

UCH - FC
Biotecnología
E 163P
C.1

ESCUELA DE PREGRADO - FACULTAD DE CIENCIAS - UNIVERSIDAD DE CHILE



“Purificación y Caracterización de la Actividad ATPásica de la Proteína FtsA de *Escheria coli*”

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

RODRIGO ULISES GALLARDO TAPIA

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Rodrigo Gallardo Tapia', written over a horizontal line.

Dr. Octavio Monasterio Opazo
Director Memoria de Título

Comisión de Evaluación de la Memoria de Título

Dra. Margarita Carú Marambio
Presidente Comisión

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

Dr. Marcelo Baeza Cancino
Corrector

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



Santiago de Chile, Abril 2006

...Dedicado a mi hermana...



Agradecimientos

Quiero agradecer en primer lugar a mis padres y a mi hermana, pues ellos han estado siempre a mi lado a pesar de los cientos de kilómetros que algunas veces nos han separado físicamente. También a mi hermano, mis abuelos y mi familia. Todos ellos me han apoyado de manera incondicional en todas mis empresas pasadas y, gracias a su cariño y estímulo, seguiré seguro adelante.

En segundo lugar quiero agradecer al Dr. Octavio Monasterio, quien me ha guiado durante el desarrollo de este trabajo y me ha ayudado a dar mis primeros en este largo camino que empiezo. También agradezco a la Dra. Rosalba Lagos y a todos los miembros del laboratorio de Biología Estructural y Molecular de la Facultad de Ciencias las constantes conversaciones y críticas que siempre hemos mantenido, pues han enriquecido no solo este trabajo, sino también mi persona.

Agradezco también a todos con quienes he tenido la suerte de compartir en los cerros. Gracias a ellos se que cualquier desafío se vence con dedicación, trabajo y amistad sincera. Finalmente quiero agradecer a la estrella que siempre alumbró mis pasos en la oscuridad de todos los "cerros" que he querido subir. Siempre estarás presente.



Que Dios nos libre de los comerciantes
sólo buscan el lucro personal

que nos libre de Romeo y Julieta
sólo buscan la dicha personal

librenos de poetas y prosistas
que sólo buscan fama personal

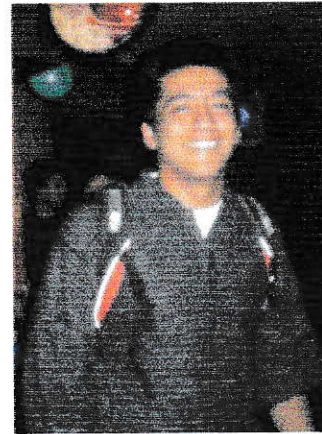
librenos de los Héroes de Iquique
librenos de los Padres de la Patria
no queremos estatuas personales

si todavía tiene poder el Señor
que nos libre de todos esos demonios
y que también nos libre de nosotros mismos
en cada uno de nosotros hay
una alimaña que nos chupa la médula
un comerciante ávido de lucro
un Romeo demente que sólo sueña con poseer a Julieta
un héroe teatral
en connivencia con su propia estatua

Dios nos libre de todos estos demonios

si todavía sigue siendo Dios.

(Que Dios nos libre, Nicanor Parra)



FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

**PURIFICACIÓN y CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD ATPásica
DE LA PROTEÍNA FtsA DE *Escherichia coli*.**

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



por
Rodrigo Ulises Gallardo Tapia

Abril, 2006
Santiago - Chile

Director de Memoria de Título: Dr. Octavio Monasterio O.

Indice de contenidos



INTRODUCCIÓN.....	1
MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
Materiales.....	9
Métodos.....	10
RESULTADOS.....	24
Modelado de la estructura tridimensional de EcFtsA por homología estructural.....	24
Purificación de EcFtsA y las mutantes EcFtsA D210A y $\Delta 27$	31
Sobre-expresión de EcFtsA.....	31
Purificación de EcFtsA y la mutante $\Delta 27$ en presencia de inhibidores de proteasas y agentes reductores.....	35
Purificación de la mutante EcFtsA D210A.....	39
Estabilidad de EcFtsA silvestre.....	43
Naturaleza de la interacción de EcFtsA en la formación de polímeros y agregados.....	44
Estado de agregación de EcFtsA soluble.....	45
Caracterización funcional y estructural de EcFtsA.....	49
Unión de nucleótido de EcFtsA.....	49
Contenido de estructura secundaria de EcFtsA.....	49
Desnaturación y renaturación de EcFtsA.....	50
Actividad ATPásica de EcFtsA.....	54
Actividad ATPásica de EcFtsA y de la mutante $\Delta 27$ determinada por el método PQ/LDH.....	54
Efecto de la concentración de ATP.....	55
Actividad ATPásica de EcFtsA determinada por la radiactividad del fosfato gamma de ATP hidrolizado.....	56
Polímeros de EcFtsA.....	59
Polimerización.....	59
Microscopía electrónica.....	60

DISCUSIÓN.....	63
Sobre-expresión y purificación de EcFtsA.....	63
Agregación de EcFtsA.....	65
Actividad ATPásica y Polimerización de EcFtsA.....	68
CONCLUSIONES.....	72
BIBLIOGRAFÍA.....	73

Indice de tablas

Tabla 1.	"Cepas".....	11
Tabla 2.	"Plasmidios".....	12
Tabla 3.	"Residuos conservados en el sitio activo de Hsc70 y su equivalente estructural en EcFtsA".....	29
Tabla 4.	"Etapas de purificación de EcFtsA, EcFtsA Δ 27 y EcFtsA D210A".....	42
Tabla 5.	"Pesos moleculares de las especies resultas en la cromatografía de filtración molecular en Superose 12 HR 10/30".....	47
Tabla 6.	"Constantes catalíticas aparentes de hidrólisis de ATP de EcFtsA silvestre y de la mutante Δ 27".....	55
Tabla 7.	"Valores de Km y Vmax para la hidrólisis de ATP catalizada por EcFtsA".....	58

Indice de figuras

Figura 1.	"Orden de la interacción secuencial de las proteínas de división en el sitio de formación del divisoma".....	3
Figura 2.	"Estructura del cristal de TmFtsA y de actina".....	6
Figura 3.	"Alineamiento de las secuencias de FtsA de <i>T. maritima</i> y de <i>E. coli</i> ".....	25
Figura 4.	"Diagrama de cable para los modelos con ATP unido y su evaluación".....	26
Figura 5.	"Diagrama de cinta del modelo de la estructura tridimensional de EcFtsA en la conformación unida a ATP".....	27
Figura 6.	"Superposición estructural de EcFtsA y del dominio amino (fragmento ATPasa) de Hsc70".....	28



Figura 7.	“Sobreexpresión de EcFtsA y las mutantes D210A y Δ 27 en <i>E. coli</i> BL21 DE3”.....	32
Figura 8.	“Sobreexpresión de EcFtsA y de la mutante D210A en <i>E. coli</i> C41(DE3)”.	33
Figura 9.	“Efecto de la concentración de IPTG en la sobreexpresión de EcFtsA en células <i>E. coli</i> C41(DE3)”.....	34
Figura 10.	“Efecto de la temperatura de post-inducción en la sobreexpresión de la mutante D210A en células <i>E. coli</i> C41(DE3)”.....	35
Figura 11.	“Purificación de EcFtsA por cromatografía de afinidad por níquel en presencia de agentes reductores e inhibidores de proteasas”.....	37
Figura 12.	“Electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE de EcFtsA y la mutante Δ 27 purificadas”.....	39
Figura 13.	“Electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE de las fracciones soluble e insoluble de la mutante D210A en extractos totales de la sobreexpresión en <i>E. coli</i> C41(DE3)”.....	40
Figura 14.	“Electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE de las fracciones de la purificación en la columna de afinidad por níquel de la mutante D210A y de la proteína purificada”.....	42
Figura 15.	“Electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE de la fracción soluble y del precipitado de EcFtsA almacenada en presencia de sacarosa y agentes reductores a 4 °C”.....	44
Figura 16.	“Efecto de Tween 20 0,36% v/v sobre la agregación de EcFtsA”.....	45
Figura 17.	“Curva de calibración de la columna Superose 12 HR10/30 y cromatograma de la cromatografía de exclusión molecular de EcFtsA”.....	46
Figura 18.	“Electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE y Western Blot de las fracciones obtenidas en la cromatografía de filtración molecular en Superose 12 HR 10/30”.....	48
Figura 19.	“Cromatograma de filtración molecular de EcFtsA en una columna de Sephadex G-25”.....	50
Figura 20.	“Espectro de dicroísmo circular y contenido de estructura secundaria de EcFtsA en estado nativo”.....	52
Figura 21.	“Espectro de dicroísmo circular y contenido de estructura secundaria de EcFtsA después de renaturación”.....	53
Figura 22.	“Espectros de dicroísmo circular de EcFtsA y de las mutantes D210A y Δ 27 después de renaturación en presencia de ATP”.....	53
Figura 23.	“Dependencia de la actividad ATPásica de la concentración de EcFtsA silvestre y de la mutante Δ 27”.....	55

Figura 24.	“Curva de saturación de sustrato para la hidrólisis de ATP catalizada por EcFtsA”.....	57
Figura 25.	“Curva de saturación de sustrato para la velocidad inicial de hidrólisis de ATP catalizada por EcFtsA”.....	58
Figura 26.	“Polimerización de EcFtsA silvestre inducida por ATP”.....	59
Figura 27.	“Microscopía electrónica de polímeros de FtsA inducidos por ATP”.....	61
Figura 28.	“Distribución del largo y ancho de los polímeros observados por microscopía electrónica”.....	62
Figura 29.	“Modelo del sitio de unión de los iones K^+ con el complejo ATP-Mg ²⁺ en Hsc70”.....	67
Figura 30.	“Formación de estructuras filamentosas de GFP-EcFtsA Δ 15”.....	71



Abreviaturas

ADP:	Adenosina 5' difosfato
ATP:	Adenosina 5' trifosfato
APS:	Persulfato de Amonio
ASA:	Area de accesibilidad al solvente
DC:	Dicroísmo circular
DTT:	Ditiotreitol
EcFtsA:	Proteína FtsA de <i>Escherichia coli</i>
EDTA:	Acido etilendiaminotetraacético
FPLC:	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
FtsA:	<i>Filament ThermoSensitive protein A</i>
Hsc70:	<i>Heat shock cognate protein 70 kDa</i>
IPTG:	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
k_{cat} :	Constante catalítica.
K_m :	Constante de Michaelis.
LDH:	Deshidrogenasa láctica
NADH:	Nicotinamida adenina dinucleótido reducido
PDB:	Protein data bank
PEP:	Fosfoenol piruvato
PQ:	Piruvato quinasa
PMSF:	Fenilmetilsulfonil fluoruro
RMSD:	Desviación promedio de la raíz de los cuadrados
RPM:	Revoluciones por minuto
SDS:	Dodecil sulfato de sodio
TEMED:	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina
TmFtsA:	Proteína FtsA de <i>Thermotoga maritima</i>
Tris:	Tris-(hidroximetil)-aminometano

Otras abreviaturas se definen en el texto.



Unidades

Å:	Ångström
°C:	grados Celcius
Ci:	Courie
g:	aceleración de gravedad
kDa:	kilo Dalton
nm:	nanómetros
M:	molar



INTRODUCCIÓN

Al alcanzar un tamaño determinado la célula bacteriana se divide en dos células hijas prácticamente idénticas entre sí y, a su vez, iguales a la célula que les dio origen. Este proceso se caracteriza por una notoria reproducibilidad en cuanto a factores como, por ejemplo, el sitio de división (en la mitad de la célula) o el momento del desarrollo celular (una vez que se ha duplicado y segregado el cromosoma), lo que nos lleva a pensar que es un proceso finamente regulado.

El mecanismo de división se ha adaptado a diferentes tipos de células, con diferente contenido de membranas y de otras envolturas. En *E. coli* el mecanismo se caracteriza por la formación de una estructura en la mitad del eje longitudinal de la célula, llamada anillo Z, que permite reclutar más de una docena de proteínas que forman el llamado divisoma, responsable de la constricción de las membranas y la pared celular. En *B. subtilis* la división no está mediada por una constricción, sino más bien por la generación de nueva pared celular entre las dos células hijas (Goehring y Beckwith, 2005). Aun cuando los procesos parecen distintos, estos convergen en la formación del divisoma que media la citocinesis de estas células (Errington y col, 2003). Esta maquinaria estaría compuesta por al menos 15 proteínas diferentes pertenecientes a distintas familias (Vicente y col, 2006), algunas de las cuales se encuentran ampliamente conservadas en procariontes y arqueas (Errington y col, 2003). Esto indica que la mayoría de las distintas familias bacterianas comparten una maquinaria de división común. Al comparar los distintos genomas se ha encontrado que el núcleo de la maquinaria estaría compuesta por 6 productos génicos, 5 de los cuales forman parte de una unidad génica conocida como "cluster *dcw*" que está conservada entre distintas familias de bacterias muy distantes (Vicente y col, 2006).

Los productos génicos de este “cluster” representan la base funcional común de los distintos mecanismos de división bacteriana.

Con el propósito de explicar el mecanismo molecular responsable de la división, se han construido modelos que describen la formación espacial y temporal del divisoma (Errington y col, 2003; Goehring y Beckwith, 2005; Rothfield y col, 1999) y aun cuando éstos no son ampliamente aceptados, hay coincidencia en que el proceso de formación del complejo posee un orden secuencial y jerárquico de adición de proteínas (figura 1), que se inicia con la formación del anillo Z, producto de la oligomerización de FtsZ. Esta proteína es homóloga a tubulina (Erickson, 1995), y sus estructuras tridimensionales son muy similares a pesar de presentar una identidad de secuencia no superior al 20% (Lowe, 1998; Lowe y Amos, 1998; Nogales y col, 1998). Ambas unen e hidrolizan GTP y también polimerizan para formar protofilamentos que dan origen a microtúbulos en eucariontes y al anillo Z en procariontes, donde la polimerización induce la hidrólisis de GTP. Sin embargo, FtsZ por si sola no es capaz de formar el anillo Z, pues en ausencia de las proteínas FtsA y ZipA, el anillo no se localiza correctamente o bien no se forma, e impide el progreso de la constricción y la posterior división celular. No está claro si la interacción de FtsA y ZipA con FtsZ es previa a la formación del anillo Z, o bien si estas proteínas interactúan posterior a la localización del anillo Z en el sitio de división (Aarsman y col, 2005).

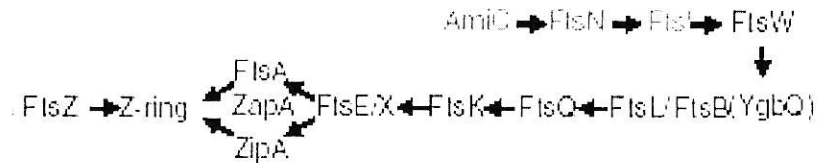


Figura 1: Orden de la interacción secuencial de las proteínas de división en el sitio de formación del divisoma. Se establece que FtsZ es la primera en localizarse y luego de ella FtsA y/o ZipA, también en esta etapa puede unirse ZapA (proteína no esencial). Una vez que se ha formado el anillo Z y ensamblado el complejo con FtsA y/o ZipA se localizan sobre este complejo las proteínas restantes en el orden que se indica en la figura (tomado de Aarsman y col, 2005).

El divisoma formado por FtsZ, FtsA, ZipA y las restantes proteínas de la división celular es una estructura altamente dinámica que presenta intercambio continuo de subunidades, donde FtsZ se ensambla y desensambla rápidamente, gracias a lo cual puede relocalizarse (Romberg y Levin, 2003).

Se demostró que una mutación puntual en FtsA le permite a esta proteína suplir el requerimiento esencial de ZipA en la división celular (Geissler y col, 2003), hecho que apoya la idea previamente existente de que ZipA y FtsA comparten un mismo papel funcional (Pichoff y Lutkenhaus, 2002). El uso de mutantes termo-sensibles permitió establecer que en ausencia de una de estas dos proteínas el anillo Z se forma, pero las restantes proteínas de la división celular no pueden localizarse. En ausencia de ambas proteínas, FtsA y ZipA, el anillo Z no se forma y los anillos previamente formados se desensamblan. Esto sugiere que FtsA y ZipA participan en el ensamblaje y estabilización del anillo Z y, también, en el posterior reclutamiento de las restantes proteínas de la división celular.

A pesar de la redundancia de funciones, la manera en que FtsA y ZipA desarrollan su papel en el divisoma debe ser distinta, pues estas proteínas no comparten las mismas características estructurales que dan cuenta de su función y además, ZipA no es parte del "cluster *dcw*". Esto último indica que la función de ZipA no es conservada entre las distintas familias de bacterias y por lo mismo no es parte de la maquinaria básica que explica el proceso de división.

ZipA es una proteína de membrana citoplasmática que posee un dominio carboxilo terminal citoplasmático unido por un segmento flexible a un dominio amino-integral de membrana (Moy y col, 2000). Cuando los niveles de ZipA son reducidos al 10% se genera filamentación celular y en estas células filamentadas aun se observa el anillo Z (Liu y col, 1999). Sin embargo el número de anillos por filamento de células, en esta condición, es menor al que se observa comúnmente cuando la causa de la filamentación no es una alteración en el nivel de ZipA. Por esta razón se considera que su papel es mas bien estabilizar los polímeros de FtsZ (Mosyak y col, 2000). Otra evidencia que apoya esta última idea es que ZipA es capaz inducir la formación de manojos de polímeros de FtsZ *in vitro* y también la formación de anillos Z *in vivo*, en la mutante termo-sensible FtsZ84 a temperatura restrictiva (RayChaudhuri, 1999).

En cuanto a FtsA, esta proteína se clasificó como parte de la superfamilia de proteínas actina/Hsc70/hexoquinasas en base a la presencia de determinados motivos de secuencias que caracterizan a la familia, y que están involucrados en la unión de nucleótido y la formación de un surco interdominio (Bork y col, 1992). FtsA se definió como una proteína citoplasmática, aunque resultados de fraccionamiento celular muestran a esta proteína asociada con la membrana celular (Sanchez M. y col, 1994), hecho que apoya la idea de que esta proteína puede participar en el anclaje del anillo Z a la membrana. Sólo en *E. coli* la proteína FtsA se encontró fosforilada y se postula

que la fosforilación induce su asociación con la membrana citoplasmática. También se determinó que la unión de nucleótido depende del estado soluble o asociado a la membrana. Se determinó que el extremo carboxilo terminal de FtsA está conservado entre distintas especies (Lowe y van den Ent, 2001) y por lo tanto puede ser importante para la función de esta proteína. Es más, la remoción o reemplazo de esta región genera cambios en la morfología celular y la pérdida o disminución de la función biológica (Yim y col, 2000). Recientemente se demostró que esta región constituye una secuencia de destinación a membrana ("membrane targeting sequence" o "MTS") reafirmando la hipótesis de que FtsA interactúa directamente con la membrana (Pichoff y Lutkenhaus, 2005).

Se conoce la estructura tridimensional de FtsA de *Thermotoga maritima* (TmFtsA) resuelta por difracción de rayos X a 1,9 Å (van den Ent y Lowe, 2000). La estructura tridimensional (3D) mostró homología con la estructura de las proteínas pertenecientes a la superfamilia actina/Hsc70/hexoquinasas, apoyando la clasificación de FtsA como parte de esta superfamilia. La figura 2 muestra las estructuras 3D de TmFtsA y actina como representante de la superfamilia. A partir de la comparación de ambas estructuras se observa que la estructura de TmFtsA posee los subdominios IA y IIA, conservados en la superfamilia, y el subdominio variable IIB. El subdominio variable IB de actina se encuentra reemplazado en FtsA por el subdominio IC. FtsA es el único miembro de la superfamilia que presenta este subdominio. Por otra parte, en el mismo estudio cristalográfico de van de Ent y Lowe (2000) se determinó la estructura del cristal de TmFtsA sustituida con selenio metionina a 2,4 Å de resolución. En este cristal se observó una molécula de ATP unida en el surco creado entre los dominios IA, IIA y IIB, lo que es característico para las proteínas de la superfamilia actina/Hsc70/hexoquinasas.

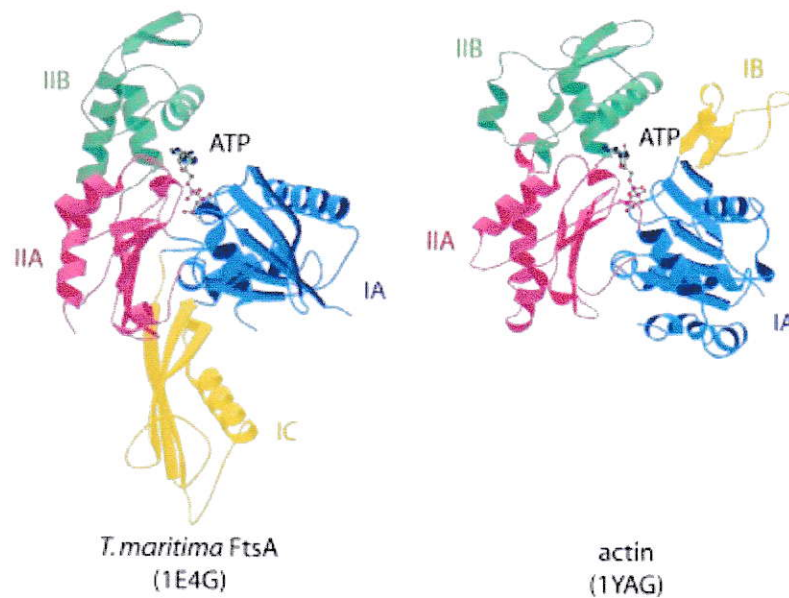


Figura 2: Estructura del cristal de TmFtsA y de actina. A la izquierda se muestra la estructura de TmFtsA con 4 subdominios, indicados con números romanos y letras mayúsculas, y con ATP unido en el surco interdominio. A la derecha se muestra la estructura de actina con sus 4 subdominios y ATP unido en el surco interdominio. $RMSD_{C\alpha}$ de 2,7 Å. Identidad de secuencia: 12% (adaptado de Lowe y col., 2004).

La función de EcFtsA en la división celular bacteriana, como se dijo antes, es ayudar en la localización o ensamblaje del anillo Z y también en la localización del resto de las otras proteínas que participan en la división celular. Un análisis estructural de la proteína mostró que el subdominio IC de EcFtsA es un motivo estructural simple que se encuentra presente en una gran diversidad de proteínas tanto de bacterias como de arqueas (Anantharaman y Aravind, 2004). Aun cuando estas proteínas tienen funciones biológicas distintas, el subdominio IC parece estar relacionado con interacciones proteína–proteína necesarias, por ejemplo, en la formación de la

subunidad Rpb7/Rpb4 de la RNA polimerasa II de bacterias y arqueas que presentan este subdominio (Todone y col, 2001).

Como se observa en la figura 2 solo FtsA presenta una unidad del subdominio IC, por lo tanto es posible pensar que esta parte de la proteína es la encargada de establecer las interacciones proteína-proteína específicas de FtsA. Esto podría explicar su dimerización como fue propuesto por Carrettoni (2003) y la interacción con otras proteínas del divisoma. Se demostró en *E. coli* que el dominio IC permite la interacción de FtsA con FtsQ, FtsN y FtsI y que las interacciones de FtsA con FtsN y FtsI son independientes del divisoma (Corbin y col, 2004).

A pesar de la similitud de FtsA con la superfamilia de proteínas que unen e hidrolizan ATP (Hurley, 1996), no se sabe si FtsA de *E. coli* (EcFtsA) presenta actividad ATPásica y solo se sabe que las proteínas de *B. subtilis* (Feucht y col, 2001) y *P. aeureginosa* (Paradis-Bleau y col, 2005) presentan esta actividad. Se conoce que FtsA de *B. subtilis* se asocia para formar dímeros (Feucht y col, 2001) al igual que lo haría EcFtsA (Carrettoni y col, 2003). Recientemente se demostró que FtsA de *S. pneumoniae* forma polímeros que se ensamblan de manera dependiente de ATP (Lara y col, 2005). Esta conducta es similar a la de actina, que forma polímeros de largo indefinido. Se observó que los polímeros son espirales de aproximadamente 20 nm de ancho compuestos de dos pares de protofilamentos pareados en forma antiparalela. Sin embargo en esta especie no se detectó actividad ATPásica, lo que podría explicar la gran estabilidad observada de estos polímeros.

La información dispersa que existe para FtsA, de diferentes organismos, no permite precisar el papel funcional de FtsA en la división celular. Es interesante observar que las propiedades funcionales de FtsA son más parecidas a las de actina, donde la asociación entre monómeros induce la actividad ATPásica y es responsable

de la dinámica de sus polímeros Surge entonces la pregunta: ¿La actividad ATPásica de FtsA está asociada a la polimerización de la proteína? La respuesta al observar el comportamiento de FtsA de *S. pneumoniae* parece ser no. Entonces, ¿Cómo se explica la dinámica del divisoma a medida que disminuye el diámetro del anillo de constricción?. La respuesta parece estar dada por el número de moléculas de FtsA que se encuentran en *E. coli*, que es de 50 a 700 moléculas (Rueda y col, 2003). Esta cantidad de moléculas no es suficiente para formar un anillo alrededor de la membrana interna de la célula en el sitio de división. Por lo tanto, si FtsA polimeriza, pequeños polímeros deben interactuar con el anillo Z. Así, Vicente y col. (2006) proponen que esta conducta evitaría la constricción del anillo Z antes del reclutamiento de las otras proteínas que forman el divisoma, que ocurre 20 minutos después de la formación del complejo anillo FtsZ-ZipA-FtsA (Vicente y col, 2006).

Por esta razón surgen al menos tres preguntas: ¿EcFtsA polimeriza en presencia de ATP?, ¿La formación de los polímeros induce la actividad ATPásica? y ¿Es la hidrólisis de ATP responsable de la despolimerización?

Para responder las dos primeras preguntas, y en base a los antecedentes presentados, se propuso la siguiente hipótesis: **“EcFtsA en estado soluble posee actividad ATPásica”**. Para probar esta hipótesis se propuso como objetivo general purificar y caracterizar la actividad ATPásica de FtsA de *E. coli*, y como objetivos específicos: Analizar estructuralmente el sitio activo de EcFtsA

2. Expresar y purificar EcFtsA y las mutantes EcFtsA D210A, en el sitio de unión de ATP, y EcFtsA Δ 27, en el extremo carboxilo terminal responsable de su unión a membrana.
3. Determinar la actividad ATPásica.
4. Determinar si ATP es responsable de la polimerización de EcFtsA.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES.

Reactivos. Cloruro de magnesio hexahidratado, dimetilformamida, glicina, Tween 20, glicerol, EDTA, fenol, cloruro de guanidinio, acrilamida, bis-acrilamida, estándar de masa molecular λ HindIII, 1 kb DNA ladder, fosfato de sodio, mono y di-básico, β -mercaptoetanol, citrato de sodio, TEMED y DTT se adquirieron en Winkler, Santiago Chile. Azul de bromofenol, cloroformo, alcohol isoamílico, isopropanol, etanol, metanol, peróxido de hidrogeno, glucosa, sacarosa, disulfito de sodio, cloruro de sodio, hidróxido de sodio, cloruro de potasio y carbón activado granular se obtuvieron de Merck, Darmstadt, Alemania. Ribonucleasa A, LDH, PQ, NADH, PEP, SDS, ATP, ADP azul brillante de Coomassie, estándar de masa molecular SDS-VII, "kit" de marcadores de masa molecular para proteínas no desnaturaladas, anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa alcalina y persulfato de amonio se obtuvieron de Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA. Sephadex G-25 y la columna Superose 12 HR10/30 se obtuvo de Pharmacia, Uppsala, Suiza. La resina Probond se obtuvo de Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Luminol y ácido p-coumárico se adquirieron de Fluka Chemie AG, Messerschmittstr, Suiza. Imidazol, BCIP y NBT se adquirieron de Applichem Damstadt, Alemania. Los reactivos grado técnico (ácido acético, etanol, metanol, acetona, ácido clorhídrico) se adquirieron en TCL, Santiago, Chile. El Tris se obtuvo de US Biological, Swampscott, MA, USA. El agar se adquirió de DIFCO Laboratorios, Detroit, MI, USA. La triptona y el extracto de levadura se obtuvieron de MOBIO Laboratories Inc., Solana Beach, CA, USA. El cloranfenicol se adquirió de Flamingo Pharmaceuticals y la kanamicina se obtuvo de Gibco BRL, Grand Island, NY, USA.

Materiales. Las cubetas de electroporación, membranas de nitrocelulosa para Western Blot, kit de cuantificación de proteínas "Protein assay" y el estándar "kaleidoscopio" de amplio rango se obtuvieron de BioRad Laboratorios, Inc., Hercules, CA, USA. El sistema E.Z.N.A.™ Plasmid Miniprep Kit I se obtuvo de Omega Bio-Tek Inc., Doraville, GA, USA. Los dispositivos de concentración Centricon se obtuvieron de Millipore, Bedford, MA, USA. Los "cassettes" de microdiálisis Slide-A-Lyzer se obtuvieron de Pierce, Rockford, IL, USA. Las membranas de diálisis de celulosa regenerada Spectra/Por 7 se obtuvieron de Spectrum Laboratorios, Rancho Domínguez, CA, USA. Las enzimas de restricción se adquirieron en Fermentas Inc., Hanover, MD, USA. Los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa se compraron de Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA. La película autoradiográfica X-OMAT BT Film, se obtuvo en Kodak, Windsor, Colorado, USA.

Cepas bacterianas. Las cepas utilizadas durante el desarrollo de esta tesis se resumen en la Tabla 1.

Plasmidios. En la Tabla 2 se detallan los plasmidios y vectores utilizados.

MÉTODOS.

Medios de cultivo.

Caldo Luria Bertani (LB). Bactotripton 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 10 g/l, NaOH 3,5 mM final, se usó para el crecimiento de todas las cepas de *E. coli*.

Medio SOB. Bactotripton 20 g/l, extracto de levadura 5,0 g/l, NaCl 0,5 g/l, KCl 0,18 g/l. Se ajustó el pH a 7,0 con NaOH 5 N (~0,2 ml/l).

Medio SOC. Se añadió a un litro de medio SOB estéril 20 ml de una solución estéril de glucosa 1 M. Esta solución se preparó disolviendo 18 g de glucosa para un volumen total de 100 ml de solución y se esterilizó con un filtro de 0,22 μ m.

Tabla 1: Cepas.

Cepa	Genotipo	Fuente
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F- <i>ompT</i> , rB mB	Novagen
<i>E. coli</i> DH5 α	F' <i>l</i> <i>endA1 hsdR17</i> (r _k ⁻ m _k ⁺) <i>glnV44 thi-1 recA1</i> <i>gyrA</i> (Nal ^r) <i>relA1</i> Δ (<i>lacIZYA-argF</i>) U169 <i>deoR</i> (ϕ 80 <i>dlac</i> Δ (<i>lacZ</i>)M15)	Stratagene
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>recA, endA1, gyrA96, thi1, hsdR-17, supE44, relA1,</i> <i>lac</i> [F' <i>proAB, lacIqZ</i> Δ M15, Tn10]	Stratagene.
<i>E. coli</i> C41	F' <i>ompT hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3)	(Miroux y Walker, 1996)
<i>E. coli</i> VIP386	<i>E. coli</i> BL21(DE3) transformada con pMVF12 y pLysS	Yim y col, 2000
<i>E. coli</i> VIP813	<i>E. coli</i> BL21(DE3) transformada con pMVF12-D210A y PlyS	Yim y col, 2000
<i>E. coli</i> VIP516	<i>E. coli</i> BL21(DE3) transformada con pSRV2	Yim y col, 2000

Las cepas *E. coli* DH5 α y *E. coli* XL1-Blue se utilizaron indistintamente para almacenar y replicar los plasmidios contenidos en las cepas VIP.

Placas de agar LB. Se prepararon las placas con el medio caldo LB y con 1,5% ó 1,0% de agar.

Las células bacterianas que portan plasmidios se crecieron en placas o en medio líquido suplementado con antibióticos, cuya concentración final fue la siguiente: cloranfenicol 50 μ g/ml y kanamicina 50 μ g/ml. Estos antibióticos se prepararon como se describió previamente (Sambrook y col, 1989).

Aislamiento de DNA plasmidial bacteriano (miniprep).

El DNA plasmidial se extrajo según el método de lisis alcalina descrito por Sambrook y cols. (1989). Se centrifugaron 5 ml de un cultivo bacteriano crecido durante toda la noche en medio LB. El precipitado bacteriano se suspendió en 200 μ L de amortiguador de lisis (glucosa 50 mM; Tris-HCl 25 mM pH 8,0; EDTA 10 mM). Se incubó 5 min a

temperatura ambiente y se agregó 400 μl de una solución fresca de SDS/NaOH (SDS 1% y NaOH 0,2 M), se mezcló invirtiendo los tubos 10 veces. A continuación se agregó 300 μl de acetato de potasio 7,5 M pH 5,2 y se mezcló suavemente por inversión. Esta solución se incubó a -20°C durante 5 min, y se centrifugó a $14.500 \times g$. El sobrenadante se traspasó a otro tubo previamente rotulado, y se agregó 250 μl de una mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) para eliminar proteínas contaminantes. La muestra se agitó en el vortex por 10 s y se centrifugó durante 5 min a $14.500 \times g$. Luego se extrajo la fase acuosa (superior), la que se sometió a una extracción con 250 μl de cloroformo:alcohol-isoamílico (24:1) para remover los restos de proteínas y fenol. A la fase con el DNA se adicionó 0,6 volúmenes de isopropanol y se dejó a -20°C durante 15 min para precipitar el DNA. El DNA precipitado por centrifugación se lavó con etanol al 70% y posteriormente se secó en una estufa (37°C) o en un Speed Vac (Labconco). El precipitado de DNA se suspendió en 50 μL de agua nanopura y se agregó 5 μL de ribonucleasa A (10 mg/ml).

Tabla 2: Plasmidios.

Pasmidio	Característica	Resistencia	Origen
pET28a	Permite generar fusiones con péptido poli Histidina	Kan	Novagen
PLysS	Expresa inhibidor de la polimerasa del Fago T7	Cm	Novagen
pMVF12	Plasmidio pET28a con inserto de EcFtsA que genera la proteína de fusión His ₆ -EcFtsA	Kan	Yim y col, 2000
pSRV2	Plasmidio pET28a con el inserto que codifica por la mutante EcFtsA $\Delta 27$, para generar la proteína de fusión His ₆ -EcFtsA $\Delta 27$.	Kan	Yim y col, 2000
PMVF12-D210A	Plasmidio pET28a con el inserto que codifica por la mutante EcFtsA D210A, para generar la proteína de fusión His ₆ -EcFtsA D210A	Kan	Yim y col, 2000

Electroforesis de DNA plasmidial.

El DNA plasmidial se analizó mediante electroforesis en geles de agarosa preparada al 1% en amortiguador TAE (Tris-HCl 40 mM pH 8,1; ácido acético glacial 20 mM; EDTA 2 mM). Esta electroforesis se llevó a cabo en una cámara horizontal, con amortiguador TAE. La muestra se preparó mezclando una alícuota de la solución a analizar con un volumen apropiado del amortiguador de carga (glicerol 50%, EDTA 50 mM, xilén cianol 1 mg/ml, azul de bromofenol 1,5 mg/ml) antes de cargar los pocillos del gel. Se mantuvo una diferencia de potencial de 80 a 100 V durante la electroforesis. Una vez finalizada la electroforesis, el gel se tiñó con bromuro de etidio (10 µg/ml) y se puso sobre un transiluminador UV para observar las bandas de DNA.

Preparación de células electrocompetentes.

Las células electrocompetentes se prepararon a partir de un cultivo de crecimiento exponencial, y para ello se inoculó 100 ml de medio LB con 1 ml de un cultivo crecido hasta fase estacionaria. Las células se colectaron a una D.O._{550 nm} de 0,75 ($3-6 \times 10^8$ cel/ml) en tubos de centrifuga fríos y se centrifugaron durante 10 min a 4.000 rpm. El precipitado bacteriano obtenido se suspendió en 40 ml de glicerol frío 10% y se centrifugó durante 10 min a 4.000 rpm. Este procedimiento se repitió dos veces. Después de los lavados, las células se suspendieron en el glicerol 10% que quedó en el tubo después de eliminar el sobrenadante de la última centrifugación. Se midió el volumen de la suspensión celular y se determinó la D.O._{550 nm} diluyendo una pequeña porción de ella en glicerol al 10%. Se ajustó el volumen de la suspensión del precipitado celular con glicerol al 10% para llegar a una D.O._{550 nm} final de 200-250 unidades/ml. Las células se alicuotaron y se usaron directamente para la electroporación o se almacenaron a -80 °C.

Transformación por electroporación.

Se utilizó un equipo Gene Pulser (BioRad) acoplado a un controlador de pulso, para realizar la transformación de las células competentes. El aparato se configuró a un voltaje de 2.500 V, una resistencia de 200 $\mu\Omega$ y una capacitancia de 25 μF . Las células y las cubetas se colocaron en hielo antes de proceder a la transformación. Se mezclaron 25 μl de células electrocompetentes con 1 a 2 μl de DNA plasmidial en un tubo y se electroporó la mezcla en una cubeta de electroporación de 0,2 cm de separación entre los electrodos. Inmediatamente después se suspendieron las células en 1 ml de medio SOC estéril y se las incubó a 37 °C durante 1 h. Las células transformadas se sembraron en placas LB con los antibióticos apropiados y se incubaron durante 12 h a la temperatura apropiada.

Sobreexpresión y purificación de EcFtsA y mutantes.

Pruebas de sobreexpresión. Para las pruebas de sobreexpresión se inoculó 10 ml de caldo Luria, suplementado con antibióticos, con una muestra de las cepas congelados a - 80 °C en glicerol 50% v/v. Los cultivos se agitaron a 200 RPM a 37 °C durante una noche y se inocularon 25 ml de caldo Luria suplementado con antibióticos con una dilución 1:100 del cultivo. Esta suspensión se creció a 37 °C agitando a 200 RPM hasta alcanzar una D.O._{600 nm} de 0,6. En ese momento se indujo la sobreexpresión con IPTG y se continuó agitando el cultivo a la misma velocidad. La concentración de IPTG, el tiempo y la temperatura post-inducción variaron dependiendo de la finalidad del experimento. Para obtener extractos celulares totales de estos cultivos se centrifugaron 3 ml del cultivo bacteriano. El precipitado celular obtenido se lavó tres veces con amortiguador TEN (Tris-HCl 50mM pH 8, EDTA 1mM, NaCl 100 mM). Para el análisis por electroforesis SDS-PAGE las células se lisaron en 75 μL de TEN y 25 μL de

amortiguador de carga 4X (Glicerol 40%, Tris-HCl 50 mM pH 7,6, SDS 10%, β -mercaptoetanol 20%, azul de bromofenol 0,01% p/v) y se calentaron a 95 °C durante 10 min. Posteriormente esta solución se centrifugó durante 10 minutos a 13000 rpm y muestras de 20 μ L de sobrenadante fueron analizadas por geles de poliacrilamida SDS-PAGE 10% (se describe más adelante).

Purificación de la EcFtsA tipo silvestre y la mutante Δ 27. Para purificar la proteína EcFtsA tipo silvestre y la mutante Δ 27 se inocularon 10 ml de caldo Luria suplementado con antibióticos adecuados con una muestra de las cepas almacenadas a -80 °C en glicerol 50 % v/v. Este cultivo se creció a 37 °C durante una noche y se utilizó para inocular un litro de caldo Luria en un matraz de 2 l suplementado con los antibióticos antes mencionados. Los cultivos se incubaron a 37 °C hasta que alcanzaron una D.O._{600 nm} de 0,6. En este momento se indujo la sobreexpresión agregando IPTG a una concentración final de 1,0 mM. Se mantuvo el cultivo por tres horas a 37 °C. Se colectaron las células por centrifugación (4800 RPM, centrifuga Sorvall RC-3B) y luego se lavaron con 50 ml de amortiguador TEN y se centrifugaron a 4.380 x g. El precipitado celular obtenido se almacenó a -80 °C. Al descongelar las células se suspendieron en 20 ml de amortiguador A (fosfato de sodio 50 mM pH 8,0, NaCl 500 mM, disulfito de sodio 10 mM) suplementado con PMSF 1,0 mM e inhibidores de proteasas libre de EDTA. Las células se lisaron por sonicación (5 pulsos de 20 segundos, output 6, con pausas de 1 minuto, sonicador Misonix SONICATOR 3000), manteniendo el cultivo en un baño de hielo. Posteriormente se centrifugó a 67.600 x g y se descartó el precipitado. El sobrenadante se cargó en 5 ml de resina Probond agitando suavemente (agitador magnético) por 1 hora a 0 °C (baño de agua-hielo). Luego se empacó la resina en una columna de vidrio de 10 ml utilizando una bomba peristáltica a un flujo constante de 1 ml/min. Se realizaron lavados con 10 volúmenes

de columna de amortiguador A y luego con el mismo amortiguador más imidazol 50 mM (10 volúmenes de columna). Posteriormente se eluyó la proteína de la columna con 4 volúmenes de columna de amortiguador A suplementado con 100 mM imidazol y luego con 4 volúmenes de columna de amortiguador A suplementado con 200 mM imidazol. Las fracciones obtenidas a 100 mM imidazol y 200 mM imidazol se analizaron mediante geles de poliacrilamida SDS-PAGE 10%. Las fracciones que contenían solo la banda correspondiente a EcFtsA o la mutante $\Delta 27$ se mezclaron y dializaron contra 1 l de amortiguador B (fosfato de sodio 50 mM pH 8,0, NaCl 500 mM, disulfito de sodio 10 mM, DTT 1,0 mM, $MgCl_2$ 2,0 mM, ATP 0,1 mM y sacarosa 1,0 M) durante 12 horas a 4°C. Al terminar la diálisis la proteína se llevó a una concentración de aproximadamente 2,0 mg/ml al concentrar por centrifugación en dispositivos Centricon. Finalmente la proteína se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -80 °C.

Purificación de la mutante D210A. Dado que la mutante D210A formó cuerpos de inclusión la purificación de esta proteína se realizó como se describe a continuación. El precipitado de células que sobreexpresan la mutante D210A se obtuvo con el mismo método descrito para EcFtsA y la mutante $\Delta 27$. Los cuerpos de inclusión se lavaron de acuerdo a lo descrito previamente por Sambrook y cols., (1989) y posteriormente se solubilizaron en amortiguador A suplementado con urea 8,0 M. La solución de proteína de los cuerpos de inclusión solubilizados se cromatografió en una columna de níquel por el método descrito para EcFtsA y la mutante $\Delta 27$, pero se incluyó urea 8,0 M en todos los amortiguadores utilizados. Al finalizar la cromatografía las fracciones que contenían la mutante D210A se mezclaron y dializaron contra 1 l de amortiguador A suplementado con urea 8,0 M durante 12 horas a 4 °C y la proteína se concentró en dispositivos Centricon hasta aproximadamente de 6,0 mg/ml. Finalmente la proteína se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -80 °C.

Electroforesis en geles desnaturantes de poliacrilamida (SDS-PAGE).

El análisis de proteínas por electroforesis en geles desnaturantes se realizó según Laemmli (Laemmli, 1970). Se utilizó acrilamida al 10% en el gel separador y 4% en el gel concentrador. Las muestras se disolvieron en amortiguador de carga 4X. La muestra se calentó a 100 °C por 5 minutos y luego se cargó en los pocillos. Se separaron los componentes de la muestra por electroforesis en amortiguador SDS 10%, glicina y Tris pH 8,8, a una corriente eléctrica constante de 25 mA, hasta que el azul de bromofenol alcanzó el límite inferior del gel. Al terminar la electroforesis el gel se tiñó con azul de Coomassie (0,25 g de azul de Coomassie brillante en 90 ml de metanol:agua (1:1 v/v) y 10 ml de ácido acético glacial) durante dos horas con agitación constante y se destiñó con la solución de desteñido (50 % de metanol, 10% ácido acético).

Hibridación Western.

Electrotransferencia. Una vez separado el gel de los vidrios donde se realizó la electroforesis SDS-PAGE se montó el sistema de transferencia colocando el gel sobre una esponja y 3 papeles filtro, sobre este gel se puso una membrana de nitrocelulosa, tres papeles filtro y otra esponja. Antes de montar el sistema de transferencia las hojas de papel filtro, las esponjas y la membrana de nitrocelulosa se humedecieron en amortiguador de transferencia (Tris-HCl 25 mM, glicina 190 mM, metanol 20%). El sistema se montó en la cámara respectiva y la transferencia se realizó durante 1,5 h a 100 V y -20 °C, en el amortiguador de transferencia enfriado previamente.

Desarrollo inmunológico. Una vez finalizada la transferencia, la membrana se bloqueó con leche al 5% en TS-Tween (Tris-HCl 50 mM pH 7,5; NaCl 150 mM, Tween 0,2%) durante 1 h a temperatura ambiente y se traspasó a una solución de leche 5%

en TS-Tween que contenía el anticuerpo primario. La membrana se incubó con el anticuerpo primario antiEcFtsA (diluido 1:20.000) o antiHis (diluido 1:500) durante 1 h con agitación a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados con amortiguador TS-Tween y la membrana se incubó por 1 h en leche al 5% en TS-Tween con el anticuerpo secundario (diluido 1:20.000), conjugado con la enzima fosfatasa alcalina o con la enzima peroxidasa. Cuando se utilizó el anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa alcalina la membrana se lavó con 10 ml de amortiguador para fosfatasa (Tris-HCl 100 mM pH 9,5; NaCl 100 mM; MgCl₂ 5 mM) y se reveló con 10 ml de amortiguador para fosfatasa alcalina, al que se le adicionó 33 µL de BCIP (0,5 g del reactivo disuelto en 10 ml de dimetilformamida 100%) y 66 µL de NBT (0,5 g del reactivo disuelto en 10 ml de dimetilformamida 70%). La membrana se incubó hasta la aparición del color en la banda y la reacción se detuvo lavando la membrana con abundante agua destilada. Cuando se utilizó el segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa, la membrana se reveló en 10 ml de Tris-HCl 100 mM pH 8,5, a la cual se agregó 50 µl de luminol 250 mM (preparado en DMSO) y 22 µl de ácido p-cumárico 90 mM (preparado en DMSO). La reacción de quimioluminiscencia se inició agregando 3 µl de peróxido de hidrógeno. La membrana se expuso entre 5 segundos y 2 minutos, de acuerdo a la intensidad de las bandas.

Determinación de la concentración de proteínas.

Las preparaciones de EcFtsA y la mutante $\Delta 27$ se cuantificaron colorimétricamente por el método de Bradford (Bradford, 1976) mediante el "kit" de cuantificación de proteínas "Protein assay". Se utilizó como estándar BSA comercial. Dado que la mutante D210A se encontraba en una solución de urea 8,0 M las preparaciones de

esta mutante se cuantificaron espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a 280 nm en GdmCl 6,0 M. Se utilizó el coeficiente de extinción molar $27220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, calculado a partir de la secuencia primaria en el servidor web ProtParam, ExPasy (Gasteiger y col, 2005).

Filtración molecular de EcFtsA.

Las cromatografías de filtración molecular de EcFtsA, para caracterizar el estado de agregación, se realizaron en una columna Superose 12 HR 10/30 (Pharmacia) equilibrada en amortiguador Tris 100 mM; pH 8,0; EDTA 1,0 mM; KCl 100 mM y DTT 2,5 mM. La columna se refrigeró en un baño de agua a 4 °C. Debido a la baja presión que la resina es capaz de tolerar (435 psi) la cromatografía se hizo a un flujo constante de 0,4 ml/min mediante un sistema de HPLC Beckman GOLD y se registró el perfil de salida de las proteínas desde la columna midiendo la absorbancia a 280 nm con el detector del sistema Beckman GOLD. Para calibrar la columna se utilizó un kit de marcadores de masa molecular para proteínas no desnaturaladas (SIGMA) y con la curva estándar generada se analizó el perfil cromatográfico obtenido al inyectar en la columna una alícuota de 160 μL de EcFtsA 0,9 mg/ml.

El contenido de nucleótido de EcFtsA se observó por filtración de la proteína en una columna (20,6 cm de largo y 0,8 cm de diámetro interno) empacada con 8 ml de Shepadex G-25 (Pharmacia) equilibrada con amortiguador fosfato de sodio 50 mM; pH 8,0; NaCl 500 mM; disulfito de sodio 10 mM; DTT 1,0 mM y MgCl_2 2 mM. Se utilizó presión hidrostática generada por la gravedad entre el cono para solvente de la columna y la salida de esta. Se colectaron fracciones de 0,5 ml. Se midió la absorbancia de cada fracción a 260 nm y 280 nm en un espectrofotómetro Hewlett Packard 8452A.

Dicroísmo circular.

Se utilizó un espectropolarímetro Jasco 600 (Japón) para obtener los espectros de dicroísmo circular (DC) que se registraron entre 200 nm a 250 nm a temperatura ambiente (25 °C). Se utilizaron cubetas de cuarzo cuyo paso óptico se especifica en los pie de cada figura. La apertura del colimador se ajustó a 1 nm para todas las determinaciones. Cada espectro es un promedio de 5 barridos. El efecto del solvente se restó en cada una de las mediciones.

Determinación de la actividad ATPásica de EcFtsA.

Determinación de la hidrólisis de ATP por el método acoplado PQ/LDH. Para determinar la actividad ATPásica de EcFtsA se utilizó el método con las enzimas piruvato quinasa y láctico deshidrogenasa, y los cofactores NADH y PEP. La velocidad de hidrólisis de ATP se determinó espectrofotométricamente por la disminución de la absorbancia a 340 nm, en un espectrofotómetro Hewlett Packard 8452A (USA), pues existe una correlación 1:1 entre cada mol de ATP hidrolizado y cada mol de NADH oxidado. El amortiguador de la reacción, a 30 °C, contenía en un volumen de 500 µL: amortiguador Tris 100 mM; pH 8,0; EDTA 1,0 mM; KCl 100 mM; DTT 2,5 mM; PEP 2,5 mM; NADH 0,4 mM; MgCl₂ 5,0 mM por sobre la concentración de ATP; 1,0 Unidad de piruvato quinasa; 0,4 Unidades de láctico deshidrogenasa y concentraciones variables de ATP como se indica en los pie de cada figura. La temperatura se mantuvo constante con un baño termo-regulado y se midió la temperatura en la cubeta con una termocupla. La reacción de hidrólisis de ATP se inició agregando EcFtsA.

Determinación de la hidrólisis de $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP. La actividad ATPásica de EcFtsA se determinó a través de la cuantificación radiactiva de fosfato inorgánico ($^{32}\text{P}_i$). Se utilizó el mismo medio de reacción anterior, pero se eliminaron las enzimas acopladas y los cofactores. Cada tubo de reacción contenía, en un volumen final de 1 ml: amortiguador Tris 100 mM; pH 8,0; EDTA 1,0 mM; KCl 100 mM; DTT 2,5 mM; MgCl_2 5,0 mM por sobre la concentración de ATP, aproximadamente 1,0 μCi de ($\gamma^{32}\text{P}$)ATP y concentraciones variables de ATP como se indica en los pie de figura. Cada tubo se preincubó a 30 °C y se inició la reacción agregando EcFtsA. A los tiempos indicados se extrajo una alícuota de la reacción de 100 μl y la reacción se detuvo al depositar la muestra en un tubo que contenía 200 μl de una suspensión de carbón activado 100 mg/ml en KCl 0,2 M pH 1,8. Se centrifugó por 10 minutos a 15.000 RPM (centrifuga Labnet, Spectrafuge 16M) y se tomaron 150 μL de sobrenadante que se centrifugaron de la misma manera anterior para retirar las partículas de carbón activado remanentes. Se tomaron 100 μl de sobrenadante y se homogenizaron en 800 μl líquido de centelleo (ARCOTOL). Cada tubo se colocó en un vial de vidrio para determinar la radioactividad del $^{32}\text{P}_i$ no retenido por el carbón activado, que se cuantificó en un contador de centelleo líquido Packard 1600TR (USA).

Microscopia electrónica.

Las muestras para microscopia electrónica se tomaron de una solución polimerizada de EcFtsA a una concentración de 2,25 μM . El amortiguador de polimerización contenía: Tris 10 mM; pH 8,0 y NaCl 50 mM. Se incubó la solución a 30 °C durante 2 min y se indujo la polimerización agregando ATP a una concentración final de 5,0

mM. Después 5 min se tomaron 20 μ l de la muestra con los polímeros de EcFtsA y se depositaron en una grilla para microscopia electrónica de 400 mesh. Se incubó por 30 s y se retiró el exceso de muestra con un papel filtro. Se tiñó con acetato de uranilo al 1% en agua, filtrada con un filtro de 0,22 μ m. En un trozo de parafilm se colocaron 5 gotas de 50 μ l de acetato de uranilo. La grilla se puso en contacto con cada gota en forma seriada. En la última gota la grilla se dejó en contacto con la solución durante un minuto y se retiró el exceso de acetato de uranilo y se guardó en un portagrilla. Se utilizó un microscopio electrónico de transmisión Jeol JEM-100SX, (Japón).

Modelado por homología estructural 3D.

Se utilizó el software MODELLER 6.2 (Sali, 1995) para generar 20 modelos en cada experimento y se escogió aquel que presentó un menor valor de "función objetivo" de MODELLER. Para modelar algunas zonas no determinadas en la estructura tridimensional del cristal que se usó como templado se hicieron restricciones espaciales a ciertos residuos en la estructura secundaria de esa zona generada con el servidor web PHYRE (Imperial College of London). La evaluación de los modelos se realizó con el programa *Prosa II* (Sippl, 1993) y, a partir del "Z-score" calculado, se estimó la probabilidad de tener un buen modelo con el servidor web pG (Sanchez y Sali, 1998). La representación gráfica de los modelos se realizó con las herramientas presentes en el paquete DSModelling 1.1 de Accelrys.

Análisis de datos.

Se utilizó el programa SigmaPlot 8.02 (SSI, Cal., USA) para analizar matemáticamente todos los datos experimentales de la determinación de concentración de proteínas y actividad ATPásica. Los datos obtenidos de los espectros DC se analizaron con el

programa J-700 de JASCO para determinar la elipticidad molar residuo promedio de las muestras y se utilizó el programa CONTIN para el cálculo del porcentaje de estructura secundaria. La concentración relativa de las bandas de proteínas en los geles de poliacrilamida SDS-PAGE se determinó con el programa Lab-Works (UVP, Inc. Upland, CA, USA). Los negativos de las fotografías de los polímeros fueron digitalizados con un scanner CanoScan N640P y las medidas hechas con el software ImageJ 1.34s (National institutes of Health, USA) y se graficaron utilizando el programa Microsoft Excel.

RESULTADOS

MODELADO DE LA ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE EcFtsA POR HOMOLOGÍA ESTRUCTURAL.

La estructura cristalina de FtsA proveniente de *Thermotoga maritima* (TmFtsA) se determinó por difracción de rayos X (van den Ent y Lowe, 2000). En base a las características estructurales observadas, como la presencia de los dominios de unión a nucleótido, semejantes a los de la ribonucleasa-H, se confirmó que esta proteína forma parte de la superfamilia actina/Hsc70/hexoquinasas (Bork y col, 1992). Todas las proteínas de esta familia han mostrado la capacidad de unir e hidrolizar ATP (Hurley, 1996).

La estructura tridimensional de EcFtsA no se ha determinado, de ahí que, para establecer si esta proteína une e hidroliza ATP se construyó un modelo por homología utilizando el programa Modeller 6.02 (Sali y col, 1995). Se utilizó la estructura de TmFtsA, en la conformación con ATP (PDB ID: 1E4G) y libre del nucleótido (PDB ID: 1E4F) como moldes. Dada la baja identidad de secuencia (20%) entre la secuencia del molde TmFtsA y la proteína EcFtsA el alineamiento necesario para el modelado fue construido en dos pasos. Primero se realizó una búsqueda de homólogos con PSI-Blast y la base de datos NR de GenBank (NCBI, USA) para generar una matriz de sustitución posición-específica para EcFtsA. Se obtuvo una matriz que considera la información de los homólogos más lejanos en identidad de secuencia, pero que son parte de la superfamilia actina/Hsc70/hexoquinasa. Con la matriz de sustitución específica para EcFtsA se realizó una PSI-BLAST con la base de datos PDB (RCSB PDB, USA). El resultado mostró como mejor candidato la estructura del cristal de

TmFtsA. El archivo del alineamiento obtenido (figura 3) se utilizó para construir los modelos. Para modelar EcFtsA libre de ATP se utilizó el mismo método y sólo se cambió el archivo PDB de la estructura de TmFtsA unida a ATP, que se utilizó como molde, por el archivo de TmFtsA libre de ATP (1E4F)

```

          10          20          30          40          50          60
FtsA_coli  RKLVYGLEIGTAKVAALVGEVLPDQMN IIGVGSQPSRGMKGGVNDLESVYKCVQRAID
FtsA_thermo TVFYTSIDIGSRYIKGLVL-GKRDQEWELAPSSVKSRLDDEGEIKDAIAPKESVNTLLK
conservados  **      **      *      *      *      *      *      *

          70          80          90          100         110         120
FtsA_coli  QAEIMADQQISSVYLALSGKHISQQNEIGMVPISSE-----EVTQEEVENVYHTAKSVRV
FtsA_thermo ELEEDQLQKSLRSDPV-ISFSSVSFEREDTVIE-RDFGEEKRSITLIDLSEMQSEALEKLLK
conservados  *      *      *      *      *      *      *      *

          130         140         150         160         170         180
FtsA_coli  RDEHRVLHVIPQEYATDYQEGIKIPVGLSGVRMCAKVHLITCHNIMAKHIVKAVERCGLK
FtsA_thermo ENGKTPLIHIFSKRYLLDDERIVFNPLEMKASKIAIEYTSIVVP-----LKVYEMFYHF
conservados  **      *      *      *      *      *      *      *

          190         200         210         220         230         240
FtsA_coli  VDQLIFAGL-----ASSYSVLTEDERELGVGVWDIGGQIMDIAVYTGGAALRHTKVIPIY
FtsA_thermo LQDTVKSPPQLKSSSLVSTADGVLTTPKDRGWWWVNLGVNFTGLIAYKHGVPKISVYVEV
conservados  *      *      *      *      *      *      *      *

          250         260         270         280         290         300
FtsA_coli  AGNVVTSDIAYAFQTPPSDAEAIKVRHGCALQSIVGKDESVEVPSVQGRPPRSLQRQTLA
FtsA_thermo GMIGHVTKDVSAVLDTSPFEESERLIITHGNVYNDL-KEEIQYRGLDQNTIKTITAKKLS
conservados  *      *      *      *      *      *      *      *

          310         320         330         340         350         360
FtsA_coli  EVIEFRYTELLNLVNEEILQLQEKLRQQGVKHHLAAGIVLVTGGAAQIEGLAAACAQRVPHT
FtsA_thermo VIITHARLREIMSKSKKFFREVEAKIVEEG-EIGIQQGVVLTGGAKIFRINELATEVPKFS
conservados  *      *      *      *      *      *      *      *      *      *

          370         380         390
FtsA_coli  QVRIGAPLN-----ITGLTDYAQEPYYSTAVGLLHYG
FtsA_thermo PVRTGCYANSDRSIIKNADEVANDPSFAAAGNVPFV
conservados  **      *      *      *      *

```

Figura 3: Alineamiento de las secuencias de FtsA de *T. maritima* y de *E. coli*. FtsA_thermo corresponde a la secuencia de TmFtsA. FtsA_coli corresponde a la secuencia de EcFtsA. Se destacan los residuos conservados mediante asteriscos. Los “gaps” están indicados por “---” y provienen de residuos no determinados en la estructura del cristal de TmFtsA o bien de inserciones en EcFtsA o TmFtsA.

Se construyeron 20 modelos en cada caso. Se escogieron los modelos que presentaban menor valor de “función objetivo” de MODELLER. Se analizó su validez con el programa Prosa II (Sippl, 1993). El cálculo de pG hecho con el servidor web pG

(Sanchez R. y Sali, 1998) y los valores de “Z-score” entregados por Prosa II, indican que los modelos construidos son confiables ($pG = 1$ para todos los modelos). La figura 4A muestra un diagrama de cable para la estructura de diez modelos obtenidos en la conformación ATP. Se observa la presencia de regiones de Alta Variabilidad Posicional (AVP) que se ubican fuera del “core” de la proteína. La figura 4B muestra los resultados del análisis de Prosa II para estos modelos. Se observa que tanto los moldes como los modelos tienen la misma tendencia en el perfil de evaluación de Prosa II.

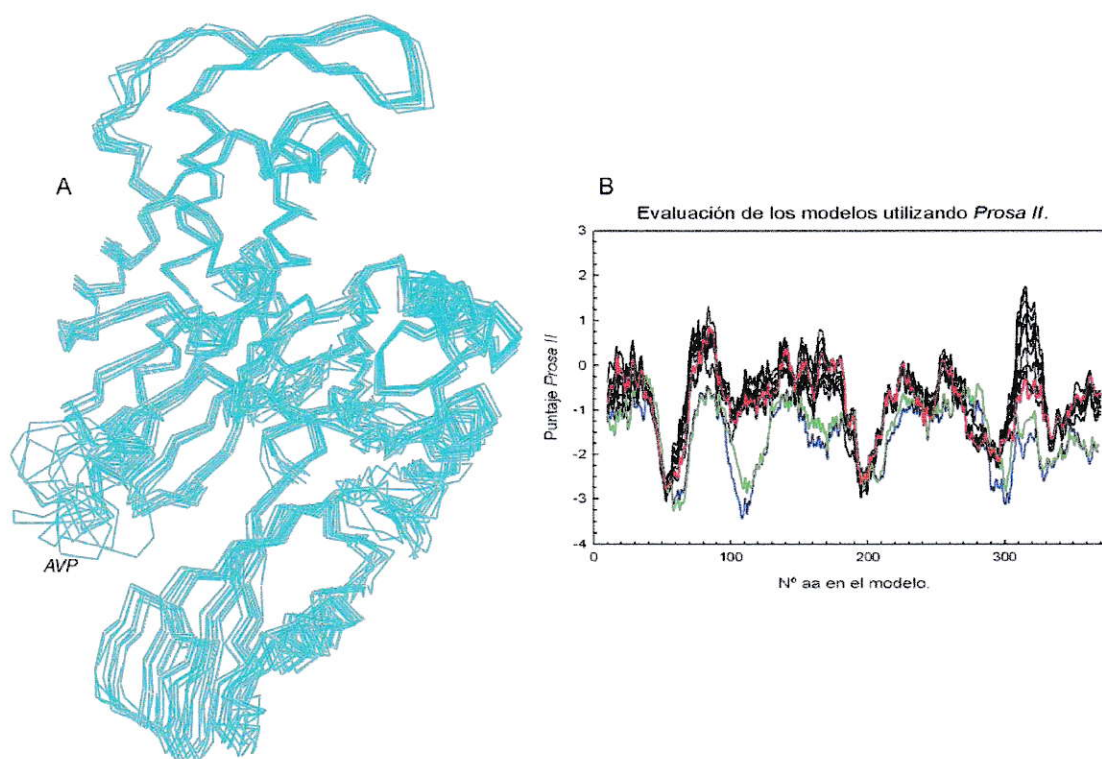


Figura 4: Diagrama de cable para los modelos con ATP unido (A) y su evaluación (B). En A se muestra la superposición de 10 modelos de EcFtsA en la conformación unida a ATP con una zona de AVP entre los residuos 160 a 180. En B se muestra la evaluación de los modelos (—), se destaca el mejor evaluado (—) y se compara con el resultado de la evaluación de la estructura de los moldes 1E4G (—) y 1E4F (—) realizadas con el programa *Prosa II*.

La figura 5A muestra el esquema de cintas del modelo con el nucleótido unido. Al igual que en el caso de TmFtsA se observa la ausencia del subdominio variable IIA, presente en la actina, y la presencia del dominio IC que se encuentra solo en FtsA, miembro de la superfamilia actina/Hsc70/hexoquinasa.

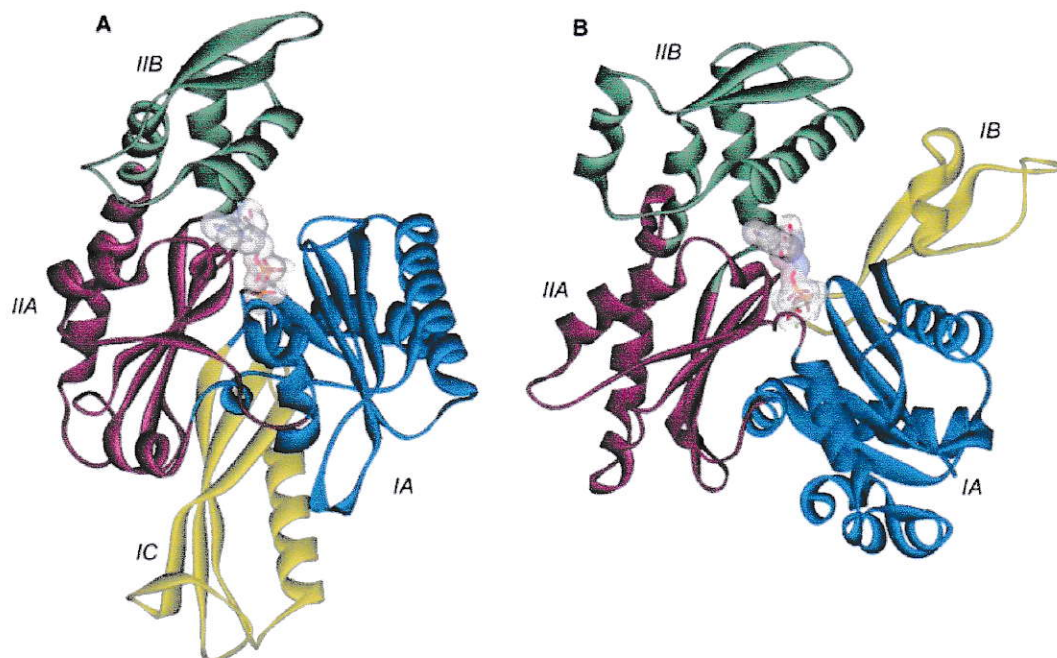


Figura 5: Diagrama de cinta del modelo de la estructura tridimensional de EcFtsA en la conformación unida a ATP. A, muestra el diagrama de cinta de la estructura tridimensional del modelo de EcFtsA obtenido en la conformación unida a ATP, se utilizó el mismo código de colores que para los dominios de actina destacando la ausencia del subdominio variable IIA y la presencia del subdominio IC. B, muestra el diagrama de cinta de la estructura tridimensional de actina (PDB I.D.: 1YAG_A). Se muestra una molécula de ATP unida en el surco interdominio y los cuatro subdominios que caracterizan su estructura.

Para determinar la equivalencia entre los residuos que forman parte de los sitios activos de EcFtsA y Hsc70 se hizo un alineamiento estructural. Se utilizó el programa CE (Shindyalov y Bourne, 1998) con el propósito de obtener el alineamiento

estructural entre el mejor modelo en conformación unido a ATP y la estructura del dominio amino (fragmento ATPasa) de Hsc70 (PDB ID: 3HSC).

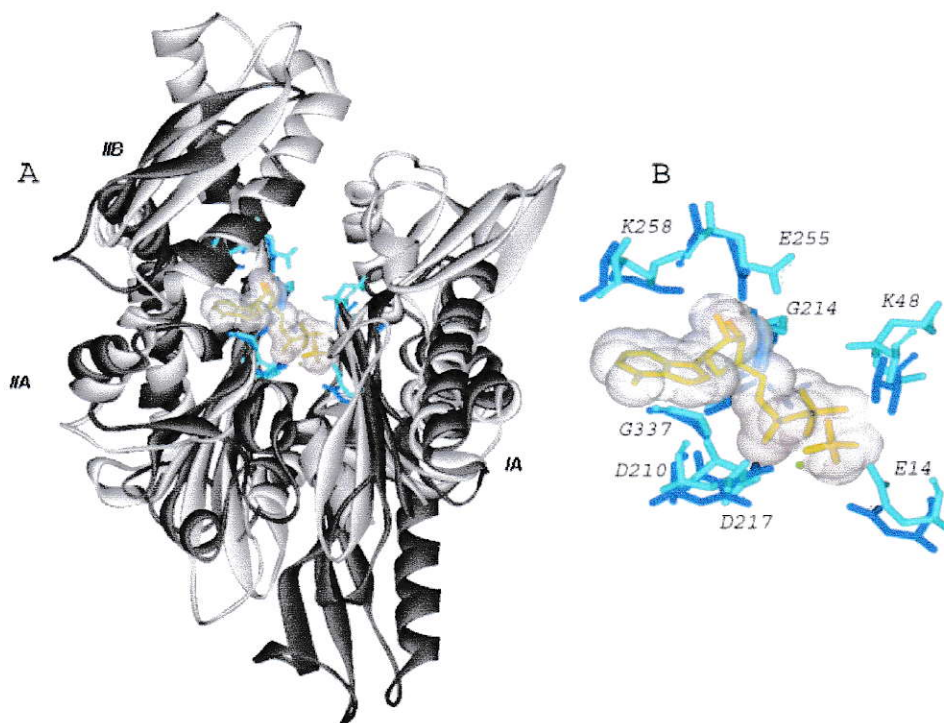


Figura 6: Superposición estructural de EcFtsA y del dominio amino (fragmento ATPasa) de Hsc70. En A se muestra la estructura de EcFtsA (gris oscuro) superpuesta con el fragmento ATPasa de Hsc70 (gris claro) indicando los subdominios que se superponen. Se muestra una molécula de ATP unida en el surco interdominio de EcFtsA y Hsc70. En B se muestra una ampliación de los sitios activos de ambas proteínas con los residuos del sitio activo de Hsc70 (azul) superpuestos con los de EcFtsA (celeste). Los residuos que se numeran corresponden a EcFtsA.

En la figura 6 se observa que en la estructura 3D de ambas proteínas se superponen los subdominios IA, IIA y IIB, no así los subdominios IB de Hsc70 y IC de EcFtsA. Es importante notar que el sitio de unión a nucleótido en la superfamilia actina/Hsc70/hexoquinasas se forma entre los subdominios que se superponen. En la figura 6B, que muestra una ampliación del sitio activo de ambas proteínas, se observa

una buena superposición de los residuos que forman parte del sitio activo de EcFtsA con los de Hsc70.

En la tabla 3 se observa que de los 17 residuos considerados importantes en el sitio de unión del nucleótido 11 se encuentran conservados en EcFtsA cuando se superponen con los que forman parte del sitio activo de Hsc70 (Hurley, 1996). En Hsc70 cinco de estos residuos (conservados en EcFtsA), que se destacan con asteriscos en la tabla 3, conforman un sitio de unión para dos iones K^+ que median la unión de ATP y son cofactores necesarios para la hidrólisis del nucleótido. De esta manera EcFtsA probablemente posee estos dos sitios de unión para K^+ , requeridos como cofactor para la catálisis de ATP.

Tabla 3: Residuos conservados en el sitio activo de Hsc70 y su equivalente estructural en EcFtsA.

Hsc70		EcFtsA	
D*	10	E	14
T	13	T	17
T	14	A	18
Y*	15	K	19
K	71	K	48
E	175	S	192
D*	199	D	210
G	202	G	213
G	203	G	214
T*	204	T	215
D*	206	D	217
D	234	T	240
E	268	E	255
K	271	K	258
S	277	A	264
G	339	G	337
D	366	Y	375

*: residuos que conforman los dos sitios de unión de K^+ en Hsc70.

Estas evidencias en su conjunto apoyan la hipótesis de que EcFtsA puede presentar actividad ATPásica, sin embargo no se descarta que al igual que otras

proteínas de la familia como actina y Hsc70 (Hurley, 1996), la actividad catalítica requiera de algún cofactor, como por ejemplo cationes monovalentes (Flaherty y col,1990) o proteínas accesorias que controlen la hidrólisis (Hurley, 1996), y en cuya ausencia solo seamos capaces de estudiar un nivel basal de hidrólisis del nucleótido.

También se analizó el modelo para explicar la tendencia de esta proteína a agregar. Se sabe que EcFtsA tiene un inusual contenido de residuos cisteína (9 residuos) y se presume que ellos pueden ser parte del mecanismo de agregación al participar en la formación de puentes disulfuro intermoleculares. Utilizando el paquete de programas DS Modeling (Accelrys, USA) se observó que de las 9 cisteínas presentes solo una de ellas está oculta al solvente ($ASA < 5\%$), dos están expuestas medianamente ($5\% < ASA < 10\%$) y 6 están expuestas al solvente ($ASA > 10\%$). De las expuestas, solo 2 (C35 y C54) están a una distancia tal que podrían formar un puente disulfuro intramolecular (2,2 Å). De esta manera es probable que algunas de las 4 cisteínas restantes expuestas al solvente participen en la agregación.

Al inicio de este trabajo de tesis no se sabía si esta proteína se asociaba directamente a la membrana o si lo hacía a través de otras proteínas del divisoma. La presencia de una zona de interacción con la membrana podría dar cuenta de la agregación en solvente acuoso. Aunque se conocía la estructura 3D de TmFtsA, esta carecía de la región C-terminal (van den Ent y Lowe, 2000). Esta región contiene 34 residuos, donde los 10 a 13 últimos residuos son conservados en FtsA (Lowe y van den Ent, 2001). A partir de una predicción de estructura secundaria por medio del servidor PHYRE 0.2 (Imperial Collage of London) se observó que esta región tiene una alta probabilidad de formar una hélice α de tipo anfipática que no estaría asociada al resto de la estructura de FtsA, pues está precedida por un lazo flexible (razón por la

que no pudo ser cristalizada). Pichoff y Lutkenhaus (2005) confirmaron que esta región correspondería a una secuencia anfipática de localización en la membrana o "MTS".

De esta manera es muy probable que la región carboxilo terminal de EcFtsA, junto con la exposición al solvente de 4 residuos de cisteína, esté participando en el proceso de agregación de esta proteína. Para probar la participación de esta región en la agregación de EcFtsA, la mutante EcFtsA $\Delta 27$, que carece de esta región, podría probar su importancia.

PURIFICACION DE EcFtsA Y LAS MUTANTES EcFtsA D210A y $\Delta 27$.

Sobre-expresión de EcFtsA. En una primera etapa se sobreexpresó la FtsA a partir de los tres alelos de FtsA que se encontraban disponibles en el laboratorio (FtsA tipo silvestre (EcFtsA) y las mutantes D210A y $\Delta 27$).

En la figura 7 se muestran las fotografías de los geles de la electroforesis SDS-PAGE de los ensayos de sobreexpresión realizados como se describe en Materiales y Métodos. Se observa que en la cepa inducida aparece con mayor intensidad una banda con una masa molecular de 45 kDa para la mutante $\Delta 27$, masa esperada para la proteína His₆-FtsA resultante de la remoción de los últimos 27 residuos del extremo carboxilo terminal, y una banda de 47 kDa para la proteína tipo silvestre y la mutante D210A, que corresponde a la masa esperada para la fusión His₆-FtsA. Estos resultados muestran la sobre expresión de los tres alelos de EcFtsA en *E. coli* BL21(DE3).

Se observa además que mayores tiempos de post inducción, de dos a cuatro horas, genera un aumento en el nivel de proteína sobre-expresada.

Aun cuando el nivel de sobreexpresión de EcFtsA y la mutante D210A es bajo, lo que es un resultado esperado de acuerdo a la toxicidad de la sobreexpresión de estas proteínas, se observa que la mutante EcFtsA $\Delta 27$ muestra un mayor nivel de sobre-expresión con respecto a los otros dos alelos. Esto es importante, pues nos

permite inferir que al remover estos últimos 27 residuos la proteína resultante es menos tóxica, o bien, el desbalance con la FtsA cromosómica es menos importante para la célula. Se sabe que la eliminación de los últimos 5 residuos carboxilo-terminales es suficiente para impedir la correcta localización de FtsA en la membrana celular, y que al eliminar los 27 residuos carboxilo terminales no se afecta el contenido de estructura secundaria ni la capacidad de la proteína de unir ATP (Yim y col, 2000).

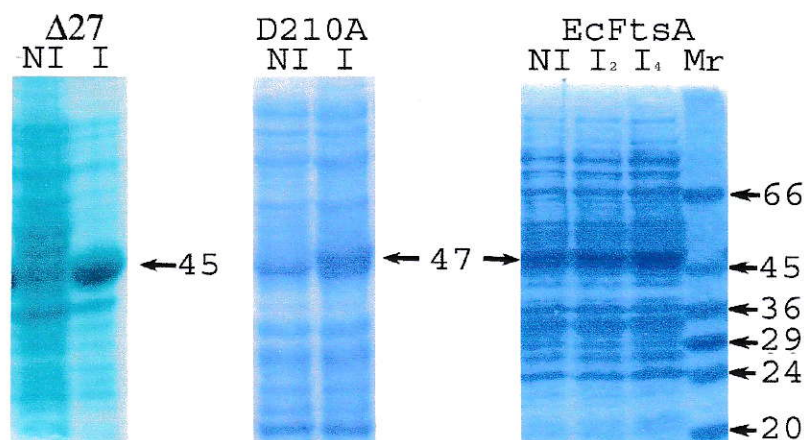


Figura 7: Sobreexpresión de EcFtsA y las mutantes D210A y $\Delta 27$ en *E. coli* BL21 DE3. En el carril Mr se muestra el estándar de masa molecular cuyas bandas corresponden a las masas relativas indicadas por las flechas. Para cada cepa se muestran los estados No Inducido (NI) e Inducido (I) con IPTG 0,2 mM final. Para EcFtsA se probó la sobreexpresión induciendo durante 2 (I_2) y 4 (I_4) horas.

Para aumentar el nivel de sobreexpresión de EcFtsA silvestre y la mutante D210A obtenido en *E. coli* BL21(DE3), se procedió a transformar por electroporación células *E. coli* C41(DE3) con los plasmidios pMVF12 y pMVF12-D210A, provenientes de las cepas VIP 386 (que expresa EcFtsA tipo silvestre) y VIP 813 (que expresa la mutante D210A). Experimentos previos del laboratorio demostraron que estas células

toleran mejor la sobreexpresión de proteínas tóxicas y disminuyen el nivel de degradación proteolítica de las proteínas bajo estudio.

Los plasmidios fueron aislados mediante el uso de “kits” de extracción de DNA plasmidial y se transformaron células de *E. coli* C41(DE3) electro-competentes preparadas de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos. Las transformantes se plaquearon en placas LB suplementadas con antibióticos. Se eligieron 10 clones de cada cepa y se estudió la sobre-expresión en las mismas condiciones descritas para *E. coli* BL21(DE3). La figura 8 muestra las fotografías de los geles de poliacrilamida SDS-PAGE para la sobreexpresión de EcFtsA y de la mutante D210A. Se observa un aumento de la intensidad de la banda de 47 kDa en la cepa inducida, lo que indica sobreexpresión de la proteína al comparar la intensidad relativa de ésta banda respecto de las otras del gel. También se observa un aumento respecto a lo que ocurre en *E. coli* BL21(DE3) por lo que se prefirió esta cepa para purificar estas proteínas.

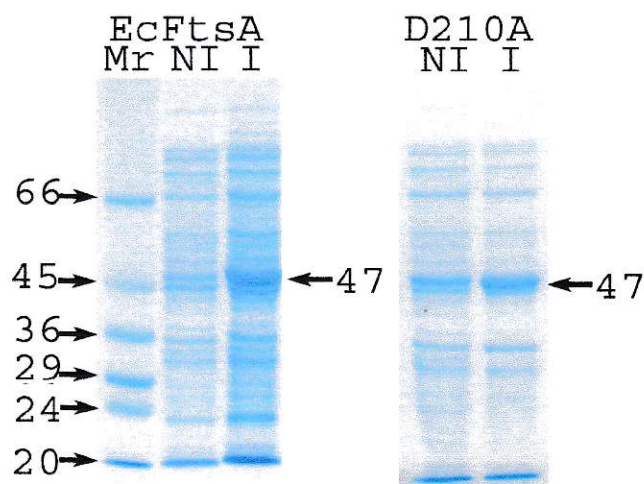


Figura 8: Sobreexpresión de EcFtsA y de la mutante D210A en *E. coli* C41(DE3). En el carril Mr se muestra el estándar de masa relativa cuyas bandas se indicadas por flechas. Para cada cepa se muestran los estados No Inducido (NI) e Inducido (I) con IPTG 0,2 mM final.

Para aumentar aun más el nivel de sobreexpresión se determinó la relación entre la cantidad de proteína respecto a la concentración de inductor utilizado, la temperatura y el tiempo post-inducción.

El efecto de la concentración del inductor se analizó en un rango entre 0,2 y 1,0 mM. En la figura 9 se muestra una fotografía del gel de poliacrilamida SDS-PAGE a diferentes concentraciones de IPTG. Se observa que luego de tres horas post-inducción hay aumento de la sobreexpresión de la proteína a 37 °C.

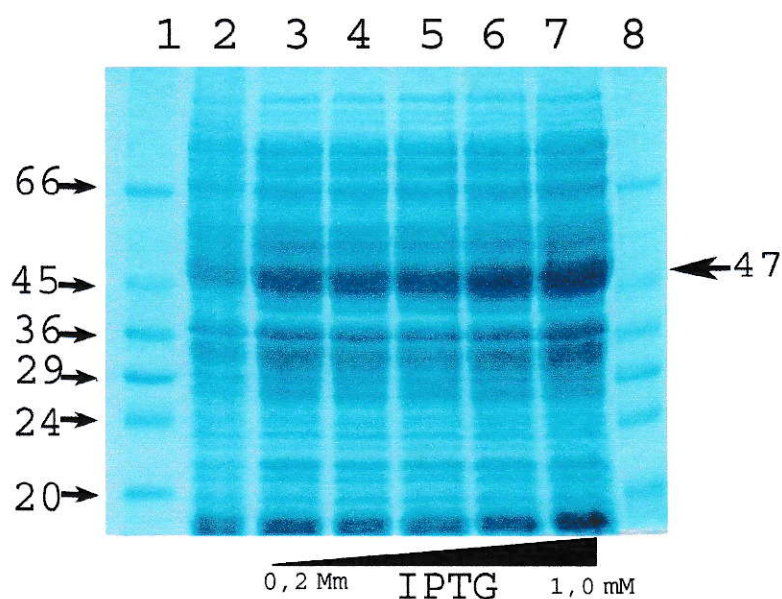


Figura 9: Efecto de la concentración de IPTG en la sobreexpresión de EcFtsA en células *E. coli* C41(DE3). En los carriles 1 y 8 se muestran los estándares de masa molecular relativa cuyos valores en kDa se indica por flechas. En el carril 2 se muestra el estado no inducido y en los carriles 3 a 7 inducido con concentraciones crecientes de IPTG. Carril 3: 0,2 mM; Carril 4: 0,5 mM; Carril 6: 0,7 mM; Carril 7: 1,0 mM. Se indica la sobre-expresión de una banda de 47 kDa cuya intensidad es mayor conforme aumenta la concentración del inductor IPTG.

El efecto de la temperatura sobre la sobreexpresión de EcFtsA en las células *E. coli* C41(DE3) se probó con el mismo procedimiento descrito anteriormente. Se agregó el inductor a los cultivos y se mantuvieron, por distintos tiempos, a 37 o 18 °C. La figura

10 muestra la fotografía de los geles de poliacrilamida SDS-PAGE del extracto total de la cepa que sobreexpresa la mutante D210A. Se observa que no hay un efecto significativo de la temperatura en la sobreexpresión de la mutante a las tres horas post-inducción. Un resultado similar se obtuvo con EcFtsA silvestre (resultado no mostrado). Sin embargo, al prolongar el cultivo a 18 °C por 18 horas se observó un aumento en la intensidad de la banda de 47 kDa correspondiente a EcFtsA. Este aumento en la intensidad es probablemente debido a una mayor densidad celular en los cultivos que son crecidos a 18 °C durante 18 horas, a diferencia de un cultivo a 37 °C que no aumenta su densidad celular luego de 18 horas.

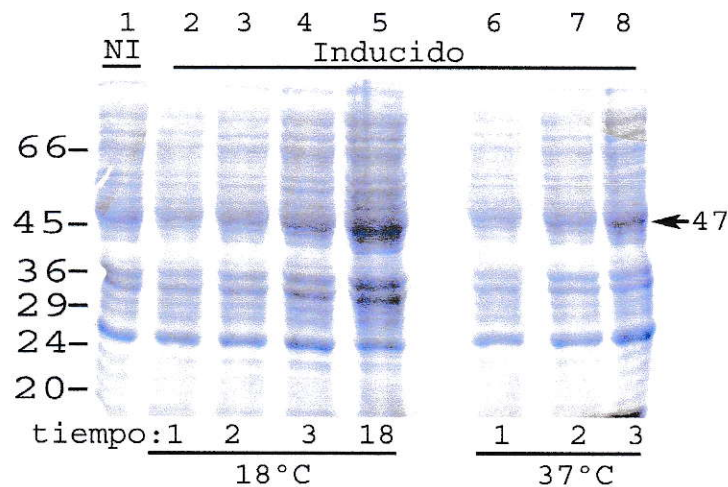


Figura 10: Efecto de la temperatura de post-inducción en la sobreexpresión de la mutante D210A en células *E. coli* C41(DE3). Los valores de las masas moleculares en kDa del estándar de masa molecular se indican por barras. En el carril 1 se muestra el estado No Inducido (NI) y en los carriles 2 a 8 Inducido con IPTG 1,0 mM. El tiempo (en horas) y la temperatura (en grados Celsius) para la colección de cada alícuota se indica en la figura.

En conclusión, las condiciones para la sobreexpresión de EcFtsA y la mutante D210A en las células *E. coli* C41(DE3) fueron las siguientes: inducir los cultivos con

IPTG a una concentración final de 1,0 mM y mantener los cultivos a 37 °C durante tres horas de post-inducción.

Purificación de EcFtsA y la mutante $\Delta 27$ en presencia de inhibidores de proteasas y agentes reductores. EcFtsA no se ha purificado a homogeneidad, por lo tanto no se ha podido caracterizar esta proteína. Esta situación se encuentra para la mayoría de las proteínas que forman parte del divisoma, pues son proteínas de membrana o asociadas a membrana, lo que hace difícil su manipulación para mantenerlas estables en solución. Además, la sobreexpresión produce un efecto tóxico debido a que el nivel de expresión de cada proteína está finamente regulado para obtener un divisoma funcional. Los primeros intentos de purificación de esta proteína fueron hechos en el laboratorio del Dr. Miguel Vicente (CESIC, España) que utilizó las siguientes etapas: lisis del cultivo que sobreexpresa His₆-EcFtsA, centrifugación para separar la fracción soluble y cromatografía de afinidad por níquel de la fracción soluble obtenida en la centrifugación del lisado celular. Este método produjo una proteína parcialmente purificada, inestable y que se agregaba en poco tiempo a 4 °C.

La purificación de las proteínas en nuestro laboratorio se hizo en base al procedimiento descrito por el Dr. Vicente. Para estabilizar la proteína en las primeras etapas se incluyó inhibidores de proteasas y agentes reductores compatibles con la cromatografía de afinidad por níquel. Una vez purificada la proteína se agregó sacarosa para evitar la agregación y favorecer la estructura activa de la proteína durante el almacenamiento. Se utilizó un cóctel de inhibidores de proteasas libre de EDTA que no interfiere con la unión del metal a la columna, y disulfito de sodio como agente reductor, pues no cambia el estado de oxidación del metal unido a la columna.

Estos reactivos fueron compatibles con la etapa de purificación por cromatografía de afinidad por níquel, a diferencia de DTT, β -mercaptoetanol, EGTA o EDTA.

La pureza de la proteína en cada etapa de purificación, como se describió en Materiales y Métodos, se determinó por electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE al 10%. En la figura 11 se muestra una fotografía del gel de la electroforesis de la preparación de EcFtsA obtenida de la cromatografía de afinidad por níquel en presencia de inhibidores de proteasas y agentes reductores.

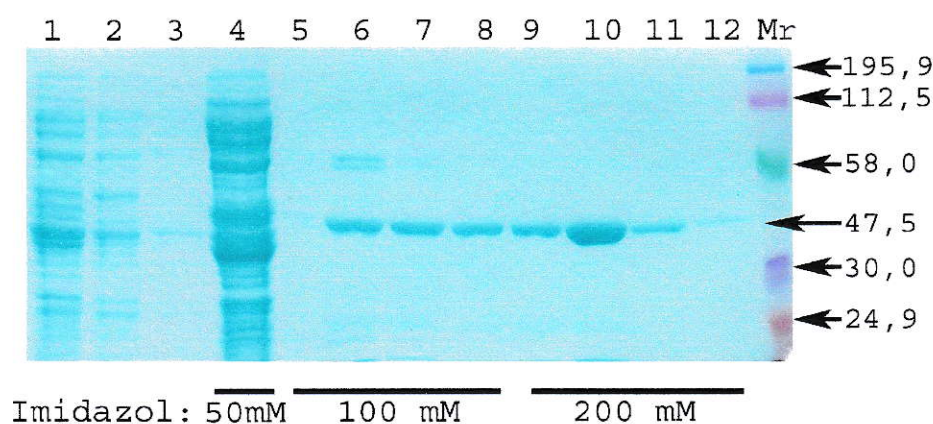


Figura 11: Purificación de EcFtsA por cromatografía de afinidad por níquel en presencia de agentes reductores e inhibidores de proteasas. El carril Mr corresponde a la distribución de las bandas del marcador de masa molecular cuyos valores en kDa se indican por flechas. Carril 1: solución de carga de la columna. Carril 2: frente de la cromatografía. Carril 3: lavado con amortiguador de carga de la resina. Carril 4: lavado con amortiguador más imidazol 50 mM. Carriles 5 a 8: lavado con amortiguador más 100 mM imidazol. Carriles 9 a 12: lavado con amortiguador más 200 mM imidazol. Se indica en los carriles 6 a 12, con una flecha más larga, las bandas de aproximadamente 47,5 kDa.

Se observa en la figura 11 que en el lavado con 50 mM de imidazol se recupera una gran cantidad de proteínas que se retienen durante la carga de la resina, y que no contienen FtsA (confirmado por Western Blot). La EcFtsA (banda de 47,5 kDa) se recupera de la columna con 100 mM imidazol y se completa su elusión con 200 mM. Al

comienzo de la elución con 100 mM imidazol aparecen dos bandas de mayor peso molecular (aproximadamente 60 kDa) que corresponderían a proteínas que copurifican con EcFtsA. Esta es una diferencia en la purificación respecto a la mutante $\Delta 27$ donde no aparecen este par de proteínas de mayor masa molecular y aumenta la cantidad de proteína purificada (no mostrado). La otra característica de la mutante $\Delta 27$ es que a mayores concentraciones que EcFtsA silvestre (aproximadamente 6,0 mg/ml) no forma agregados visibles. Una explicación razonable de estos resultados es la ausencia de los últimos 27 aminoácidos en la mutante, que contienen el MTS de FtsA (hélice anfipática) y serían responsables de la agregación. Recientemente se ha descrito que EcFtsA se asocia con proteínas del divisoma cuando se localiza en la membrana, independiente del anillo Z (Corbin y col, 2004), como por ejemplo la interacción con FtsI a través del subdominio IC de EcFtsA. FtsI es una proteína de aproximadamente 60 kDa que podría corresponder a las bandas contaminantes, pues la interacción debería desaparecer al eliminar la región C-terminal de EcFtsA, responsable de su unión con la membrana, lo que explicaría la desaparición de las bandas de 60 kDa contaminantes.

Con el fin de limitar la agregación de EcFtsA silvestre se incluyó sacarosa en la última etapa a través de una diálisis durante 12 horas a 4 °C, que también sirvió para remover el imidazol. Para esta etapa se colectaron las fracciones no contaminadas (determinado por geles de poliacrilamida SDS-PAGE) con las proteínas de aproximadamente 60 kDa. La proteína tipo silvestre se concentró hasta 2,0 mg/ml (sin observar agregación) y se almacenó a -80 °C.

La figura 12 muestra la electroforesis SDS-PAGE de la EcFtsA y la mutante $\Delta 27$ purificadas. La identidad de las proteínas fue comprobada mediante Western Blot utilizando anticuerpos policlonales anti-FtsA y se reveló utilizando anticuerpos

secundarios conjugados con fosfatasa alcalina (para EcFtsA) o conjugados con peroxidasa (para la mutante $\Delta 27$).

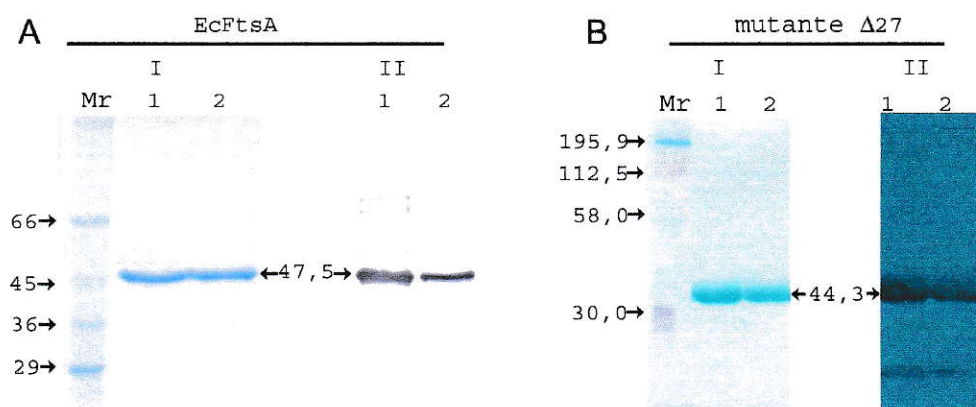


Figura 12: Electroforésis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE de EcFtsA (A) y la mutante $\Delta 27$ (B) purificadas. En el panel I de ambas figuras los carriles Mr corresponden a marcadores de masa molecular relativa donde las flechas indican sus masas en kDa. Los paneles II corresponden al análisis de Western Blot de los paneles I. Los carriles 1 y 2 de ambos paneles corresponden a dos muestras representativas de distintas purificaciones de cada proteína.

En el panel I de la figura 12 A se observa una banda de 47,5 kDa que corresponde a EcFtsA por el análisis de Western Blot (panel II). En los carriles 1 y 2 del panel II de la figura 12 A (Western Blot) se observan bandas de menor peso molecular (aprox. 29 kDa), que corresponden a degradación proteolítica. Se observa en la preparación del carril 1 la presencia de proteínas de mayor masa molecular (alrededor 66 kDa) que corresponden a proteínas que copurifican en la cromatografía de afinidad por níquel. En ambos carriles del panel I de la figura B se observa una sola banda de aproximadamente 44 kDa que corresponde a la mutante $\Delta 27$ por el análisis de Western Blot. Solo en el Western Blot revelado por quimioluminiscencia es posible ver la presencia de péptidos más pequeños productos de degradación.

Purificación de la mutante EcFtsA D210A. La purificación de la mutante EcFtsA D210A en *E. coli* mostró que esta proteína formaba agregados insolubles, pues la mayor parte de la proteína se encontró en la fracción insoluble luego de centrifugar el homogenizado celular a 67.600 x g (figura 13). El tratamiento del precipitado con el detergente Triton X-100 no solubilizó la proteína. Esto sugiere que la mutante D210A forma cuerpos de inclusión.

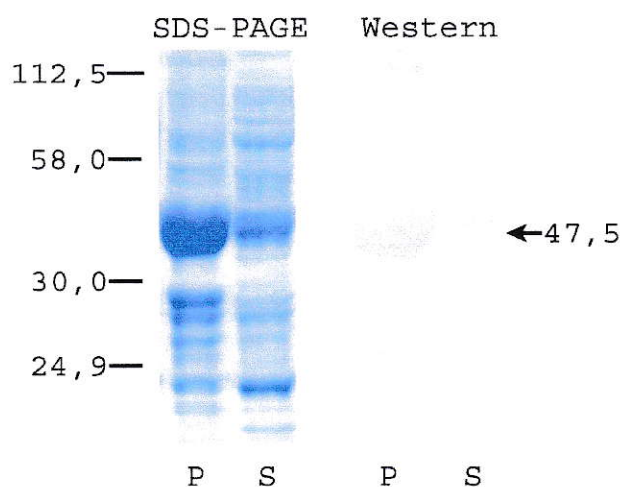


Figura 13: Electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE de las fracciones soluble e insoluble de la mutante D210A en extractos totales de la sobreexpresión en *E. coli* C41(DE3). Los estándares de masa molecular están representados por barras cuyos respectivos valores se indican en la figura en kDa. Se muestra los resultados de SDS-PAGE y Western Blot del extracto soluble (S) y del precipitado (P) luego de centrifugar a 67.600 x g.

Por esta razón la proteína se purificó a partir de la fracción insoluble de la centrifugación a 67.600 x g como se describe en Materiales y Métodos. Brevemente, este método consistió en lavar los cuerpos de inclusión, solubilizarlos con urea 8,0 M y seguir el mismo protocolo de purificación ya descrito en presencia de urea 8,0 M en

cada uno de los amortiguadores utilizados. La proteína se almacenó con urea 8,0 M a -80°C .

Cabe destacar que la urea no influyó sobre el comportamiento de la proteína durante la purificación, pues el perfil cromatográfico, visualizado por geles de poliacrilamida SDS-PAGE, muestra que la mutante D210A eluye de la columna tanto con 100 mM como con 200 mM de imidazol, de manera similar a la proteína silvestre y la mutante $\Delta 27$. Sin embargo, en el caso de la mutante D210A las fracciones obtenidas con 100 mM de imidazol contienen más proteína que las fracciones de 200 mM de imidazol. De manera similar a la purificación de la mutante $\Delta 27$ no se detectó la presencia de las bandas de aproximadamente 60 kDa. Esto sugiere que la copurificación de estas proteínas contaminantes es dependiente del estado nativo de EcFtsA, pues al solubilizar con urea 8,0 M y cromatografiar en la columna de níquel estas bandas desaparecen. La figura 14 muestra la pureza de las fracciones de la purificación de la mutante D210A obtenidas con imidazol, desde la columna cromatográfica de afinidad por níquel. Se incluye también una muestra de proteína purificada y concentrada que muestra que la banda de la mutante D210A tiene una movilidad electroforética relativa que corresponde a una proteína de 45 kDa.

Con este procedimiento la proteína presentó una pureza superior al 90%, calculado a partir de la intensidad relativa de las bandas utilizando el programa de análisis LabWorks (UVP, Inc.). Al cargar en el gel aproximadamente 30 mg de proteína se observaron bandas de menor peso molecular, que migran en forma similar a las de la purificación de la proteína silvestre y la mutante $\Delta 27$, y que corresponden a productos de degradación. También se observaron dos bandas de mayor peso molecular (aproximadamente 120 kDa).

La tabla 4 resume los pasos del proceso de purificación que se siguieron tanto para EcFtsA tipo silvestre, como para las mutantes EcFtsA $\Delta 27$ y EcFtsA D210A.

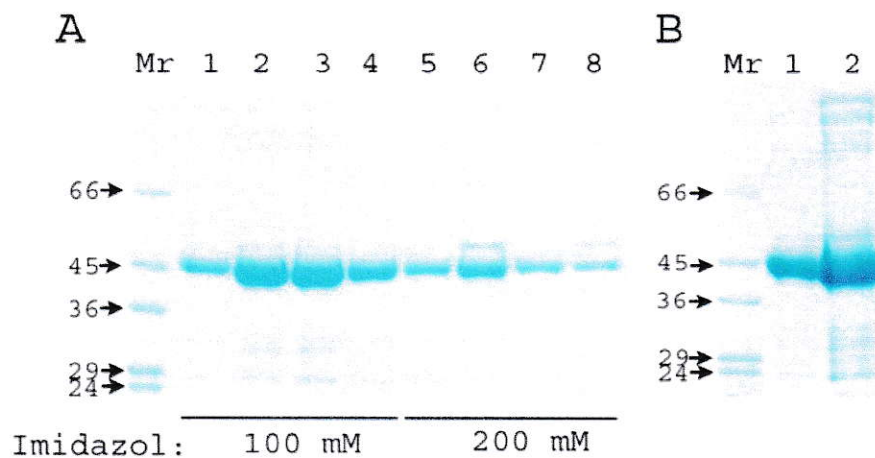


Figura 14: Electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE de las fracciones de la purificación en la columna de afinidad por níquel de la mutante D210A (A) y de la proteína purificada (B). Los carriles Mr corresponden a los estándares de masa molecular cuyos valores en kDa se indican con flechas. En A los carriles 1 a 4 corresponden a las fracciones eluidas de la columna con 100 mM de imidazol y los carriles 5 a 8 corresponden a las fracciones eluidas con 200 mM imidazol. En B los carriles 1 y 2 corresponden a dos cantidades distintas de la mutante D210A (12 y 30 μ g totales).

Tabla 4: Etapas de purificación de EcFtsA, EcFtsA $\Delta 27$ y EcFtsA D210A.

<i>Etapas</i>	EcFtsA	EcFtsA $\Delta 27$	EcFtsA D210A
<i>Lisis celular</i>	+	+	+
<i>Centrifugación</i>	S ^a	S ^a	P ^b
<i>Solubilización con urea 8,0 M</i>	-	-	+
<i>Cromatografía de afinidad por Níquel</i>	+	+	+
<i>Diálisis contra sacarosa 1,0 M^c</i>	+	+	- ^d
<i>Rendimiento promedio a partir de 2 l de cultivo (mg/ml)</i>	2,0 – 3,0	6,0	6,0

+ : etapa incluida. - : etapa no incluida. ^aS: sobrenadante de la centrifugación.

^bP: precipitado de la centrifugación. c: después de esta etapa se almacenó la proteína a -80 °C.

d: la proteína se almacenó concentrada en amortiguador con urea 8,0 M.

ESTABILIDAD DE EcFtsA SILVESTRE.

Uno de los problemas que ha retrasado la caracterización bioquímica de EcFtsA es la tendencia de esta proteína a agregar. La formación de agregados en la proteína purificada se observó a simple vista cuando esta se mantuvo a 4 °C en el amortiguador de elusión de la cromatografía de afinidad por níquel (comunicación personal Dr. Vicente). Se ha descrito que cosolventes como polialcoholes y azúcares evitan la agregación de proteínas en solución, pues favorecen la estructura nativa de la proteína (Lee y Timasheff, 1981), de modo que para evitar la agregación la proteína se dializó contra un amortiguador que contenía sacarosa 1,0 M.

La presencia de residuos tioles expuestos al solvente puede favorecer la agregación irreversible de la proteína. Por esta razón se incluyó el agente reductor disulfito de sodio durante y después de la purificación, y se suplementó con DTT en el amortiguador de almacenamiento. Se observó que la presencia de estos agentes, en conjunto con sacarosa 1,0 M, reduce considerablemente la agregación de EcFtsA, pues no es posible observar agregados luego de varios días a 4 °C. En la figura 15 se muestra la electroforesis SDS-PAGE de la fracción soluble y del precipitado de EcFtsA almacenada a 4 °C en presencia de sacarosa y agentes reductores (amortiguador de almacenamiento). Se observa que la mayoría de la proteína permanece en el sobrenadante y hay un leve aumento de los agregados en el tiempo. La cantidad de precipitado formado no superó el 20% de la cantidad total de proteína.

Una característica importante de la polimerización de proteínas es la dependencia de la concentración. El aumento de la concentración de EcFtsA mostró que a una concentración de aproximadamente 6,0 mg/ml se formaron agregados visibles. La proteína agregada no mostró actividad ATPásica detectable por el ensayo

enzimático acoplado PQ/LDH de detección de ADP. Al centrifugar a 17.500 x g esta solución, se recuperó la actividad ATPásica.

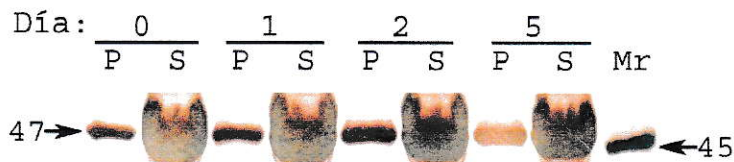


Figura 15: Electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE de la fracción soluble y del precipitado de EcFtsA almacenada en presencia de sacarosa y agentes reductores a 4 °C. La formación de agregados insolubles se siguió durante 5 días. Las fracciones soluble (S) e insoluble (P) se separaron por centrifugación a 94.600 x g durante 15 min y se analizó el contenido de proteína de las fracciones soluble y del precipitado por geles de poliacrilamida SDS-PAGE 10%. El carril Mr corresponde al marcador de masa molecular relativa de 45 kDa cuya banda se indica por una flecha. También se indica con una flecha la banda de 47 kDa que corresponde a la masa molecular relativa de His₆-EcFtsA. El gel se reveló por tinción con plata.

Naturaleza de la interacción de EcFtsA en la formación de polímeros y agregados. Con el objeto de analizar la naturaleza hidrofóbica de la agregación se probó el efecto del detergente Tween 20.

EcFtsA posee una secuencia de destinación a membrana en su región carboxilo terminal (Pichoff y Lutkenhaus, 2005) que podría ser responsable de la interacción de residuos hidrofóbicos durante la polimerización y agregación de EcFtsA. Se probó el efecto del detergente no-iónico, no-desnaturante Tween 20 sobre la formación de agregados a 30 °C luego de diluir la proteína, que se mantenía almacenada en presencia de sacarosa y reactivos tioles. Los resultados de la figura 16 muestran que la presencia de Tween 20 al 0,36% v/v redujo fuertemente la velocidad de agregación de EcFtsA, lo que sugiere la participación de un componente hidrofóbico en este proceso.

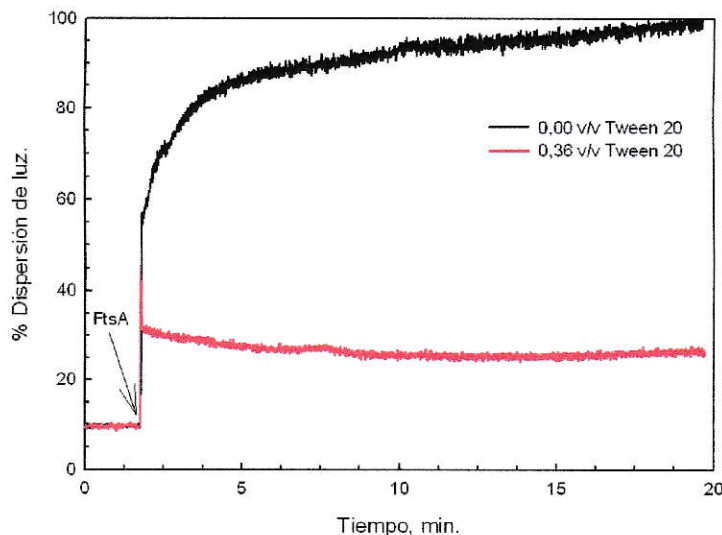


Figura 16: Efecto de Tween 20 0,36% v/v sobre la agregación de EcFtsA. Se agregó FtsA a los 90 s de comenzado el registro de la dispersión de luz (se indica con la flecha). La solución de polimerización contenía Tris 100 mM; pH 8,0; KCl 100 mM; $MgCl_2$ 12 mM, DTT 2,5 mM y EcFtsA 2,25 μ M (línea de color negro) y la misma solución más Tween 20 0,36% v/v se indica con la línea de color rojo.

Estado de agregación de EcFtsA soluble. Con el objeto de caracterizar el estado de agregación de EcFtsA soluble se utilizó una columna de filtración molecular Superose 12 HR 10/30 que permite separar macromoléculas con masas moleculares entre 1 y 300 kDa. Para determinar la masa molecular relativa de las diferentes fracciones filtradas, la columna fue calibrada con estándares de masa molecular para cromatografía de exclusión (figura 17). Se utilizó el mismo amortiguador del ensayo acoplado PQ/LDH para la actividad ATPásica, de modo de determinar de manera directa la actividad ATPásica de las diferentes fracciones filtradas de la columna (monómero, dímero, etc.).

En la figura 17 se muestra el perfil de filtración de la proteína desde la columna Superose 12, donde se observan dos picos y un hombro. El primer pico (P1), con un

tiempo de retención de 16,3 min, se obtuvo en el volumen de exclusión de la columna y corresponde a una masa molecular superior a 300 kDa. El segundo pico (P2), con mayor tiempo de retención (27,3 min), correspondió a una macromolécula con Mr de 54,6 kDa. También se observó la presencia de un pequeño hombro (H), previo al pico 2 y con un tiempo de retención de 24,6 min, que corresponde a una Mr de 133 kDa (tabla 5).

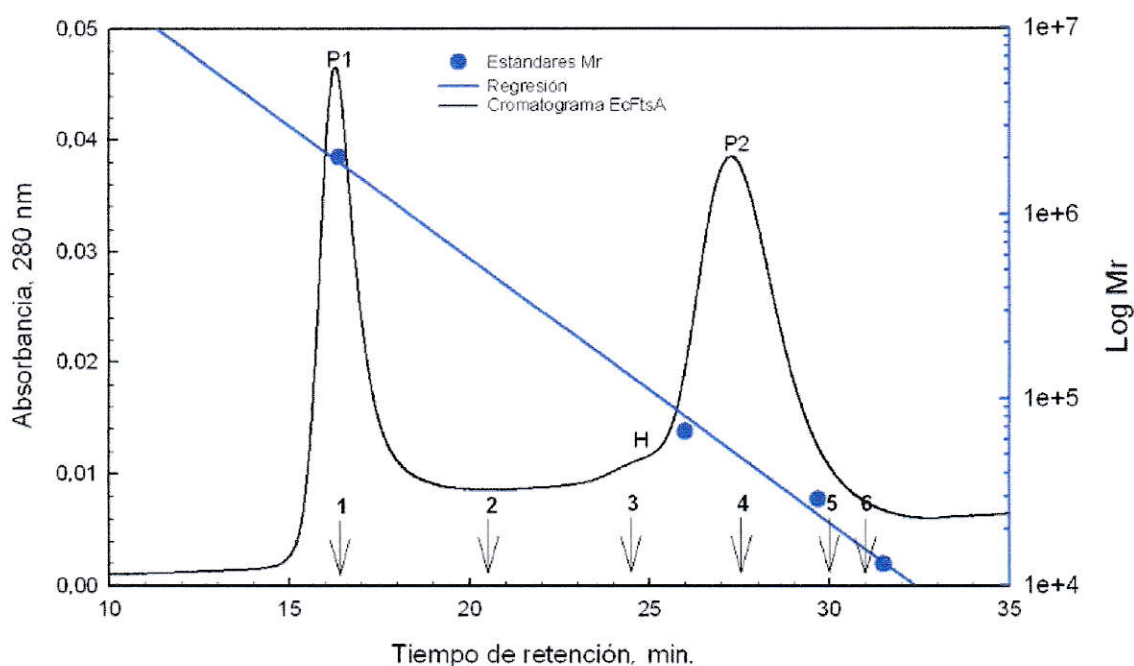


Figura 17: Curva de calibración de la columna Superose 12 HR10/30 (—) y cromatograma de la cromatografía de exclusión molecular de EcFtsA (—). Se utilizaron los siguientes estándares de masa molecular (●) para la cromatografía de exclusión: Azul Dextrano (Mr: 2.000.000), Albúmina bovina (Mr: 66.000), Anhidrasa carbónica (Mr: 29.000) y Citocromo C (Mr: 12.300). El amortiguador de la cromatografía contenía: Tris 100 mM; pH 8,0; KCl 100 mM; DTT 1,0 mM y disulfito de sodio 10,0 mM. Flujo: 0,4 ml/min. Se inyectaron 144 μ g de proteína. P1 y P2 corresponden a los picos y H al hombro. Se indican con flechas las fracciones que se analizaron por electroforesis SDS-PAGE mostradas en la figura 18.

Tabla 5: Pesos moleculares de las especies resueltas en la cromatografía de filtración molecular en Superose 12 HR 10/30

Filtrado	Tiempo de Retención (min)	Mr calculado (kDa)
Pico 1	16,3	>300
Hombro H	24,6	133
Pico 2	27,3	54,6

Para determinar la presencia de EcFtsA y de otras proteínas contaminantes en las fracciones indicadas por las flechas en el cromatograma de la figura 17, se utilizó electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE 10%, teñidos con Azul de Coomassie. La Figura 18 A muestra una banda de proteínas en todas las fracciones, con una Mr de 47,5 kDa, que corresponde a EcFtsA. Se observa que la intensidad de la banda del pico 1 (P1) es menor que la intensidad e la banda del pico 2 (P2). Esta diferencia podría ser atribuida a una contribución de la dispersión de luz producida por los polímeros a los valores de D.O. del pico 1, pues este pico aparece en el volumen de exclusión de la columna (Mr > 300 kDa). El hombro H que aparece con Mr alrededor de 133 kDa podría corresponder a un dímero no esférico.

Las bandas del gel de la electroforesis SDS-PAGE, revelada por Western Blot, confirman la presencia de FtsA en todas las fracciones analizadas y que la fracción monomérica de la proteína es mayoritaria. No se observa la presencia de proteínas contaminantes. La presencia de bandas producto de la degradación de EcFtsA en el pico 2 puede ser responsable de la pérdida de simetría de éste y de su arrastre por interacción con la proteína monomérica.

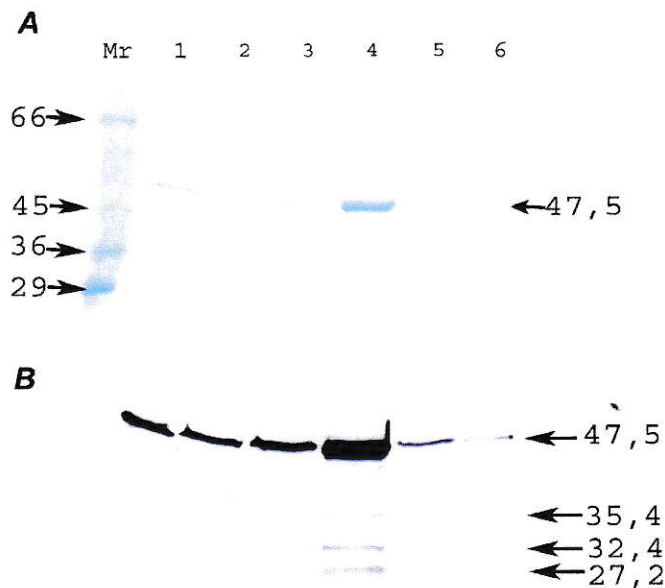


Figura 18: Electroforesis en gels de poliacrilamida SDS-PAGE (A) y Western Blot (B) de las fracciones obtenidas en la cromatografía de filtración molecular en Superose 12 HR 10/30. En A se muestra la fotografía del gel de poliacrilamida SDS-PAGE teñido con Azul de Coomassie. Las bandas del carril Mr corresponden a las proteínas estándares de masa molecular cuyos valores en kDa se indican con flechas a la izquierda. El valor correspondiente a la masa molecular de EcFtsA se indica con una flecha a la derecha. Los carriles 1 a 6 corresponden a las fracciones obtenidas en la cromatografía de exclusión molecular que se muestran en la figura 17. En B se muestra la fotografía de la membrana de Western Blot del gel obtenido en A, revelado con suero inmune de conejo anti-FtsA y fosfatasa alcalina. Los valores en kDa de las masas moleculares de las bandas de proteínas y de EcFtsA se indican por flechas a la derecha de la figura.

CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL Y ESTRUCTURAL DE EcFtsA.

Unión de nucleótido de EcFtsA. Se demostró por cristalografía de rayos X que FtsA de *Thermotoga maritima* une ATP, pues las formas unida a ATP y Apo fueron resueltas (van den Ent y Lowe, 2000). Experimentos con análogos de ATP radiactivos, capaces de unirse covalentemente a las proteínas por exposición a luz U.V., y retención en filtros de acetato de celulosa demuestran que FtsA de *B. subtilis* (Feucht y col, 2001), FtsA de *S. pneumoniae* (Lara y col, 2005) y EcFtsA (Sanchez M. y col, 1994) son capaces de unir ATP.

La unión de ATP y ADP a EcFtsA se determinó en forma cualitativa por filtración en una columna de Sephadex G-25 equilibrada en amortiguador libre de nucleótido como se describe en Materiales y Métodos.

La figura 19 muestra la separación de EcFtsA con el nucleótido unido del nucleótido libre. Se observa que EcFtsA con el nucleótido unido (absorbancia a 280 y 260 nm) aparece en el volumen de exclusión de la columna (fracciones 16 a 18) y el nucleótido libre aparece más tarde como un pico ancho y asimétrico entre las fracciones 35 a 40.

Contenido de estructura secundaria de EcFtsA. Para determinar el contenido de estructura secundaria de la proteína purificada se midieron los espectros de dicroísmo circular (DC) en un espectropolarímetro Jasco J-600 (figura 20 A). La figura 20 B muestra que el contenido de estructura secundaria es similar al determinado en el laboratorio del Dr. Miguel Vicente (Sanchez M. y col, 1994), que corresponde a 27% de hélice α , 25% de hebra β , 12% de vuelta β y 36% de elementos no estructurados o "remanente". Sin embargo estos valores son diferentes del contenido de estructura secundaria calculado a partir de la estructura del cristal de TmFtsA.

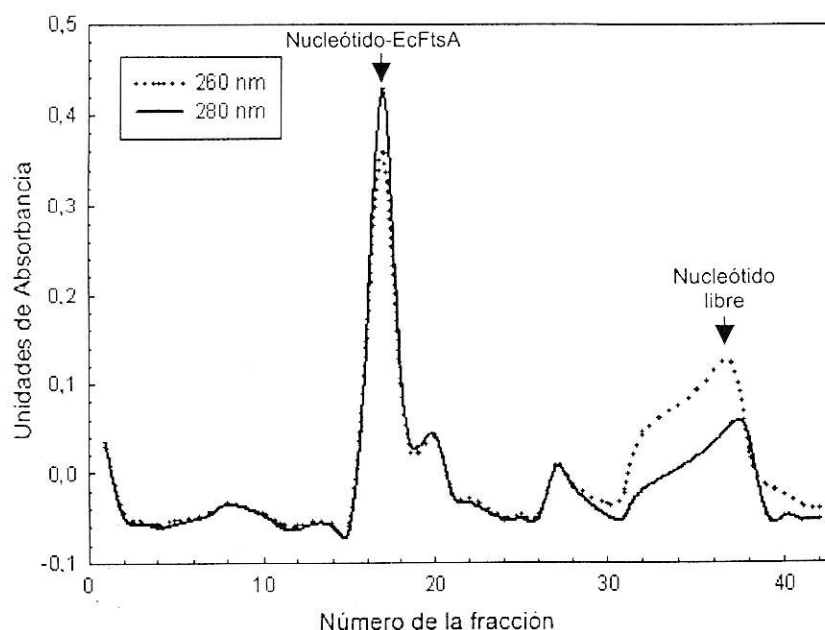


Figura 19: Cromatograma de filtración molecular de EcFtsA en una columna de Sephadex G-25. La solución de equilibrio de la columna contenía: amortiguador fosfato de sodio 50 mM; pH 8,0; $MgCl_2$ 2,0 mM; NaCl 500 mM, DTT 1,0 mM y disulfito de sodio 10,0 mM. El volumen de las fracciones fue 0,5 ml. Se sembraron 500 μ l de una solución de EcFtsA 1,8 mg/ml en amortiguador de almacenamiento. A cada fracción se le determinó la absorbancia a 260 y 280 nm.

Desnaturación y renaturación de EcFtsA. Para caracterizar el contenido de estructura secundaria de las mutantes se determinó el comportamiento de la proteína renaturada a partir de su estado desnaturalado en cloruro de guanidinio GdmCl. Esta caracterización se hizo porque una de las mutantes se expresa como cuerpos de inclusión insolubles y para caracterizar sus propiedades se renaturó a partir de la disolución de estos cuerpos de inclusión en urea.

La EcFtsA en amortiguador de almacenamiento se desnaturaló con (GdmCl) a una concentración final de 5,25 M y se renaturó por diálisis en presencia o ausencia de ATP contra el amortiguador que se indica en la figura 21. La figura 21B muestra el

contenido de estructura secundaria en ausencia de sacarosa. Al comparar estos resultados con los de la figura 20B, en presencia de sacarosa, se observa una disminución del contenido de hélice α y un aumento de hebra β . Sin embargo, el contenido de hélice α de la proteína renaturada en ausencia de ATP es menor y se recupera en presencia del nucleótido. El contenido de estructura β de la proteína renaturada en ausencia del nucleótido aumentó respecto a la nativa y la presencia del nucleótido no tuvo efecto. La variación del contenido de vuelta β y de la estructura remanente es menor en presencia y ausencia de ATP.

La figura 22 muestra un espectro DC para la mutante $\Delta 27$ renaturada que es similar al de la proteína silvestre en presencia de ATP 0,1 mM, mientras que la mutante D210A renaturada en presencia de ATP 0,1 mM mostró un incremento de la diferencia negativa a 205 nm. La figura 21A muestra un comportamiento similar para la proteína nativa cuando se renatura en ausencia de ATP, que presenta un patrón similar al de la proteína nativa cuando se agrega ATP 0,1 mM. En esta misma figura se muestra el espectro de la proteína desnaturada en GdmCl 5,25 M, la cual presenta una disminución de los valores negativos de absorbancia registrada hasta 215 nm y ausencia del máximo a 220 nm.

El aumento de los valores negativos de elipticidad a 205 nm que mostró el espectro de la mutante D210A (figura 22), característico de proteínas más ricas en estructura al azar, no se revirtió con la adición de ATP (figura 21A), resultado consistente con las mutaciones de los residuos del sitio activo que anulan la unión del nucleótido (Schuler, 2001). Esta mutante se purificó para usarla como control de la purificación al determinar actividad ATPásica. Los resultados en su conjunto indican que esta mutación induce un cambio global de la estructura secundaria que puede

afectar el sitio activo. Por esta razón se descartó el uso de la mutante D210A como control de la actividad ATPásica de EcFtsA.

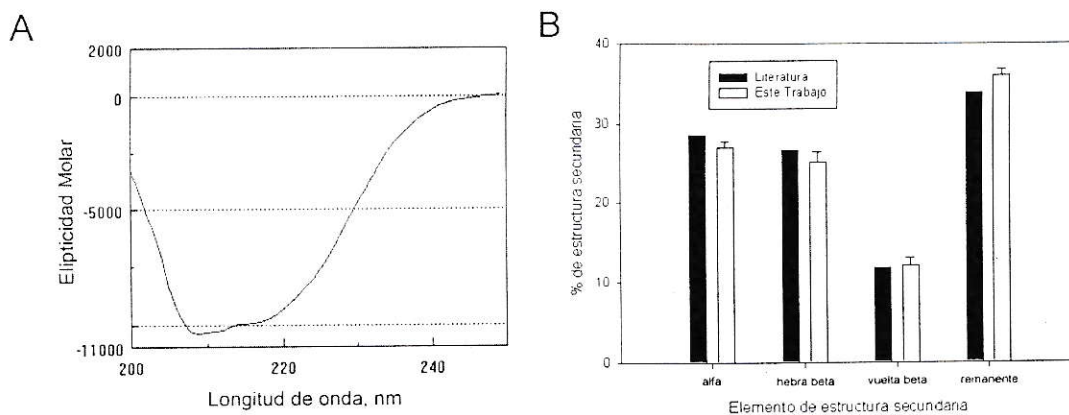


Figura 20: Espectro de dicroísmo circular (A) y contenido de estructura secundaria (B) de EcFtsA en estado nativo. En A se muestra el espectro de DC de EcFtsA medido en amortiguador B. La cubeta, de 0,1 mm de paso de luz, contenía 36,2 μ M de EcFtsA en amortiguador fosfato de sodio 50 mM; pH 8,0; NaCl 500 mM; disulfito de sodio 10,0 mM; DTT 1,0 mM; $MgCl_2$ 2,0 mM; ATP 0,1 mM y sacarosa 1,0 M. En B se muestra el porcentaje de estructura secundaria calculado a partir de la deconvolución de los puntos experimentales con el programa Contin (barras grises) y el contenido de estructura secundaria de EcFtsA reportado en la literatura (barras negras).

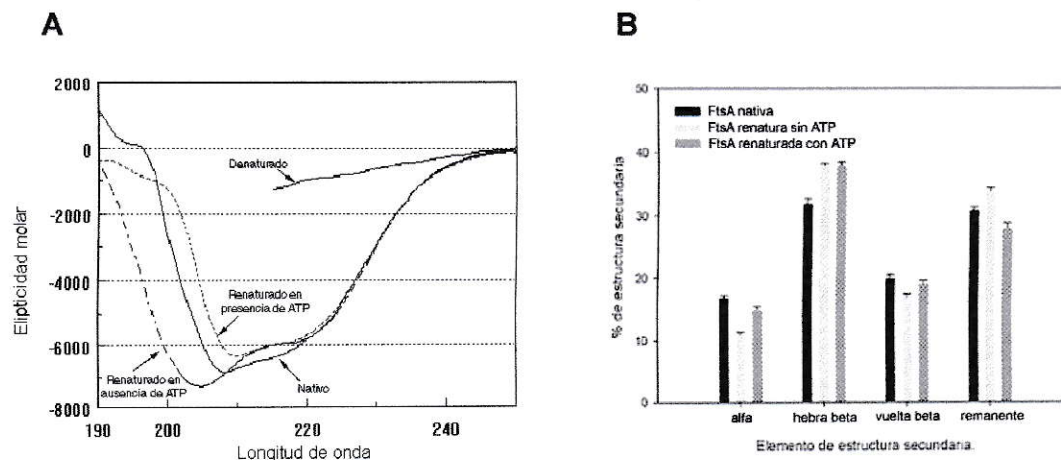


Figura 21: Espectro de dicroísmo circular (A) y contenido de estructura secundaria (B) de EcFtsA después de la renaturación. En A se muestran los espectros de DC de EcFtsA en una solución que contiene 6,3 μ M de EcFtsA en amortiguador C (Tris 20 mM; pH 8,0; NaCl 50 mM). Nativo: EcFtsA diluida en este amortiguador C antes de desnaturar. Desnaturado: EcFtsA desnaturada en amortiguador C más GdmCl 5,25 M. FtsA renaturada sin ATP: EcFtsA renaturada por diálisis en el amortiguador C (sin ATP). FtsA renaturada con ATP: EcFtsA renaturada por diálisis en el amortiguador C más ATP 0,1 mM. Cubeta de medida: 0,2 mm de paso de luz. En B se muestra el contenido de estructura secundaria calculado con Contin.

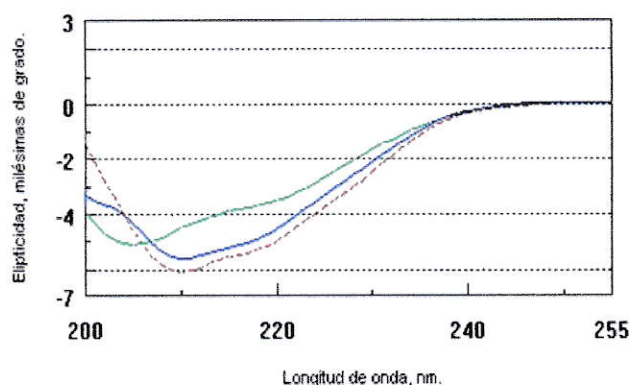


Figura 22: Espectros de dicroísmo circular de EcFtsA (—) y de las mutantes D210A (---) y Δ 27 (---) después de la renaturación en presencia de ATP. Se muestran los espectros de DC después de renaturar las proteínas en presencia de ATP 0,1 mM. La cubeta de 0,2 mm de paso de luz contenía aproximadamente 6,3 μ M de cada proteína en amortiguador Tris 20 mM; pH 8,0; NaCl 50 mM.

ACTIVIDAD ATPásica DE EcFtsA

Actividad ATPásica de EcFtsA y de la mutante $\Delta 27$ determinada por el método PQ/LDH. Para determinar la actividad ATPásica de la proteína purificada y estabilizada con sacarosa y agentes reductores, se utilizó un método acoplado en presencia de las enzimas piruvato quinasa (PQ) y láctico deshidrogenasa (LDH), y los cofactores NADH y PEP. La velocidad de hidrólisis de ATP se determinó espectrofotométricamente siguiendo la disminución de la absorbancia a 340 nm, propia del NADH. En este método se mantiene constante la concentración de ATP, pues al producirse ADP en la reacción catalizada por EcFtsA, el sistema acoplado lo vuelve a fosforilar oxidando de forma equimolar el NADH.

En la figura 23 se muestra que hay una relación lineal entre la concentración de proteína y la velocidad inicial de hidrólisis de ATP (83% de la velocidad máxima). Se observa una disminución de la pendiente de la mutante, que corresponde a k_{cat} aparente, de alrededor de un orden de magnitud respecto de la proteína silvestre (tabla 6).

Esta es la primera observación de actividad ATPásica para FtsA proveniente de *E. coli*. Se observa que ambas rectas pasan por el origen y por lo tanto no existe una concentración crítica.

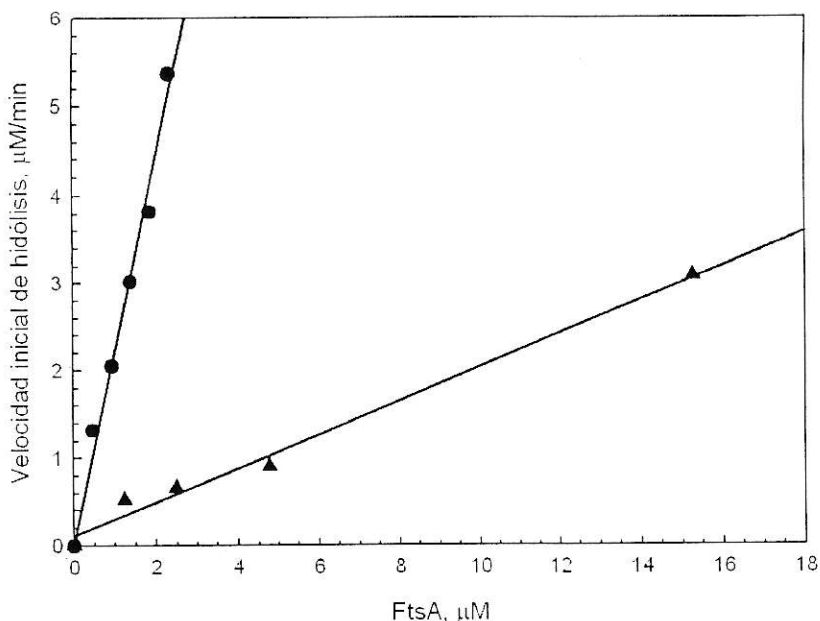


Figura 23: Dependencia de la actividad ATPásica de la concentración de EcFtsA silvestre (●) y de la mutante $\Delta 27$ (▲). La velocidad de hidrólisis de ATP se determinó con el sistema PQ/LDH. Cada cubeta de reacción contenía: Tris-HCl 100 mM; pH 8,0; KCl 100 mM; EDTA 1,0 mM; DTT 2,5 mM; $MgCl_2$ 15,0 mM; ATP 10,0 mM, NADH 0,4 mM; PEP 2,5 mM; LDH 0,8 U/ml; PQ 2,0 U/ml y EcFtsA silvestre entre 0,0 y 2,25 μM o EcFtsA mutante $\Delta 27$ entre 0,0 y 15,2 μM . Los puntos experimentales se ajustaron por regresión lineal (Materiales y Métodos).

Tabla 6: Constantes catalíticas aparentes de hidrólisis de ATP de EcFtsA silvestre y de la mutante $\Delta 27^a$.

Proteína	k_{cat} aparente ^a (μM ADP / min / μM proteína)
EcFtsA	$2,177 \pm 0,118$
Mutante $\Delta 27$	$0,193 \pm 0,013$

a, La constante catalítica k_{cat} aparente corresponde a la pendiente calculada a partir de la regresión lineal de los puntos experimentales de la figura 23, que corresponden a una concentración de ATP de 10 mM, equivalente al 83% de la velocidad máxima.

Efecto de la concentración de ATP. En las mismas condiciones anteriores se determinó la relación entre la concentración de ATP y la velocidad inicial de hidrólisis

de ATP a una concentración de 2,25 μ M de EcFtsA. La figura 24 muestra una típica conducta hiperbólica hasta una concentración de ATP 10,0 mM. El valor de la K_m fue de $2,06 \pm 0,06$ mM y la velocidad máxima de $2,17 \pm 0,12$ nmoles de ATP hidrolizados/ml/min. Este valor de velocidad máxima es menor que el obtenido a partir de la figura 23 a la misma concentración de proteína. Este resultado se explica por la pérdida de actividad cuando la proteína se agrega. Por esta razón, dependiendo de la cantidad de agregados, la velocidad máxima puede disminuir para una misma concentración de proteína total.

Actividad ATPásica de EcFtsA determinada por la radiactividad del fosfato gamma de ATP hidrolizado. Se utilizó (γ ³²P)ATP para determinar la actividad ATPásica de EcFtsA en el mismo medio de reacción utilizado en el sistema acoplado PQ/LDH. Cada tubo fue preincubado a 30 °C y se inició la reacción agregando FtsA a una concentración final de 2,25 μ M. Los resultados mostrados en la figura 25 confirman un comportamiento hiperbólico para EcFtsA silvestre con el sustrato ATP, hasta una concentración de 10,0 mM. El valor de la K_m fue $2,47 \pm 0,47$ mM y la velocidad máxima de $4,93 \pm 0,37$ nmoles de ATP hidrolizado/ml/min.

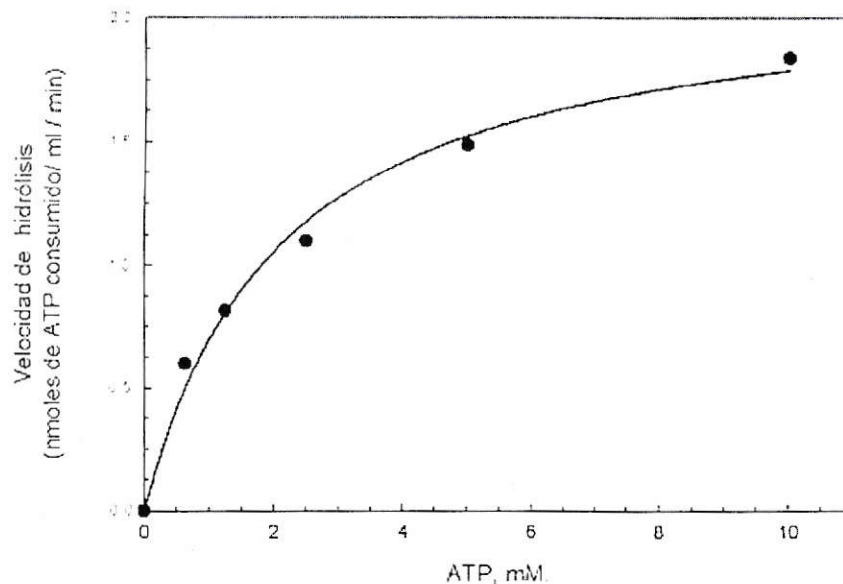


Figura 24: Curva de saturación de sustrato para la hidrólisis de ATP catalizada por EcFtsA. La velocidad inicial se determinó con el sistema PQ/LDH en un medio que contenía: Tris-HCl 100 mM; pH 8,0; KCl 100 mM; EDTA 1,0 mM; DTT 2,5 mM; NADH 0,4 mM; PEP 2,5 mM; LDH 0,8 U/ml; PQ 2,0 U/ml y EcFtsA 2,25 μ M. La concentración de $MgCl_2$ se mantuvo 5,0 mM por sobre la concentración de ATP. La curva corresponde al ajuste de los valores experimentales a la ecuación de Michaelis-Menten por regresión no lineal.

Los dos sistemas de detección de actividad ATPásica que se utilizaron en esta tesis son habitualmente usados para medir la actividad de hidrólisis de ATP de distintas proteínas. No obstante para determinar algún posible efecto de las enzimas del sistema acoplado sobre la actividad ATPásica de EcFtsA se probó el efecto de la piruvato quinasa y PEP y de la láctico deshidrogenasa y NADH sobre la velocidad de hidrólisis de ATP de EcFtsA. Con este propósito se midió la producción de $^{32}P_i$ desde $[\gamma^{32}P]ATP$ para determinar el progreso de la reacción en presencia de los distintos componentes antes mencionados. Los resultados mostraron un efecto poco significativo de los componentes del sistema acoplado sobre la velocidad de hidrólisis

de nucleótido trifosfato. De allí que la variación de la velocidad máxima medida por ambos sistemas más bien podría ser explicada por distintos niveles de agregación inicial de EcFtsA.

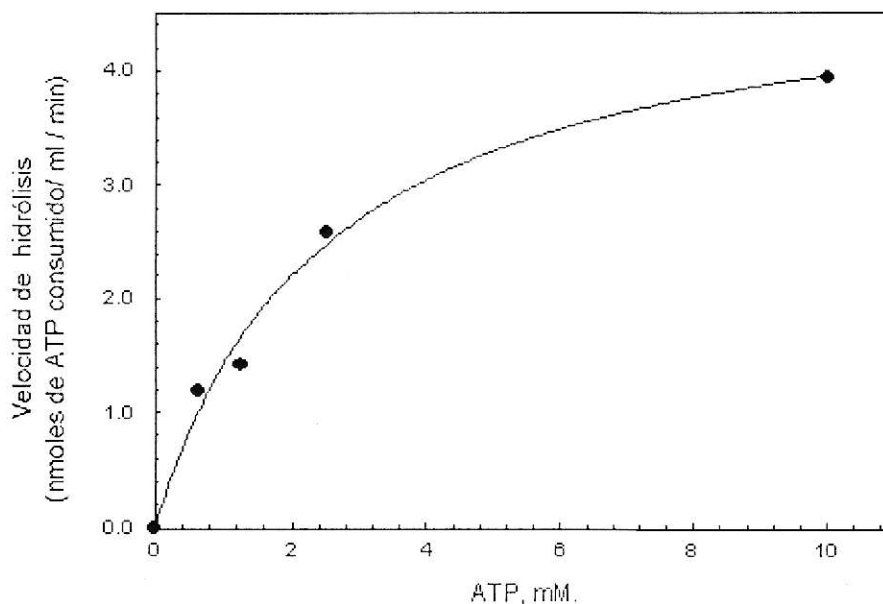


Figura 25: Curva de saturación de sustrato para la velocidad inicial de hidrólisis de ATP catalizada por EcFtsA. La velocidad inicial se determinó por el método radiactivo de medición de la producción de $^{32}\text{P}_i$ a partir de $(\gamma^{32}\text{P})\text{ATP}$. Cada tubo de reacción contenía, en un volumen final de 1 ml: amortiguador Tris-HCl 100 mM; pH 8,0; EDTA 1,0 mM; KCl 100 mM; DTT 2,5 mM; EcFtsA 2,25 μM ; MgCl_2 5,0 mM por sobre la concentración de ATP y aproximadamente 1,0 μCi de $(\gamma^{32}\text{P})\text{ATP}$. Los valores experimentales se ajustaron a una hipérbola por regresión no lineal (línea continua).

Tabla 7: Valores de K_m y V_{\max} para la hidrólisis de ATP catalizada por EcFtsA.

Método	K_m (mM ATP)	V_{\max} (nmoles de ATP hidrolizado/ml/min)
Acoplado	$2,06 \pm 0,06$	$2,17 \pm 0,12 - 5,35 \pm 0,02^a$
Radiactivo	$2,47 \pm 0,47$	$4,93 \pm 0,37$

^a: Estos valores se obtuvieron con distintas preparaciones de proteína que contenían diferentes niveles de agregados iniciales.

POLIMEROS DE EcFtsA.

Polimerización. La polimerización de EcFtsA fue seguida por dispersión de luz en 90° en un espectrofluorímetro como se indica en Materiales y Métodos. La figura 26 muestra que al agregar ATP, en presencia de sodio, se produce un aumento brusco en la dispersión de luz, similar a la polimerización de FtsZ inducida por GTP. Se alcanza un estado de cuasiequilibrio donde se produce un pequeño aumento de la turbidez en el tiempo. La magnitud de la dispersión de luz en el estado de cuasiequilibrio depende de la concentración de ATP y se alcanza la saturación (resultado no mostrado). ADP no induce la polimerización a diferencia de lo que ocurre en *S. pneumoniae* (Lara y col, 2005).

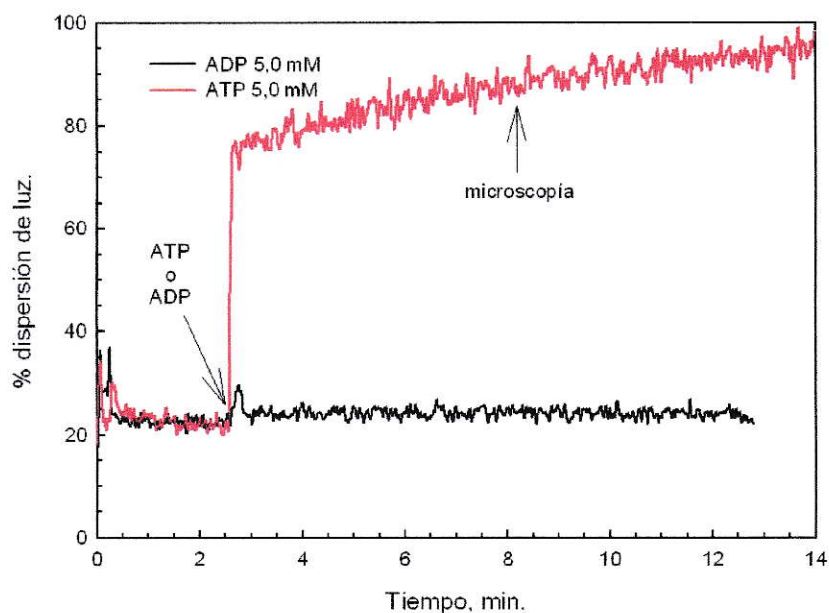


Figura 26: Polimerización de EcFtsA silvestre inducida por ATP. Se siguió la dispersión de luz en 90° en el tiempo en un espectrofluorímetro como se indica en Materiales y Métodos. La longitud de onda de excitación y emisión fue 350 nm y el ancho de banda 5 nm. El amortiguador de polimerización contenía: Tris-HCl 20 mM pH 8,0 y NaCl 50 mM, EcFtsA 0,8 μ M y ATP o ADP 5,0 mM. El momento en que se agregó nucleótido y se tomaron las muestras para microscopía se indican en la figura por flechas.

Microscopía electrónica. Las muestras para microscopía electrónica se tomaron al tiempo indicado en la figura 26. Las fotografías de microscopía electrónica (figura 27) muestran que el largo de los polímeros es variable, pues se observan polímeros desde 500 nm hasta casi 3500 nm, donde una población mayoritaria se distribuyó entre 500 nm y 1500 nm. El ancho de estos polímeros es propio de la formación de manojos de polímeros. Estos manojos parecen estar constituidos por unidades de 20 nm de ancho que se asocian entre si. El ancho de los manojos es variable alcanzando valores de 60 nm y más. La distribución de los polímeros indica que hay una población mayoritaria con un ancho de 40 nm (figura 28).

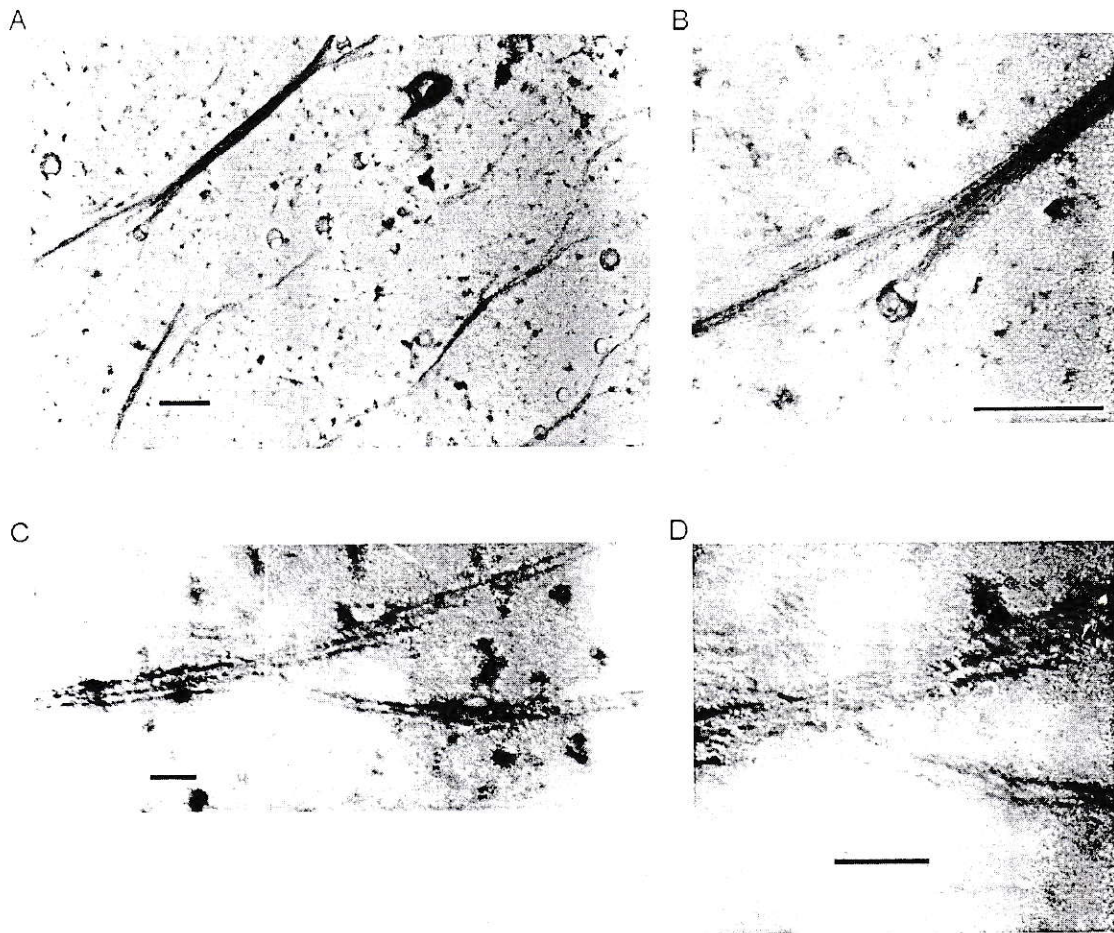
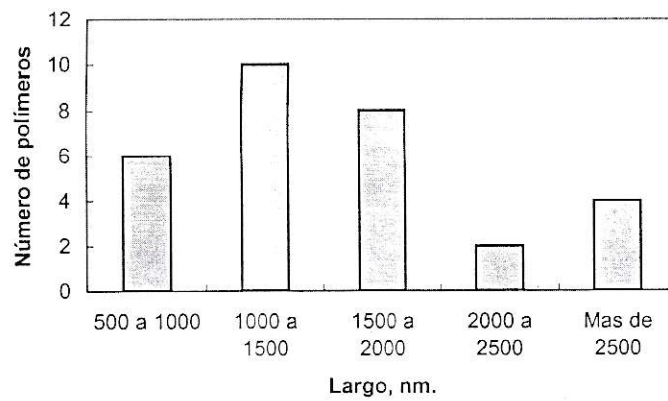


Figura 27: Microscopía electrónica de polímeros de FtsA inducidos por ATP. La solución de polimerización contenía: amortiguador Tris-HCl 20 mM; pH 8,0; NaCl 50 mM; 5 mM ATP y EcFtsA 2,25 μ M. La tinción y las condiciones de la microscopía electrónica se hicieron como se describe en Materiales y Métodos. El aumento en A es de 10.000 X y en C de 50.000 X. B y D corresponden a magnificaciones digitales de A y B, respectivamente. El largo de la barras en A y B corresponde a 500 nm y en C y D a 100 nm.

A



B

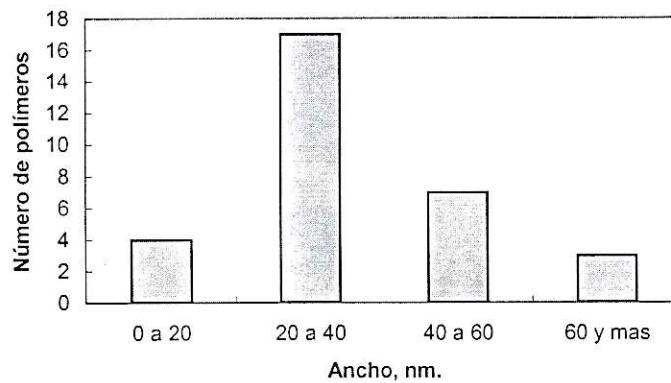


Figura 28: Distribución del largo (A) y ancho (B) de los polímeros observados por microscopía electrónica. El largo y el ancho de los polímeros se determinaron a partir de los datos de las fotografías digitalizadas que se muestran en la figura 27 con el procedimiento descrito en Materiales y Métodos.

DISCUSIÓN

Sobre-expresión y purificación de EcFtsA. En este trabajo de tesis se logró sobreexpresar la proteína EcFtsA silvestre y las mutantes EcFtsA $\Delta 27$ y EcFtsA D210A. El nivel de sobre-expresión alcanzado para la mutante $\Delta 27$ es mayor que para la mutante D210A y este, a su vez, es mayor que el de la proteína tipo silvestre. De allí que la toxicidad celular ejercida por la sobreexpresión de las mutantes es menor que la de la EcFtsA tipo silvestre. La menor toxicidad de la sobreexpresión de la mutante D210A se justifica por la formación de cuerpos de inclusión. Esto no es raro para mutantes de proteínas con plegamiento tipo actina, pues se sabe que mutaciones en el sitio activo distorsionan el plegamiento general (Schuler, 2001). Se demostró que EcFtsA $\Delta 27$ produce filamentación celular cuando es sobreexpresada a temperatura restrictiva en una cepa hospedera que porta una mutación termosensible para FtsA (Yim y col., 2000). En estas mismas células se observó que esta mutante no se localiza en el sitio de división y se atribuyó a este fenómeno la falta de división. La cantidad de FtsA que participa en la división celular es limitada, por esta razón la sobreexpresión de esta proteína es tóxica para la célula y de allí que la mutante que prácticamente no se localiza en el sitio de división puede aumentar en mayores cantidades para llegar a ser tóxica.

La purificación de la proteína tipo silvestre y de las mutantes EcFtsA $\Delta 27$ y EcFtsA D210A, por cromatografía de afinidad por níquel, mostró una diferencia en la pureza de las proteínas mutantes respecto a la proteína tipo silvestre, pues en esta última se observó la presencia de dos bandas contaminantes de alrededor de 66 kDa detectables con azul de Coomassie en geles de poliacrilamida SDS-PAGE. La ausencia de estas contaminantes en las mutantes purificadas indica que su

copurificación dependería del estado nativo de EcFtsA, pues la mutante D210A, purificada a partir de los cuerpos de inclusión disueltos en urea 8,0 M, no presenta contaminantes al igual que la mutante $\Delta 27$, donde los últimos 27 residuos C-terminales serían responsables del arrastre de estas proteínas. Se reportó que EcFtsA puede interactuar con otras proteínas del divisoma independiente de la formación del anillo Z, pues FtsA y FtsZ se asocian previo a la formación del anillo Z tanto en *E. coli* como en *B. subtilis* (Jensen y col, 2005; Goehring y col, 2005). También las proteínas FtsN y FtsI pueden interactuar con FtsA independiente de la presencia del anillo Z (Corbin y col, 2004). De esta manera existen tres proteínas del divisoma candidatas a ser las proteínas copurificadas con EcFtsA. Dado que la copurificación es dependiente de la presencia del extremo C-terminal de EcFtsA, que permite la localización en la membrana de EcFtsA, las candidatas más probables son FtsN y FtsI, pues son proteínas de membrana. Coincidentemente FtsI es una proteína de similar masa molecular que las proteínas contaminantes (alrededor de 66 kDa).

Se ha especulado que la actividad ATPásica encontrada para FtsA de *B. subtilis* (Feucht y col, 2001) y de *P. aureginosa* (Paradis-Bleau y col, 2005), expresadas en *E. coli*, sería producto de proteínas contaminantes que copurifican con FtsA (Vicente y col, 2006). Sin embargo la conclusión más importante es que entre las tres posibles proteínas que podrían copurificar con EcFtsA ninguna tiene actividad ATPásica. De esta manera, la pequeña fracción de contaminantes copurificadas de EcFtsA no serían responsables de la actividad ATPásica observada. Esto es apoyado por el hecho de que la mutante $\Delta 27$, que es purificada a homogeneidad, tiene actividad ATPásica.

Agregación de EcFtsA. Uno de los principales problemas que ha retrasado la caracterización bioquímica de FtsA de *E. coli* es su tendencia a la agregación *in vitro*. La agregación de proteínas es una interacción inespecífica entre proteínas debida a una pérdida de solubilidad. La formación de agregados generalmente está asociada a la pérdida de función, pues los grandes multímeros amorfos limitan el intercambio de sustratos o impiden la dinámica necesaria para la catálisis. En el caso de EcFtsA se observó la aparición de agregados visibles a simple vista cuando la concentración de proteína fue llevada a cerca de 6,0 mg/ml. Los agregados formados fueron inactivos cuando se determinó su actividad ATPásica por el método enzimático acoplado. Para aumentar la solubilidad se han usado cosolventes, siendo los polialcoholes y azúcares los más efectivos, pues favorecen el estado nativo de las proteínas al excluirse de la superficie de ellas y mantener estable la primera capa de solvatación de la proteína (Timasheff, 1993). Demostramos que sacarosa 1,0 M mantiene soluble a EcFtsA a 4 °C de manera similar a lo observado para tubulina y para actina, donde la estructura de la apo-actina se mantiene estable y soluble (De La Cruz y Pollard, 1995). Otras interacciones que median la agregación irreversible de proteínas son las interacciones de tipo covalente que se establecen entre los residuos de distintas cadenas polipeptídicas. Entre estas interacciones la formación de puentes disulfuro es importante. El análisis del modelo construido para EcFtsA reveló que de los 9 residuos de cisteína de esta proteína, 6 se encuentran en la superficie y 4 podrían establecer puentes disulfuros intermoleculares dado su exposición. Para evitar su formación se utilizaron agentes protectores de grupos tioles, DTT y disulfito de sodio, que en conjunto con sacarosa 1,0 M, disminuyeron la agregación a 4 °C y durante el almacenamiento a -80 °C. EcFtsA almacenada en estas condiciones durante 6 a 8 meses mantuvo su actividad ATPásica.

Otras interacciones que median la relación proteína-solvente son las interacciones que se establecen entre los residuos cargados y polares en la superficie de las proteínas con las moléculas de agua de la primera capa de solvatación. Los resultados muestran que en presencia de KCl se favorece la agregación, mientras que NaCl parece ser neutra en cuanto a la solubilidad de la proteína. KCl produce un incremento constante en la dispersión de luz indicativo de agregación y al parecer ATP no tiene efecto. NaCl no induce agregación, pues no se observa aumento de la dispersión de luz en el tiempo. Sin embargo, ATP en estas condiciones induce una rápida polimerización.

Una explicación para este comportamiento de EcFtsA, en presencia de estas dos sales, se puede encontrar en la interacción de K^+ con la proteína. Al modelar EcFtsA en base a la estructura 3D de TmFtsA se encontró que la estructura del modelo presenta residuos en el sitio del nucleótido equivalentes a los del sitio del nucleótido de Hsc70. Para la correcta formación del sitio activo de esta proteína es necesaria la presencia de dos átomos de potasio, y no de sodio.

Como se dijo, la estructura del sitio activo de EcFtsA y Hsc70 son muy parecidos y llama la atención la presencia de los mismos residuos que unen potasio. Se podría especular entonces que potasio es requerido para la actividad ATPásica de EcFtsA. El requerimiento de K^+ es habitual en chaperonas moleculares y en estas, los cationes más grandes como Cs^+ , o más pequeños, como Na^+ , no ejercen activación (Flaherty y col, 1990; Wilbanks y McKay, 1995). Un análisis del sitio activo de Hsc70 muestra la ausencia de un residuo básico análogo a la arginina 17 de la glicerolquinasa, o la lisina 18 de actina, que son necesarios para la actividad de estas proteínas y de otras pertenecientes a la superfamilia actina/Hsc70/hexoquinasa. En Hsc70 un catión K^+ , estabilizado por el residuo aspártico 210, forma una interacción

electroestática equivalente a la de la Arg17. Además, un segundo catión K^+ enlaza los residuos aspártico 199, aspártico 206 y treonina 204, posicionándolos adecuadamente para estabilizar tanto la unión del complejo ATP- Mg^{2+} , como también, el estado de transición durante la hidrólisis del nucleótido (figura 29). Así, el K^+ y estos residuos son esenciales para la actividad de Hsc70. EcFtsA posee un residuo lisina 19 idéntico a la lisina 18 de actina, y a la vez posee los tres residuos estructuralmente equivalentes a los antes mencionados (aspártico 210, aspártico 217 y treonina 215), además de un cuarto (glutámico 14) también importante. De esta manera EcFtsA tiene el mismo sitio de unión para K^+ .

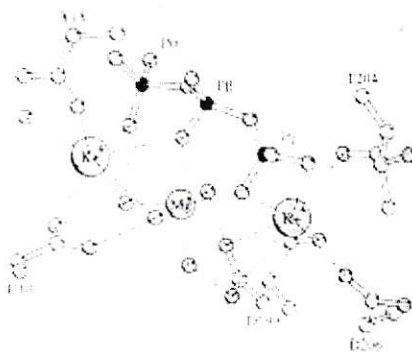


Figura 29: Modelo del sitio de unión de los iones K^+ con el complejo ATP- Mg^{2+} en Hsc70. Se muestran como los iones K^+ median la interacción de la proteína con los grupos fosfatos del nucleótido. Se destacan los residuos D10, D199, D206 y T204, todos los cuales son equivalentes estructuralmente y conservados en EcFtsA. Tomado de Wilbanks y McKay (1995).

Se sabe que en Hsc70 el catión Na^+ es incapaz de suplir la función del K^+ dado que su menor radio atómico y menor número de coordinación generan una distinta ubicación de los fosfatos del nucleótido, permitiendo la unión de ATP pero haciendo menos favorable la hidrólisis de nucleótido (Wilbanks y McKay, 1995). Esto ayuda a entender porqué en EcFtsA el Na^+ es neutro y no lo es el K^+ y también explicaría

porque los polímeros formados en amortiguador con NaCl se mantienen estables en el tiempo.

Actividad ATPásica y polimerización de EcFtsA. Con el modelo de la estructura tridimensional de EcFtsA y a través de alineamientos estructurales se determinó que FtsA es una ATPasa y no una quinasa en la superfamilia actina/Hsc70/hexoquinasas. Otras características que apoyan esta conclusión es el tamaño del surco interdominio, que en hexoquinasas albergan al nucleótido y la azúcar, y que en Hsc70 y EcFtsA solo permite ATP. Otras características estructurales comunes son que en la superfamilia actina/Hsc70/hexoquinasas, la Hsc70 sería la única que posee un residuo treonina en la posición 204, que es importante dado que establece un puente de hidrógeno con el O₃ del γ P del ATP, y también se encuentra en la EcFtsA un residuo treonina 215 en la misma posición. Por otra parte la EcFtsA posee un residuo lisina en la posición 48 equivalente a la lisina 71 de Hsc70, que para algunos autores sería el residuo encargado de coordinar un ion hidroxilo en el ataque nucleofílico al nucleótido (Schuler, 2001).

La actividad ATPásica de EcFtsA se determinó por dos métodos distintos, uno en el que se mide directamente la liberación de P_i a partir de ATP y otro en el que se mide la generación de ADP a partir de ATP. Por ambos métodos los valores de la K_m fueron similares, lo que permite utilizar ambos métodos de manera indistinta para posteriores estudios. Los valores de la K_m obtenidos son cerca de 3 veces más altos que los determinados para FtsA de *B. subtilis* (Feucht y col, 2001) y es más alta que para la mayoría de las ATPasas. FtsA es parte de una compleja maquinaria multiproteica donde interactúa directamente con las otras proteínas del divisoma. Así, es posible que las interacciones con las otras proteínas del sistema controlen o modifiquen la actividad ATPásica de EcFtsA, al igual que lo observado para actina y

Hsc70, donde la interacción con proteínas accesorias regula la hidrólisis de nucleótido. En *B. subtilis* no existe ZipA y el número de moléculas de FtsA es alrededor de 8 veces mayor que en *E. coli* (Feucht y col, 2001; Vicente y col, 2006), donde FtsA y ZipA comparten su rol en la división celular. Es posible que la variación en la k_m sea parte de la adaptación de FtsA para cumplir el papel de ZipA en *B. subtilis*.

Las principales variaciones de la actividad ATPásica determinada se observaron sobre la V_{max} , pues estas determinaciones se hicieron con distintas preparaciones de proteína que podrían contener distintos niveles de agregados inactivos.

Por otra parte, se observó que tanto para la proteína tipo silvestre como para la mutante $\Delta 27$ la relación entre velocidad inicial de hidrólisis de nucleótido y la concentración de proteína es lineal. Para la mutante $\Delta 27$ se observó una constante catalítica aparente que es un orden de magnitud menor que la constante catalítica aparente de la proteína tipo silvestre (Tabla 7). Esto sugiere que esta región es importante para controlar la actividad ATPásica de EcFtsA, pues la región C-terminal contiene la señal de localización a membrana de EcFtsA y podría existir una correlación entre la localización en la membrana y la actividad ATPásica de EcFtsA. Esta posibilidad se apoya en los resultados de la mutante que carece de los 27 residuos C-terminales que establecen que ésta no se localiza en la membrana (Yim y col, 2000), y los resultados que demuestran que la unión del nucleótido tiene relación con la asociación a la membrana celular (Sanchez M. y col, 1994). Estos resultados en su conjunto son confirmados al analizar la estructura tridimensional del modelo de EcFtsA donde la hélice H11 conecta al extremo C-terminal con el resto de la proteína. Esta hélice es parte del subdominio IA y también del bolsillo de unión a nucleótido. Además, esta hélice contiene el residuo serina 380 en TmFtsA (tirosina 369 en EcFtsA)

que establece un puente de hidrógeno con la base nitrogenada del nucleótido a través de una molécula de agua coordinada en conjunto con la lisina 340 en TmFtsA (arginina 334 en EcFtsA). Así, alteraciones en la región C-terminal pueden alterar la correcta localización de estos residuos y así influir en la posición del ATP en el sitio de unión del nucleótido de FtsA. Entonces, es posible que la tirosina 369 en EcFtsA actúe como un nexo entre el estado de asociación a membrana y ATP en su sitio de unión, ejerciendo algún efecto sobre su hidrólisis. Esta situación podría estar afectada en la mutante EcFtsA $\Delta 27$.

Los recientes experimentos de caracterización de FtsA de *S. pneumoniae* (Lara y col, 2005) muestran que esta proteína es capaz de formar filamentos espirales inducidos por nucleótido. La formación de filamentos y manojos de filamentos de EcFtsA inducida por ATP apoya la idea de que FtsA y actina son homólogos que habrían evolucionado desde un ancestro común, compartiendo algunas de sus características funcionales, como la actividad ATPásica y la polimerización, y divergiendo en aspectos específicos de cada sistema, como por ejemplo el dominio 1C de FtsA que le permite a esta proteína la interacción con otros componentes del divisoma.

EcFtsA también polimeriza con ATP en las mismas condiciones experimentales que FtsA de *S. pneumoniae*. En estas condiciones (Tris 20 mM pH 8,0 y NaCl 50 mM) los polímeros formados en presencia de ATP se mantienen estables en el tiempo. ADP a las mismas concentraciones que ATP no induce la formación de polímeros de EcFtsA. Sin embargo la FtsA de *S. pneumoniae* es capaz de polimerizar en presencia de ADP, aun cuando los polímeros formados son menos estables (Lara y col, 2005). Debido a que la formación de polímeros y su estabilidad depende del estado de fosforilación del nucleótido, se abre la posibilidad de que la hidrólisis de ATP, en

presencia de potasio, controle la dinámica de polimerización. Por otra parte, la mutante EcFtsA $\Delta 27$ se comportó de la misma manera que la proteína tipo silvestre cuando se indujo la polimerización con ATP. Esto indica que la formación de los polímeros no depende de la presencia de la región C-terminal de EcFtsA, lo que está en acuerdo con lo reportado en la literatura, pues la figura 30 muestra que esta mutante es capaz de generar estructuras tipo “bastón” o grandes filamentos lineales cuando es sobreexpresada *in vivo* en *E. coli* (Pichoff y Lutkenhaus, 2005), polímeros que son visibles no asociados a la membrana celular.

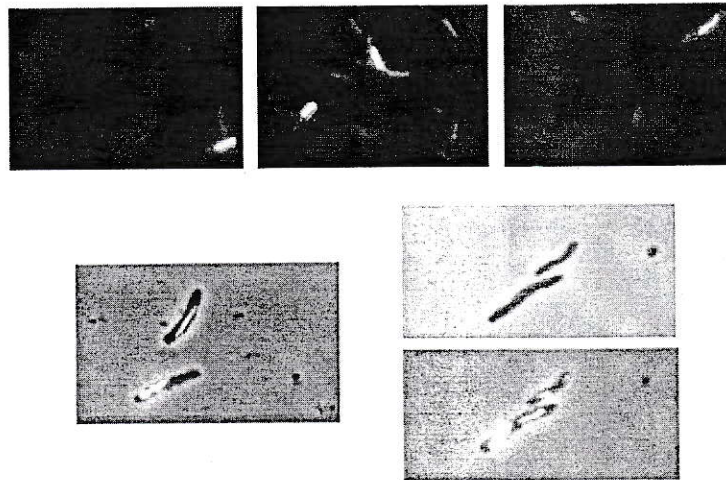


Figura 30: Formación de estructuras filamentosas de GFP-EcFtsA $\Delta 15$. Se muestran las estructuras tipo bastón formadas por GFP-EcFtsA que carece de los últimos 15 residuos C-terminales. Adaptado de Pichoff y Lutkenhaus (2005).

CONCLUSIONES

El modelo de la estructura 3D de EcFtsA y la comparación estructural con Hsc70, y de los sitios activos de estas proteínas, indican que EcFtsA es una ATPasa que posee dos sitios de unión para el ion potasio.

La presencia de sacarosa 1,0 M y los agentes reductores disulfito de sodio y DTT en el amortiguador de almacenamiento disminuyen la agregación de EcFtsA, lo que permitió su caracterización bioquímica *in vitro*.

La EcFtsA posee actividad ATPásica determinada por dos métodos independientes, con una constante de Michaelis de $2,47 \pm 0,47$ mM por el método radiactivo y de $2,06 \pm 0,06$ mM por el método enzimático acoplado PQ/LDH. La velocidad máxima fue variable dependiendo del grado de agregación.

La mutante EcFtsA $\Delta 27$ posee actividad ATPásica con una k_{cat} aparente de $0,193 \pm 0,013$ ($\mu\text{M ADP}/\text{min}/\mu\text{M proteína}$) determinada por el método enzimático acoplado PQ/LDH. La mutante EcFtsA D210A formó cuerpos de inclusión y no recuperó su estructura secundaria.

La EcFtsA forma polímeros lineales y manojos de polímeros inducida por ATP en presencia de NaCl.

BIBLIOGRAFÍA

- Aarsman, M. E., Piette, A., Fraipont, C., Vinkenvleugel, T. M., Nguyen-Disteche, M. y den Blaauwen, T. (2005). "Maturation of the Escherichia coli divisome occurs in two steps." *Mol Microbiol* **55**(6): 1631-45.
- Anantharaman, V. y Aravind, L. (2004). "The SHS2 module is a common structural theme in functionally diverse protein groups, like Rpb7p, FtsA, Gyrl, and MTH1598/TM1083 superfamilies." *Proteins* **56**(4): 795-807.
- Bork, P., Sander, C. y Valencia, A. (1992). "An ATPase domain common to prokaryotic cell cycle proteins, sugar kinases, actin, and hsp70 heat shock proteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(16): 7290-4.
- Carettoni, D., Gomez-Puertas, P., Yim, L., Mingorance, J., Massidda, O., Vicente, M., Valencia, A., Domenici, E. y Anderluzzi, D. (2003). "Phage-display and correlated mutations identify an essential region of subdomain 1C involved in homodimerization of Escherichia coli FtsA." *Proteins* **50**(2): 192-206.
- Corbin, B. D., Geissler, B., Sadasivam, M. y Margolin, W. (2004). "Z-ring-independent interaction between a subdomain of FtsA and late septation proteins as revealed by a polar recruitment assay." *J Bacteriol* **186**(22): 7736-44.
- De La Cruz, E. M. y Pollard, T. D. (1995). "Nucleotide-free actin: stabilization by sucrose and nucleotide binding kinetics." *Biochemistry* **34**(16): 5452-61.

- Erickson, H. P. (1995). "FtsZ, a prokaryotic homolog of tubulin?" *Cell* **80**(3): 367-70.
- Errington, J., Daniel, R. A. y Scheffers, D. J. (2003). "Cytokinesis in bacteria." *Microbiol Mol Biol Rev* **67**(1): 52-65.
- Feucht, A., Lucet, I., Yudkin, M. D. y Errington, J. (2001). "Cytological and biochemical characterization of the FtsA cell division protein of *Bacillus subtilis*." *Mol Microbiol* **40**(1): 115-25.
- Flaherty, K. M., DeLuca-Flaherty, C. y McKay, D. B. (1990). "Three-dimensional structure of the ATPase fragment of a 70K heat-shock cognate protein." *Nature* **346**(6285): 623-8.
- Geissler, B., Elraheb, D. y Margolin, W. (2003). "A gain-of-function mutation in *ftsA* bypasses the requirement for the essential cell division gene *zipA* in *Escherichia coli*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(7): 4197-202.
- Goehring, N. W. y Beckwith, J. (2005). "Diverse paths to midcell: assembly of the bacterial cell division machinery." *Curr Biol* **15**(13): R514-26.
- Goehring, N. W., Gueiros-Filho, F. y Beckwith, J. (2005). "Premature targeting of a cell division protein to midcell allows dissection of divisome assembly in *Escherichia coli*." *Genes Dev* **19**(1): 127-37.

- Hurley, J. H. (1996). "The sugar kinase/heat shock protein 70/actin superfamily: implications of conserved structure for mechanism." *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **25**: 137-62.
- Jensen, S. O., Thompson, L. S. y Harry, E. J. (2005). "Cell division in *Bacillus subtilis*: FtsZ and FtsA association is Z-ring independent, and FtsA is required for efficient midcell Z-Ring assembly." *J Bacteriol* **187**(18): 6536-44.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(5259): 680-5.
- Lara, B., Rico, A. I., Petruzzelli, S., Santona, A., Dumas, J., Biton, J., Vicente, M., Mingorance, J. y Massidda, O. (2005). "Cell division in cocci: localization and properties of the *Streptococcus pneumoniae* FtsA protein." *Mol Microbiol* **55**(3): 699-711.
- Liu, Z., Mukherjee, A. y Lutkenhaus, J. (1999). "Recruitment of ZipA to the division site by interaction with FtsZ." *Mol Microbiol* **31**(6): 1853-61.
- Lowe, J. (1998). "Crystal structure determination of FtsZ from *Methanococcus jannaschii*." *J Struct Biol* **124**(2-3): 235-43.
- Lowe, J. y Amos, L. A. (1998). "Crystal structure of the bacterial cell-division protein FtsZ." *Nature* **391**(6663): 203-6.

- Lowe, J. y van den Ent, F. (2001). "Conserved sequence motif at the C-terminus of the bacterial cell-division protein FtsA." *Biochimie* **83**(1): 117-20.
- Miroux, B. y Walker, J. E. (1996). "Over-production of proteins in Escherichia coli: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels." *J Mol Biol* **260**(3): 289-98.
- Mosyak, L., Zhang, Y., Glasfeld, E., Haney, S., Stahl, M., Seehra, J. y Somers, W. S. (2000). "The bacterial cell-division protein ZipA and its interaction with an FtsZ fragment revealed by X-ray crystallography." *Embo J* **19**(13): 3179-91.
- Moy, F. J., Glasfeld, E., Mosyak, L. y Powers, R. (2000). "Solution structure of ZipA, a crucial component of Escherichia coli cell division." *Biochemistry* **39**(31): 9146-56.
- Nogales, E., Wolf, S. G. y Downing, K. H. (1998). "Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography." *Nature* **391**(6663): 199-203.
- Paradis-Bleau, C., Sanschagrín, F. y Levesque, R. C. (2005). "Peptide inhibitors of the essential cell division protein FtsA." *Protein Eng Des Sel* **18**(2): 85-91.
- Pichoff, S. y Lutkenhaus, J. (2002). "Unique and overlapping roles for ZipA and FtsA in septal ring assembly in Escherichia coli." *Embo J* **21**(4): 685-93.

- Pichoff, S. y Lutkenhaus, J. (2005). "Tethering the Z ring to the membrane through a conserved membrane targeting sequence in FtsA." *Mol Microbiol* **55**(6): 1722-34.
- RayChaudhuri, D. (1999). "ZipA is a MAP-Tau homolog and is essential for structural integrity of the cytokinetic FtsZ ring during bacterial cell division." *Embo J* **18**(9): 2372-83.
- Romberg, L. y Levin, P. A. (2003). "Assembly dynamics of the bacterial cell division protein FTSZ: poised at the edge of stability." *Annu Rev Microbiol* **57**: 125-54.
- Rothfield, L., Justice, S. y Garcia-Lara, J. (1999). "Bacterial cell division." *Annu Rev Genet* **33**: 423-48.
- Rueda, S., Vicente, M. y Mingorance, J. (2003). "Concentration and assembly of the division ring proteins FtsZ, FtsA, and ZipA during the Escherichia coli cell cycle." *J Bacteriol* **185**(11): 3344-51.
- Sali, A., Potterton, L., Yuan, F., van Vlijmen, H. y Karplus, M. (1995). "Evaluation of comparative protein modeling by MODELLER." *Proteins* **23**(3): 318-26.
- Sanchez, M., Valencia, A., Ferrandiz, M. J., Sander, C. y Vicente, M. (1994). "Correlation between the structure and biochemical activities of FtsA, an essential cell division protein of the actin family." *Embo J* **13**(20): 4919-25.

- Sanchez, R. y Sali, A. (1998). "Large-scale protein structure modeling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(23): 13597-602.
- Schuler, H. (2001). "ATPase activity and conformational changes in the regulation of actin." *Biochim Biophys Acta* **1549**(2): 137-47.
- Shindyalov, I. N. y Bourne, P. E. (1998). "Protein structure alignment by incremental combinatorial extension (CE) of the optimal path." *Protein Eng* **11**(9): 739-47.
- Sippl, M. J. (1993). "Recognition of errors in three-dimensional structures of proteins." *Proteins* **17**(4): 355-62.
- Todone, F., Brick, P., Werner, F., Weinzierl, R. O. y Onesti, S. (2001). "Structure of an archaeal homolog of the eukaryotic RNA polymerase II RPB4/RPB7 complex." *Mol Cell* **8**(5): 1137-43.
- Timasheff, S. (1993), "The control of protein stability and association by weak interactions with water: How do solvents affect these processes?". *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **22**: 67-97.
- van den Ent, F. y Lowe, J. (2000). "Crystal structure of the cell division protein FtsA from *Thermotoga maritima*." *Embo J* **19**(20): 5300-7.

- Vicente, M., Rico, A. I., Martinez-Arteaga, R. y Mingorance, J. (2006). "Septum enlightenment: assembly of bacterial division proteins." *J Bacteriol* **188**(1): 19-27.
- Wilbanks, S. M. y McKay, D. B. (1995). "How potassium affects the activity of the molecular chaperone Hsc70. II. Potassium binds specifically in the ATPase active site." *J Biol Chem* **270**(5): 2251-7.
- Yim, L., Vandenbussche, G., Mingorance, J., Rueda, S., Casanova, M., Ruyschaert, J. M. y Vicente, M. (2000). "Role of the carboxy terminus of Escherichia coli FtsA in self-interaction and cell division." *J Bacteriol* **182**(22): 6366-73.