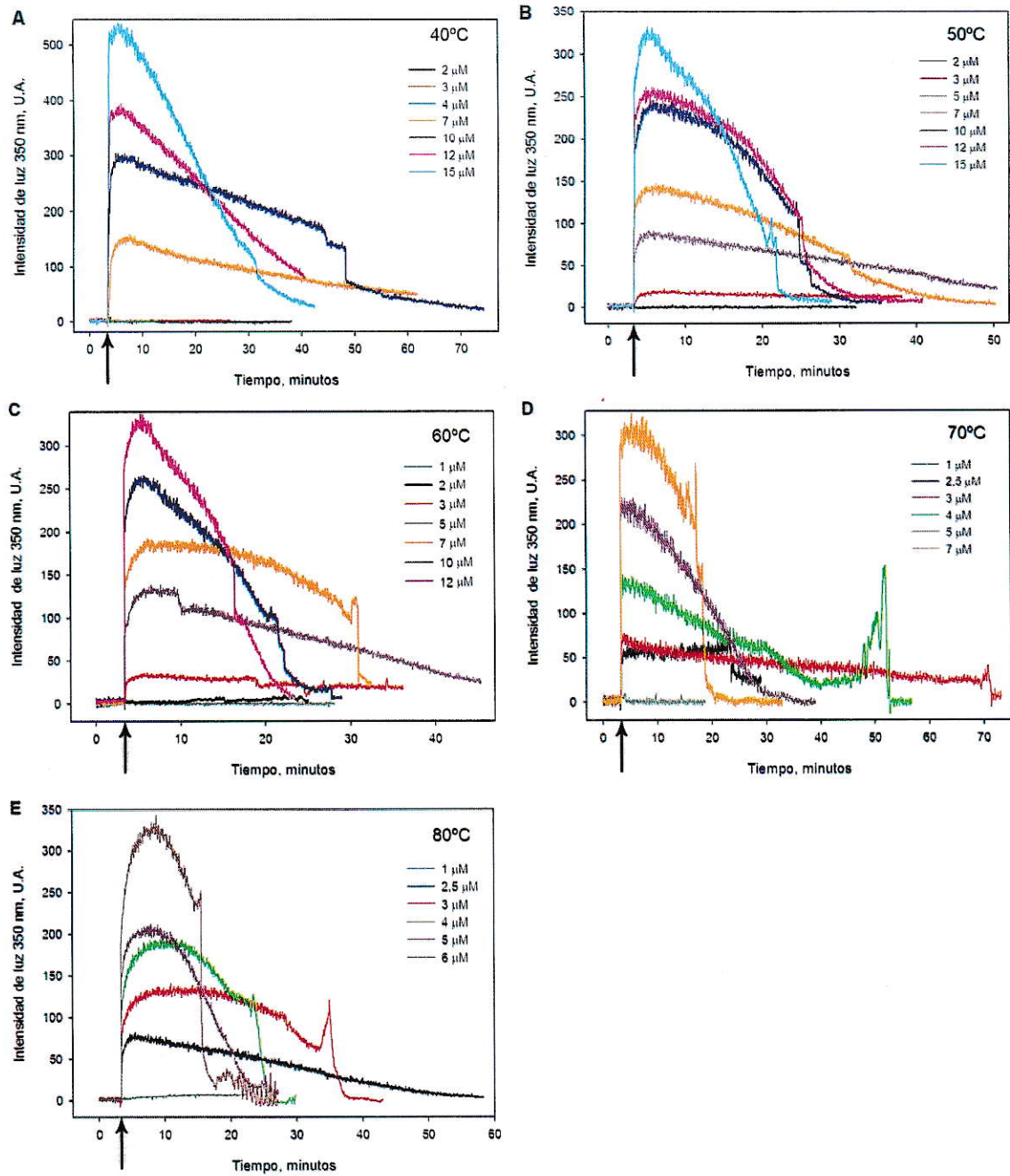


Figura 4. Polimerización y despolimerización de MjFtsZ a distintas temperaturas. Se siguió mediante dispersión de luz a 90° en amortiguador de polimerización (MES 50 mM pH 6,5; KCl 300 mM, MgCl₂ 5 mM). Al tiempo indicado por las flecha (3,3 minutos), se inició la reacción agregando GTP a una concentración inicial de 1 mM. En los paneles se grafica la dispersión de luz a 90° en unidades arbitrarias, en función del tiempo; en colores se indica la concentración de MjFtsZ utilizada. En los paneles **A**, **B**, **C**, **D**, y **E** se muestra la polimerización a 40, 50, 60, 70 y 80°C, respectivamente.

Concentración crítica de MjFtsZ

A partir de los máximos de dispersión de luz a las distintas concentraciones de proteína, se calculó la concentración crítica a cada temperatura. La concentración crítica es la mínima concentración de proteína necesaria para iniciar la polimerización. La figura 5 muestra la dependencia de la polimerización respecto a la concentración de proteína, se observa que las rectas a las distintas temperaturas intersectan con el eje de la abscisa en un punto, cuyo valor corresponde a la concentración crítica. La figura 5B muestra que a medida que la temperatura aumenta, la concentración crítica de MjFtsZ disminuye (Tabla 1). Se observa también que la pendiente de las rectas aumenta con la temperatura (exceptuando la recta a 40 °C), indicando la formación de polímeros diferentes, dado que la dispersión de luz depende de la forma y largo de los polímeros. La pendiente de la recta a 40 °C no es comparable con las pendientes determinadas a las otras temperaturas, dado que a 40 °C se usó un filtro atenuador de 4% en lugar del filtro atenuador de 1% usado a las otras temperaturas, debido a la baja dispersión a 40°C.

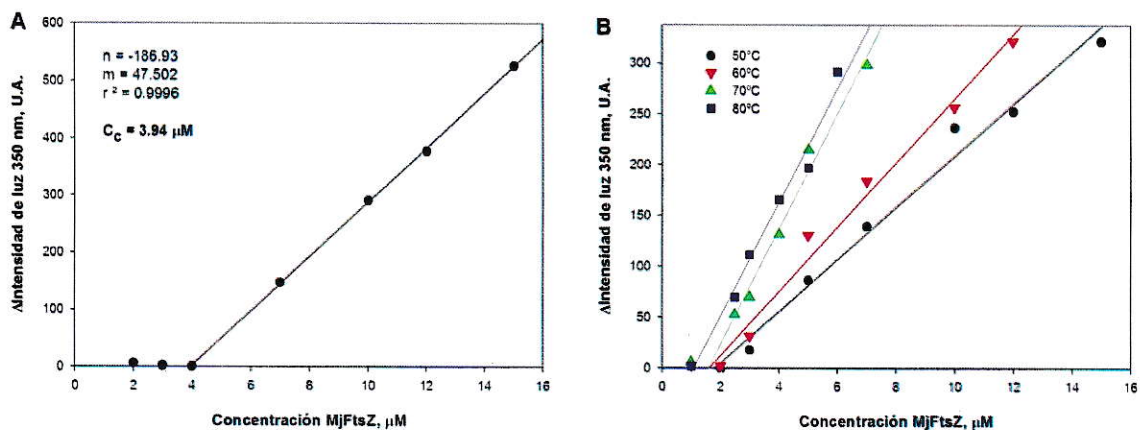


Figura 5. Determinación de la concentración crítica a distintas temperaturas. Se Graficó la máxima intensidad de dispersión de luz en función de la concentración de proteína a 40°C en **A** y a 50, 60, 70 y 80°C en **B**. El punto de intersección con la abscisa corresponde al valor de la concentración crítica de MjFtsZ a cada temperatura.

Tabla 1. Concentración crítica de MjFtsZ a distintas temperaturas de polimerización. Se muestran los valores de las concentraciones críticas obtenidas a partir de los valores característicos de las rectas de la figura 5 a distintas temperaturas. Los parámetros de las regresiones y las concentraciones críticas se muestran con las desviaciones estándar provenientes del ajuste de la recta. DF son los grados de libertad del ajuste.

Temperatura (°C)	Ecuación de la recta	Coefficiente de correlación (R ²)	DF	Concentración Crítica (μM)
40	$y = (47,50 \pm 0,48)x - 186,93 \pm 4,91$	0,9996	3	$3,94 \pm 0,11$
50	$y = (25,44 \pm 1,36)x - 45,571 \pm 12,09$	0,985	5	$1,79 \pm 0,48$
60	$y = (31,51 \pm 1,88)x - 50,70 \pm 13,95$	0,985	4	$1,61 \pm 0,45$
70	$y = (57,00 \pm 4,13)x - 91,42 \pm 18,94$	0,985	3	$1,60 \pm 0,35$
80	$y = (55,87 \pm 3,74)x - 60,76 \pm 14,74$	0,982	4	$1,10 \pm 0,27$

Actividad GTPasa

Se midió la actividad GTPasa de MjFtsZ a 40, 60 y 80°C, detectando la producción de ortofosfato con el primer método colorimétrico descrito por Lanzetta *y col.* (1979). En los paneles A, B y C de la Figura 6 se muestran las curvas de progreso para la hidrólisis de GTP catalizada por MjFtsZ a distintas temperaturas. Para todas las temperaturas estudiadas la velocidad inicial de la reacción se mantiene constante dentro de los primeros 4 minutos y, mientras mayor es la temperatura de reacción, menor es el tiempo en que se mantiene constante la velocidad inicial. La proteína hidroliza GTP cuando está formando polímeros, una vez que se insertan los residuos claves para la actividad GTPasa ubicados en el *loop* T7 de un monómero en el sitio activo de otro. Debido a esto no hay actividad GTPasa bajo la concentración crítica, pues la proteína está despolimerizada. En el panel 6A se observa que la actividad GTPasa es muy baja a 40°C entre 5 y 7 μM de MjFtsZ. A esta temperatura la concentración crítica de MjFtsZ es 4 μM, por lo tanto se espera que bajo 4 μM de

MjFtsZ no haya polimerización y por lo tanto la actividad GTPasa se haga nula, como se observa en la figura 6A, donde prácticamente no hay variación de la velocidad de hidrólisis. La hidrólisis de GTP a 40 °C a la concentración 3 μ M de MjFtsZ es inespecífica pues no hay actividad GTPasa. Luego, la velocidad se triplica a una concentración de MjFtsZ de 7 μ M (tabla 2) y se observa también un aumento en la misma proporción a 10 μ M. La actividad GTPasa de MjFtsZ aumenta con la temperatura (compárense las figuras 6A, 6B y 6C) y, como se observa en la figura 6D, la actividad específica se mantiene relativamente constante a 40 °C, sin embargo, a 60 y 80 °C se observa una disminución de la actividad específica conforme aumenta la concentración de proteína, lo cual podría ocurrir si se establecen interacciones laterales o alargamiento de los polímeros que produzcan una disminución del intercambio de GDP por GTP en los polímeros.

En la figura 6E se grafica la velocidad inicial (equivalente a V_{max} dado que se usa una concentración saturante de sustrato) en función de la concentración de proteína, a partir de este gráfico se puede extrapolar la concentración crítica de MjFtsZ, cuyo valor corresponde a la intersección con la abscisa. En la tabla 2 se indican las velocidades máximas, la constante catalítica (k_{cat}) y, las concentraciones críticas determinadas a las tres distintas temperaturas, excepto a 80°C, que interseca en valores negativos. Dada la alta temperatura, la medición de la actividad GTPasa a 80°C incorpora fuentes de error, debidas por ejemplo, a la evaporación de la solución. Las concentraciones críticas indicadas en la tabla 2 son menores a las determinadas mediante dispersión de luz (ver tabla 1). Esto es razonable, puesto que se requiere la formación de polímeros de largo suficiente para la detección de la dispersión luz, mientras el ortofosfato total liberado puede ser detectado desde el inicio de la reacción.

También se midió la actividad GTPasa de MjFtsZ, detectando la producción de ortofosfato mediante el método de Lanzetta y *col.* (1979) modificado. En la figura 6F, se muestra el gráfico de velocidad máxima en función de la concentración de MjFtsZ a distintas temperaturas en un rango de 40 a 80 °C, y en la tabla 3 se resumen los valores de k_{cat} determinados. Dado que se utilizó una concentración saturante de GTP, la velocidad inicial es igual a la velocidad máxima. En la figura 6F se muestra el gráfico de velocidad máxima en función de la concentración de MjFtsZ (P) a distintas temperaturas, dada la siguiente expresión:

$$(7) \quad V_{max} = k_{cat} \cdot [P]$$

Las pendientes de las rectas graficadas en la figura 6F equivalen a las constantes catalíticas a las distintas temperaturas.

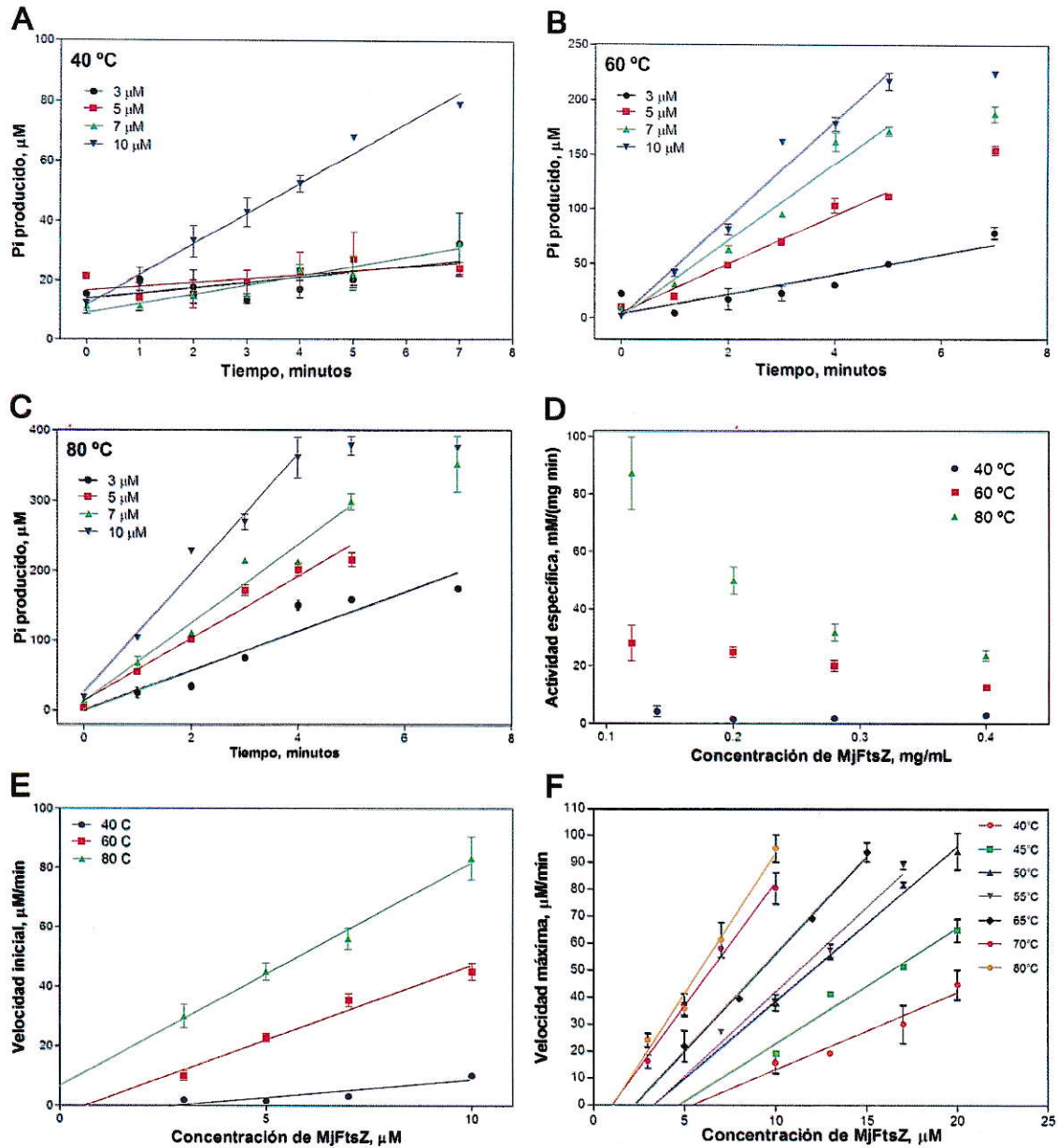


Figura 6. Curvas de progreso de la hidrólisis de GTP debido a la actividad GTPasa de MjFtsZ y su dependencia de la concentración de proteína y temperatura. Se grafica el ortofosfato (Pi) producido en función del tiempo como producto de la hidrólisis de GTP. Las figuras 6 A, B y C muestran las curvas de progreso a 40°C, 60°C y 80°C, respectivamente. En D se grafica la actividad específica en función de la concentración de MjFtsZ, y en E y F, la velocidad inicial de la reacción en función de la concentración de MjFtsZ a diferentes temperaturas. Las barras de error corresponden al error estándar del promedio de 2 experimentos.

Tabla 2. Efecto de la temperatura y la concentración de proteína sobre la actividad GTPasa. Se indican las temperaturas y concentraciones de proteína usadas en las reacciones de polimerización, las ecuaciones de las rectas trazadas sobre los puntos experimentales de las curvas de progreso, la velocidad inicial, la actividad específica calculada como la razón entre la velocidad inicial y la cantidad de proteína, la k_{cat} y la concentración crítica. ND: No determinado. Los errores que se muestran son las desviaciones estándar provenientes del ajuste de la recta, se muestran también los grados de libertad del ajuste (DF).

Temperatura (°C)	Concentración de MjFtsZ (μM)	Ecuación de la recta	DF	Velocidad inicial (μM/min)	Actividad específica (mM/mg min)	k_{cat} (min ⁻¹)	Concentración crítica de MjFtsZ (μM)
40	3	$y = (1,77 \pm 0,81)x + 13,94 \pm 3,11$	5	$1,77 \pm 0,81$	$4,08 \pm 1,87$	$1,19 \pm 0,42$ (DF=2)	$2,79 \pm 2,60$ (DF=2)
	5	$y = (1,29 \pm 0,65)x + 16,54 \pm 2,50$	5	$1,29 \pm 0,65$	$1,43 \pm 0,72$		
	7	$y = (3,07 \pm 0,41)x + 9,07 \pm 1,59$	5	$3,07 \pm 0,41$	$1,74 \pm 0,23$		
	10	$y = (10,15 \pm 0,57)x + 11,71 \pm 2,21$	5	$10,15 \pm 0,57$	$2,82 \pm 0,16$		
60	3	$y = (9,01 \pm 2,02)x + 3,88 \pm 7,77$	5	$9,01 \pm 2,02$	$27,81 \pm 6,23$	$5,03 \pm 0,62$ (DF=2)	$0,63 \pm 0,83$ (DF=2)
	5	$y = (22,23 \pm 1,65)x + 4,63 \pm 4,99$	4	$22,23 \pm 1,65$	$24,70 \pm 1,83$		
	7	$y = (35,31 \pm 3,24)x + 0,47 \pm 9,82$	4	$35,31 \pm 3,24$	$20,02 \pm 1,84$		
	10	$y = (44,91 \pm 3,54)x + 1,17 \pm 10,71$	4	$44,91 \pm 3,54$	$12,48 \pm 0,98$		
80	3	$y = (28,24 \pm 4,09)x + 0,21 \pm 15,76$	5	$28,24 \pm 4,09$	$87,16 \pm 12,62$	$7,48 \pm 0,50$ (DF=2)	ND
	5	$y = (44,92 \pm 4,24)x + 12,18 \pm 12,84$	4	$44,92 \pm 4,24$	$49,91 \pm 4,71$		
	7	$y = (55,95 \pm 5,29)x + 13,03 \pm 16,02$	4	$55,95 \pm 5,29$	$31,72 \pm 3,00$		
	10	$y = (85,07 \pm 6,52)x + 25,51 \pm 15,97$	3	$85,07 \pm 6,52$	$23,63 \pm 1,81$		

Tabla 3. k_{cat} de la actividad GTPasa de MjFtsZ a distintas temperaturas. Se muestran los valores de la regresión lineal de los datos del gráfico de velocidad máxima en función de la concentración de proteína de la figura 6F, el coeficiente de correlación de cada recta y las k_{cat} . Los errores que se muestran son las desviaciones estándar provenientes del ajuste de la recta, el ajuste de cada una de las rectas tiene 2 grados de libertad (DF = 2).

Temperatura (°C)	ecuación de la recta	Coefficiente de correlación (R^2)	k_{cat} (min^{-1})
40	$y = (2,88 \pm 0,52)x - 15,78 \pm 8,12$	0,9378	$2,88 \pm 0,52$
45	$y = (4,28 \pm 0,64)x - 19,95 \pm 9,86$	0,9576	$4,28 \pm 0,64$
50	$y = (5,75 \pm 0,33)x - 19,03 \pm 5,07$	0,9936	$5,75 \pm 0,33$
55	$y = (6,28 \pm 0,69)x - 21,00 \pm 8,47$	0,9766	$6,28 \pm 0,69$
65	$y = (7,24 \pm 0,33)x - 16,21 \pm 3,53$	0,9959	$7,24 \pm 0,33$
70	$y = (9,19 \pm 0,58)x - 9,53 \pm 3,94$	0,992	$9,19 \pm 0,58$
80	$y = (10,48 \pm 0,94)x - 11,45 \pm 6,39$	0,984	$10,48 \pm 0,94$

Microscopía electrónica

Para caracterizar los polímeros de MjFtsZ inducidos con GTP a las distintas temperaturas de polimerización usadas en los experimentos de dispersión de luz a 90° , se utilizó microscopía electrónica. En la figura 7 se muestran las microfotografías electrónicas representativas de los polímeros de MjFtsZ inducidos a distintas temperaturas (todas con el mismo aumento) y los gráficos respectivos (abajo) de la distribución de frecuencia del ancho de los polímeros, expresada como la razón entre el número de veces que se repite un ancho de polímero y el número total de polímeros medidos a cada temperatura. Se observa que a medida que aumenta la temperatura de inducción de los polímeros disminuye el número de polímeros mientras que el ancho y el largo de los polímeros aumenta, lo cual es consecuente con el cambio en la pendiente de los gráficos de la figura 5B, donde los máximos de polimerización aumentan con el aumento de temperatura.

En la figura 7A se observan polímeros de MjFtsZ inducidos a 40°C , estos polímeros son cortos y escasos (indicados por puntas de flecha), tienen un ancho promedio de 14

nm y, como se muestra en el gráfico inferior de la figura 7A, hay una sola población de polímeros que tiene un ancho en un rango de 7 a 18 nm. Las estructuras formadas por MjFtsZ a 50 °C son principalmente polímeros dobles y minoritariamente manojos de polímeros (figura 7B), esto se refleja en la distribución de frecuencia de ancho de los polímeros (figura 7B, gráfico) donde hay una gran población de polímeros con un ancho en el rango de 14 a 25 nm y tres poblaciones reducidas por sobre los 25 nm con anchos variables. Como se muestra en la figura 7F, la cantidad de polímeros es abundante y el ancho promedio de los polímeros es de 27 nm. La abundancia de polímeros inducidos a 60 °C disminuye a la mitad respecto a los inducidos a 50 °C, y su ancho promedio es de 38 nm (figura 7F). MjFtsZ a esta temperatura forma principalmente manojos de polímeros y en menor medida polímeros dobles (figura 7C), se observan 3 poblaciones de polímeros: una pequeña con un ancho en el rango de 18 a 25 nm y dos poblaciones más grandes con polímeros de un ancho entre 29 y 55 nm. Los polímeros formados a 70 °C son menos abundantes; son principalmente manojos de polímeros de un ancho promedio de 45 nm (Figura 7F), que constituyen una gran población de un ancho dentro del rango de 30 a 60 nm (Figura 7D, gráfico inferior) con un reducido número de filamentos delgados y manojos más gruesos (figura 7D, fotografía). En la polimerización inducida a 80 °C se forman manojos de polímeros de un ancho promedio de 65 nm (Figura 7F) y pocos polímeros dobles que conforman una población pequeña (figuras 7E, gráfico). En general hay pocos polímeros y, los manojos tienen un ancho de entre 40 a 55 nm (figura 7F).

En resumen, como se observa cualitativa y cuantitativamente en la figura 7, con el aumento de temperatura la población de polímeros dobles disminuye y aumenta el número de manojos de polímeros.

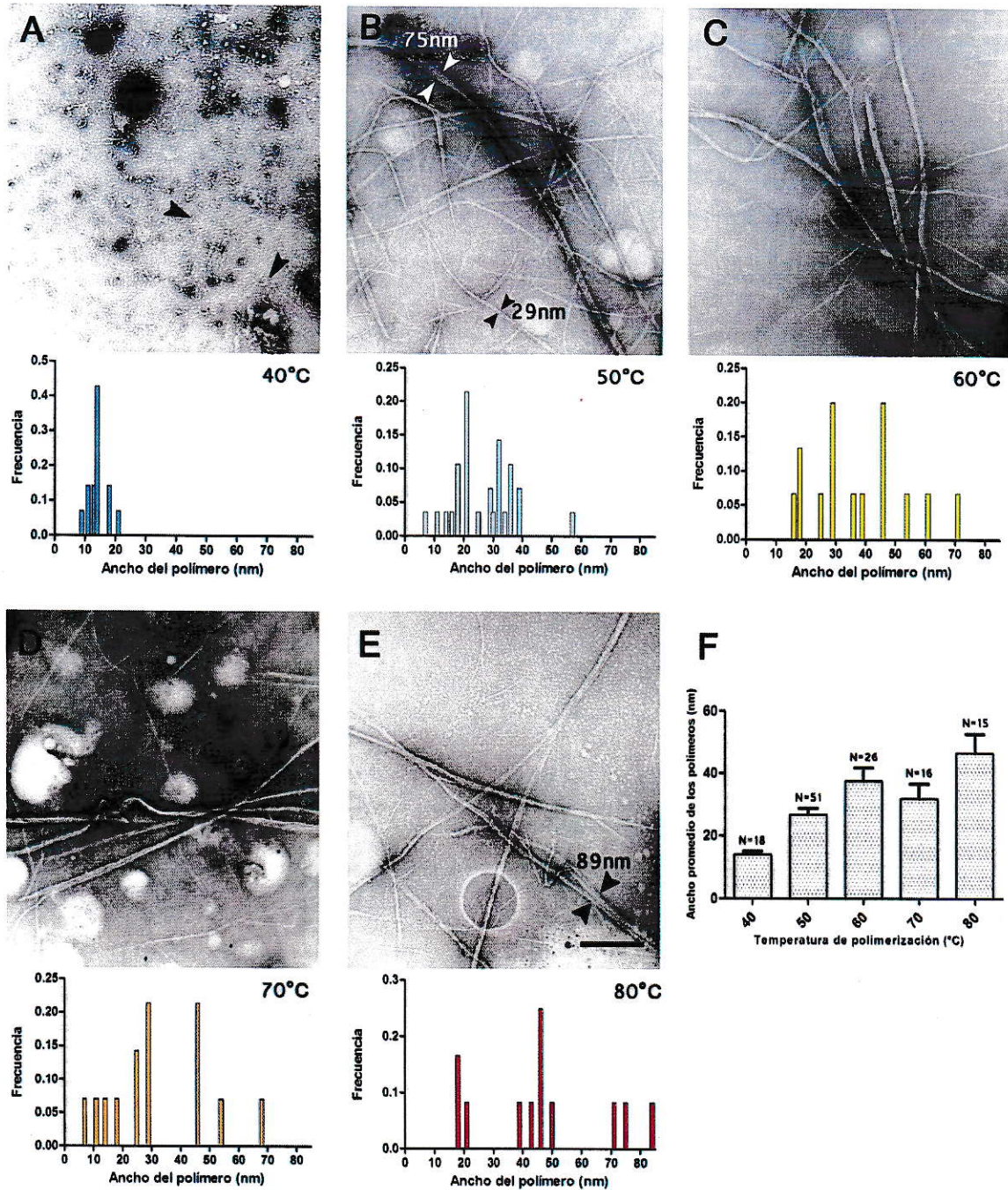


Figura 7. Fotografías de polímeros de MjFtsZ obtenidas mediante microscopía electrónica. En las figuras 7A, B, C, D y E se muestran los polímeros de MjFtsZ, cuya polimerización se indujo a 40, 50, 60, 70 y 80 °C, respectivamente. Debajo de cada figura se grafica la frecuencia de distribución del ancho de los polímeros de MjFtsZ. La solución de polimerización contenía MES-KOH 50 mM pH 6,5; KCl 300 mM; MgCl₂ 5 mM y MjFtsZ 7 μM (0,28 mg/mL). La barra en la figura 7E corresponde a 500nm el aumento de la fotografías es 20000X. En la figura 7F se muestra un gráfico del ancho promedio de los polímeros a distintas temperaturas, donde N indica el número de polímeros medidos en cada caso de una microfotografía por temperatura.

Energías de activación de la actividad GTPasa y la despolimerización de MjFtsZ

La actividad GTPasa y la velocidad de despolimerización de MjFtsZ (7 μM equivalente a 0,28 mg/mL) se midieron por el método de verde de malaquita modificado y mediante dispersión de luz, respectivamente a 40, 50, 55, 60, 70, 75 y 80 $^{\circ}\text{C}$, en amortiguador MES-KOH 50 mM pH 6,5; KCl 300 mM; MgCl_2 5 mM. A partir de los gráficos de dispersión de luz (figura 8A) se calcularon las pendientes de la primera fase de despolimerización, y se obtuvo la velocidad de despolimerización (k), cuyo valor se utilizó para determinar la energía de activación de despolimerización (E_{aDes}). La actividad GTPasa de MjFtsZ a 40, 45, 50, 55, 65, 70 y 80 $^{\circ}\text{C}$, se midió en el mismo amortiguador y los resultados se muestran en la figura 6F, a partir de las velocidades máximas de hidrólisis de GTP se calculó la k_{cat} (tabla 3), cuyo valor se utilizó para determinar la energía de activación de la actividad GTPasa ($E_{aGTPasa}$). Ambos valores de la energía de activación E_{aDes} y $E_{aGTPasa}$ se calcularon a partir de la ecuación de Arrhenius:

$$(8) \quad k = A \cdot e^{-E_a/RT}$$

El gráfico de Arrhenius se construyó utilizando la ecuación:

$$(9) \quad \ln k = \ln A - \frac{E_a}{RT}$$

Donde:

R : Constante ideal de los gases

T : Temperatura absoluta

A : Factor de frecuencia

k : Velocidad de reacción

E_a : Energía de activación

La figura 8A muestra las curvas de polimerización y despolimerización de los polímeros de MjFtsZ 7 μM a diferentes temperaturas y, la figura 8B muestra el gráfico de Arrhenius para las velocidades de despolimerización obtenidas de la primera fase de despolimerización que se muestran de la figura Suplementaria 1. En la figura 8A se observa el mismo comportamiento antes descrito: a mayor temperatura, mayor es el máximo de polimerización y mayor la velocidad de despolimerización de MjFtsZ. En la figura 8B se observa que el gráfico de Arrhenius es bifásico para la velocidad de despolimerización de MjFtsZ, y el punto de quiebre se produce a los 62 °C. En consecuencia, hay dos valores de energía de activación uno de 152 kJ/mol (36,3 kcal/mol) para temperaturas de despolimerización entre 40 y 62 °C y, una menor energía de activación de 94,0 kJ/mol (22,5 kcal/mol) para temperaturas de despolimerización por sobre los 62 °C. Estas dos energías de activación de despolimerización se relacionan con la estructura de los polímeros a las diferentes temperaturas ensayadas. Así la población de polímeros más cortos y delgados tiene una mayor energía de activación de despolimerización que la otra población. Se observa también que la estabilidad de los polímeros disminuye con la temperatura y al graficar el tiempo de permanencia de los polímeros en función de la temperatura se observa un quiebre a 60 °C (figura 8C), exceptuando el punto a 40 °C debido a que como se observa en la microscopía electrónica a esta temperatura hay una escasa formación de polímeros.

La figura 8D muestra el gráfico de Arrhenius para la constante catalítica de la actividad GTPasa dependiente de la polimerización, aquí se observa que el comportamiento de MjFtsZ también es bifásico, y el punto de quiebre se produce a los 49 °C, por lo tanto durante la hidrólisis de GTP aparecen en el gráfico de Arrhenius dos energías de

activación distintas, una a temperaturas bajo los 49 °C cuyo valor es de 58,2 kJ/mol (13,9 kcal /mol) y, una menor energía de activación de valor 19,7 kJ/mol (4,7 kcal/mol) para la actividad GTPasa por sobre los 49 °C. Es notable que a altas temperaturas (sobre 50 °C) la energía de activación para la actividad GTPasa de MjFtsZ es similar a la reportada para la de polimerización de microtúbulos (4,8 kcal/mol), principalmente dada por el rompimiento de las interacciones laterales (Molodtsov y *col.*, 2005).

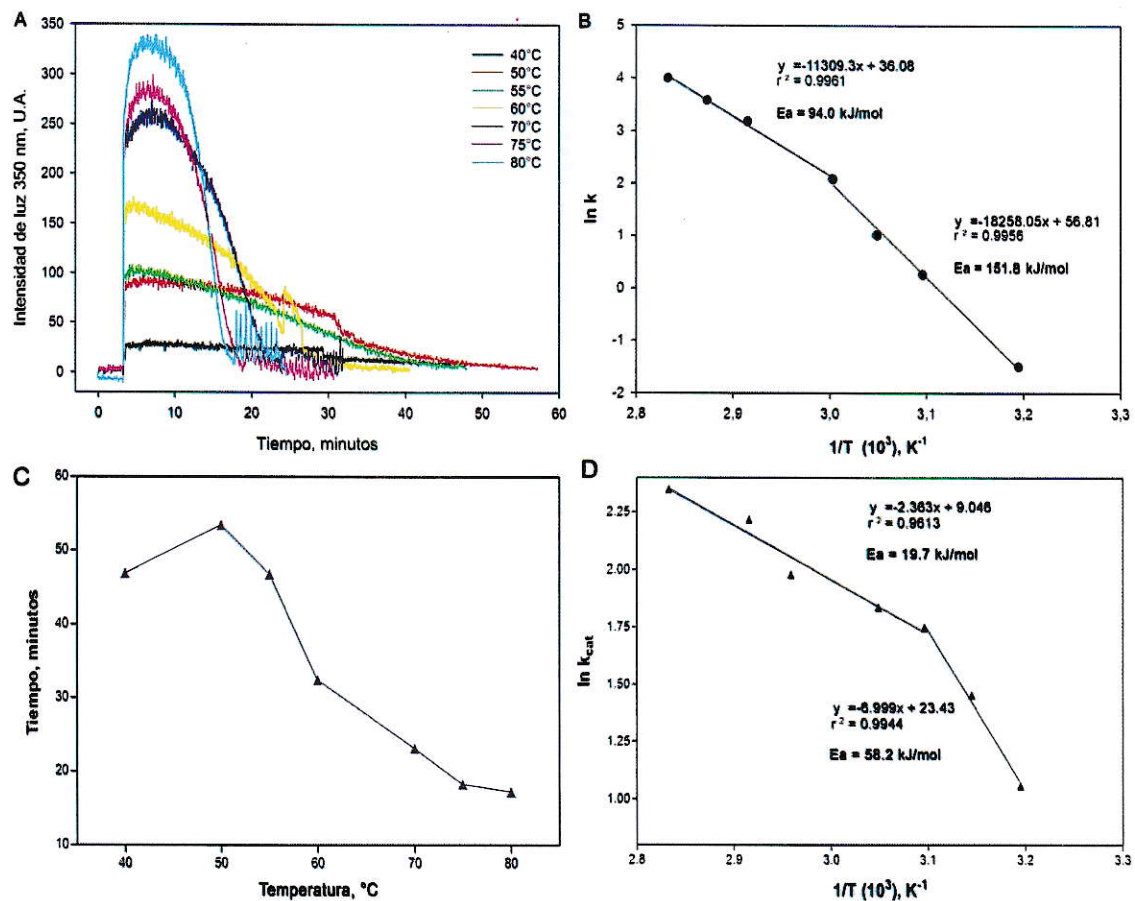


Figura 8. Energías de activación para la actividad GTPasa y la despolimerización de MjFtsZ a distintas temperaturas. La figura 8A muestra la dispersión de luz a 90° en función del tiempo a distintas temperaturas. La figura 8B muestra el gráfico de Arrhenius de la velocidad de despolimerización de MjFtsZ, k , E_a corresponde a la energía de activación calculada para cada recta. En 8C se grafica el tiempo de permanencia de los polímeros en función de la temperatura. 8D muestra el gráfico de Arrhenius para la velocidad de hidrólisis de GTP catalizada por MjFtsZ, se indican las ecuaciones de las rectas y la energía de activación calculada en un intervalo de temperatura entre 40 y 80 °C.

Efecto de la temperatura sobre ΔG^* , ΔH^* y ΔS^* de la actividad GTPasa y la despolimerización de MjFtsZ

En la determinación de la energía libre, entropía y entalpía del estado activado se utiliza la teoría de las velocidades absolutas que se basa en la mecánica estadística, a diferencia la ecuación de Arrhenius usada para determinar la energía de activación, que se basa en la teoría de las colisiones (Castellan, G., 1974) . La teoría de las velocidades absolutas de reacción la desarrolló H. Eyring en 1935, basándose fundamentalmente en la postulación de que los reactantes se encuentran siempre en equilibrio con el estado de transición, lo cual se deduce de consideraciones estadísticas de que el número de moléculas que han adquirido la energía necesaria para alcanzar el estado activado es proporcional a $e^{-E_a/RT}$, cuyo valor se incrementa con la temperatura. El equilibrio entre los reactantes y el estado de transición se expresa como:



Donde la constante de equilibrio es

$$K^* = \frac{[M^*]}{[A][B]}$$

La velocidad de la reacción está dada por la velocidad a la cual los complejos activados se descomponen en productos



En la teoría de las velocidades absolutas la constante de velocidad, k , es:

$$(10) \quad k = \kappa (Q^*/Q) \frac{k_b T}{h} K^*$$

Donde $\frac{k_b T}{h}$ es el "factor de frecuencia" de Eyring, y kappa (κ) el factor de transmisión, el cual mide la probabilidad promedio que tienen los reactantes cuya energía excede ΔE^0

de reaccionar efectivamente. Q^* y Q son las funciones de partición, y miden el número de estados térmicamente accesibles entre la cima y el pozo del potencial energético. Dado que las reacciones químicas son procesos mecano cuánticos, la probabilidad de que aquellos reactantes que estén suficientemente energizados realmente reaccionen no es 1 (Jordan, P., 1999).

El coeficiente de transmisión generalmente es cercano a 1,0 para reacciones simples. Sin embargo, hay una gran atenuación de κ para reacciones complejas debido al roce viscoso del medio. En catálisis enzimática la teoría del estado de transición se usa sólo cualitativamente o para ver cambios en las velocidades donde el coeficiente de transmisión y otros efectos se cancelan y así pueden ser ignorados (Fersht, A., 1999). Para determinar el valor del factor pre-exponencial en la ecuación de Eyring hace falta conocer las masas atómicas, arreglo geométrico, las constantes de fuerza de los enlaces de valencia y el largo de los enlaces, entre otros, de las moléculas que conforman el complejo activado (Jordan, C. P., 1979; Herschbach y cols., 1956). Todo esto impide el cálculo del factor pre-exponencial en el sistema FtsZ-GTP ó FtsZ-GDP que está formado por múltiples átomos, en consecuencia se asumirá que $\kappa(Q^*/Q) = 1$, y todas las variables termodinámicas que se calculen serán aparentes, en este sentido aquí se utiliza la teoría del estado de transición cualitativamente.

La constante de equilibrio K^* en la ecuación (10) puede escribirse en función de una energía* de Gibbs estándar de activación ΔG^* :

$$(11) \quad \Delta G^* = -RT \ln K^* = -RT \ln(kh / \kappa (Q^*/Q) k_b T)$$

De forma que k se puede expresar como:

$$(12) \quad k = \kappa (Q^*/Q) \frac{k_b T}{h} e^{-\Delta G^*/RT}$$

$$(13) \quad k = \kappa (Q^*/Q) \frac{k_b T}{h} e^{-\Delta H^*/RT} e^{\Delta S^*/R}$$

Donde:

R: Constante ideal de los gases

k_b : Constante de Boltzman

h : Constante de Planck

T: Temperatura absoluta

k : Constante de velocidad

ΔH^* : Cambio de entalpía de activación

ΔS^* : Cambio de entropía de activación

κ : Factor de transmisión

(Q^*/Q) : Función de partición

A partir de la expresión (12) se calculó el ΔG^* utilizando $\kappa(Q^*/Q) = 1$, la velocidad de despolimerización (k) y la k_{cat} . Para calcular ΔH^* se toma el logaritmo natural de la constante de velocidad respecto al inverso de la temperatura absoluta y se obtiene:

$$(14) \quad \frac{d(\ln k)}{d(1/T)} = \frac{-(\Delta H^* + RT)}{R} = -E_a/R$$

Esta expresión se utilizó para calcular ΔH^* a partir de las energías de activación de la despolimerización y de la actividad GTPasa previamente calculadas. Para determinar ΔS^* se utilizó la relación:

$$(15) \quad \Delta G^* = \Delta H^* - T\Delta S^*$$

Tabla 4. ΔG^* , ΔH^* y ΔS^* aparentes de la velocidad de despolimerización. Se muestran los valores de energía de activación, y los valores aparentes de la energía de Gibbs de activación, entalpía de activación y entropía de activación calculados para la velocidad de despolimerización de MjFtsZ, considerando $\kappa(Q^*/Q)=1$.

Temperatura (°C)	E_a (kJ/mol)	ΔG^* (kJ/mol)	ΔH^* (kJ/mol)	ΔS^* (J/mol·K)
40	151,8	91,3	149,2	184,9
50		89,6	149,1	184,2
55		89,0	149,1	183,1
60	94,0	87,4	91,3	11,5
70		87,0	91,2	12,2
75		87,2	91,1	11,4
80		87,2	91,1	11,0

Tabla 5. ΔG^* , ΔH^* y ΔS^* aparentes de la actividad GTPasa. Se muestran los valores de energía de activación y los valores aparentes de la energía de Gibbs de activación, entalpía de activación y entropía de activación calculado para la actividad GTPasa de MjFtsZ, considerando $\kappa(Q^*/Q) = 1$.

Temperatura (°C)	E_a (kJ/mol)	ΔG^* (kJ/mol)	ΔH^* (kJ/mol)	ΔS^* (J/mol·K)
40	58,2	84,7	55,6	-92,9
45		85,0	55,6	-92,7
50		85,6	16,9	-212,6
55	19,7	86,8	16,9	-212,9
65		89,1	16,8	-213,7
70		89,8	16,8	-212,7
80		92,1	16,7	-213,5

Como se puede observar en las tablas 4 y 5 la entalpía de activación (ΔH^*) es menor a mayores temperaturas en la despolimerización de MjFtsZ ($p < 0,0001$; entre 62 y 80 °C) y la actividad GTPasa ($p < 0,0001$; entre 49 y 80 °C), vale decir, la ΔH^* es más favorable tanto para la despolimerización como para la actividad GTPasa a mayor temperatura. La entropía de activación (ΔS^*) de la actividad GTPasa es desfavorable, siendo menos favorable a altas temperaturas ($p < 0,0001$), condición en la cual se observa la mayor actividad GTPasa de MjFtsZ. Por otra parte, en la despolimerización, la entropía de activación es favorable, pero al igual que en la actividad GTPasa, la ΔS^*

de la despolimerización es mayor a bajas temperaturas (entre 40 y 62 °C), y disminuye ($p < 0,0001$) con el aumento de la temperatura.

La energía de Gibbs de activación (ΔG^*) es positiva a todas las temperaturas y se torna levemente menor a las temperaturas más bajas en la actividad GTPasa ($p = 0,0300$; entre 40 y 49°C), mientras que durante la despolimerización el ΔG^* no es significativamente distinto entre altas y bajas temperaturas ($p = 0,0577$).

Los valores de ΔG^* , ΔS^* y ΔH^* mostrados en las tablas 4 y 5 se calcularon utilizando $\kappa(Q^*/Q) = 1$, este factor pre-exponencial aquí no está determinado y se supone que su valor es 1, como para las reacciones enzimáticas. Sin embargo, para reacciones bimoleculares en fase gaseosa de moléculas inorgánicas se estimó que este valor puede variar entre 0,01 y 100 (Jordan, P., 1999; Herschbach, D.R. y *col.*, 1956). En consecuencia, no se puede afirmar que los valores de ΔG^* , ΔS^* y ΔH^* calculados sean exactos, sin embargo, las tendencias antes descritas de cada variable termodinámica entre altas y bajas temperaturas se mantienen como se muestra en la figura Suplementaria 3.

DISCUSIÓN

En este trabajo, se purificó MjFtsZ recombinante sobreexpresada en *E. coli* del organismo hipertermófilo *Methanococcus jannaschii*, y se caracterizó la polimerización, despolimerización y la actividad GTPasa a distintas temperaturas. En trabajos previos se ha explorado la polimerización y observado la morfología de los polímeros de MjFtsZ en condiciones distintas a las que se encuentra en el organismo hipertermófilo. Se han observado los diferentes tipos de polímeros formados por la proteína mediante microscopía electrónica (Löwe & Amos, 1999; Löwe & Amos, 2000), al inducirlos con altas concentraciones de Ca^{2+} a temperatura ambiente (20-30°C), una condición que no existe en el citoplasma de la *archaea*. En un acercamiento un poco más fisiológico, se caracterizó la polimerización inducida por GTP y el análogo no hidrolizable GMPCCP, por dispersión de luz y microscopía electrónica y, se analizó la influencia de Mg^{2+} , K^+ , Na^+ y EDTA a 55 °C (Oliva y col., 2003). Como se observa, estas condiciones no reflejan su comportamiento en las condiciones óptimas de crecimiento de *M. jannaschii*, alta salinidad y temperatura alrededor de 85 °C, condiciones en las que naturalmente se encuentra la proteína en el citoplasma de la *archaea*.

Con el propósito de entender cómo polimeriza FtsZ en las condiciones extremas en que vive el termófilo, se determinó el curso temporal de la polimerización de MjFtsZ mediante dispersión de luz a distintas temperaturas. Se observó que el aumento de la temperatura y de la concentración de proteína potencian la polimerización de MjFtsZ, así se observó un aumento de la dispersión de luz, relacionado directamente con la formación de manojos de polímeros y un incremento de la actividad GTPasa, debido al aumento de la hidrólisis de GTP. Ambos eventos afectaron la estabilidad de los

polímeros que se reflejó como una disminución de la duración del estado estacionario. Se observó también una despolimerización más rápida de los polímeros al aumentar la temperatura.

En un mecanismo de polimerización cooperativa, la fragmentación de los polímeros es varios órdenes de magnitud más desfavorable que la despolimerización en los extremos del polímero, también presenta una concentración crítica que implica una transición abrupta entre un estado despolimerizado y la polimerización, generándose una latencia cinética en la polimerización a concentraciones cercanas a la concentración crítica que disminuye con el aumento de la concentración de proteína.

La fase de elongación sumada a la fase de nucleación resulta en polímeros largos en equilibrio con una población de monómeros cuya concentración es equivalente a la concentración crítica. Aunque aún no se sabe si el mecanismo de polimerización es cooperativo o isodésmico, hay mucha evidencia a favor del mecanismo cooperativo. Los resultados obtenidos, muestran una concentración crítica, coincidiendo con el mecanismo de polimerización cooperativo.

Al graficar la dispersión máxima de luz en función de la concentración de MjFtsZ se observa, al igual que en EcFtsZ, la existencia de una concentración crítica característica de un mecanismo de polimerización cooperativa. Se determinó la concentración crítica a distintas temperaturas (figura 5) y se observó una disminución de la concentración crítica conforme mayor es la temperatura de polimerización. Lo que se condice con un aumento en la polimerización. Sin embargo, la observación de un aumento de la máxima dispersión de luz con el aumento de temperatura a una misma concentración de proteína (figura 5B), vale decir, una vez que la proteína polimeriza los

máximos de dispersión son mayores a más alta temperatura, sugiere la formación de polímeros de formas distintas a cada temperatura. Este fenómeno se confirma en las microfotografías (figura 7), donde se observa la disminución del número de polímeros angostos de 7 a 20 nm de ancho, y el aumento de la población de manojos de polímeros de 40 a 80 nm de ancho (figura 7F), además de una disminución el número de polímeros conforme aumenta la temperatura. Por consiguiente, consecuente con un mecanismo de polimerización cooperativa, la población de polímeros que forma MjFtsZ corresponde a polímeros largos y manojos en lugar de pequeños fragmentos de polímeros.

Previamente se describió una concentración crítica de MjFtsZ de $\approx 2\mu\text{M}$ a 55°C (Oliva y *col.*, 2003) en el mismo amortiguador de reacción aquí usado. Los valores de concentración crítica de MjFtsZ determinados a las distintas temperaturas son similares al descrito, excepto a 40°C que presenta una concentración crítica de $3,94\ \mu\text{M}$. Entre los 50 y 80°C de temperatura la concentración crítica es menor y se encuentra en un rango de $1,1 - 1,8\ \mu\text{M}$, donde las menores concentraciones se corresponden con las mayores temperaturas de polimerización. En general, a 40°C la polimerización de MjFtsZ está muy disminuida, como lo indica la escasa formación de polímeros (microfotografías figura 7A) y la baja actividad GTPasa, con una consecuente disminución en la producción de ortofosfato, excepto al aumentar la concentración por sobre la concentración 7 y $10\ \mu\text{M}$ (figura 6A).

Se ha reportado en varios trabajos que la velocidad de hidrólisis catalizada por FtsZ es dependiente de la concentración de proteína (Romberg y *col.*, 2001; Scheffers y *col.*, 2002; Mingorance y *col.*, 2001). En nuestro trabajo se confirmó que la velocidad inicial de hidrólisis es mayor a mayores concentraciones de proteína y a mayor temperatura

de reacción. En *E. coli* la concentración de EcFtsZ en el citoplasma fluctúa alrededor de 4 y 10 μM (Lu y col., 1998; Kubitschek, 1986), lo cual nos sirve de punto de referencia para analizar el efecto de la temperatura. A 40°C MjFtsZ requiere de concentraciones mayores a 5 μM para inducir la formación de filamentos cortos y delgados, equivalentes a dobles protofilamentos (como se ve en la figura 7A), e inducir una discreta actividad GTPasa, como se observa en las curvas de progreso (figura 6A). Por sobre los 50 °C, MjFtsZ ya a concentraciones de 3 μM forma polímeros y presenta actividad GTPasa detectable. Se ha estimado que la actividad específica de FtsZ de *Escherichia coli* (EcFtsZ) es aproximadamente 4,5 /min·FtsZ en condiciones óptimas de polimerización, es decir, pH 6,5, en presencia de Mg^{2+} , altas concentraciones de K^+ y a 30 °C (Romberg y Mitchinson, 2004). Para MjFtsZ a 40 °C la velocidad promedio de hidrólisis de GTP es de $\approx 4 \mu\text{M}/\text{min}$, similar a la reportada para EcFtsZ, sin embargo a 80 °C la velocidad promedio de hidrólisis de GTP es de $\approx 54 \mu\text{M}/\text{min}$, superior a la reportada para EcFtsZ (Romberg y Mitchinson, 2004). En consecuencia, a 80 °C MjFtsZ está en una condición de polimerización que permite una alta actividad GTPasa, incluso superior a la de un organismo mesófilo.

Es necesario considerar que en el contexto celular es necesario un equilibrio entre la polimerización y despolimerización de FtsZ, puesto que la formación de polímeros permite el establecimiento del anillo Z y el posterior reclutamiento de las proteínas del *divisoma* y, por otro lado, la despolimerización permite la constricción del anillo durante el proceso de citoquinesis. Si los polímeros despolimerizan demasiado rápido no se podría establecer el anillo Z y, por el contrario, la formación de polímeros demasiado estables impediría la constricción del anillo Z, y en consecuencia la división celular. Por lo tanto, MjFtsZ altamente dinámica tanto en la polimerización como en la

despolimerización favorece la progresión del ciclo celular, permitiendo el establecimiento del anillo Z y su posterior constricción en la citoquinesis. Como se observa, la actividad específica de FtsZ disminuye conforme aumenta la concentración de MjFtsZ (figura 6D) a 60 y 80 °C, lo cual se espera que ocurra debido a una disminución del intercambio de GDP por GTP en el polímero. Esta disminución del intercambio de GDP por GTP en el polímero, a su vez, podría deberse al establecimiento de interacciones laterales y a la disminución del número de puntas de polímeros causado por la disminución del número de polímeros y a su alargamiento. Por lo tanto, conforme aumenta la temperatura MjFtsZ presenta una mayor velocidad de hidrólisis y actividad específica, pero a su vez el establecimiento de interacciones laterales y longitudinales a altas temperaturas podría tener un rol estabilizador de los polímeros de MjFtsZ.

Los resultados de microscopía electrónica muestran por primera vez que a medida que se aumenta la temperatura por sobre los 50 °C empiezan a formarse sábanas bidimensionales, que a mayores temperaturas se agrupan como manojos. La inducción de sábanas y túbulos de alrededor de 20 nm de ancho sólo se había observado con un aumento sustancial de la concentración de calcio (8 – 10 mM) tanto con EcFtsZ como con MjFtsZ a temperatura ambiente (20 – 30 °C) (Löwe y Amos, 1999). A 40°C MjFtsZ forma filamentos cortos y curvos (figura 7A). Así, a bajas temperaturas la formación de hojas y túbulos se debería solo a la inducción por Ca^{2+} que no tendría una mayor relevancia fisiológica, pues las concentraciones de calcio utilizadas están varias órdenes de magnitud por sobre las presentes en una célula. Como se dijo, a temperaturas mayores a 50 °C se observa la formación de manojos largos polímeros (Figura 7B), resultados que se ven confirmados por las observaciones de Oliva y *col.*,

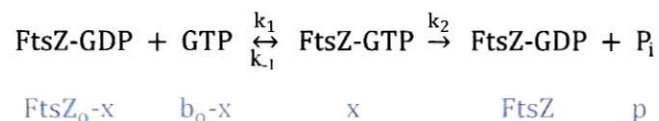
(2003), que muestran el mismo tipo de estructuras a 55 °C utilizando MjFtsZ con y sin cola de poli-histidina. Esto valida los resultados aquí expuestos, y por otra parte, sugiere que la adición de la cola de poli-histidina, necesaria para la purificación de la proteína, no provoca diferencias significativas entre los resultados. En incubaciones a temperaturas mayores a 50°C se observa una disminución del número de filamentos, con un notorio aumento del número de manojos, y un aumento del largo y ancho de éstos (figura 7F) conforme aumenta la temperatura.

La conducta bifásica de la energía de activación se correlaciona con la distribución de la forma y tamaño de los polímeros. Así, a bajas temperaturas entre 40 y 60 °C la energía de activación de despolimerización de los numerosos polímeros cortos y delgados es mayor que la obtenida por sobre los 60 °C donde abundan las hojas y manojos. El aumento de la temperatura induce la formación de manojos de protofilamentos anchos y largos sobre 60 °C y su despolimerización muestra una energía de activación menor. La actividad GTPasa es muy baja a 40 °C y aumenta alrededor de 5 veces cuando la temperatura se incrementa en 20 °C. La energía de activación entre 40 y 60 °C es 1,6 veces mayor que entre 60 y 80 °C, lo que se correlaciona con el cambio de forma de los polímeros y su despolimerización.

Notablemente, MjFtsZ presenta un comportamiento bifásico en un gráfico de Arrhenius tanto para la velocidad de despolimerización como para la actividad GTPasa. De aquí se pueden obtener dos energías de activación distintas para dos rangos de temperatura que presentan un punto de quiebre de 62 y 49 °C para la despolimerización y la actividad GTPasa, respectivamente. Este comportamiento bifásico de los gráficos de Arrhenius, nunca antes documentado para FtsZ, es propio de algunas proteínas termófilas, pero es un fenómeno poco frecuente (Vieille y Zeikus,

2001). El comportamiento lineal usual en los gráficos de Arrhenius proviene del hecho que las constantes de velocidad individuales dependen de la temperatura de modo proporcional en un rango de temperatura dado. Por el contrario, el cambio de pendiente en un gráfico de Arrhenius bifásico se explica de dos formas. La primera es que las dependencias respecto de la temperatura de las constantes de velocidad de la reacción enzimática son muy distintas entre sí, de modo que al cambiar la temperatura de la reacción sus contribuciones a la velocidad de reacción cambian sustancialmente generando un cambio de pendiente en el gráfico de Arrhenius. La segunda explicación para este comportamiento se basa en un cambio de fase de la enzima, por esto se aplica usualmente a enzimas asociadas a membrana. Así, una enzima rodeada parcialmente por fosfolípidos cambia su forma en uno de los pasos limitantes de la velocidad de la reacción, lo que lleva a la aparición de cambios compensatorios en la entalpía y entropía de activación a la temperatura en que los fosfolípidos se licúan, de modo que la entalpía de activación es necesariamente menor sobre esta temperatura (Londesborough, 1980).

Si la velocidad de hidrólisis de GTP está dada por la hidrólisis de GTP en el polímero, que es la etapa limitante (Romberg y Mitchison, 2004), entonces la formación de los productos está dada por:



Lo que se conoce en esta reacción es $[\text{FtsZ}_0]$ (que corresponde $[\text{FtsZ}_T - \text{FtsZ}_{Cc}]$) y b_0 $[\text{GTP}]$ que están dados por:

$$\text{FtsZ}_0 = \text{FtsZ} + x$$

$$b_0 = b + x$$

Si $b_0 \gg \gg FtsZ_0$, entonces $x \ll \ll b_0$ de allí que $b = b_0$

Considerando lo anterior y si el primer paso de intercambio de GDP por GTP en FtsZ es rápido y alcanza el equilibrio, es decir si $k_2 \ll \ll k_{-1}$ se tiene $k_d = k_{-1}/k_1$

Luego en el estado estacionario tenemos que:

$$(16) \quad x = (FtsZ_0 - x)b/k_d$$

Así, esta ecuación se puede arreglar y se tiene:

$$(17) \quad x = FtsZ_0 / ([k_d/b] + 1)$$

El segundo paso de la reacción es $FtsZ-GTP \leftrightarrow FtsZ-GDP + Pi$ y es una simple reacción de primer orden cuya constante es k_2 y se tiene:

$$(18) \quad v = k_2 x = k_2 (FtsZ_0) / ([k_d/b] + 1) = k_2 (FtsZ_0) b / (k_d + b)$$

La ecuación anterior es del tipo Michaelis y Menten (MM) por lo tanto si b_0 es saturante es decir $b \gg k_d$ se tiene que la ecuación de velocidad de la reacción de hidrólisis es:

$$(19) \quad v = k_2 (FtsZ_0)$$

Donde:

k_1 : Es la constante de velocidad de intercambio GDP por GTP.

k_2 : Es la constante de velocidad de la hidrólisis de GTP.

Por lo tanto, el comportamiento bifásico podría ser causado por la dependencia distinta respecto a la temperatura de k_1 o k_2 , situación difícil de dilucidar con nuestros resultados. Un modelo que se adapta a la formación de hojas con la temperatura y que podría dar cuenta del cambio de pendiente en el gráfico de Arrhenius, es un cambio de la constante k_1 y de la constante k_2 con la temperatura. Así la polimerización de protofilamentos induciría una actividad GTPasa con mayor energía de activación que cuando estos interactúan para formar hojas. Lo mismo podría ocurrir durante la

despolimerización, pues como se mide el cambio en dispersión de luz y esta es mayor para hojas y manojos de éstas, su despolimerización tendría una energía de activación menor a mayores temperaturas.

Otro modelo compatible, tiene relación con el cambio de estado de la enzima, discutido anteriormente, y con otros hallazgos para la despolimerización de EcFtsZ. Así, aunque FtsZ es una proteína soluble, experimenta un cambio de estado (cambio en las poblaciones de ensamblajes conformacionales) al hallarse unida a GTP y rodeada de otros monómeros cuando es parte de un polímero y/o un manojito. Otro cambio de estado fue descrito por Romberg *y col.*, 2004, donde se reportó que el paso limitante de la velocidad es la hidrólisis de GTP, y que los polímeros de FtsZ-GDP son curvos mientras que los polímeros de FtsZ-GTP son rectos. De este modo, los datos reportados en la literatura en conjunto con los resultados aquí presentados, sugieren que el comportamiento bifásico observado tanto en la despolimerización como en la actividad GTPasa de MjFtsZ a distintas temperaturas, podría estar relacionado con cambios de estado experimentados por la proteína: la formación de manojos de filamentos y el cambio en la curvatura de los polímeros al hidrolizar GTP. Y precisamente los cambios de estados en el paso limitante de la velocidad de la reacción, la hidrólisis de GTP en este caso, llevarían a la aparición de cambios compensatorios en la entalpía y entropía de activación a la temperatura en que MjFtsZ tiene una alta actividad GTPasa, de modo que la entalpía de activación es necesariamente menor sobre esta temperatura.

No debemos descartar la posibilidad que los gráficos de Arrhenius pueden ser distorsionados como resultado de diversos factores, entre ellos, las mediciones realizadas a una única concentración de sustrato, donde la dependencia de la

temperatura de las constantes de Michaelis-Menten y una posible inhibición por sustrato se mezclan con la dependencia de la velocidad (Londesborough, 1980). Esto último es posible en el presente trabajo, dado que las mediciones se realizaron a una única concentración de GTP. Sin embargo, aquí se puede descartar la posibilidad de un comportamiento artefactual, pues como se observa en la figura 3A la dispersión de luz de los polímeros de MjFtsZ a 1mM de GTP es tan alta como la observada con el doble de GTP.

La formación de hojas y manojos se ve favorecida con la temperatura lo que se puede explicar a través de interacciones hidrófobas que son favorecidas a mayores temperaturas, pues son de tipo exergónicas de acuerdo a la ecuación $\Delta G^{\circ} = \Delta H^{\circ} - T\Delta S^{\circ}$. En este caso es el término $T\Delta S$ el que favorece la energía libre de polimerización en presencia de GTP. Estas mismas interacciones se ven desfavorecidas en presencia de GDP e inducen la despolimerización de manojos y hojas, y en último término de los protofilamentos.

La formación del estado activado para la actividad GTPasa es un proceso endergónico ($\Delta G^* > 0$), donde el valor de la entalpía de activación es menor a mayor temperatura. El valor de la entropía de activación de la actividad GTPasa es negativo a todas las temperaturas estudiadas y sobre 50 °C es aún menor, a su vez, la energía de activación es menor y la actividad GTPasa mayor.

El conjunto de estos resultados indican que el estado de transición es menos desfavorecido por el cambio de energía interna (ΔH^*) sobre 50 °C, pero entrópicamente más desfavorable. En consecuencia, el estado de transición a temperaturas altas se encuentra más ordenado que a temperaturas más bajas, lo cual sugiere que el número de ensambles conformacionales es menor a mayor temperatura.

Dado que el sitio activo de una enzima es complementario al estado de transición del sustrato más que a su estado fundamental, la disminución de los posibles ensambles conformacionales a temperaturas sobre 50 °C, coincidiría con el aumento de la actividad GTPasa. Dicho aumento de la actividad GTPasa, se debería al aumento de la probabilidad de alcanzar el estado de transición producto de la disminución de los ensambles conformacionales.

La hidrólisis de GTP es el paso limitante de la velocidad de reacción de MjFtsZ, por lo tanto esta transición en el sitio activo de la proteína durante el paso limitante de la velocidad, concordaría con la existencia de dos energías de activación: 1) Bajo 50 °C con varios ensambles conformacionales posibles y por lo tanto un estado de transición menos probable, y 2) Sobre 50 °C con menos ensambles conformacionales posibles (una estructura más rígida) y por lo tanto un estado de transición más probable.

La formación del estado activado para la velocidad de despolimerización también es un proceso endergónico ($\Delta G^* > 0$), donde el valor de la entalpía de activación es menor sobre 60 °C. A diferencia de la actividad GTPasa, el valor de la entropía de activación de la velocidad de despolimerización es positivo, siendo menor a temperaturas sobre los 60 °C. Además sobre 60 °C la energía de activación es menor, hay una mayor formación de manojos y polímeros largos, y la velocidad de despolimerización es mayor.

Estos resultados indican que el estado de transición de la despolimerización es menos desfavorecido por el cambio de energía interna (ΔH^*) sobre 60 °C, y que pese a que la despolimerización está entrópicamente favorecida a todas las temperaturas, lo está en menor medida sobre los 60 °C. En consecuencia, el estado de transición a temperaturas bajas se encuentra más desordenado que a temperaturas más altas. Esta entropía de activación de la velocidad de despolimerización podría generarse por

la curvatura de los polímeros de MjFtsZ una vez que el GTP es hidrolizado, previo a la despolimerización de los polímeros.

La energía interna (ΔH^*) del estado activado de la despolimerización, en general a cualquier temperatura es menos favorable comparada con ΔH^* de la actividad GTPasa. En contraste, la entropía de activación de la velocidad de despolimerización favorece (aunque levemente) esta transición. Vale decir, para la velocidad de despolimerización el estado de transición es favorecido por la entropía de activación y no por la energía interna de activación.

En la variación global de la entropía de activación de la velocidad de despolimerización contribuyen las interacciones laterales y longitudinales entre polímeros de FtsZ, produciendo una disminución de la entropía debido a la organización de los polímeros de FtsZ en manojos. Sin embargo, la disminución de las moléculas de agua organizadas alrededor de la superficie de un manajo en lugar de la superficie mayor proporcionada por cada polímero por separado produce un aumento de la entropía. También se debe considerar que el aumento de la temperatura deja más expuestas las cadenas laterales de los residuos aminoacídicos de la proteína, lo cual genera una disminución de la entropía debido al aumento de la superficie hidrófoba expuesta, alrededor de la cual las moléculas de agua se organizan minimizando la superficie de contacto.

En resumen, tanto para la actividad GTPasa como para velocidad de despolimerización se generan compensaciones entre ΔS^* y ΔH^* , en respuesta al aumento de la temperatura, durante el establecimiento y ruptura del complejo activado.

RESUMEN DE RESULTADOS

Con experimentos de dispersión de luz se determinó la concentración crítica de la proteína en un intervalo entre 40 y 80 °C, y se observó que la concentración crítica disminuyó conforme la temperatura aumentó. La despolimerización de MjFtsZ fue rápida y con una breve fase estacionaria a las mayores concentraciones de proteína y temperatura de polimerización.

La misma tendencia se observó en la actividad GTPasa de MjFtsZ donde a mayor temperatura aumentó la actividad específica. Se determinó que a temperaturas bajas como 40°C la proteína tiene muy baja actividad GTPasa y casi no hay formación de polímeros. A partir de la actividad GTPasa se determinó la concentración crítica bajo la cual no hubo actividad hidrolítica detectable. Se encontró que el valor de la concentración crítica es inferior al observado por dispersión de luz, pues mediante esta última técnica no se puede detectar polímeros cortos que dispersan poca luz, pero sí hidrolizan GTP que permite medir la actividad GTPasa a más bajas concentraciones de FtsZ.

El aumento de dispersión de luz durante la polimerización y el cambio de pendiente de la recta para determinar la concentración crítica sugirieron la formación de polímeros más largos y/o anchos a mayores temperaturas lo que se confirmó por microscopía electrónica. Se encontraron manojos más anchos y largos conforme aumenta la temperatura, que presentan una menor energía de activación de despolimerización y de actividad GTPasa, a diferencia de los filamentos obtenidos a más bajas temperaturas que fueron más angostos y cortos, con una menor dispersión de luz y mayor concentración crítica, y una energía de activación de despolimerización y de

actividad GTPasa mayor. Se puede explicar la mayor energía de activación por la menor actividad GTPasa a temperaturas bajas, lo que aumenta el tiempo de permanencia de los polímeros y hace más lenta la despolimerización de los filamentos.

Un gráfico de Arrhenius bifásico, es poco frecuente en enzimas termófilas. Esta conducta sugiere distintas dependencias de las constantes cinéticas de despolimerización respecto a la temperatura, ó que morfología de los polímeros de MjFtsZ afecta la actividad GTPasa generando cambios en la entalpía de activación de la despolimerización. La explicación más parsimoniosa de nuestros resultados indica que el cambio en la pendiente en el gráfico de Arrhenius depende de la presencia de hojas y manojos estabilizados por interacciones hidrófobas.

CONCLUSIONES

A altas temperaturas MjFtsZ forma manojos de polímeros, presenta una menor concentración crítica y mayor actividad GTPasa. Además presenta una menor energía de activación, ΔG^* , ΔH^* y ΔS^* para la actividad GTPasa y consecutivamente para la despolimerización, respecto a las menores temperaturas. Todas estas evidencias correlacionan una mayor actividad y dinámica en la polimerización de MjFtsZ con el establecimiento de interacciones laterales y longitudinales entre los filamentos de MjFtsZ a altas temperaturas.

Nuestros resultados en su conjunto sugieren que en la formación del anillo Z participan interacciones de tipo longitudinal y transversal que lo estabilizan a altas temperaturas, propias de los organismos termófilos y que juegan un papel importante en la transducción de energía química de la hidrólisis de GTP en energía mecánica de constricción del anillo para la división de la célula. En conclusión la transducción de la energía de hidrólisis de GTP en la energía mecánica de la división se mantiene a altas temperaturas por un cambio en la entropía de activación (estructura) y entalpía de activación (cinética) de los polímeros.

BIBLIOGRAFÍA

- Adams, D. y Errington, J., (2009). Bacterial cell division: assembly, maintenance and disassembly of the Z ring. *Nature*. **7**:642-653.
- Bramhill, D. y Thompson, C. M., (1994). GTP-dependent polymerization of *Escherichia coli* FtsZ protein to form tubules. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. **91**: 5813–5817.
- Box, G. E.; Hunter, J.S. y Hunter, W. G., (2008). Fuentes de variaciones múltiples e Introducción al diseño de productos y procesos robustos. Estadística para Investigadores: Diseño, innovación y descubrimiento. pp 353-358, 549-550. Editorial Reverté, Barcelona.
- Castellan, G., (1974). Cinética química. Fisicoquímica. pp 893-908. Addison Wesley Longman de México.
- Chen, Y.; Bjornson, K.; Redick, S. y Erickson, H., (2005). A rapid fluorescence assay for FtsZ assembly indicates cooperative assembly with a dimer nucleus. *Biophysical Journal*. **88**: 505-514.
- Erickson, H.; Taylor, D.; Taylor, K. y Bramhill, D., (1996). Bacterial cell division protein FtsZ assembles into protofilaments sheets and minirings, structural homologs of tubulin polymers. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. **93**: 519-523.
- Fersht, A., (1999). Structure and mechanism in protein science: a guide to enzyme catalysis and protein folding. pp. 54-58. W. H. Freeman and Company.
- Geladopoulos, T.P.; Sotiroidis, T.G. y Evangelopoulos, A.E., (1991). A malachite green colorimetric assay for protein phosphatase activity. *Anal. Biochem*. **192**:112–116.
- Haney, P.J.; Stees, M. y Konisky J., (1999). Analysis of thermal stabilizing interactions in mesophilic and thermophilic adenylate kinases from the genus *Methanococcus*. *J. Biol. Chem*. **274**:28453 – 28458.

- Herschbach, D.R.; Johnston, H.S.; Pitzer, K.S. y Powell, R.E., (1956). Theoretical pre-exponential factors for twelve bimolecular reactions. *J. Chem. Phys.* **25**:736–741.
- Huecas, S.; Llorca, O.; Boskovic, J.; Martín-Benito, J.; Valpuesta, JM. y Andreu, JM., (2008). Energetics and geometry of FtsZ polymers: nucleated self-assembly of single protofilaments. *Biophysical Journal*. **94**: 1796-1806.
- Jordan, P. C., (1979). Chemical kinetics and transport. pp. 269-323. Plenum Press, New York
- Kubitschek, H. E., (1986). Increase of cell mass during the division cycle of *Escherichia coli* B/rA. *J. Bacteriol.* **168**:613–618.
- Jordan, P. C., (1999). Ion Permeation and Chemical Kinetics. *J. Gen. Physiol.* **114**:601-603.
- Lanzetta, P. A.; Alvarez, L. J.; Reinach, P.S. y Candia, O., (1979). An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate. *Anal. Biochem.* **100**: 95-97.
- Li, Z.; Trimble, M.; Brun, Y. y Jensen, G., (2007). The structure of FtsZ filaments *in vivo* suggests a force-generating role in cell division. *The EMBO Journal*. **26**: 4694-4708.
- Londesborough, J., (1980). The causes of sharply bent or discontinuous Arrhenius plots for enzyme-catalyzed reactions. *Eur. J. Biochem.* **105**: 211-215.
- Löwe J. y Amos L., (1998). Crystal structure of the bacterial cell-division protein FtsZ. *Nature*. **391**: 203-206.
- Löwe J. y Amos L., (1999). Tubulin-like protofilaments in Ca²⁺-induced FtsZ sheets. *The EMBO Journal*. **9**: 2364-2371.
- Löwe J. y Amos L., (2000). Helical Tubes of FtsZ from *Methanococcus jannaschii*. *Biol. Chem.* **381**: 993-999.
- Lu, C.; Stricker, J. y Erickson H. P., (1998). FtsZ From *Escherichia coli*, *Azotobacter vinelandii*, and *Thermotoga maritima* -Quantitation, GTP Hydrolysis, and Assembly. *Cell Motility and the Cytoskeleton* **40**:71–86.

- Lu, C.; Reedy, M. y Erickson, H. P., (2000). Straight and curved conformations of FtsZ are regulated by GTP hydrolysis. *J. Bacteriol.* **182**, 164–170.
- Mingorance, J.; Rueda, S.; Gómez-Puertas, P.; Valencia, A. y Vicente, M., (2001). *Escherichia coli* FtsZ polymers contain mostly GTP and have a high nucleotide turnover. *Mol. Microbiol.* **41**, 83–91.
- Molodtsov, M. I.; Grishchuk, E. L.; Efremov, A. K.; McIntosh, J. R. y Ataulakhanov, F.I., (2005). Force production by depolymerizing microtubules: A theoretical study. *PNAS* **102**: 12: 4353–4358.
- Mukherjee, A. y Lutkenhaus, J., (1994). Guanine nucleotide-dependent assembly of FtsZ into filaments. *J. Bacteriol.* **176**: 2754–2758.
- Mukherjee, A. y Lutkenhaus J., (1998). Dynamic assembly of FtsZ regulated by GTP hydrolysis. *The EMBO Journal.* **17**(2): 462-469.
- Mukherjee, A. y Lutkenhaus J., (1999). Analysis of FtsZ assembly by light scattering and determination of the role of divalent metal cations. *J. Bacteriology.* **181**:823-832.
- Nogales, E.; Downing, K.; Amos, L. y Löwe, J., (1998). Tubulin and FtsZ form a distinct family of GTPases. *Nature Structural Biology.* **5**(6): 451-458.
- Oliva, M.A.; Huecas, S.; Palacios, J. M.; Martín-Benito, J.; Valpuesta, J.M. y Andreu, J.M., (2003). Assembly of Archaeal Cell Division Protein FtsZ and a GTPase-inactive Mutant into Double-stranded Filaments. *J. Biol. Chem.* **278**: 33562–33570.
- Oliva, M.A; Cordell, S.C. y Löwe J., (2004). Structural insights into FtsZ protofilament formation. *Nature Structural & Molecular Biology.* **11**:1243-1250.
- Pace, C. N., (1992). Contribution of the hydrophobic effect to globular protein stability. *J. Mol. Biol.* **226**: 29-35.
- Romberg, L.; Simon, M. y Erickson, H., (2001). Polymerization of FtsZ, a bacterial homolog of tubulin. Is assembly cooperative? *Journal of Biological Chemistry.* **276** (15): 11743-11753.

- Romberg, L. y Mitchison T.J., (2004). Rate-Limiting 5'-Triphosphate Hydrolysis during Nucleotide Turnover by FtsZ, a Prokaryotic tubulin Homologue Involved in Bacterial Cell Division. *Biochemistry*. **43**: 282-288.
- Santander V., (2004). Análisis filogenético y caracterización de los aminoácidos responsables de la termoestabilidad de las proteínas. Tesis para optar al título de bioquímico. Universidad de Santiago de Chile.
- Scheffers, D. J.; de Wit, J. G.; den Blaauwen, T. y Driessen, A. J., (2002). GTP hydrolysis of cell division protein FtsZ: evidence that the active site is formed by the association of monomers. *Biochemistry* **41**, 521–529.
- Sontag, C.A.; Staley, J.T. y Erickson, H.P., (2005). In vitro assembly and GTP hydrolysis by bacterial tubulins BtubA and BtubB. *JCB* **169**: 2233-238.
- Stricker, J.; Maddox, P.; Salmon, ED. y Erickson, H.P., (2002). Rapid assembly dynamics of the *Escherichia coli* FtsZ-ring demonstrated by fluorescence recover after photobleaching. *PNAS*. **99**(5): 3171-3175.
- Vieille, C. y Zeikus, G. J., (2001). Hyperthermophilic Enzymes: Sources, Uses, and Molecular mechanisms for Thermostability. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**(1): 1-43.

ANEXO

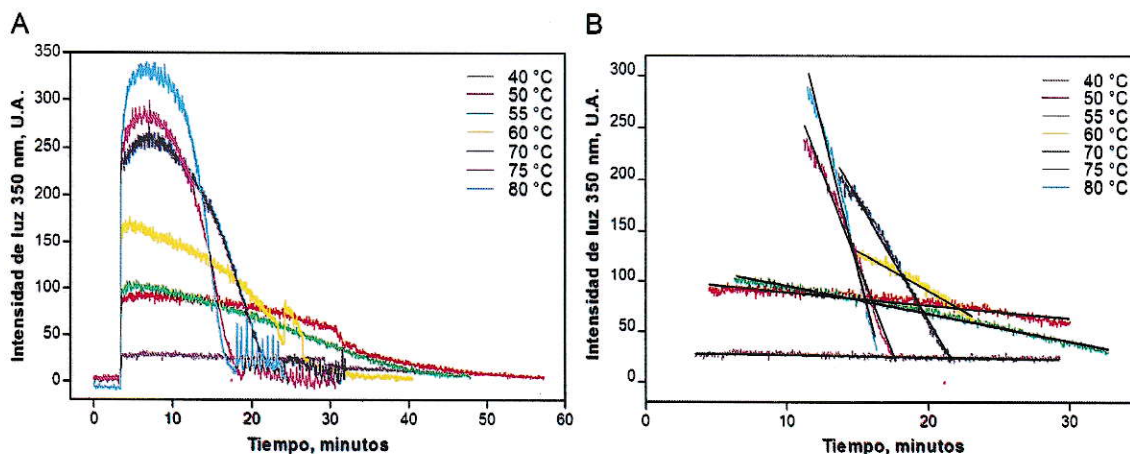


Figura Suplementaria 1. Determinación de la velocidad de despolimerización. El panel **A** muestra la dispersión de luz a 90° (en unidades arbitrarias) en función del tiempo a distintas temperaturas. En colores se indica la temperatura a la que se siguió la dispersión de luz. Se indujo la polimerización de MjFtsZ ($7\mu\text{M}$) en amortiguador de polimerización (MES 50 mM pH 6,5; KCl 300 mM, MgCl_2 5 mM), agregando GTP hasta una concentración inicial de 1 mM. El panel **B** muestra la sección de las curvas del panel A que se usaron para determinar la primera fase de la velocidad de despolimerización; se muestran también las regresiones lineales (trazos negros) usadas para determinar el valor de la velocidad de despolimerización (la pendiente de la regresión lineal).

Tabla Suplementaria 1. Velocidades de despolimerización. Se indican las temperaturas usadas en las reacciones de polimerización, las ecuaciones de las rectas trazadas sobre la primera fase de despolimerización, el coeficiente de correlación de cada recta y los intervalos de confianza de sus parámetros, la velocidad de despolimerización y su desviación estándar.

Temperatura (°C)	Ecuación de la recta	Intervalos de confianza (95%)		Coeficiente de correlación (R^2)	Velocidad de despolimerización ($\mu\text{M}/\text{min}$)
		Pendiente	Intersección con la ordenada		
40	$y = -0,226 \pm 0,01x + 29,15 \pm 0,11$	-0,24 a -0,21	28,94 a 29,36	0,4886	$-0,226 \pm 0,006$
50	$y = -1,303 \pm 0,01x + 102,3 \pm 0,24$	-1,33 a -1,28	101,8 a 102,8	0,8764	$-1,303 \pm 0,013$
55	$y = -2,746 \pm 0,01x + 122,8 \pm 0,18$	-2,76 a -2,73	122,4 a 123,2	0,9845	$-2,746 \pm 0,009$
60	$y = -8,03 \pm 0,06x + 251,3 \pm 1,19$	-8,15 a -7,91	248,9 a 253,6	0,9711	$-8,03 \pm 0,062$
70	$y = -24,1 \pm 0,10x + 543,6 \pm 1,82$	-24,29 a -23,90	540,1 a 547,2	0,9915	$-24,1 \pm 0,102$
75	$y = -35,91 \pm 0,19x + 657,1 \pm 2,91$	-36,30 a -35,52	651,4 a 662,9	0,9881	$-35,91 \pm 0,199$
80	$y = -54,92 \pm 0,38x + 937,4 \pm 5,32$	-55,66 a -54,17	926,9 a 947,8	0,9862	$-54,92 \pm 0,38$

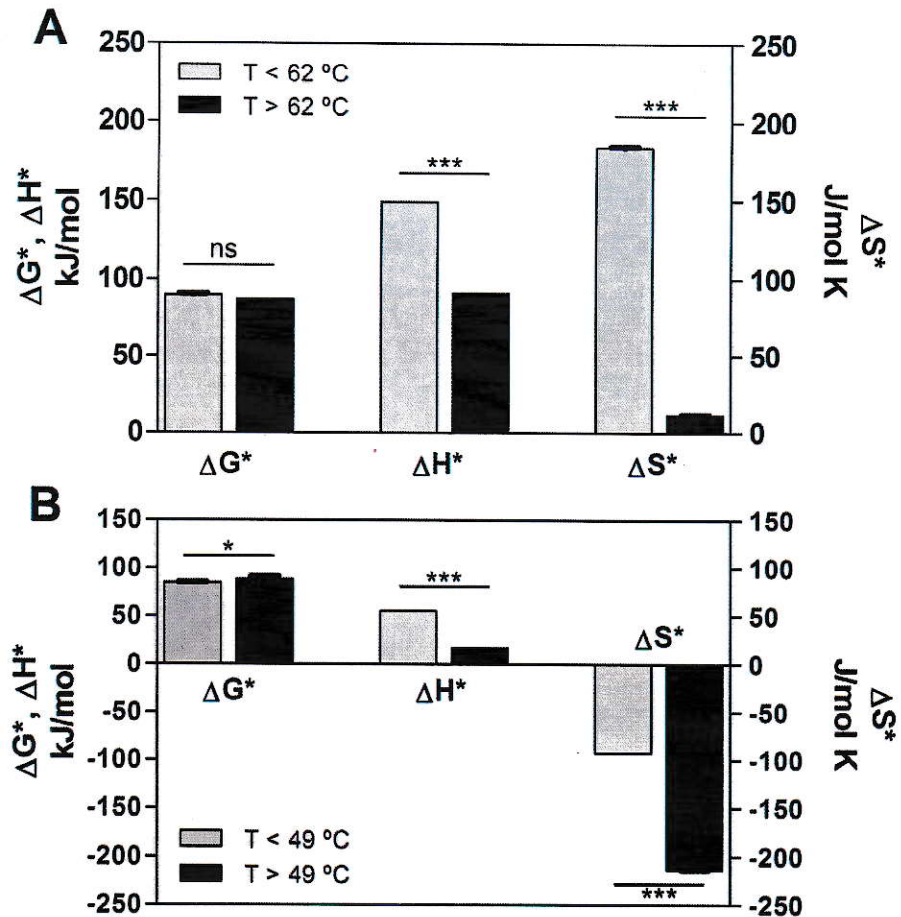


Figura Suplementaria 2. Valores de ΔG^* , ΔH^* y ΔS^* a altas y bajas temperaturas. En el panel **A** se grafica el valor promedio de ΔG^* , ΔH^* y ΔS^* a altas y bajas temperaturas (como indica la leyenda) para la despolimerización. En el panel **B** se grafica el valor promedio de ΔG^* , ΔH^* y ΔS^* a altas y bajas temperaturas (ver leyenda) para la actividad GTPasa. El eje izquierdo indica la escala para ΔG^* y ΔH^* en kJ/mol y el eje derecho indica la escala para ΔS^* en J/mol K. ***, $p < 0,0001$; *, $0,01 < p < 0,05$; ns: no significativo. Las barras de error indican el error estándar del promedio.

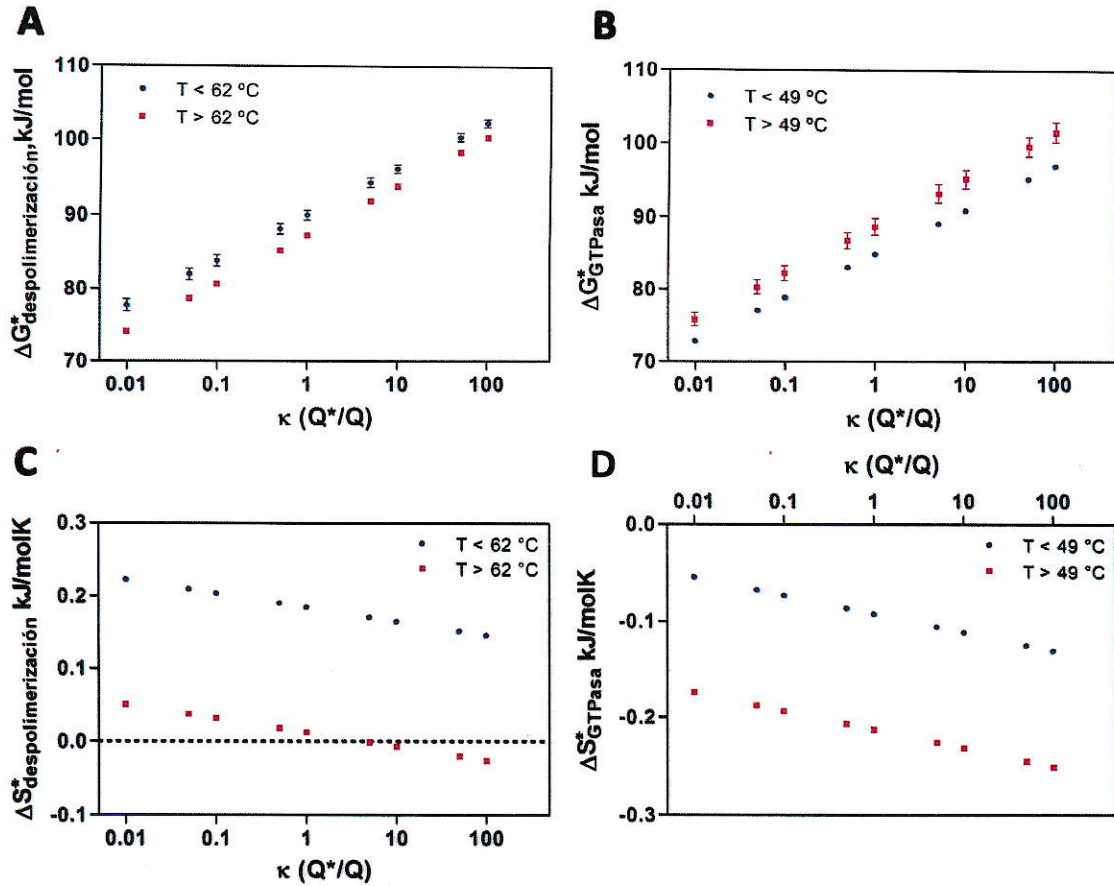


Figura Suplementaria 3. ΔG^* y ΔS^* promedio calculado a altas y bajas temperaturas para valores de $\kappa(Q^*/Q)$ entre 0,01 y 100. Se grafica el ΔG^* y ΔS^* promedio calculado para bajas y altas temperaturas utilizando valores de $\kappa(Q^*/Q)$ entre 0,01 y 100. En el panel **A** se muestra el gráfico del valor promedio de ΔG^* de despolimerización a temperaturas bajo y sobre $62^\circ C$ calculado para distintos $\kappa(Q^*/Q)$ en función de $\kappa(Q^*/Q)$; la diferencia de la ΔG^* de despolimerización entre altas y bajas temperaturas no es significativa a ningún valor de $\kappa(Q^*/Q)$. El panel **B** muestra el valor promedio de ΔG^* para la actividad GTPasa a temperaturas bajo y sobre $49^\circ C$ calculado para distintos $\kappa(Q^*/Q)$ en función de $\kappa(Q^*/Q)$; la diferencia de la ΔG^* para la actividad GTPasa entre altas y bajas temperaturas es significativa ($p < 0,05$) para todos los valores de $\kappa(Q^*/Q)$. En el panel **C** se muestra el gráfico del valor promedio de ΔS^* de despolimerización a temperaturas bajo y sobre $62^\circ C$ calculado para distintos $\kappa(Q^*/Q)$ en función de $\kappa(Q^*/Q)$; la diferencia de la ΔS^* de despolimerización entre altas y bajas temperaturas es significativa ($p < 0,0001$) para todos los valores de $\kappa(Q^*/Q)$. La ΔS^* de despolimerización a temperaturas sobre $62^\circ C$ es negativa (y por lo tanto favorable) para valores de $\kappa(Q^*/Q)$ sobre 4,0 (IC 95% 3,9 a 4,1). El panel **D** muestra el valor promedio de ΔS^* para la actividad GTPasa a temperaturas bajo y sobre $49^\circ C$ calculado para distintos $\kappa(Q^*/Q)$ en función de $\kappa(Q^*/Q)$; la diferencia de la ΔS^* para la actividad GTPasa entre altas y bajas temperaturas es significativa ($p < 0,0001$) para todos los valores de $\kappa(Q^*/Q)$. Las barras de error indican el error estándar del promedio.