

UCH-FC

DOC-Microb

Y451P
C.1

**Papel del glutamato 83 y la arginina 85 de
EcFtsZ en la formación y el anclaje del anillo Z en
el sitio de la división celular**

Tesis

Entregada a la

Universidad de Chile

En Cumplimiento Parcial de los Requisitos

Para Optar al grado de

Doctor en Ciencias con Mención en Microbiología

Facultad De Ciencias

Por

Jae Yen Shin

Enero, 2007

Director de Tesis Dr: Octavio Monasterio Opazo

Co-Directora de Tesis Dra: Rosalba Lagos



FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION
TESIS DE DOCTORADO

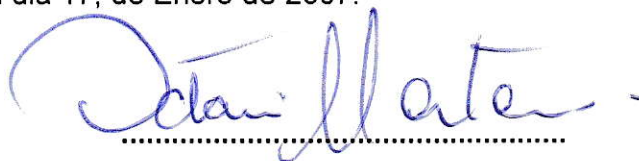
Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata.

Jae Yen Shin

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Microbiología en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 17, de Enero de 2007.

Director de Tesis:

Dr. Octavio Monasterio Opazo



.....

Co-Director de Tesis:

Dra. Rosalba Lagos

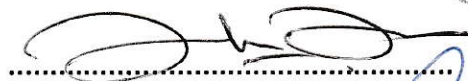


.....



Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Carlos Jerez



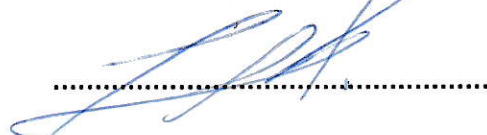
.....

Dr. Oscar León



.....

Dr. Jonas Chnaiderman



.....

나의 사랑하는 가족에게 드림.

Tesis dedicada

a mi familia.



Fuentes de Financiamiento

El trabajo de esta tesis y mi estadía en el programa de Doctorado en Ciencias fue financiado por:

- Beca DAAD
- Beca DAAD de investigación para doctorandos y jóvenes científicos.
- Financiamiento parcial de finalización de Tesis de Postgrado de la Vicerectoría de la Universidad de Chile.
- Beca de postgrado María Girardi.
- Proyecto del laboratorio BEM, FONDECYT 1050677.





Soy Jae Yen Shin y nací en Korea del Sur, luego de mi infancia en el lejano oriente (lejano según los occidentales), dí media vuelta al mundo y llegué al nuevo continente. Adopté como segundo país a Paraguay en donde pasé gran parte de mi adolescencia. En Paraguay estudié biología en la Universidad Nacional de Asunción, motivada por el sub-mundo de los microbios. Una vez concluido mis estudios de pregrado, crucé la cordillera y llegué a Chile, en persecución del "conocer". Viví varios años en este tercer país adoptado, en donde cursé los estudios de Magíster y Doctorado en Ciencias en la Universidad de Chile. Ambas tesis las hice con el profesor Monasterio en el laboratorio de Biología Estructural y Molecular (BEM) sobre la división celular de *Escherichia coli*. Y ahora emprendo un viaje hacia el Tibet, con el objetivo de comprender la razón de mi existencia.

Agradecimientos

Este espacio de la tesis me obliga a reflexionar sobre el periodo de mi estadía en el doctorado y que necesariamente lo relaciono con mi permanencia en Chile. Aunque suene paradójal, estos largos cuatro años y medio se pasaron volando y me encuentro ya en la etapa final, que más bien lo siento como un comienzo y un nuevo desafío, que espero afrontar con lo aprendido en este periodo.

Doy gracias a mis tutores Dr. Octavio Monasterio y Dra. Rosalba Lagos que contribuyeron enormemente con mi aprendizaje e inculcado sobre el hacer de la ciencia. A cada una de las personas del laboratorio y amigos (foto de la página siguiente) que contribuyeron con esta tesis y brindarme su apoyo emocional en los momentos requeridos.

Expreso mi más profundo agradecimiento al apoyo ilimitado ofrecido por Guillermo, Esteban, Juan Pablo y Tatiana.

Agradezco al Sr. Víctor Marín y Sra. Luisa Delgado por sus consejos y ayuda incondicional.

También agradezco a los miembros de la comisión, Dr. Carlos Jerez, Dr. Oscar León y Dr. Jonás Chnaiderman por las críticas constructivas a la tesis y su disposición de tiempo dentro de su agenda comprimida.

De manera especial ofrezco mi gratitud a cada miembro de mi familia que me han acompañado en todos los periodos de mi vida.



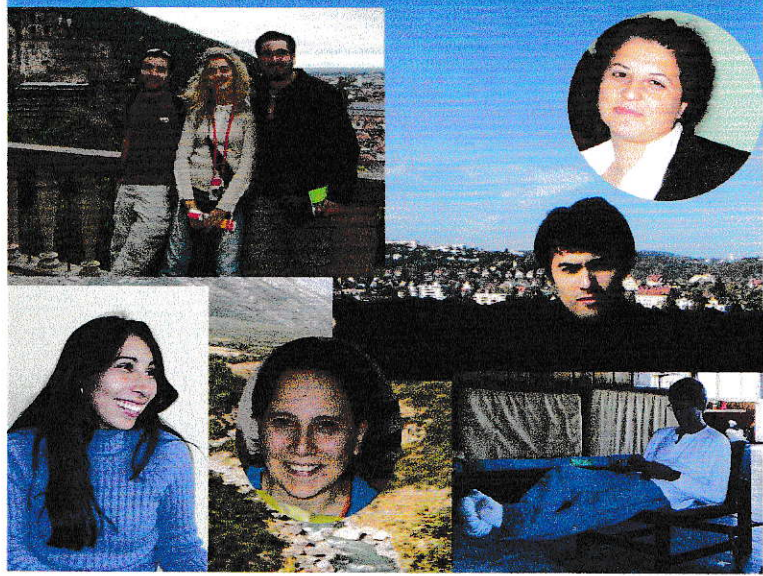


*Like branches on a tree, we grow in different directions,
yet our root remains as one.*

Each of our lives will always be a special part of the other.

S. N. G. 1998

A mis compañeros y amigos



ÍNDICE DE MATERIAS



	Pág.
Dedicatoria	ii
Fuentes de Financiamiento	iii
Agradecimientos	iv
Índice de materiales	v
Lista de Tablas	viii
Lista de Figuras	ix
Lista de abreviaturas	xiii
RESUMEN	xiv
SUMMARY	xvii
INTRODUCCIÓN	1
MATERIALES Y MÉTODOS	8
Reactivos	8
Ensayo de complementación	10
Purificación de EcFtsZ por precipitación con sulfato de amonio	10
Purificación de ZipA	12
Dicroísmo circular	13
Electroforesis en gel SDS-PAGE	13
Inmunotransferencia	13

Dispersión de luz a 350 nm	14
Microscopía electrónica	14
Determinación de la actividad GTPásica	15
Tinción por inmunofluorescencia	15
Procesamiento de las imágenes	17
Formación de proteoliposomas	18
RESULTADOS	19
I. Influencia del glutamato 83 y la arginina 85 de la EcFtsZ sobre las interacciones laterales.	20
I.1. Efecto de las mutaciones E83Q y R85Q sobre la formación de las láminas de polímeros de EcFtsZ.	20
I.2. Efecto del calcio sobre la actividad GTPásica de EcFtsZ tipo silvestre y las mutantes E83Q y R85Q.	30
II. Influencia del glutamato 83 y la arginina 85 de EcFtsZ en la formación del anillo Z.	34
II.1. Caracterización <i>in vitro</i> de la proteína de fusión EcFtsZ-EYFP	34
II.2. Caracterización <i>in vivo</i> de EcFtsZ tipo silvestre y las mutantes E83Q y R85Q fusionada a la proteína fluorescente EYFP.	39
III. Influencia del glutamato 83 y la arginina 85 de EcFtsZ sobre el reclutamiento de ZipA en el anillo Z	52
III.1. Efecto de ZipA sobre la formación <i>in vitro</i> de láminas de EcFtsZ tipo silvestre y las mutantes E83Q y R85Q.	52



III.2. Efecto de las mutaciones E83Q y R85Q de EcFtsZ sobre su interacción con ZipA unida a liposomas.	63
III.3. Efecto de las mutaciones E83Q y R85Q de EcFtsZ sobre la localización de ZipA en la célula.	69
DISCUSIÓN	75
CONCLUSIONES	89
BIBLIOGRAFÍA	90

LISTA DE TABLAS

	Pag.	
Tabla 1	Contenido de estructura secundaria de EcFtsZ tipo silvestre y las mutantes E83Q y R85Q, en presencia y ausencia de GTP y de ZipA.	24
Tabla 2	Longitud de las células <i>E. coli</i> VIP2/pLAR9 que expresan la EcFtsZ tipo silvestre y las mutantes E83Q y R85Q a 30 °C y 42 °C.	46
Tabla 3	Localización relativa de EcFtsZ y ZipA en células VIP2/pLAR9 complementadas con EcFtsZ tipo silvestre y las mutantes E83Q y R85Q.	49
Tabla 4	Influencia de los proteoliposomas y liposomas sobre la dispersión de luz de polímeros en solución de EcFtsZ tipo silvestre y las mutantes E83Q y R85Q inducidos por ZipA.	68
Tabla 5	Resumen de las propiedades de EcFtsZ con mutaciones puntuales localizadas en la superficie lateral del dominio carboxilo o amino.	79



LISTA DE FIGURAS

		Pag.
Figura 1	Esquema de la interacción de los componentes del divisoma y estructura modelada de EcFtsZ.	2
Figura 2	Modelo de polimerización y despolimerización de EcFtsZ.	4
Figura 3	Análisis de la pureza de EcFtsZ tipo silvestre y las mutantes E83Q y R85Q.	22
Figura 4	Influencia del calcio sobre la polimerización de EcFtsZ tipo silvestre y las mutantes E83Q y R85Q.	25
Figura 5	Efecto del calcio y de ZipA sobre la polimerización de EcFtsZ tipo silvestre y las mutantes E83Q y R85Q.	27
Figura 6	Influencia de la concentración del calcio sobre la polimerización de EcFtsZ tipo silvestre y las mutantes E83Q y R85Q.	28
Figura 7	Microscopía electrónica e histograma del ancho de los polímeros de EcFtsZ tipo silvestre y la mutante E83Q.	29
Figura 8	Efecto del calcio sobre la actividad GTPásica de EcFtsZ tipo silvestre y las mutantes E83Q y R85Q.	31
Figura 9	Influencia de calcio y de ZipA sobre la actividad GTPásica de EcFtsZ tipo silvestre y las mutantes E83Q y R85Q.	33
Figura 10	SDS-PAGE e "inmunoblot" de EcFtsZ-EYFP purificada.	36
Figura 11	Espectros de absorción y de emisión de fluorescencia de EcFtsZ-EYFP.	37

Figura 12	Cinéticas de polimerización y despolimerización de EcFtsZWT-EYFP.	38
Figura 13	Microscopía confocal de células que expresan la EYFP fusionada con EcFtsZ tipo silvestre y las mutantes E83Q y R85Q.	41
Figura 14	Viabilidad de las células VIP2/pLAR9 complementadas con EcFtsZ tipo silvestre y las mutantes E83Q y R85Q fusionadas con la proteína EYFP.	42
Figura 15	Efecto de la complementación con EcFtsZ tipo silvestre y las mutantes en células VIP2/pLAR9 sobre la expresión de EcFtsZ a 30 °C y 42°C.	45
Figura 16	Localización de EcFtsZ tipo silvestre y las mutantes E83Q y R85Q en las células VIP2/pLAR9 crecidas a 30 °C y 42 °C.	47
Figura 17	Distribución de EcFtsZ tipo silvestre y las mutantes E83Q y R85Q a lo largo del eje longitudinal de la célula.	50
Figura 18	SDS-PAGE e "inmuno blot" de ZipA.	54
Figura 19	Cromatograma de la elusión de His6-ZipA digerida con trombina desde una columna de afinidad de níquel.	55
Figura 20	Dicroísmo circular en el UV lejano de His6-ZipA y digerida con trombina.	56
Figura 21	Efecto de ZipA sobre la polimerización y actividad GTPásica de EcFtsZ tipo silvestre y las mutantes E83Q y	57

	R85Q.	
Figura 22	Co-sedimentación de ZipA inducida por EcFtsZ tipo silvestre y las mutantes E83Q y R85Q.	60
Figura 23	Microscopía electrónica de los polímeros de EcFtsZ tipo silvestre y las mutantes E83Q y R85Q en presencia de ZipA.	62
Figura 24	Interacción de EcFtsZ tipo silvestre y las mutantes E83Q y R85Q en proteoliposomas de ZipA y en una solución de liposomas en una condición de no polimerización	64
Figura 25	Interacción de EcFtsZ tipo silvestre y las mutantes E83Q y R85Q en proteoliposomas de ZipA y en una solución de liposomas.	66
Figura 26	Efecto de la complementación con EcFtsZ tipo silvestre y las mutantes sobre la expresión de ZipA en células VIP2/pLAR9 crecidas a 30 °C y a 42°C.	70
Figura 27	Localización de ZipA en las células VIP2/pLAR9 que expresan EcFtsZ tipo silvestre o las mutantes E83Q o R85Q.	71
Figura 28	Distribución de ZipA a lo largo del eje longitudinal de la célula.	73
Figura 29	Modelo para explicar el efecto de las mutaciones E83Q y R85Q de EcFtsZ sobre la formación de láminas.	76
Figura 30	Aminoácidos de la hélice H3 en la interfase de interacción	81

lateral de dos monómeros de EcFtsZ

ABREVIATURAS

APS	Persulfato de amonio
BSA	Albúmina de suero bovino
CD	Dicroísmo circular
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
IPTG	Isopropil β -D-tiogalactopiranosido
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FtsZ	“Filamentous temperature sensitive”
GTP	Guanosina trifosfato
HEPES	Ácido 1-etanosulfónico 4-(2-hidroxietil)piperazina
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución (High performance liquid chromatography)
MES	4-ácidomorfo etanosulfónico
MOPS	Ácido 4-morfolinopropanosulfónico
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina
Tris	2-amino-2-(hidroximetil)-1, 3-propanediol.
Triton X-100	4-(1,1,3,3-Tetrametilbutil) fenil-polietilen glicol
Tween 20	Polioxietilen-sorbitan mono laureato
ZipA	FtsZ interacting protein

Resumen

FtsZ y ZipA son proteínas que forman parte del divisoma de *Escherichia coli*, complejo proteico que se forma en el sitio de la división celular. La maduración del divisoma requiere del ensamblaje del proto-anillo, compuesto por el anillo Z, ZipA y FtsA, seguido del reclutamiento de al menos 9 proteínas, la mayoría de ellas relacionadas con la síntesis de mureína. Se piensa que el anillo Z está compuesto por varios polímeros de EcFtsZ y que se ancla a la membrana citoplasmática por ZipA. *In vitro*, EcFtsZ, en presencia de GTP, polimeriza en protofilamentos y filamentos dobles que se estabilizan por interacciones longitudinales y laterales. Se postulan dos modelos para explicar cómo ocurrirían las interacciones laterales. Primero, la superficie del dominio amino de dos protofilamentos interactuaría paralelamente para formar los filamentos dobles, y estos, a su vez, se asociarían en forma antiparalela a través de las superficies del dominio carboxilo para formar las láminas. Segundo, la predicción *in silico* plantea una interacción paralela entre las superficies del dominio amino de un protofilamento y la del dominio carboxilo de otro, para formar las láminas. La ausencia de un único modelo de interacciones laterales y la escasa evidencia de la importancia de las interacciones laterales en el ensamblaje del anillo Z, ha mantenido velado el mecanismo de formación y la dinámica del anillo Z. En esta tesis se utilizó EcFtsZ con las mutaciones puntuales E83Q y R85Q localizadas en la hélice H3 de la superficie lateral del dominio amino, como herramienta para

comprender la formación y la función del anillo Z. La complementación de EcFtsZ con sustituciones del glutamato 83 por glutamina o la arginina 85 por glutamina en cepa de *E. coli* que no contiene el gen de *ftsZ* cromosomal redujo la viabilidad celular. *In vivo*, la EcFtsZ tipo silvestre y las mutantes E83Q y R85Q fusionadas a la proteína fluorescente EYFP no complementaron a una cepa carente de *ftsZ*. Por lo tanto, la visualización de EcFtsZ tipo silvestre y las mutantes sin EYFP se hizo por inmunofluorescencia. La localización de EcFtsZ en la mitad de la célula no se afectó por las mutaciones E83Q o R85Q. Tanto EcFtsZ tipo silvestre como las mutantes reclutaron a ZipA con un patrón de localización similar a su propio patrón. En proteoliposomas de ZipA la interacción con EcFtsZ tipo silvestre y con las mutantes E83Q o R85Q no se afectó. Estos resultados confirman que EcFtsZ interactúa con ZipA *in vivo* y los aminoácidos E83 y R85 no son fundamentales para la localización de EcFtsZ en la mitad de las células. *In vitro*, la mutación E83Q incrementó en dos veces la estabilidad de los polímeros con respecto a los de tipo silvestre, y la mutación R85Q anuló la capacidad de polimerizar. La actividad GTPásica de la mutante E83Q y R85Q se redujo en 41 % y en 83 % con respecto a la de tipo silvestre, respectivamente. Estos resultados sugieren que las mutaciones E83Q y R85Q disminuyen la dinámica de polimerización de EcFtsZ. La adición de calcio y de ZipA aumentó la polimerización de EcFtsZ tipo silvestre en 400 % y 10 %, respectivamente, y de la proteína mutante E83Q en 730 % y 100 %, respectivamente. Sin embargo, no se indujo la polimerización de la mutante R85Q con calcio y con ZipA se duplicó. Estos resultados sugieren que la arginina 85 participa en las interacciones

laterales y que estas podrían estar reguladas por repulsión de cargas. Por esto, al eliminar la carga negativa del glutamato 83 (i.e., mutación E83Q) se estabilizan los polímeros de EcFtsZ afectando la dinámica necesaria para el correcto funcionamiento del anillo Z.

Abstract

FtsZ and ZipA are proteins that form part of the divisome of *Escherichia coli*, the protein complex that forms at the site of cellular division. Divisome maturation requires assembly of the proto-ring that is composed of the Z ring, ZipA and FtsA, followed by the recruitment of at least 9 proteins, most of which are related to murein synthesis. It is believed that the Z ring is composed of multiple EcFtsZ polymers, anchored to the cytoplasmic membrane by ZipA. *In vitro*, and in the presence of GTP, EcFtsZ polymerizes into protofilaments and double filaments that are stabilized by longitudinal and lateral interactions. Two models were advanced to explain how the lateral interactions occur. The first states that the surfaces of the amino domain of two protofilaments interact in parallel to form double filaments, which are known as “the thick filament”. In turn, the thick filaments associate in an antiparallel arrangement through the surface of the carboxyl domain to form sheets. The second model, an *in silico* prediction, postulates a parallel interaction between the surface of the amino domain of one protofilament and the surface of the carboxyl domain of a second protofilament, to produce the sheets. The existence of two models to explain the lateral interactions and the limited available evidence for their role in assembly of the Z ring, have kept hidden the formation mechanism and dynamics of the Z ring. In this dissertation, EcFtsZ with point mutations E83Q and R85Q localized in the H3 helix of the amino domain lateral surface were used as a tool to understand the

formation and function of the Z ring. Expression of E83Q and R85Q mutants reduced cellular viability. *In vivo* the expression of wild type and mutated EcFtsZ fused to the fluorescent protein EYFP blocked the cellular division and did not complement a strain lacking *ftsZ*. Therefore, the visualization of the wild type and mutant EcFtsZ, without EYFP, was done by immunofluorescence. E83Q and R85Q mutations did not affect the localization of the EcFtsZ at the mid cell. Wild type and mutated EcFtsZ recruited ZipA in a localization pattern similar to their own. The interaction between ZipA and wild type and the mutants was not affected at the ZipA proteoliposomes. These results suggest that EcFtsZ interacts with ZipA *in vivo* and that the E83 and R85 aminoacids are not fundamental to localize the EcFtsZ at the mid cell. *In vitro* E83Q mutation increased the stability of the polymers twofold with respect to wild type, while the R85Q mutation inhibited polymerization. In comparison to the wild type, the GTPase activity of E83Q and R85Q mutants was reduced by 41 and 83 %, respectively. These results show that the dynamic of EcFtsZ polymerization is decreased by these mutations. The addition of calcium and ZipA increased the polymerization of EcFtsZ wild type by 400 and 10 %, respectively, and that of the E83Q mutant by 700 and 100 %, respectively. However, polymerization of R85Q mutant was not induced by calcium, while it was increased two times with ZipA. These results suggest that arginine 85 takes part in the lateral interactions, which could be regulated by charge repulsion. Therefore, when the negative charge of the glutamate 83 is eliminated (i.e., mutation E83Q), the EcFtsZ polymers

stabilize, affecting, in turns, the dynamics needed for the correct functioning of the Z ring.

Introducción

La división celular es un proceso esencial para la perpetuación de todos los organismos vivos. La división de *E. coli*, se produce por la formación de un complejo proteico, llamado divisoma en la mitad de la célula, constituyendo el sitio donde ocurrirá la septación celular. El ensamblaje del divisoma se inicia con la formación del anillo Z (polímero de EcFtsZ), que se ancla a la cara interna de la membrana citoplasmática por medio de las proteínas ZipA y FtsA (Addinall y Lutkenhaus, 1996; Hale y de Boer, 1999) y forma el denominado proto-anillo (Rico, 2006) responsable del sucesivo reclutamiento de las otras proteínas del divisoma relacionadas con la síntesis de la mureína (figura 1 A, B y C) (Addinall *et al.*, 1997; Hale y de Boer, 2002; Weiss *et al.*, 1999).

EcFtsZ (FtsZ de *E. coli*) es homóloga a la tubulina, pues comparten similitudes estructurales y funcionales. EcFtsZ es la primera proteína que se localiza en forma de una banda (anillo Z) en el sitio de la división celular y es la más abundante entre las proteínas que componen el divisoma (Rueda *et al.*, 2003). *In vitro* a través de interacciones longitudinales polimeriza en protofilamentos (polímero compuesto por un solo filamento de EcFtsZ) de manera dependiente de GTP. La polimerización de EcFtsZ en protofilamentos activa la hidrólisis del GTP y el intercambio con GTP mantiene los polímeros

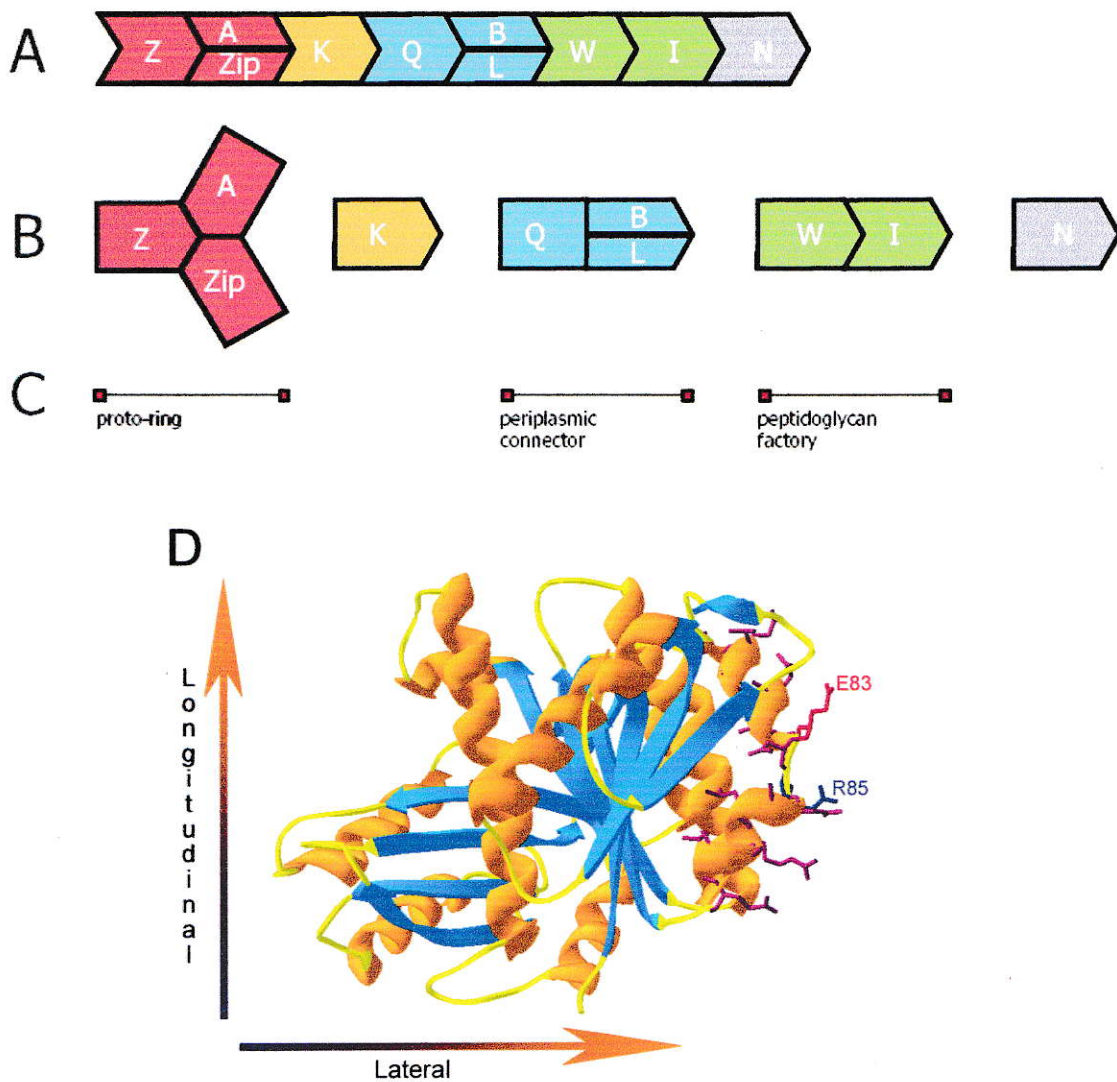


Figura 1. Esquema de la interacción de los componentes del divisoma y estructura modelada de EcFtsZ. A, modelo secuencial y B, concertado de reclutamiento de las proteínas del divisoma. C, “proto-ring” formado por FtsZ (Z), FtsA (A) y ZipA (Zip). FtsK (K) permite el ensamble del “periplasmic connector” formado por FtsQ (Q), FtsB (B) y FtsL (L) y “peptidoglycan factory” dada por FtsW (W) y FtsI (I), según Vicente, M. y Rico, A (2006). D, vista frontal de un monómero de EcFtsZ modelada por (Garcés, 2007). Hélice alfa (naranja), hebra beta (azul) y lazo (amarillo). Se destacan los aminoácidos E83 (rojo) y R85 (azul) ubicados en la hélice H3. La cadena lateral del resto de los aminoácidos que componen la H3 se muestra en lila. Las flechas indican la dirección de las interacciones.

estables, hasta que se consuma el GTP y ocurre la despolimerización (figura 2). Los protofilamentos a su vez por interacciones laterales inducidos por calcio, DEAE-dextrano, rutenio rojo, glutamato o ficoll se asocian en láminas (polímero compuesto por varios protofilamentos) (Beuria *et al.*, 2003; Gonzalez *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 1998; Marrington *et al.*, 2004; Mukherjee y Lutkenhaus, 1999; Santra *et al.*, 2004) La superficie de contacto entre los monómeros para formar los protofilamentos se ha estudiado con detalle, lo que permitió la caracterización del sitio de unión del GTP, su posible mecanismo de hidrólisis y la importancia de los aminoácidos que se encuentran en esta interfase en la formación y función del anillo Z (Addinall *et al.*, 1997; Mingorance *et al.*, 2001; Mukherjee y Lutkenhaus, 1994; Scheffers *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 1997). La superficie del dominio amino (lateral izquierda) de un protofilamento se asocia lateralmente en paralelo con la misma superficie de otro protofilamento para formar un filamento doble (polímero compuesto por dos protofilamentos). Estos a su vez interactúan lateralmente de manera antiparalela por la superficie del dominio carboxilo (lateral derecha) para producir las láminas (Figura 1 D y 2) (Lowe y Amos, 1999). Esta interacción puede ser inducida por cationes como el calcio o ficoll y también mediante la proteína ZipA (Gonzalez *et al.*, 2003; Hale *et al.*, 2000; RayChaudhuri, 1999). Además de esta descripción de contactos laterales, recientemente Beuria *et al.*, (2006) presentaron un modelo donde la interacción lateral entre los monómeros de los protofilamentos sería en forma paralela, entre la superficie del dominio amino de un protofilamento con la

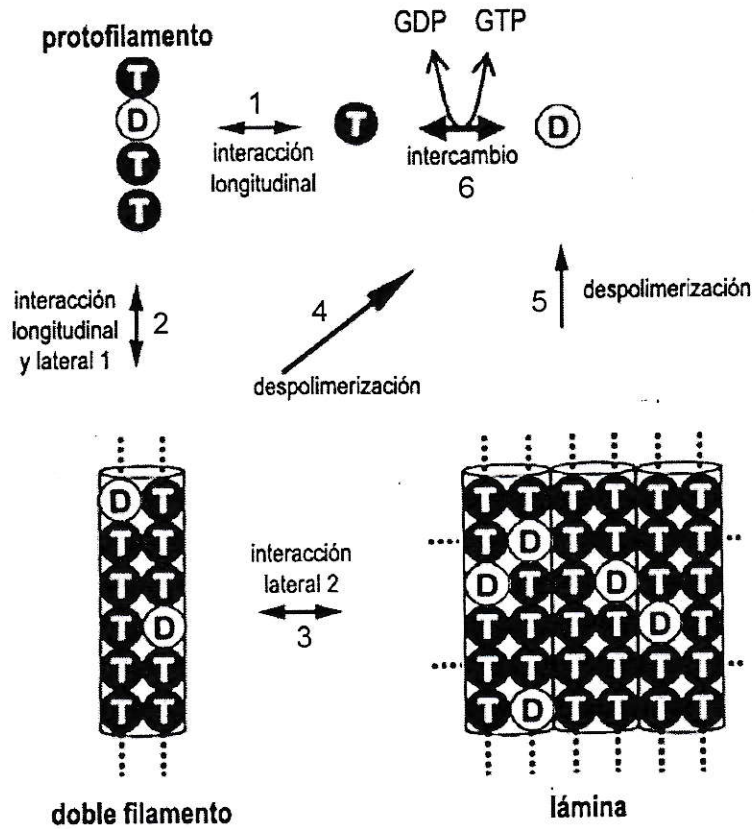


Figura 2. Modelo de polimerización y despolimerización de EcFtsZ. Los monómeros de EcFtsZ-GTP (T) se polimerizan en protofilamentos por interacciones longitudinales, reacción 1. A estos protofilamentos se unen monómeros de EcFtsZ en la superficie lateral (interacción lateral 1) para formar el núcleo de los dobles filamentos, los cuales crecen longitudinalmente de manera cooperativa, reacción 2. Los filamentos dobles se asocian por interacción laterales (interacción lateral 2) para formar láminas, reacción 3. En todos los polímeros ocurre hidrólisis de GTP, lo que produce la despolimerización para producir monómeros de EcFtsZ-GDP (D), reacciones 4 y 5. El GDP unido a EcFtsZ se intercambia por GTP, reacción 6.

superficie del dominio carboxilo del otro (Beuria *et al.*, 2006). Estos resultados en cierto modo contradictorios, no han permitido tener un único modelo para comprender la importancia de los aminoácidos que se encuentran en esta interfase de interacción y su participación en la funcionalidad del anillo Z. Se piensa que la funcionalidad del anillo Z involucra varios pasos, como la localización de EcFtsZ en el sitio de división celular (formación del anillo Z), su polimerización y la dinámica del anillo a través de la hidrólisis de GTP y el reclutamiento de las proteínas FtsA y ZipA. Se plantea que ZipA mantendría la integridad del anillo Z anclándola a la membrana y estabilizando los polímeros de EcFtsZ que componen el anillo (RayChaudhuri, 1999). ZipA es la primera proteína que interactúa con el anillo Z *in vivo* y tiene la capacidad de inducir la formación de láminas de EcFtsZ *in vitro*. ZipA es una proteína compuesta por tres dominios, un primer dominio amino que contiene una secuencia de anclaje a membrana, uno intermedio rico en prolina y glutamina y uno carboxilo que contiene el dominio FZB (FtsZ "binding") de interacción con el carboxilo terminal de EcFtsZ (Hale y de Boer, 1997; Hale *et al.*, 2000; Mosyak *et al.*, 2000). El dominio FZB por si solo puede inducir la formación de láminas a partir de polímeros de EcFtsZ.

Para demostrar la importancia de las interacciones laterales de EcFtsZ para la formación de filamentos dobles, basado en el modelo de Lowe y Amos (1999), en la formación y funcionamiento del anillo Z, hemos construido y caracterizado las mutantes de EcFtsZ E83Q y R85Q. Estos aminoácidos se encuentran en la hélice H3 de la superficie lateral izquierda de EcFtsZ (figura 1

D) que es la interfase de interacción para formar los filamentos dobles según el modelo de formación de láminas de Lowe y Amos (1999). La complementación con las mutantes E83Q y R85Q a una cepa mutante en *ftsZ*, redujo la viabilidad celular a 0,9 y a 0,1 %, respectivamente. La caracterización *in vitro* de estas mutantes mostró que R85Q afecta la polimerización y la actividad GTPásica, y la mutante E83Q lo hace en menor grado (Shin, 2003). Las propiedades de las mutantes E83Q y R85Q mencionadas permitieron postular la siguiente hipótesis, “La interacción lateral responsable de la formación de los filamentos dobles de EcFtsZ en la célula de *E. coli* está mediada por la hélice H3, donde participan los aminoácidos E83 y R85. Las interacciones laterales de EcFtsZ son responsables de la formación del anillo Z e influyen en su interacción con ZipA”.

Objetivo General

Evaluar el efecto de las mutaciones E83Q y R85Q, en la H3 de EcFtsZ sobre la formación de los filamentos dobles, su interacción con la membrana y con ZipA.

Objetivos Específicos

1. Determinar el efecto de las mutaciones E83Q y R85Q de EcFtsZ sobre la formación de láminas mediante polimerización y actividad GTPásica, en presencia de calcio.
2. Comparar en la célula bacteriana la localización de EcFtsZ silvestre con el de las mutantes mediante inmunolocalización.

3. Evaluar el efecto de las mutaciones E83Q y R85Q de EcFtsZ sobre la interacción con la ZipA en vesículas de lípidos de *E. coli*, mediante polarización de fluorescencia.

4. Comparar en la célula bacteriana la localización de ZipA en células que expresan EcFtsZ silvestre y las mutantes.

MATERIALES

Reactivos:

Sigma (USA): BSA, SDS, APS, imidazol, azida, fosfato di-ácido de potasio, azul brillante R de Coomassie, GTP, 4-cloro -1-naftol molibdato de amonio, poli-L-lisina y lisozima.

Merck (Alemania): azul de bromofenol, perhydrol 30 % H₂O₂, etanol, carbonato ácido de potasio, metanol, ácido acético, ácido perclórico y verde oxalato de malaquita.

Pharmacia (Sweden): Sephadex G-25.

Winkler (Chile): cloruro de sodio, agar, cloruro de magnesio, GdmCl, Tris, glicina, glicerol, EDTA, fosfato ácido de potasio, TEMED, IPTG, acrilamida, HEPES, Tween-20, Triton X-100 y citrato de sodio.

Fluka Chemie AG (Switzerland): cloruro de potasio y cloruro de calcio.

TCL (Chile): ácido acético, etanol, metanol y acetona.

Difco (USA): triptona y extracto de levadura.

Gibco (USA): bisacrilamida.

Calbiochem (USA): anticuerpo Ig-G de conejo conjugado con peroxidasa y MOPS.

Roche (Alemania): cóctel de inhibidor de proteasa Free EDTA.

Applichem (Alemania): MOPS.

Invitrogen: (USA): anti-conejo conjugado con Alexa 488.

MÉTODOS

Ensayo de complementación. La cepa de *E. coli* VIP2/pLAR9 se transformó con los plásmidos que expresan los genes de *ftsZ* tipo silvestre y mutantes E83Q y R85Q fusionados a la EYFP. Las células se crecieron a 30 °C en medio LB líquido con agitación hasta un OD₆₀₀ aproximadamente de 0,5 y se realizaron diluciones seriadas hasta 10⁶ con medio LB. Se inocularon 10 µl de estas diluciones por triplicado y en paralelo en dos placas, una en LB-agar/amp/kan/clor y otra en LB-agar/amp/kan, para ser incubadas a 30 °C y a 42 °C, respectivamente. Las células VIP2/pLAR9 sin complementar (considerado como control negativo) se inocularon en LB-agar/kan/clor y en LB-agar/kan para ser incubado a 30 °C y a 42 °C, respectivamente.

Purificación de EcFtsZ por precipitación con sulfato de amonio. Este método de purificación consiste básicamente en tres etapas (Mukherjee y Lutkenhaus, 1998). Lisis de células bacterianas y fraccionamiento de extracto celular. El pellet bacteriano se resuspendió en 25 ml de amortiguador AZ (Tris-HCl 50 mM pH 7.9, KCl 50 mM, EDTA 1 mM, glicerol 10 %) por litro de cultivo y se sonicó con 5 ciclos de 20 s con un output 6 y pausa de un minuto, en un sonicador con sonda de 1 cm (Sonicatortm 3000 Misonic). El lisado se centrifugó a 28.000 rpm, a 4 °C durante 90 min (Beckman L5-75B Ultracentrifuge, rotor type 30). El sobrenadante se transfirió en un vaso precipitado pequeño colocado previamente en hielo. Por cada 100 ml de sobrenadante se agregó

4,16 g de sulfato de amonio (30 % de sal por volumen de sobrenadante) en frío agitando con una barra magnética. La solución se centrifugó a 10.000 rpm a 4 °C durante 30 min. El sobrenadante se eliminó y el precipitado se suspendió en 3 ml de amortiguador AZ. El suspendido se dializó contra 100 volúmenes de amortiguador AZ al menos 4 h (o toda la noche) con 2 cambios a 4 °C.

Cromatografía en Q-Sepharosa. La muestra dializada se inyectó a la columna de intercambio aniónico (Q-Sepharosa, 25 cm x 4,6 mm) mediante un súper "loop". La elución se llevó a cabo con un gradiente de una mezcla de amortiguador AZ y BZ (Tris-HCl 50 mM pH 7,9, KCl 1 M, EDTA 1 mM, glicerol 10 %), desde 10 a 70 % de amortiguador BZ con un flujo a 1 ml/min a 4 °C, colectando 4 ml cada fracción. La elución de la proteína se monitoreó mediante SDS-PAGE y espectrofotométricamente a 280 nm. La fracción correspondiente a la EcFtsZ (que eluye alrededor de 200-250 mM de KCl) se colectó para la siguiente cromatografía.

Cromatografía en Sephacryl S-300. La EcFtsZ obtenida de la cromatografía en Q-Sepharosa se inyectó a la columna sephacryl S-300 y se eluyó con amortiguador AZ a 1 ml/min, 4 °C. Las fracciones colectadas fueron de 3 ml y el monitoreo se hizo por SDS-PAGE y espectrofotométricamente a 280 nm. La EcFtsZ colectada se concentró utilizando Centriprep (4.000 rpm a 4°C) hasta un volumen final en que la concentración final de proteína fuera aproximadamente 30 mg/ml. La EcFtsZ se alicuotó y se congeló inmediatamente por inmersión en etanol (-80 °C) y posteriormente se conservó a -80 °C hasta su uso.

Purificación de la ZipA. Para la purificación de la His6-ZipA (ZipA) se sobre-expresó y purificó a partir del plásmido pET-15ZIP (gentilmente donado por RayChaudhuri de la Universidad Tufts, USA) mediante un protocolo descrito por la misma autora (RayChaudhuri, 1999). Esta purificación básicamente consiste en lisar las células que contienen la ZipA sobre-expresada, mediante 3 ciclos de congelado y descongelado, a -80 °C y a temperatura ambiente, seguido de una sonicación breve de tres ciclos de 20 s con un “output” 3 a intervalos de 1 min (Sonicatortm 3000 Misonic). Para la separación de las proteínas hidrosolubles y de membranas se centrifugó el lisado a 200,000 xg por 30 min. La fracción precipitada que corresponde a la fracción de membranas que contiene la ZipA, se suspendió en el amortiguador AP (tris-HCl 25 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, EDTA 2 mM, glicerol 5 % y cóctel de inhibidor de proteasa libre de EDTA). Para extraer y solubilizar la ZipA de la membrana, se adicionó tween-20 a una concentración final de 1,2 % y se incubó en hielo con agitación durante 2h. La ZipA solubilizada se centrifugó a 200,000 xg durante 30 min y se dializó contra el amortiguador BP (MOPS 25 mM pH 6,5, NaCl 500 mM, glicerol 5 % y Tween 20 0,36 %) durante toda la noche. La solución dializada se cargó a una columna que contiene la resina ProBond de Niquel (Invitrogen) y para eliminar las proteínas de unión inespecífica se lavó con el amortiguador BP suplementado con imidazol a una concentración final de 1, 50 y 150 mM. La ZipA se eluyó con amortiguador BP que contiene 500 mM de Imidazol y las fracciones que contienen la proteína ZipA se dializaron contra el amortiguador CP (MOPS 25 mM pH 6,5, NaCl 50 mM, glicerol 5 % y Tween-20 0,36 %). La solución

dializada se concentró mediante Centricon C-10 (Millipore) y se calculó su concentración espectroscópicamente utilizando coeficiente de extinción molar de ZipA y se almacenó a -80 °C hasta su uso.

Dicroísmo circular. Los espectros de dicroísmo circular de las proteínas se registraron con un espectropolarímetro (Jasco J-600) en el UV lejano. A partir de estos espectros se obtuvieron los porcentajes de estructura secundaria de las proteínas mediante el programa CDPro.

Electroforesis en SDS-PAGE. El gel acrilamida:bisacrilamida separador y concentrador se preparó al 10 % y 4 %, respectivamente en condiciones desnaturalantes. Las muestras se suspendieron en amortiguador de muestra (Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, SDS, β -mercaptoetanol, azul de bromofenol y glicerol,) y se calentaron por 15 min a 85 °C. Una vez cargadas las muestras a los pocillos, se corrieron en amortiguador de corrida (SDS 10 %, glicina y Tris-base) a 120 V hasta la caída del frente de corrida. El gel se tiñó con azul de Coomassie (0,25 g de azul de Coomassie brillante en una solución de 90 % de metanol:agua (1:1 v/v) y 10 % de ácido acético) durante media hora con agitación y se destiñó con la solución de desteñido (45 % de metanol y 10 % de ácido acético).

Inmunotransferencia. Las reacciones de inmunoblot se describen en dos pasos, uno, la transferencia de las bandas de proteínas desde el gel SDS-PAGE a la membrana de nitrocelulosa y las inmunoreacciones, y dos, el revelado. Para la transferencia se incubó la membrana de nitrocelulosa (tamaño de poro 0,2 μ m, Protran Schleicher & Schuell, BioScience, Cassel, Germany) y

los papeles de filtro en amortiguador semi-seco (Tris-HCl 25 mM pH 8,3, glicina 150 mM y metanol 10 %). Luego de armar el "sandwich" se colocó sobre la placa de transferencia y se aplicó 140 mA durante 1 h. La membrana se lavó con TTBS (Tris-HCl 0,1 M pH 7,5, NaCl 0,9 %, Tween-20 0,2 %) y los sitios inespecíficos se bloquearon con amortiguador de bloqueo (5 % de leche descremada en amortiguador TTBS) a temperatura ambiente. Al cabo de una hora se incubó con el primer anticuerpo policlonal (anti-EcFtsZ de conejo o anti-ZipA de conejo) y se lavó con TTBS antes de ser incubado con el segundo anticuerpo (anti-conejo conjugado con peroxidasa). Para la reacción del revelado, la membrana se lavó en amortiguador TTBS seguido de dos lavados con Tris-HCl 0,1 M pH 7,4 y se incubó en 24 mL de Tris-HCl 0,1 M pH 7,4, 4-chloro-1-naphthol 0,5 mg/ml y H₂O₂ 0,015 % (perhydrol 30 % H₂O₂). Una vez que aparecieron las bandas de proteínas, se detuvo la reacción con agua.

Dispersión de luz a 350 nm. Las cinéticas de polimerización de EcFtsZ se midieron en amortiguador de polimerización (Mes 50 mM pH 6,5, KCl 50 mM y MgCl₂ 10 mM) a 30 °C. Las concentraciones de EcFtsZ, del GTP y de ZipA utilizados se detallan en las leyendas de los gráficos. La dispersión de luz a 90° se registró mediante un espectrofluorímetro (Luminescence Spectrometer LS 50, Perkin Elmer), a 350 nm de excitación y de emisión, con un atenuador de 6 % o de 2 % y con 2,5 nm de ancho de banda de excitación y de emisión.

Microscopía electrónica. Para la visualización de los polímeros de las proteínas mediante un microscopio electrónico se realizó tinción negativa de las muestras de proteínas adheridas a las grillas. Para ello, 50 µl de la muestra se

colocaron sobre una grilla (cubierta con formvar y tratada con carbón) durante 20 s. Una vez adherida la muestra a la grilla, se lavó 4 veces y se tiñó durante 2 min con una solución de acetato de uranilo al 1,5 %.

Determinación de la actividad GTPásica. La hidrólisis del GTP de la EcFtsZ se determinó mediante el protocolo de verde malaquita, que consiste en la cuantificación del fosfato libre en solución. Para la reacción de hidrólisis, el GTP se incubó a una concentración final de 1 mM, en el amortiguador de polimerización (Mes 50 mM pH 6,5, KCl 50 mM y MgCl₂ 10 mM) y se tomó como tiempo cero la adición de de EcFtsZ a una concentración final de 12 μM. Para detener la reacción se adicionó ácido perclórico y se neutralizó con carbonato de potasio. Para separar la fracción soluble del precipitado, que contiene la proteína, se centrifugó y 70 μl del sobrenadante se mezcló con 800 μl de la solución VM-MA-TX (verde malaquita 0,03375 %, molibdato de amonio 1,05 % (la solución madre se prepara 4,2 % en 4 N de HCl) y Triton X-100 0,0004 %). Una vez agitada esta mezcla se adicionó 100 μl del amortiguador que contiene 34 % de citrato y al cabo de 20 min de incubación en hielo se midió la absorbancia a 630 nm en un espectrofotómetro (Hewlett-Packard 8452). Para calcular la cantidad de fosfato libre a partir de los valores de la absorbancia se utilizó como estándar, una curva de calibración construida con soluciones de varias concentraciones de KH₂PO₄.

Tinción por inmunofluorescencia. Para la observación de la EcFtsZ y la ZipA *in situ*, las células se trataron según el protocolo de Rueda, 2003, que

consta básicamente de tres etapas, fijación, permeabilización y revelado con los anticuerpos. Fijación, a partir de un cultivo de células, VIP2/pLAR9 complementadas con EcFtsZ WT y mutantes E83Q y R85Q, crecidas hasta la fase exponencial temprana en medio líquido LB con los antibióticos kan, clor y amp, se hicieron dos diluciones 1:50 en paralelo, en un medio LB fresco previamente temperado, uno a 30 °C (medio de cultivo con kan, clor y amp) y el otro a 42 °C (kan y amp). Como control negativo se incluyó la cepa VIP2/pLAR9 sin complementar (las diluciones se hicieron en LB con kan y clor para 30 °C y solo kan para 42 °C). Se incubaron a las temperaturas respectivas y al cabo de 4 h de crecimiento las células se fijaron con 0,75 % formaldehído y se incubaron 10 min a temperatura ambiente y posteriormente 30 min en hielo. Las células fijadas se lavaron con PBS y se suspendieron en buffer GTE (Tris pH 7,5 20 mM, glucosa 50 mM, EDTA 10 mM). Permeabilización, a 30 µl de las células fijadas se añadieron lisozima a una concentración final de 8 µg/ml y se colocaron sobre un portaobjeto pre-tratado con poli-L-lisina. La permeabilización se continuó entre 2 o 3 min y se lavó con PBS. Revelado con anticuerpos, los sitios inespecíficos para la reacción con los anticuerpos se bloquearon durante 15 min a temperatura ambiente y la solución de bloqueo (BSA 3 % en PBS) se reemplazó por una misma solución pero que contiene el primer anticuerpo policlonal anti-conejo (anti-FtsZ o anti-ZipA, con una dilución de 1:200.000). Luego de una incubación durante toda la noche a 4 °C, se lavó con PBS y se incubó con el anticuerpo secundario (anti-conejo conjugado con Alexa 488,

Invitrogen) durante 2 h en la oscuridad y a temperatura ambiente. Luego de varios lavados con PBS, se añadió una gota de "antifading" (Vectors Lab) y se colocó el cubre objeto. Las células se observaron mediante un microscopio confocal (Leica TCS SP2). Notas. 1, las muestras montadas en portaobjetos pueden ser guardadas en la oscuridad y a 4 °C durante meses o a – 20 °C durante años; 2, durante todo el procedimiento de la tinción de inmunofluorescencia es crucial mantener la humedad de las muestras y 3, las células fijadas y suspendidas en GTE pueden ser guardadas a 4 °C durante semanas.

Procesamiento de las imágenes. Las imágenes obtenidas del microscopio electrónico y del confocal se procesaron mediante el programa ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/download.html>). Este programa se utilizó para varios propósitos generales como ajustar brillo y contraste de las fotos, cambiar los colores e incluir la barra de tamaño. También se tomaron mediciones del ancho de los polímeros y del largo de las células, que consiste en trazar un vector entre dos o más puntos y determinar su longitud en la unidad de medida correspondiente. Para la obtención del patrón de distribución de la señal de inmunofluorescencia en las células, que corresponde a la localización de la EcFtsZ o de la ZipA, se trazó un vector desde un extremo al otro de la célula. Sobre este vector se registran, en el eje de la ordenada, la intensidad de la señal, a un intervalo regular en unidades arbitrarias, y el largo de la célula, para el eje de la abscisa, para cada célula. A partir de estos valores se construyeron pares de columnas (ejes "x" e "y") que por motivos de comparación, el largo

celular se normalizó entre los valores cero y uno (eje x) y la intensidad se representó en porcentaje de señal (eje y).

Formación de proteoliposomas de ZipA. La incorporación de ZipA dentro de los liposomas se llevó a cabo mediante la estrategia de reconstitución paso a paso (Rigaud y Levy, 2003). Esta consiste en dos etapas, una de formación de liposomas y una segunda, incorporación de la proteína dentro de los liposomas.

Formación de liposomas. Los liposomas se formaron siguiendo el protocolo descrito por Jung, H. (Jung *et al.*, 1998). A partir de una solución de almacenamiento de lípidos totales de *E. coli* (Avanti Polar Lipids, Inc.) disuelto en cloroformo, se calculó el volumen necesario para obtener una concentración final de 50 μM de lípidos para 1 ml de solución de liposomas. Este volumen se transfirió a un vial ámbar (para evitar la oxidación de los lípidos es importante mantenerlos en viales ámbar y con tapas recubiertas internamente con teflón) y se evaporó el cloroformo con nitrógeno gaseoso para que los lípidos queden adheridos al fondo y a la pared del vial (en cada uno de los pasos es recomendable tratar de disminuir el contacto de los lípidos con el aire). Se disolvieron los lípidos con 1 ml de amortiguador suplementado con 3 mg/ml de Triton X-100 mediante sonicación en un baño de agua a 30 °C durante 40 min. A esta solución de lípidos se agregan perlas de poliestireno (Bio-Beads SM-2, Bio-Rad), previamente tratados según indicaciones del fabricante, y se incubó a 4 °C toda la noche con agitación mediante una barra magnética.

Formación de proteoliposomas (incorporación de proteínas dentro de los liposomas). Para la

inserción de ZipA dentro de los liposomas, estos se desestabilizaron con la adición de Triton X-100 a una concentración final de 0,12 % y se agitaron mediante inversión durante 20 min a 0 °C. A estos liposomas desestabilizados se agregó ZipA a una concentración final de 5 μ M (proporción lípido:proteína equivalente a 10:1) y perlas de poliestireno y se agitó mediante inversión durante una hora a 0 °C. Finalmente, se adicionó una cantidad extra de perlas de poliestireno y se agitó con una barra magnética durante toda la noche a 4 °C.

RESULTADOS

I. Influencia del glutamato 83 y la arginina 85 de la EcFtsZ sobre las interacciones laterales. La EcFtsZ polimeriza en protofilamentos mediante las interacciones longitudinales y láminas por interacciones laterales. Con el fin de determinar la importancia del glutamato 83 y la arginina 83 de EcFtsZ en las interacciones laterales para la formación de filamentos dobles o láminas, se caracterizaron *in vitro* las mutantes EcFtsZ E83Q y R85Q mediante experimentos de polimerización y actividad GTPásica en presencia de calcio, que es un inductor de las interacciones laterales entre protofilamentos para la formación de láminas de polímeros.

1.1. Efecto de las mutaciones E83Q y R85Q sobre la formación de las láminas de polímeros de EcFtsZ. En la estructura tridimensional del modelo de EcFtsZ, los aminoácidos E83 y R85 se encuentran en un quiebre de la hélice H3, ubicada en la superficie lateral del dominio amino (figura 1 D). Durante la polimerización, esta superficie interactuaría lateralmente para formar los dobles filamentos, que son precursores de las láminas. Para explicar en donde ocurriría esta interacción, se manejan dos modelos de formación de láminas. Un modelo de láminas de EcFtsZ inducidas por calcio determinado mediante difracción electrónica a partir de una micrografía electrónica. Según este modelo, las láminas de polímeros de EcFtsZ estarían formadas por unidades

básicas, llamadas filamentos dobles, que serían asociaciones paralelas entre dos protofilamentos que interactúan por una superficie del dominio amino. La interacción, a través de una superficie del dominio carboxilo, entre los filamentos dobles en forma antiparalela daría origen a las láminas (Lowe y Amos, 1999). El otro modelo de interacciones laterales se propuso a partir de resultados de "docking" molecular. Según este modelo, una superficie lateral del dominio carboxilo de un protofilamento interactúa en forma paralela con una superficie del dominio amino de otro protofilamento. Así las láminas se formarían por adición consecutiva de protofilamentos (Beuria *et al.*, 2006). Proponemos que en ambos modelos, los aminoácidos E83 y R85 de la H3 se encontrarían en la superficie de interacción lateral, pues en presencia de GTP, ambas mutantes disminuyen la capacidad de polimerizar (Shin, 2003). Para determinar la influencia de E83 y R85 en las interacciones laterales, se evaluó el efecto del calcio sobre la formación de láminas. Con este propósito se purificaron las proteínas EcFtsZ tipo silvestre y las mutantes E83Q y R85Q y se caracterizaron *in vitro* mediante dispersión de luz, microscopía electrónica y actividad GTPásica.

Purificación. En la figura 3 (carril 1, 2 y 3) se observa que EcFtsZ tipo silvestre y las mutantes E83Q y R85Q purificadas migraron como una sola banda con una masa relativa de aproximadamente 40 kDa. Estas bandas transferidas a una membrana de nitrocelulosa se reconocieron con el anticuerpo anti-EcFtsZ en una reacción de inmunoblot (figura 2 carril 4, 5 y 6). Se observó

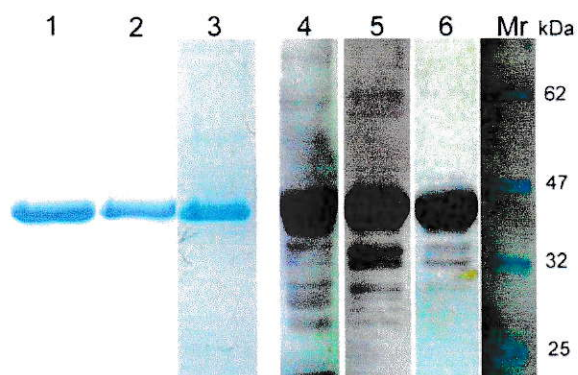


Figura 3. Análisis de la pureza de EcFtsZ tipo silvestre y las mutantes E83Q y R85Q. SDS-PAGE, carriles 1, 2 y 3 e inmunoblot, carriles 4, 5 y 6, para cada caso corresponden a EcFtsZ tipo silvestre, mutante E83Q y R85Q, respectivamente. Las proteínas se purificaron y las bandas se tiñeron con azul de Coomasie. Las bandas del gel de poliacrilamida transferidas a una membrana de nitrocelulosa se detectaron mediante la reacción de “inmunoblotting” con el uso de un anticuerpo policlonal anti-EcFtsZ. Mr, estándar de masa relativa.

una banda mayoritaria que correspondió a EcFtsZ y varias bandas de menor intensidad con una masa molecular relativa menor y mayor a la de EcFtsZ. La estabilidad e integridad estructural de EcFtsZ tipo silvestre y las mutantes se determinó por dicroísmo circular. En la tabla 1 se muestra el contenido de estructura secundaria para EcFtsZ tipo silvestre y las mutantes E83Q y R85Q. Se observa que el contenido de estructura secundaria es similar para las tres proteínas. Esto indica que las mutaciones no introdujeron alteraciones mayores a la estructura secundaria de EcFtsZ.

Polimerización. La influencia de las mutaciones sobre la interacción lateral se evaluó mediante la formación de láminas inducidas por calcio. La polimerización inducida por GTP incrementa la dispersión de luz debida a la formación de una mezcla de polímeros compuestos por protofilamentos, filamentos dobles y a asociaciones de ellos. Esta a su vez vuelve a incrementar con la adición de calcio debido a la formación de láminas. En la figura 4 A se observa que al agregar EcFtsZ tipo silvestre a una solución que contiene GTP, la dispersión de luz aumentó y se mantuvo hasta aproximadamente 17 min y luego disminuyó producto de la despolimerización inducida por la hidrólisis del GTP. La figura 4 A también muestra que al agregar la proteína a una solución que contiene GTP y calcio, la dispersión de luz aumentó aproximadamente cinco veces más respecto a la polimerización en ausencia de calcio y se mantuvo al menos hasta los 30 min. La figura 4 B muestra el mismo protocolo experimental para la mutante E83Q, donde el aumento fue de aproximadamente ocho veces respecto al control sin calcio. Este resultado

Tabla 1. Contenido de estructura secundaria de EcFtsZ tipo silvestre y las mutantes E83Q y R85Q, en presencia y ausencia de GTP y de ZipA^a.

Proteínas	Adición	Hélice alfa	Hebra beta	Vuelta	Azar
WT	-	0,79	0,02	0,07	0,16
E83Q	-	0,78	0,03	0,07	0,16
R85Q	-	0,79	0,02	0,07	0,16
WT	GTP	0,79	0,02	0,07	0,15
E83Q	GTP	0,79	0,02	0,07	0,15
R85Q	GTP	0,79	0,02	0,07	0,15
WT	GTP ZipA	0,79	0,02	0,07	0,15
E83Q	GTP ZipA	0,79	0,02	0,07	0,16
R85Q	GTP ZipA	0,79	0,02	0,07	0,15
ZipA	-	0,42	0,14	0,19	0,25

^a7,5 μ M de EcFtsZ WT, E83Q y R85Q, se incubaron en amortiguador de polimerización con o sin GTP (1 mM) o con GTP más ZipA 7,5 μ M. Los espectros de dicroísmo circular se obtuvieron en las condiciones descritas en Materiales y Métodos. El contenido de estructura secundaria se calculó a partir de estos espectros con el programa Selcon 3 del conjunto de programas CDPro.

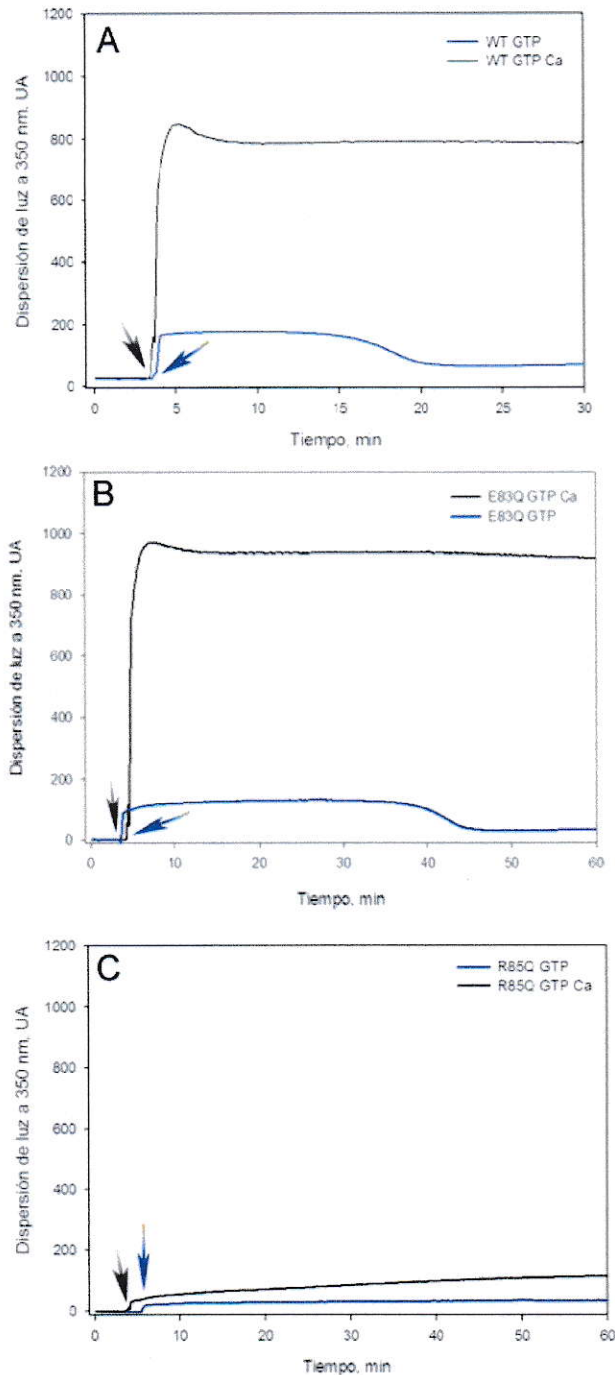


Figura 4. Influencia del calcio sobre la polimerización de EcFtsZ tipo silvestre y las mutantes E83Q y R85Q. Se registró la dispersión de luz a 350 nm de una solución a 30 °C que contenía amortiguador de polimerización y GTP 1 mM (azul) y de otra idéntica con calcio 10 mM (negro). La reacción se inició con la adición de EcFtsZ tipo silvestre (A) y las mutantes E83Q (B) y R85Q (C). Con una flecha se indica la adición de la proteína, cuyo color corresponde a las condiciones de polimerización. Concentración final de proteína, 12 μ M.

indica que la mutación del glutamato 83 por glutamina aumentó la estabilidad de los polímeros y favoreció la polimerización inducida por calcio. Las figuras 4 C y 5 muestran que la mutante R85Q no polimerizó en presencia de GTP, resultado que indica que esta mutación impidió la interacción longitudinal y lateral. Al comparar el efecto del calcio sobre la polimerización de EcFtsZ tipo silvestre y las mutantes se observa que la mutación E83Q favoreció la polimerización con respecto a la del tipo silvestre (figuras 4 A, B y 5).

En la figura 6 se muestra el efecto de la concentración de calcio sobre el máximo de polimerización de EcFtsZ tipo silvestre y las mutantes E83Q y R85Q. Se observa que la dispersión de luz de EcFtsZ tipo silvestre y la mutante E83Q aumentó con el incremento de la concentración de calcio, fenómeno que no se observa para la mutante R85Q. La mutante E83Q mostró una mayor susceptibilidad al calcio que EcFtsZ tipo silvestre entre 3 y 10 mM de calcio.

La morfología de los polímeros inducidos por calcio de EcFtsZ tipo silvestre y de las mutantes se determinó por microscopía electrónica, como se muestra en la figura 7. Se observa que en ausencia de calcio EcFtsZ tipo silvestre y la mutante E83Q formaron polímeros largos y curvos compuestos por varios protofilamentos (figura 7 A y C). La mutante R85Q polimerizó en filamentos cortos, curvos y sin bordes bien definidos (figura 7 F), cabe destacar que se observaron escasos polímeros, por lo que la figura 7F no representa su abundancia. En presencia de calcio (figura 5 B y D) se observa que EcFtsZ tipo silvestre y la mutante E83Q formaron láminas compuestas por protofilamentos

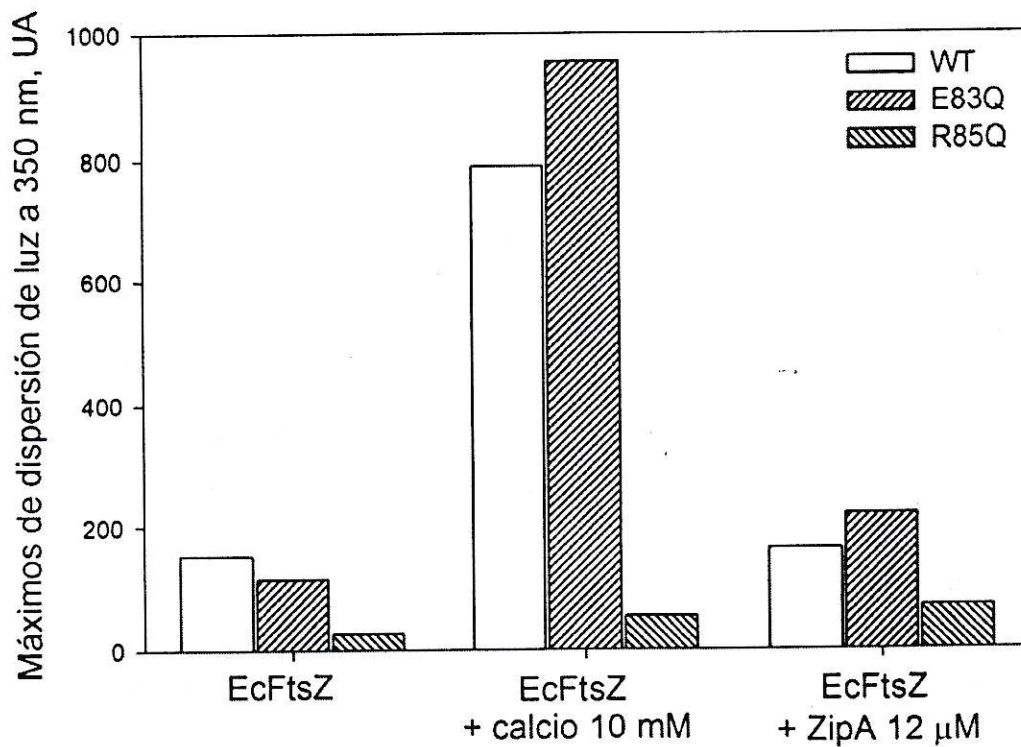


Figura 5. Efecto del calcio y de ZipA sobre la polimerización de EcFtsZ tipo silvestre y las mutantes E83Q y R85Q. Los máximos de dispersión de luz de EcFtsZ tipo silvestre (WT) y las mutantes E83Q y R85Q en el amortiguador de polimerización (EcFtsZ) en presencia de calcio 10 mM (EcFtsZ + calcio 10 mM) o de ZipA (EcFtsZ + ZipA 12 μM) se obtuvieron a partir de las curvas de la figura 4 EcFtsZ y calcio y de la figura 21 para ZipA. Los valores graficados corresponden a la dispersión de luz a los 5 min después agregar EcFtsZ.

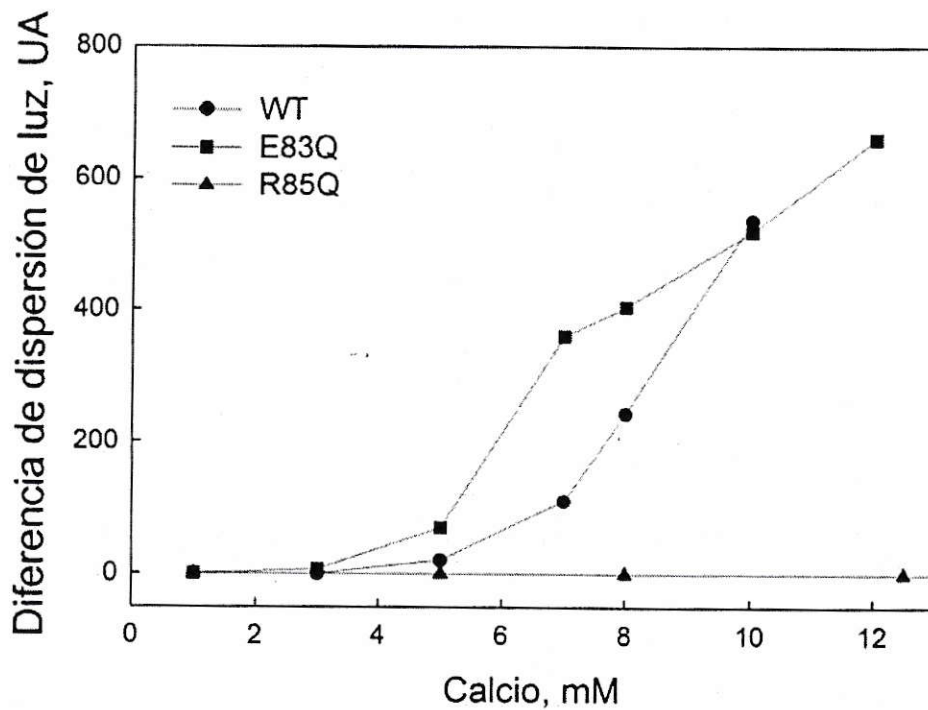


Figura 6. Influencia de la concentración del calcio sobre la polimerización de EcFtsZ tipo silvestre y las mutantes E83Q y R85Q. Se registró la dispersión de luz a 350 nm de una solución a 30 °C que contenía amortiguador de polimerización, GTP 1 mM y proteína 12 μ M. Al cabo de 4 min, la reacción se inició con la adición de concentraciones variables de calcio. La resta entre los valores de la dispersión de luz de la línea base (antes de agregar el calcio) y del máximo luego de agregar el calcio, corresponde a la diferencia de dispersión de luz (eje y)

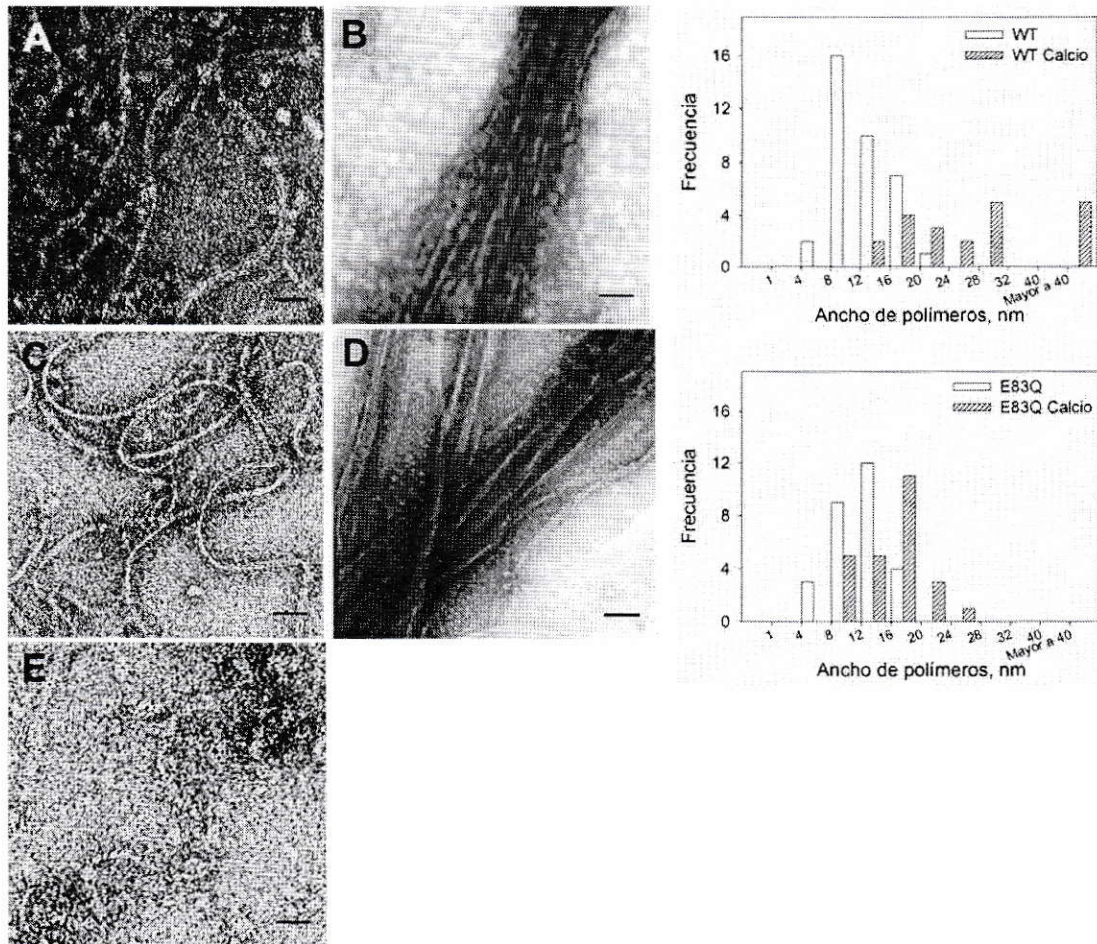


Figura 7. Microscopía electrónica e histograma del ancho de los polímeros de EcFtsZ tipo silvestre y la mutante E83Q. La polimerización de EcFtsZ tipo silvestre (A y B) y las mutante E83Q (C y D) y R85Q (F) 5 μ M, se hizo en amortiguador de polimerización a 30 °C en ausencia (A, C y E) y presencia de calcio 10 mM (B y D). 50 μ L de muestra se pusieron sobre una grilla después de 5 min de inducir la reacción con GTP 1 mM (ver Materiales y Métodos). Barra, 50 nm. Los gráficos de la derecha muestran el ancho de los polímeros en ausencia (barra vacía) y en presencia (barra achurada) de calcio que se determinó mediante el programa ImageJ. El promedio de estos valores se representaron en histogramas.

más rectos. No se observaron láminas de la mutante R85Q (no se muestra). La medida del ancho de los polímeros EcFtsZ tipo silvestre indicó que los filamentos compuestos por dos protofilamentos (8 nm) poseen una mayor frecuencia y los compuestos por 3 y 4 protofilamentos (12 y 16 nm) mostraron una frecuencia menor. Una distribución similar se observó para la mutante E83Q, en donde el polímero más frecuente correspondió al compuesto por 3 protofilamentos (12 nm), seguido de polímeros compuestos 2 protofilamentos (8 nm). El bajo número de polímeros formados a partir de la mutante R85Q y la reducida nitidez de sus bordes no permitieron hacer un análisis poblacional de la frecuencia del ancho de los polímeros.

Los resultados de dispersión de luz y de microscopía electrónica sugieren que la mutación E83Q favorece y estabiliza las interacciones entre los protofilamentos tanto en ausencia como en presencia de calcio. Por el contrario, la mutación R85Q impide la formación de protofilamentos largos y calcio no induce la formación de láminas a partir de los protofilamentos cortos.

1.2. Efecto del calcio sobre la actividad GTPásica de EcFtsZ tipo silvestre y las mutantes E83Q y R85Q. Como se mostró en la figura 4 los polímeros de EcFtsZ tipo silvestre y la mutante E83Q se estabilizaron en presencia de calcio. Se sabe que la despolimerización depende de la hidrólisis de GTP. En la figura 8 se observa que el calcio inhibió la hidrólisis de GTP de EcFtsZ tipo silvestre y de E83Q. También se observa que la mutación R85Q por si sola disminuyó la

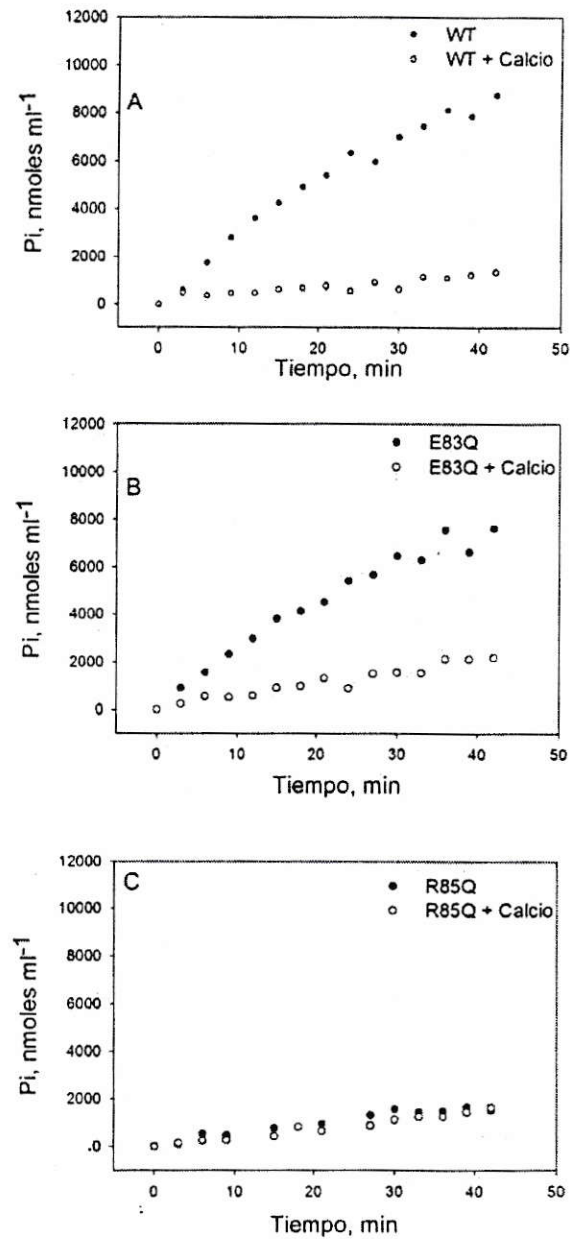


Figura 8. Efecto del calcio sobre la actividad GTPásica de EcFtsZ tipo silvestre y las mutantes E83Q y R85Q. La actividad GTPásica se determinó en amortiguador de polimerización a 30 °C con GTP 1 mM, en presencia (círculo cerrado) y ausencia (círculo abierto) de calcio 10 mM. El contenido de fosfato libre se cuantificó con verde malaquita (Materiales y Métodos). La reacción se inició con la adición de 12 μ M de proteína.

hidrólisis del GTP, por lo que no hay una diferencia mayor en presencia de calcio. En la figura 9 se observa que la velocidad de hidrólisis de la mutante E83Q y R85Q disminuyó aproximadamente a 60 % y a 17 %, respectivamente, con respecto a la de tipo silvestre. Al comparar estos resultados con los de la polimerización por dispersión de luz y microscopía electrónica se sugiere que la mutación E83Q reduce la actividad GTPásica debido a la estabilidad de sus polímeros. Y la mutación R85Q la reduce, pues forma polímeros cortos disminuyendo la formación de los sitios activos para la hidrólisis del GTP.

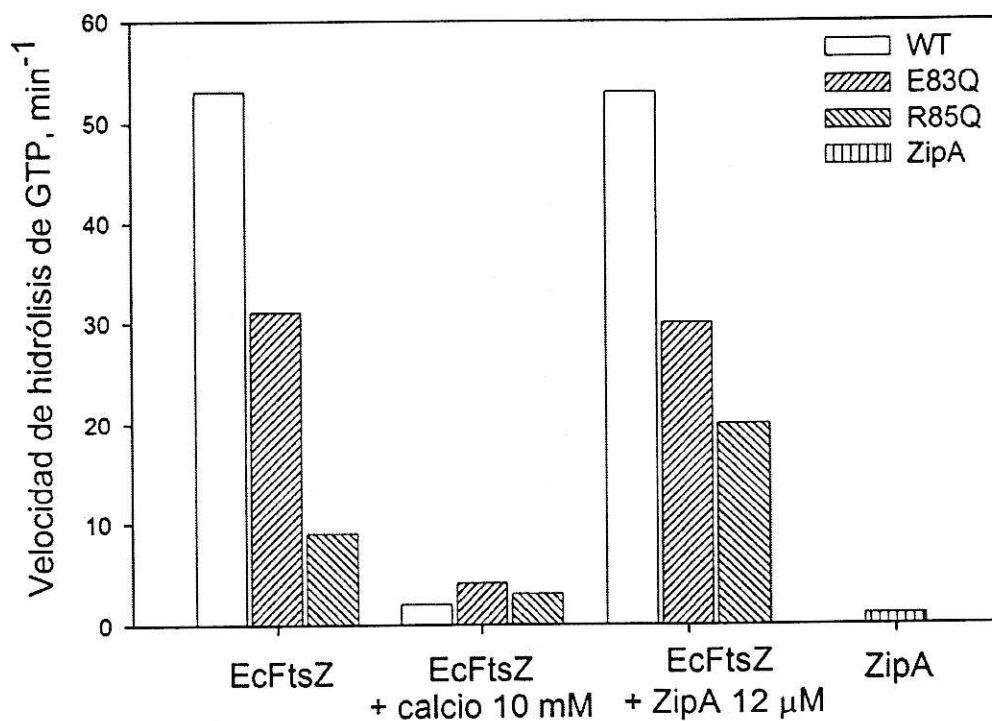


Figura 9. Influencia de calcio y de ZipA sobre la actividad GTPásica de EcFtsZ tipo silvestre y las mutantes E83Q y R85Q. La velocidad de hidrólisis del GTP de EcFtsZ tipo silvestre (WT) y las mutantes E83Q y R85Q se obtuvo de la figura 21. Los datos del efecto de calcio (EcFtsZ + calcio 10 mM) y de ZipA (EcFtsZ + ZipA 12 μM) sobre esta actividad se obtuvieron de la figura 8 y 21, respectivamente.

II. Influencia de glutamato 83 y la arginina 85 de EcFtsZ en la formación del anillo Z. *In vivo*, se desconoce la participación de las interacciones laterales de EcFtsZ para formar el anillo Z. En el capítulo anterior se estableció que el glutamato 83 participa en las interacciones laterales de EcFtsZ responsables de la formación de las láminas y la arginina 85 participa en las interacciones longitudinales para la formación de los protofilamentos largos. Para determinar la relación entre las propiedades *in vitro* de las mutantes y su importancia en la formación del anillo Z, se determinó la localización de E83Q y R85Q en las células. Con este propósito se expresaron y caracterizaron EcFtsZ tipo silvestre y las mutantes como proteínas de fusión con EYFP.

II.1. Caracterización *in vitro* de la proteína de fusión EcFtsZ-EYFP. La proteína EcFtsZ fusionada a la proteína fluorescente EYFP (enhanced yellow fluorescent protein) y a la proteína GFP (green fluorescent protein) se han utilizado para determinar la localización de la EcFtsZ *in vivo* (Chen y Beckwith, 2001). La GFP y la EYFP son proteínas con una alta similitud en la secuencia primaria y casi idénticas a nivel de estructura terciaria, con diferentes propiedades espectroscópicas. La GFP fusionada a EcFtsZ (EcFtsZ-GFP) purificada es capaz de polimerizar *in vitro* en presencia de GTP y calcio induce la formación de láminas y manojos (Yu y Margolin, 1997). En esta tesis se utilizó la EcFtsZ-EYFP, por lo que se evaluó si en esta proteína de fusión se

alteraban las propiedades espectroscópicas de EYFP o la capacidad de polimerización de la EcFtsZ.

Purificación. El gel SDS-PAGE de la figura 10 (carril 2) muestra una banda superior que corresponde al peso molecular de la EcFtsZ-EYFP y una banda inferior que corresponde al de EcFtsZ. Para confirmar la identidad de estas bandas se identificó EcFtsZ con un anticuerpo anti-EcFtsZ. En el carril 3 de la figura 10 se observan dos bandas que reaccionaron con el anticuerpo, las cuales coinciden con las bandas de la proteína de fusión (EcFtsZ-EYFP) y de EcFtsZ del carril 2 de la figura 10. La presencia de la banda inferior correspondería a la expresión basal de la EcFtsZ cromosomal, que co-purifica con la proteína de fusión. La EcFtsZ-EYFP parcialmente purificada mostró un pico máximo de absorbancia a 514 nm y un hombro aproximadamente a 475 nm (figura 11 A). Al ser excitada a 514 nm mostró un pico máximo en 524 nm en el espectro de emisión (figura 11 B). Estos espectros corresponden al espectro característico de la EYFP (Patterson, Day, y Piston, 2001).

Polimerización. La polimerización *in vitro* de EcFtsZWT-EYFP mostró que al agregar GTP, la dispersión de luz aumentó hasta alcanzar un máximo que disminuyó al despolimerizar (figura 12 A). Este proceso se pudo repetir al adicionar nuevamente GTP. Este resultado indica que la polimerización es reversible y depende de la presencia de GTP. Como se mencionó anteriormente, EcFtsZ forma láminas en presencia de calcio, en donde la

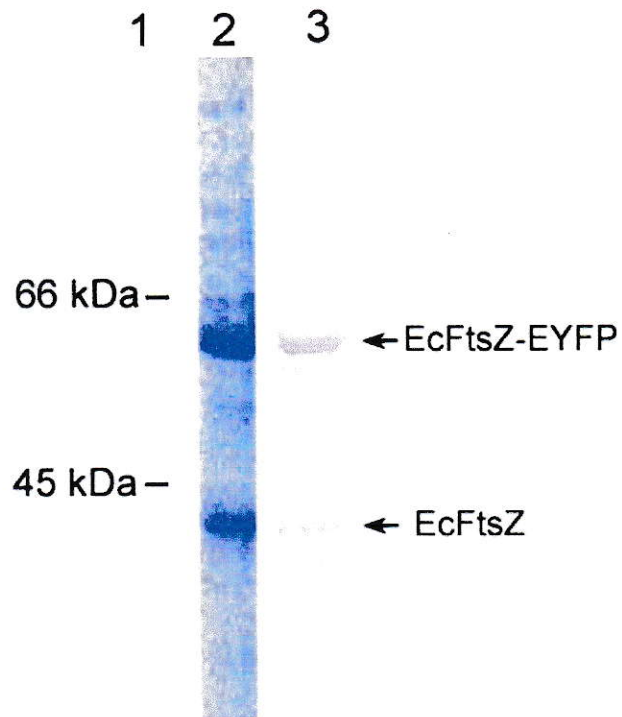


Figura 10. SDS-PAGE e “inmunoblot” de EcFtsZ-EYFP purificada. La proteína purificada se separó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS. En el primer carril se indican los marcadores de masa relativa y en el segundo carril las bandas de proteínas provenientes de la preparación de EcFtsZ-EYFP. En el tercer carril se muestra el “inmunoblot”, con un anticuerpo policlonal anti-EcFtsZ.

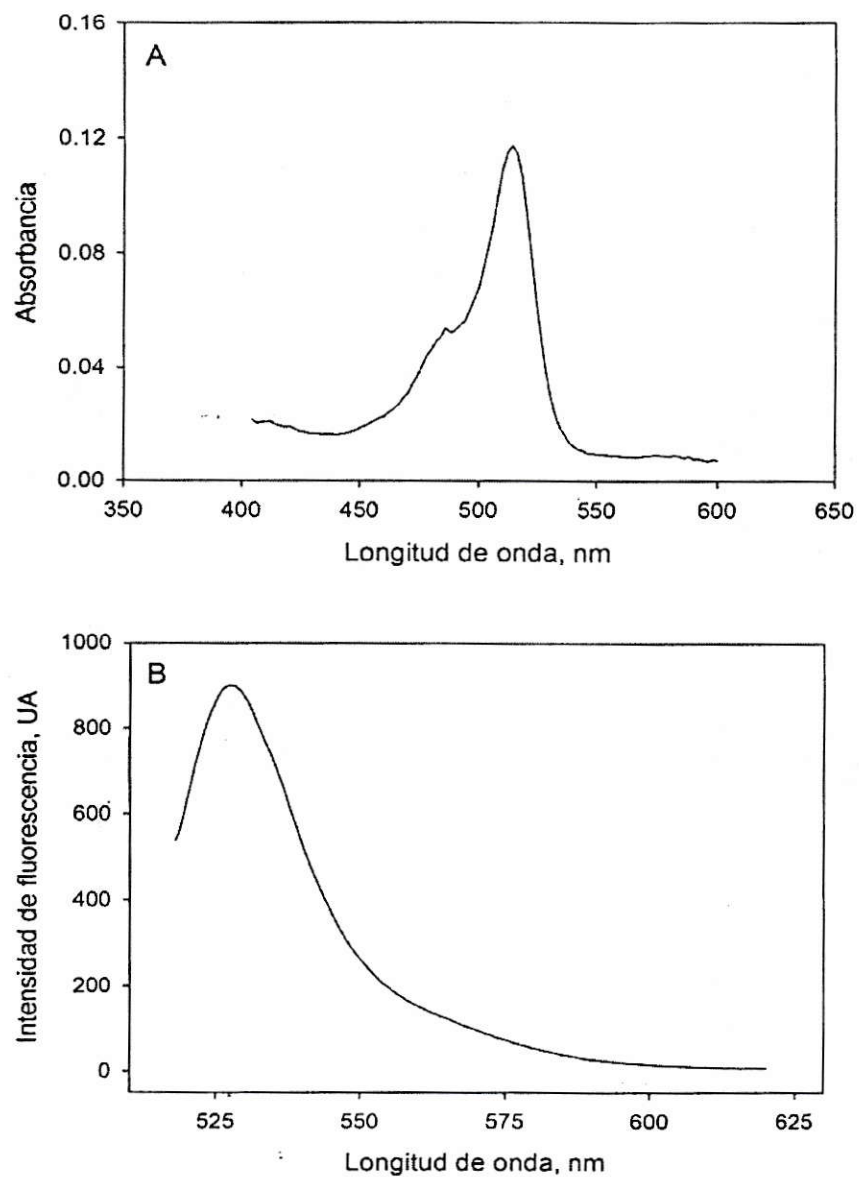


Figura 11. Espectros de absorción y de emisión de fluorescencia de EcFtsZ-EYFP. La muestra de EcFtsZ-EYFP en amortiguador de polimerización se registró el espectro de absorbancia (A), con una excitación a 514 nm, se registró el espectro de emisión (B) en un espectrofluorímetro con un ancho de banda de excitación y de emisión de 5 nm.

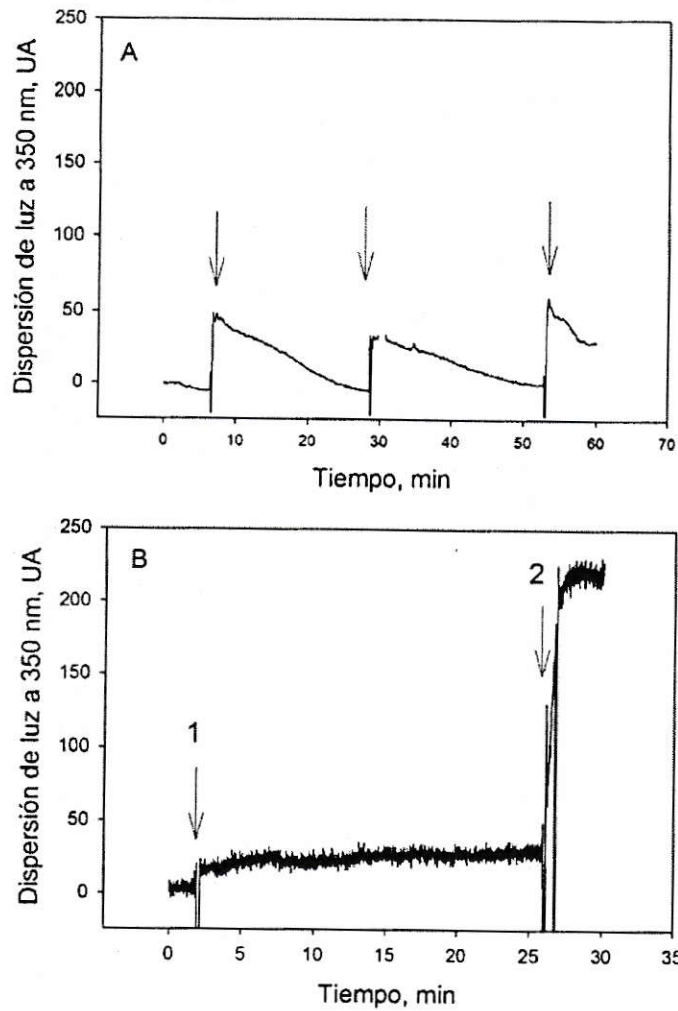


Figura 12. Cinéticas de polimerización y despolimerización de EcFtsZWT-EYFP. (A) dispersión de luz a 350 nm de una muestra que contiene 12 μM de EcFtsZWT-EYFP en amortiguador de polimerización. Las flechas indican el tiempo en que se agregó GTP para alcanzar 1 mM. (B) polimerización de EcFtsZWT-EYFP (5 μM) en amortiguador de polimerización inducida con GTP 1 mM final (flecha 1). En el tiempo indicado por la flecha 2 se adicionó cloruro de calcio 10 mM final.

superficie lateral del extremo carboxilo terminal de los filamentos dobles se asocia. Por lo tanto, para determinar si la fusión de la proteína EYFP al carboxilo terminal de EcFtsZ tipo silvestre alteró su capacidad de formar láminas se evaluó el efecto de calcio sobre la polimerización de la EcFtsZWT-EYFP. En la figura 12 B se observa que la EcFtsZWT-EYFP polimerizada por la adición de GTP, al agregar calcio aumenta su dispersión de luz en al menos 10 veces. Este aumento en la dispersión de luz es característico de la formación de láminas. Por lo tanto, estos resultados indican que en la proteína de fusión (EcFtsZWT-EYFP) no alteran las características funcionales de polimerización de EcFtsZ *in vitro*.

Las proteínas fusionadas con la proteína fluorescente EYFP se expresaron en una cepa que contenía *ftsZ* cromosomal y el anillo Z se visualizó por microscopía confocal. Sin embargo cuando se expresaron las proteínas de fusión para complementar una cepa mutante en *ftsZ*, la viabilidad celular disminuyó, a pesar que *in vitro* las proteínas de fusión polimerizaron. Por esta razón en la cepa mutante en *ftsZ* la localización de la EcFtsZ tipo silvestre y las mutantes E83Q y R85Q (sin la proteína de fusión EYFP) se hicieron mediante inmunofluorescencia.

II.2. Caracterización in vivo de EcFtsZ tipo silvestre y las mutantes E83Q y R85Q fusionada a la proteína fluorescente EYFP. Para determinar el efecto de las mutaciones E83Q y R85Q sobre la formación del anillo Z, se construyeron plásmidos que sobre-expresan estas proteínas mutantes fusionadas con la

proteína EYFP. Cabe hacer notar que hubo expresión de EcFtsZ cromosomal endógena como es habitual en la mayoría de los trabajos de este tipo. La expresión, tanto de la EcFtsZ WT-EYFP como de las mutantes EcFtsZ E83Q-EYFP y R85Q-EYFP produjo células filamentosas (figura 13). Este resultado indica que la división celular está afectada y sugiere que la proteína de fusión EYFP-EcFtsZ bloquea la división celular. Para comprobar, en ausencia de EcFtsZ cromosomal, si EYFP-EcFtsZ es funcional, se evaluó su capacidad de complementar a una cepa mutante en *ftsZ*. Con este propósito, se expresó las proteínas de fusión en células VIP2/pLAR9 que es una cepa que carece de EcFtsZ cromosomal (Pla *et al.*, 1991). El gen de la *ftsZ* cromosomal de estas células se reemplazó por el gen que confiere resistencia a kanamicina. Debido a que esta mutación es letal, la expresión de la EcFtsZ se encuentra complementada mediante un plásmido termo-sensible, pLAR9. La expresión de la EcFtsZ a partir de este plásmido es termosensible, con una temperatura permisiva a 30 °C (se expresa la EcFtsZ desde pLAR9 y la célula sobrevive) y con una temperatura restrictiva a 42 °C (el plásmido no se propaga, EcFtsZ no se expresa y la viabilidad celular disminuye). Los resultados de complementación muestran que a 30 °C, la cepa VIP2/pLAR9 formó colonias hasta una dilución de 10^6 , en tanto que a 42 °C lo hizo hasta una dilución de 10^2 (figura 14), indicando que no hay complementación. Los resultados de complementación con las mutantes E83Q y R85Q fusionadas con la proteína EYFP, muestran resultados similares a los resultados con la proteína silvestre

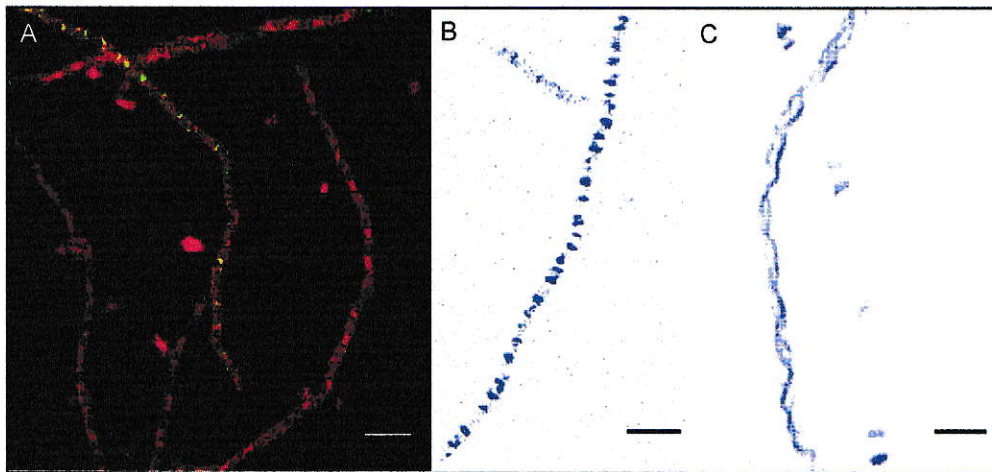


Figura 13. Microscopía confocal de células que expresan la EYFP fusionada con EcFtsZ tipo silvestre y las mutantes E83Q y R85Q. Células que sobre-expresan EcFtsZWT-EYFP, rojo (A), EcFtsZE83Q-EYFP, azul (B) y EcFtsZR85Q-EYFP, azul (C) se crecieron hasta la fase exponencial temprana. 10 μ L de cultivo se colocaron sobre un porta objeto y se observó la fluorescencia mediante un microscopio confocal. Barra 5 μ m.

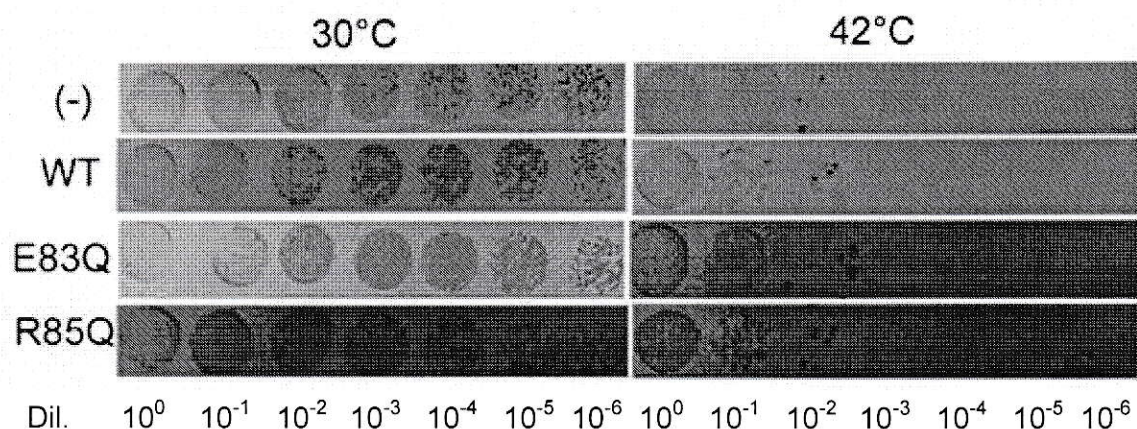


Figura 14. Viabilidad de las células VIP2/pLAR9 complementadas con EcFtsZ tipo silvestre y las mutantes E83Q y R85Q fusionadas con la proteína EYFP. Células transformadas con los plásmidos que sobre-expresan EcFtsZWT-EYFP (WT), EcFtsZE83Q-EYFP (E83Q) y EcFtsZR85Q-EYFP (R85Q) y el control sin plásmido (-), crecidos en medio líquido hasta la fase exponencial temprana a 30°C se diluyeron en serie desde 10⁰ hasta 10⁶ (izquierda a derecha) y se sembraron 10 µl sobre dos placas LB en paralelo con los antibióticos correspondientes (ver Materiales y Métodos), y se incubaron a 30 °C y 42 °C.

fusionada (figura 14). A 42 °C, la viabilidad celular disminuyó al mismo orden que el de la cepa que no expresa la EcFtsZ, control (-). El control de esta cepa, VIP2/pLAR9, complementada con EcFtsZ tipo silvestre restaura totalmente la viabilidad a los 42 °C (Shin, 2003). De esta forma, EcFtsZ tipo silvestre y las mutantes fusionada con la proteína EYFP no complementaron la carencia de EcFtsZ de la cepa VIP2/pLAR9 a 42 °C.

La filamentación observada en la figura 13 indica que cuando se encuentran ambas proteínas, la proteína de fusión y EcFtsZ de origen cromosomal, estas se incorporan en el anillo Z. La velocidad de septación se hace más lenta que la velocidad de elongación de la célula por lo que se observan células filamentosas. A 42 °C, en ausencia de la EcFtsZ cromosomal, las proteínas de fusión no formarían un anillo Z funcional e impediría la división celular bajando la viabilidad celular (figura 14). Se concluyó que la estrategia de utilizar las EcFtsZ fusionadas a la proteína EYFP (la sonda) no permite determinar la localización de EcFtsZ en las células. Por lo tanto, este objetivo se abordó con una estrategia alternativa y la localización de EcFtsZ se visualizó directamente por inmunofluorescencia de la proteína sin fusión. La localización por inmunofluorescencia de EcFtsZ tipo silvestre y las mutantes E83Q y R85Q se hizo en células VIP2/pLAR9 mediante microscopía confocal. Con este propósito esta cepa se transformó con un segundo plásmido que contenía ya sea el gen de EcFtsZ tipo silvestre o el de las mutantes E83Q o R85Q. Para comprobar que a 42 °C, la mayoría de la EcFtsZ expresada en las células correspondía a la proteína introducida por el segundo plásmido, se identificó

cada una de ellas mediante inmunoblot. La figura 15 muestra que EcFtsZ tipo silvestre y las mutantes se expresaron en todas las cepas crecidas a 30 °C y a 42 °C. Se observa que la cepa VIP2/pLAR9 (que se muestra como VIP2/(-) en la figura 15) expresa la EcFtsZ a 30 °C y en muy poca cantidad a 42 °C, resultado esperado para una cepa que contiene solamente el plásmido termo-sensible pLAR9. Esto indica que en células crecidas a 42 °C, se expresa mayoritariamente las EcFtsZ a partir del segundo plásmido, lo que permite evaluar el efecto de la EcFtsZ tipo silvestre o de las mutantes E83Q y R85Q sobre la longitud celular y la localización de la proteína en las células por ensayos inmunofluorescencia.

La tabla 2 muestra los valores de la longitud de las células. Se observa que las células complementadas con EcFtsZ tipo silvestre y las mutantes E83Q y R85Q, crecidas a 30 °C y a 42 °C, presentaron una longitud de células similar. En contraste, la cepa VIP2/pLAR9 sin complementar crecidas a 42 °C produjo células filamentosas producto de la carencia de EcFtsZ.

En la figura 16 se muestra la localización de EcFtsZ tipo silvestre y las mutantes E83Q y R85Q en las células VIP2/pLAR9 a 30 °C y 42 °C. Se observa que todas estas proteínas se localizan como una banda en la mitad de la célula a ambas temperaturas (figura 16 a, a', c, c', d y d'). Las células VIP2/pLAR9 carentes del segundo plásmido (control negativo), a 30 °C también mostraron una banda de proteína en la mitad de la célula (figura 16 b), mientras que a 42 °C, la proteína se encontró dispersa (figura 16 b').

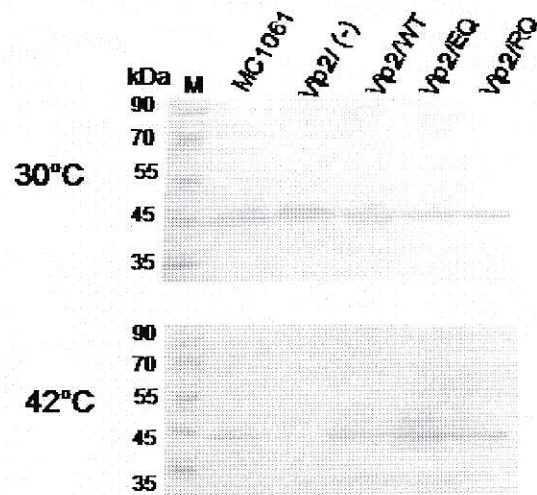


Figura 15. Efecto de la complementación con EcFtsZ tipo silvestre y las mutantes en células VIP2/pLAR9 sobre la expresión de EcFtsZ a 30 °C y 42 °C. Inmunoblot de las proteínas totales, separadas por SDS-PAGE, provenientes de las cepas crecidas a 30 °C y a 42 °C. Las cepas se indican en la parte superior de la membrana de arriba. Carril M, marcador de masa molecular relativa cuyos valores se indican a la izquierda. Carriles MC1061, cepa parental de VIP2/pLAR9; Vip2/(-), cepa VIP2/pLAR9 que contiene el plásmido, pLAR9, termo-sensible a 42 °C; Vip2/WT, Vip2/EQ y Vip2/RQ, corresponden a la cepa VIP2/pLAR9 complementada con la EcFtsZ tipo silvestre y las mutantes E83Q y R85Q, respectivamente.

Tabla 2. Longitud de las células de *E. coli* VIP2/pLAR9 que expresan EcFtsZ tipo silvestre y las mutantes E83Q y R85Q a 30 °C y 42 °C.

Cepa	30°C			42°C		
	^a prom. de long. celular, mm (DS)	^a media	^b n° cel	^a prom. long. celular, mm (DS)	^a media	^b n° cel
VIP2/ WT	4,4 (4,3)	3,6	182	3,5 (1,8)	3,1	356
VIP2/ -	3,5 (1,1)	3,4	264	30,6 (20,4)	25,7	195
VIP2/E83Q	4,5 (2,6)	3,7	239	4,6 (3,6)	3,4	271
VIP2/R85Q	4,1 (2,6)	3,6	248	3,4 (2,4)	2,7	397
MC1061	2,9 (0,6)	2,9	316	2,4 (0,4)	2,4	211

^aSe determinó la longitud (long.) de las células, a partir de los datos mostrados en la figura 12, midiendo desde un polo al otro mediante el programa ImageJ. A partir de estas mediciones se calculó el promedio y su desviación estándar (DS) y la media mediante el programa Excel.

^bNúmero de células analizadas.

WT, EcFtsZ tipo silvestre y MC1061, cepa parental de VIP2/pLAR9.

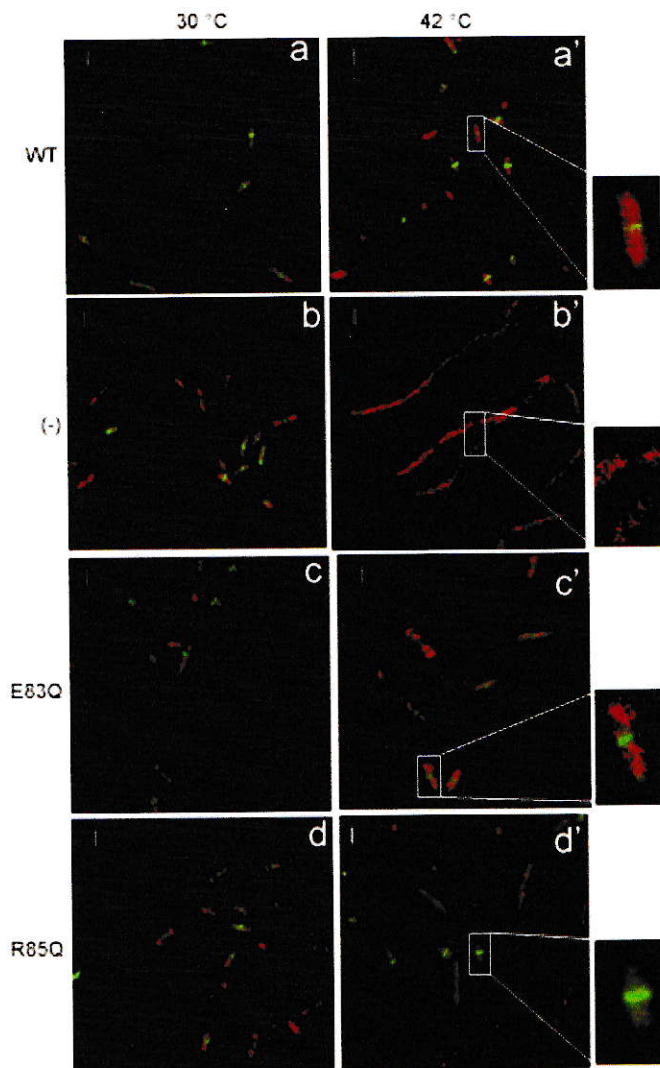


Figura 16. Localización de EcFtsZ tipo silvestre y las mutantes E83Q y R85Q en las células VIP2/pLAR9 crecidas a 30 °C y 42 °C. Localización de EcFtsZ en las células VIP2/pLAR9 complementadas con EcFtsZ tipo silvestre (a y a') y las mutantes E83Q (c y c') y R85Q (d y d') y sin complementar (b y b'), se crecieron a 30 °C (columna izquierda) y a 42 °C (columna derecha). Las proteínas se visualizaron por inmunofluorescencia (verde) con el anticuerpo policlonal anti-EcFtsZ y el DNA se tiñó con DAPI (rojo), ver Materiales y Métodos. Barra, 5 μ m.

En una población de células de crecimiento no sincronizado, estas se encuentran en distintas etapas de división celular, por lo que no todas las células poseen el anillo Z al mismo tiempo. Para analizar la distribución cuantitativa de EcFtsZ tipo silvestre y las mutantes en una población de las células, a partir de las imágenes de inmunofluorescencia se hicieron dos tratamientos. En primer término, la cuantificación de la localización de la banda de EcFtsZ en la mitad de la célula y en segundo lugar, el patrón de distribución de las proteínas a lo largo del eje longitudinal de la célula. Para cuantificar la localización de EcFtsZ tipo silvestre y las mutantes en la mitad de la célula, se calculó la razón del número de bacterias que poseen una banda en la mitad de la célula a 30 °C, dividido por el número de bacterias que lo presentan a 42 °C (tabla 3). Este valor se definió como un parámetro que representa la eficiencia de la incorporación de estas proteínas en el anillo Z y se denominó localización relativa. En la tabla 3 se observa que las células que expresaron EcFtsZ tipo silvestre y las mutantes E83Q y R85Q mostraron una localización relativa similar entre ellas. Esto indica que para la localización del anillo Z, tanto el glutamato 83 como la arginina 85 no son determinantes.

En la figura 17 se muestra la distribución de EcFtsZ a 30 °C y a 42 °C de la célula VIP2/pLAR9 complementadas con EcFtsZ tipo silvestre y las mutantes E83Q y R85Q. A 30 °C, todas las células presentaron una distribución similar mayoritariamente alrededor de la mitad de la célula. A 42 °C, el control sin complementar no mostró un máximo de intensidad de fluorescencia,

Tabla 3. Localización relativa de EcFtsZ y ZipA en células VIP2/pLAR9 complementadas con EcFtsZ tipo silvestre y las mutantes E83Q y R85Q.

Cepas	FtsZ		ZipA		FtsZ	ZipA
	^a 30°C, %	^b 42°C, %	^a 30°C, %	^b 42°C, %	^c LR	^c LR
VIP2/neg	68	ND	50	ND	ND	ND
VIP2/WT	81	67	62	45	0,83	0,73
VIP2/E83Q	68	62	43	31	0,91	0,72
VIP2/R85Q	73	57	58	19	0,78	0,33

^a y ^bPorcentaje de EcFtsZ localizada en la mitad de la célula. Este valor se obtuvo dividiendo el número de células que poseen señal de fluorescencia en la mitad de la célula crecidas a 30 °C(^a) o 42 °C(^b), por el número total de células que presenta alguna señal en la célula.

^cLR (localización relativa) de incorporación de EcFtsZ o ZipA en la mitad de la célula. Se obtuvo dividiendo el porcentaje a 42 °C por el porcentaje a 30 °C.

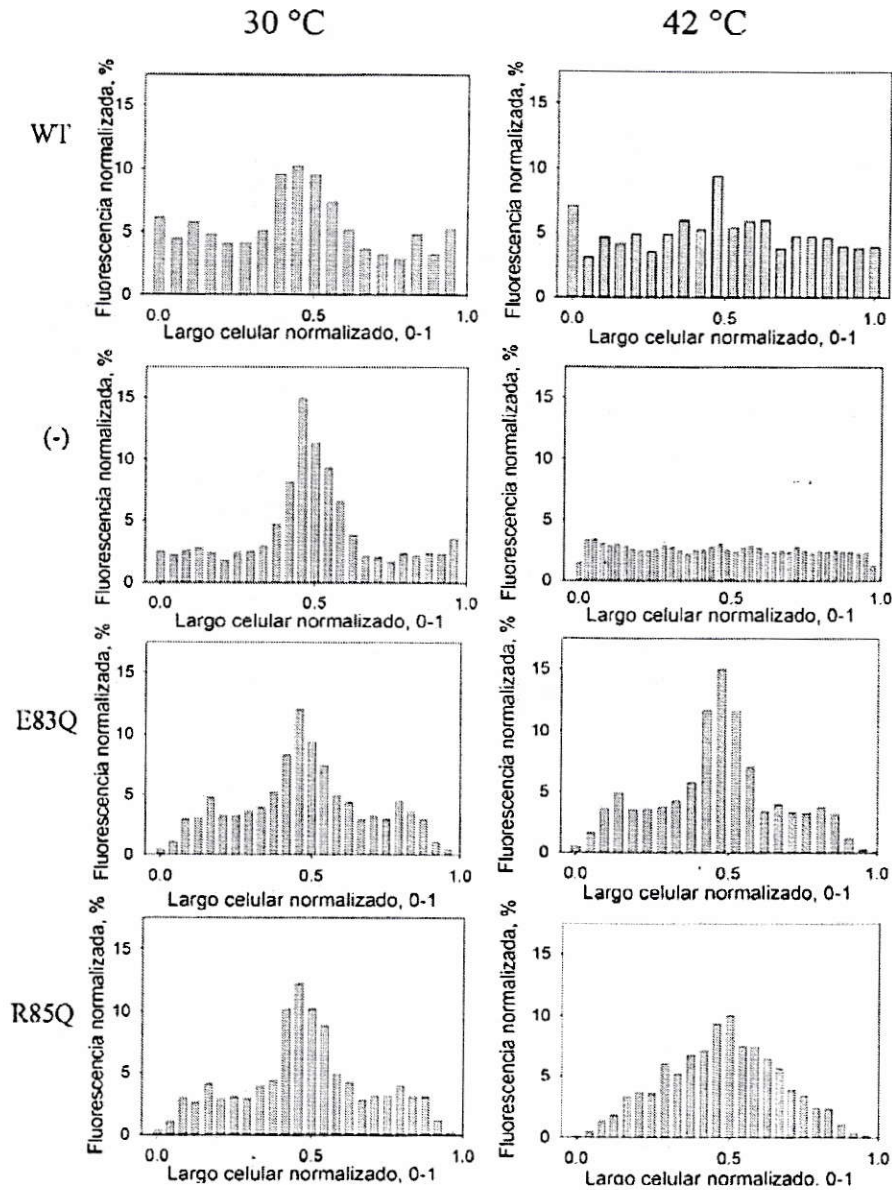


Figura 17. Distribución de EcFtsZ tipo silvestre y las mutantes E83Q y R85Q a lo largo del eje longitudinal de la célula. En las imágenes de las células que se muestran en la figura 13 se trazó un vector entre los polos de la célula y se registró la intensidad de señal de fluorescencia en el vector mediante el programa ImageJ. El largo celular se normalizó entre los valores 0 y 1 mediante un programa desarrollado en nuestro laboratorio. La intensidad normalizada para cada una de las cepas se graficó versus el largo celular normalizado.

producto de la pequeña cantidad de EcFtsZ presente y formación de células filamentosas. La complementación con la proteína tipo silvestre mostró que esta se localizó principalmente en la mitad de la célula a diferencia de las mutantes. La mutante E83Q mostró una distribución similar a su control a 30 °C y la mutante R85Q una distribución más expandida con un máximo en la mitad de la célula. Si comparamos este patrón de distribución con la viabilidad celular para cada uno de los casos ensayados, observamos que la carencia (no se localiza porque no hay) de EcFtsZ, resulta a células no viables. Aunque la distribución de la proteína tipo silvestre fue diferente de su control a 30 °C, no influyó sobre la viabilidad de las células. Sin embargo, la mutante E83Q presentó un patrón de distribución similar a 30 °C y a 42 °C, pero su viabilidad celular fue menor (0,9 %). La mutante R85Q con un patrón de localización más expandido mostró una viabilidad menor (0,1 %).

III. Influencia del glutamato 83 y la arginina 85 de la EcFtsZ sobre el reclutamiento de ZipA en el anillo Z. El ensamblaje del divisoma comprende la formación del proto-anillo en la cara citoplasmática de la membrana interna y el reclutamiento secuencial de las proteínas de membrana que formarán en el espacio periplásmico la maquinaria responsable de la síntesis de la mureína y la septación celular. El proto-anillo es el anillo Z, polímero de EcFtsZ, anclado a la membrana por FtsA y ZipA. El objetivo de este capítulo es determinar la importancia de los aminoácidos E83 y R85 de EcFtsZ en la interacción con ZipA en solución y en proteoliposomas y observar la dependencia de estos aminoácidos para la localización de ZipA en las células.

III.1. Efecto de ZipA sobre la formación in vitro de láminas de EcFtsZ tipo silvestre y las mutantes E83Q y R85Q. En el capítulo II se demostró *in vivo* que EcFtsZ tipo silvestre y las mutantes se localizan en la mitad de la célula y en el capítulo I que la mutación E83Q favorece las interacciones laterales para la asociación de los protofilamentos en láminas y la R85Q anula la interacción para la formación de los protofilamentos largos en presencia de calcio. Se sabe que *in vitro*, ZipA induce la formación de láminas de EcFtsZ tipo silvestre a través de la interacción de los últimos 17 aminoácidos del extremo carboxilo terminal de EcFtsZ con el dominio FBP de ZipA (Mosyak 2000). Con el objeto de comparar las interacciones laterales de las mutantes con las de la proteína

silvestre en los polímeros de EcFtsZ, se determinó el efecto de ZipA en la formación de láminas de estas tres proteínas.

Purificación. Para purificar la proteína ZipA se utilizó esta proteína fusionada en el extremo amino terminal con un péptido de poli-histidina (6His). Para eliminar un posible efecto de este péptido sobre la funcionalidad de ZipA se trató con la proteasa trombina, que es específica para cortar este péptido desde ZipA. En la figura 18 (carril 1) se observa que la proteína ZipA purificada mostró una banda correspondiente al tamaño molecular de 51 kDa, pues esta posee una migración anómala, que no equivale a su peso molecular, pero concuerda con el valor descrito por (RayChaudhuri, 1999). La banda de proteína se reconoció por "inmuno blot" con el anticuerpo anti-ZipA (figura 18, carril 2). En la figura 19 se muestra el cromatograma de los productos de digestión de His6-ZipA con trombina. Se observan dos picos, el primero correspondiente a ZipA sin el péptido 6His y el segundo a la proteína no digerida. Los espectros de dicroísmo circular en el UV lejano (figura 20) mostraron que la proteína sin poli-histidina tenía un contenido menor de estructura secundaria que la proteína no digerida. Por esta razón, se decidió continuar con los experimentos sin eliminar la poli-histidina.

Efecto de ZipA sobre la polimerización y actividad GTPásica de EcFtsZ silvestre y las mutantes E83Q y R85Q. Con este propósito se hicieron dos experimentos en paralelo, en uno se siguió la polimerización por dispersión de luz y en el otro la actividad GTPásica. La figura 21 muestra que al agregar

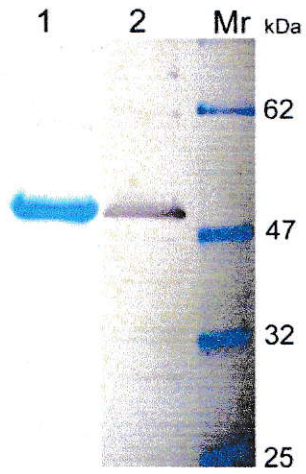


Figura 18. SDS-PAGE e “inmuno blot” de ZipA. SDS-PAGE de la proteína de la última etapa de la purificación, teñida con azul de Coomassie, carril 1. “Inmuno blot” con anticuerpo policlonal anti-ZipA, carril 2. Mr, estándar de masa relativa.

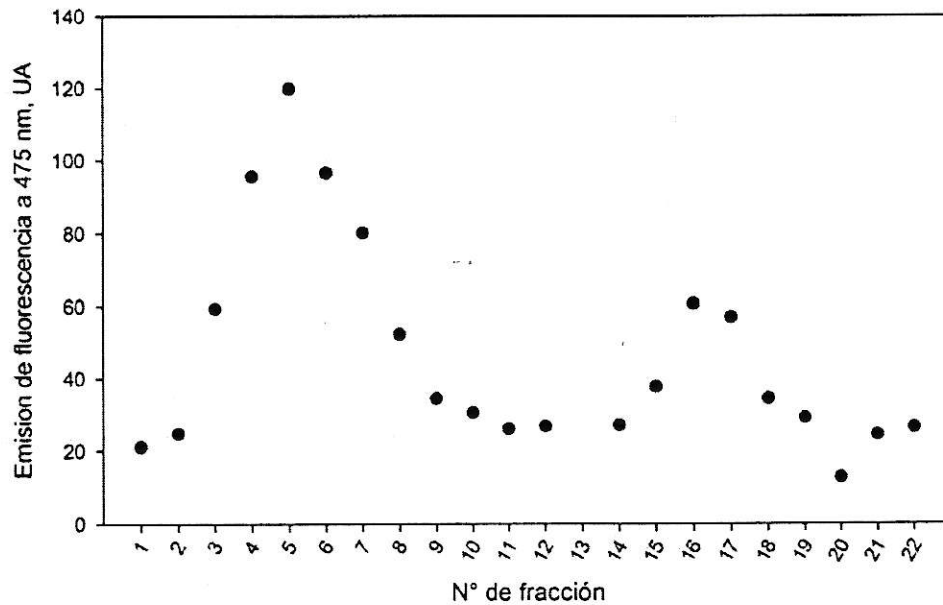


Figura 19. Cromatograma de la elución de His6-ZipA digerida con trombina desde una columna de afinidad de níquel. His6-ZipA digerida con trombina se eluyó desde una columna de níquel con amortiguador sin imidazol (fracciones 1 – 11) y con imidazol 0,5 M (fracciones 12 – 22). Las fracciones se trataron con fluorescamina y se registró la intensidad de emisión a 475 nm.

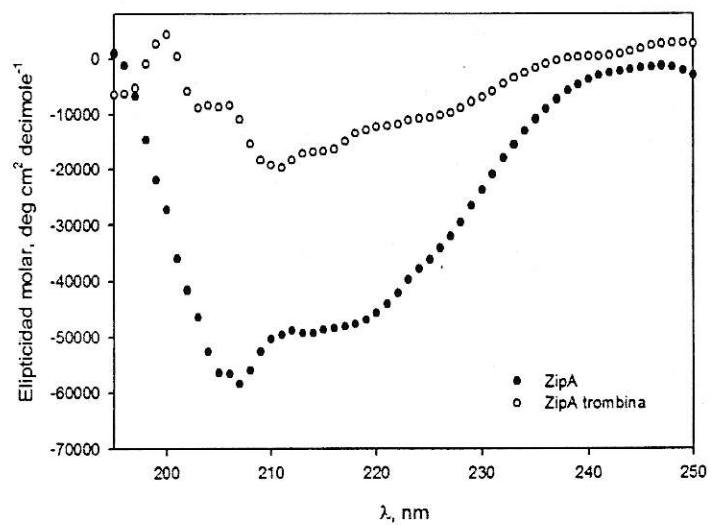


Figura 20. Dicroísmo circular en el UV lejano de His6-ZipA y digerida con trombina. Espectros de His6-ZipA 12 μ M en amortiguador MOPS (círculo lleno) de la proteína digerida con trombina en su medio de reacción (círculo vacío).

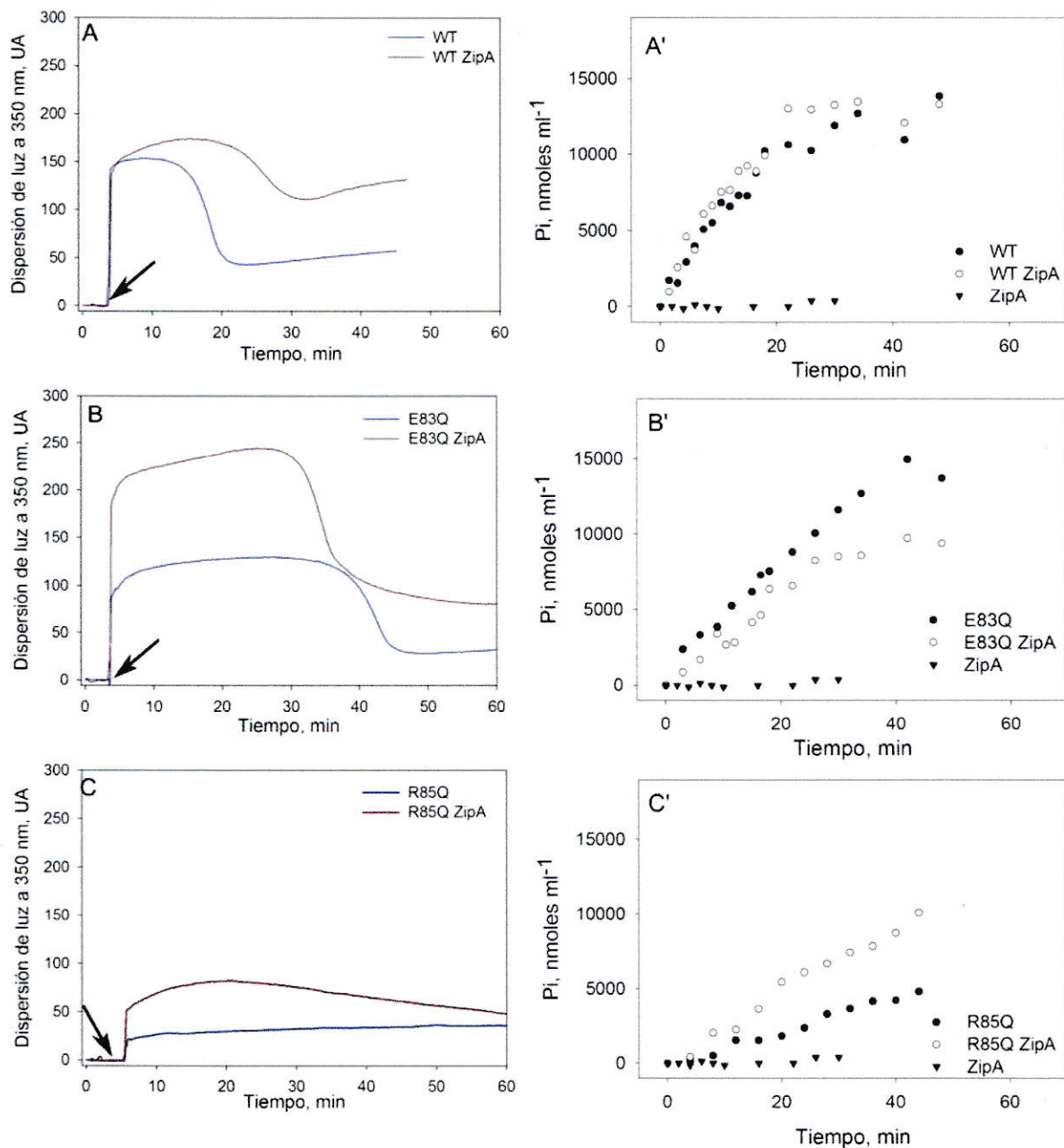


Figura 21. Efecto de ZipA sobre la polimerización y actividad GTPásica de EcFtsZ tipo silvestre y las mutantes E83Q y R85Q. Se registró la dispersión de luz a 350 nm (A, B y C) de una solución a 30 °C que contenía amortiguador de polimerización y GTP 1 mM (azul) y de otra idéntica con ZipA 12 μM (rojo) y se cuantificó el contenido de Pi con verde malquita (A', B' y C'). La reacción se inició con la adición de EcFtsZ tipo silvestre (A y A') y mutantes E83Q (B y B') y R85Q (C y C'). La flecha indica la adición de la proteína, 12 μM.

EcFtsZ tipo silvestre a una solución que contenía ZipA y GTP, la dispersión de luz aumentó hasta alcanzar un máximo igual que su control sin ZipA. Una vez alcanzado el máximo, la dispersión de luz aumentó lentamente con una extensión mayor y la despolimerización se redujo hasta alcanzar una línea base mayor que tendió a incrementar respecto al control sin ZipA. El aumento del valor de la línea base indicaría la presencia de polímeros de ZipA-EcFtsZ-GDP. Esto se sustenta en que la actividad GTPásica es prácticamente nula después de 30 minutos (figura 21 A'). Se observa que la velocidad inicial de hidrólisis de GTP en presencia de ZipA prácticamente no se altera (figura 9). Estos resultados indican que ZipA estabiliza los polímeros de EcFtsZ tipo silvestre de manera independiente a la actividad GTPásica y es responsable del aumento de la extensión de la polimerización.

En la figura 21 B se observa que la dispersión de luz de una solución que contenía ZipA y GTP, al agregar la mutante E83Q, aumentó dos veces respecto al valor del control sin ZipA. Con ZipA, se observó un aumento en la dispersión de luz, la extensión de la polimerización se hizo menor y disminuyó hasta alcanzar un valor mayor que la línea base de su control sin ZipA y continuó decayendo lentamente. Al comparar el máximo de la polimerización de la mutante E83Q con la de la tipo silvestre, se observa que la mutante mostró un mayor aumento en la dispersión de luz en presencia de ZipA (figura 5), lo que indica que la mutante E83Q favorece la polimerización en presencia de ZipA. Además, la extensión de polimerización con y sin ZipA es mayor que la de tipo silvestre, lo que sugiere que los polímeros de la mutante E83Q son más

estables que la de tipo silvestre. La figura 21 B' muestra que la actividad GTPásica no se afecta en presencia de ZipA (figura 9). Al comparar las velocidades de hidrólisis de la mutante E83Q con la de la tipo silvestre se observa una disminución aproximadamente a la mitad. Esto explica la mayor extensión en el estado polimerizado de la mutante. La figura 21 C muestra que la pequeña dispersión de luz de la mutante R85Q incrementó en dos veces en presencia de ZipA con respecto a su control. Este, luego de alcanzar un máximo, disminuyó lentamente tendiendo a llegar al valor del control sin ZipA. La figura 21 C' muestra que ZipA incrementó 2,1 veces la velocidad inicial de hidrólisis del GTP de la mutante, con respecto a su control sin ZipA (figura 9). Cabe hacer notar que la actividad de esta última mutante es 5,4 veces menor que la de la tipo silvestre en ausencia de ZipA. Estos resultados indican que la polimerización en protofilamentos cortos de la mutante R85Q (figura 7 F) es responsable de una reducida actividad GTPásica y que ZipA induce la interacción longitudinal (formación de sitio de hidrólisis del GTP), pues en su presencia se incrementa la reducida actividad GTPásica (figura 9) y de polimerización (figura 5).

En la figura 22 se muestra la sedimentación de ZipA en presencia de polímeros de EcFtsZ tipo silvestre y las mutantes E83Q y R85Q. Se observa que ZipA se distribuye tanto en la fracción soluble y precipitada. Pero en presencia de EcFtsZ tipo silvestre o las mutantes, ZipA co-sedimenta con ellas y se encuentra mayoritariamente en la fracción precipitada. Este resultado

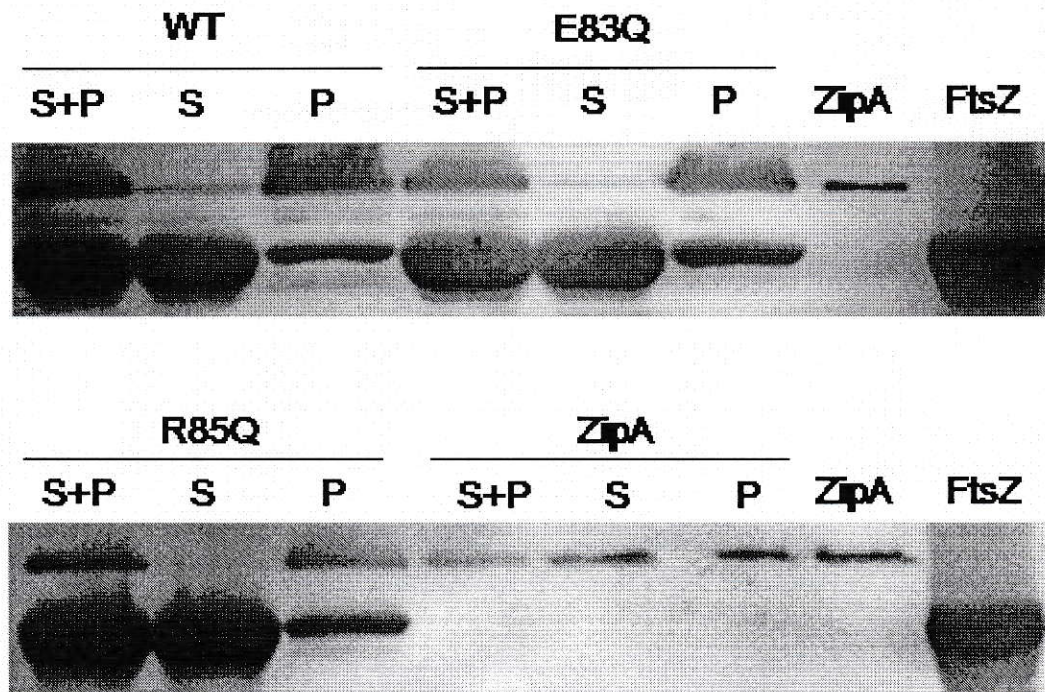


Figura 22. Co-sedimentación de ZipA inducida por EcFtsZ tipo silvestre y las mutantes E83Q y R85Q. El ensayo de polimerización a 30 °C en amortiguador de polimerización a 30 °C con GTP 1 mM, se incubó 5 minutos con EcFtsZ tipo silvestre (WT) y las mutantes E83Q (E83Q) y R85Q (R85Q) 12 μ M. La reacción se inició con ZipA 12 μ M, y las muestras se colectaron después de centrifugar 15 min. Las muestras antes (S+P) y después de centrifugar (S, sobrenadante y P, precipitado) se separaron por SDS-PAGE y las bandas correspondientes a las proteínas EcFtsZ tipo silvestre y las mutantes se reconocieron con anticuerpos policlonales para las respectivas proteínas (Materiales y Métodos).

sugiere que la ZipA interactúa tanto con EcFtsZ tipo silvestre como con las mutantes.

La morfología de los polímeros de EcFtsZ tipo silvestre y de las mutantes E83Q y R85Q inducidos con ZipA se determinó por microscopía electrónica. En la figura 23 C y a mayor aumento en la figura 23 D, se observa que ZipA indujo la formación de una mezcla de filamentos y láminas a partir de los polímeros de EcFtsZ tipo silvestre inducidos por GTP. El control sin GTP (figura 23 B) muestra más bien agregados amorfos y ZipA con GTP no forma polímeros (figura 23 A). En las muestras tomadas a tiempos más largos de despolimerización, una vez estabilizada la dispersión de luz, se observaron agregados amorfos similares al de la figura 23 B. Las láminas de E83Q inducidas con ZipA son más anchas y menos definidas (figura 23 E). La mutante R85Q no formó láminas en presencia de ZipA (figura 23 F).

Estos resultados en su conjunto indican que ZipA solo induce la formación de manojos de polímeros que contienen GTP y que la mutante E83Q forma láminas más anchas y estables que los de la proteína silvestre. La ausencia de polímeros de la mutante R85Q no favorece la formación de láminas y solo produce un pequeño aumento de protofilamento responsable del aumento de la actividad GTPásica.

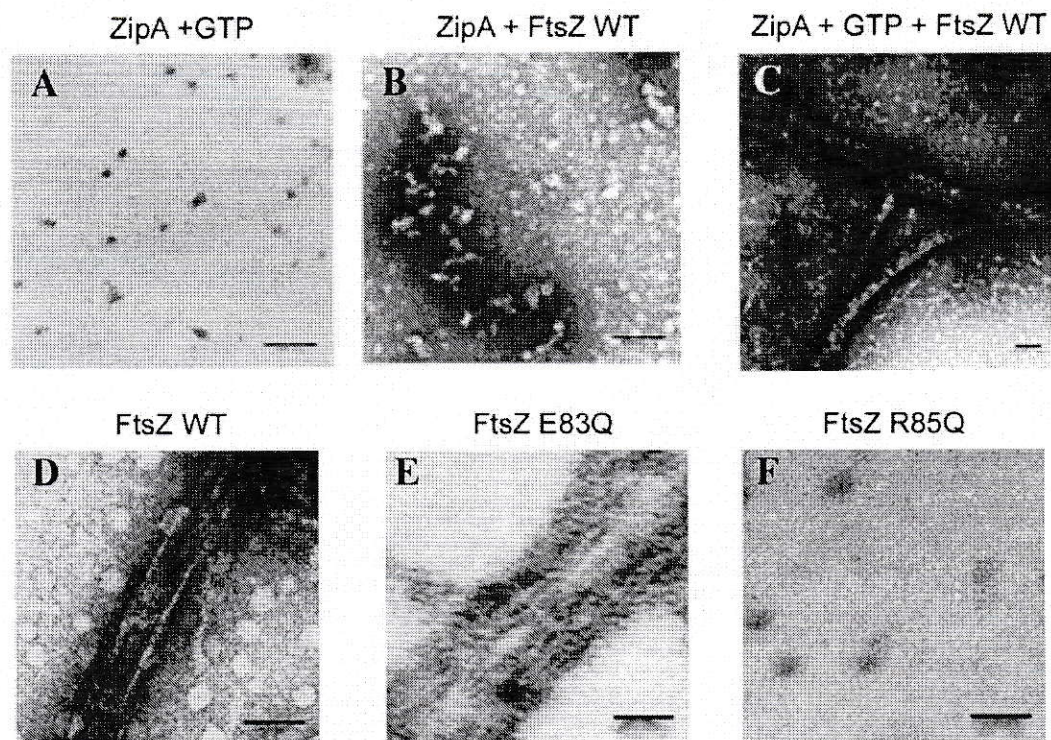


Figura 23. Microscopía electrónica de los polímeros de EcFtsZ tipo silvestre y las mutantes E83Q y R85Q en presencia de ZipA. La polimerización a 30 °C de EcFtsZ tipo silvestre (C y D) y las mutantes E83Q (E) y R85Q (F), se hizo en amortiguador de polimerización que contenía GTP 1 mM. (B) control EcFtsZ silvestre sin GTP. Concentración de proteína 5 μ M. Después de 5 minutos de agregar ZipA 5 μ M, se tomaron las muestras (Materiales y Métodos). Barra de las figuras A, B y C, 100 nm. Barra de las figuras D, E y F, 50 nm.

III.2. Efecto de las mutaciones E83Q y R85Q de EcFtsZ sobre su interacción con ZipA unida a liposomas. La ZipA es una proteína que se une a la membrana citoplasmática de *E. coli* por su extremo amino terminal y co-localiza en la mitad de las células con el anillo Z. Esto indica que EcFtsZ interactúa con ZipA en la membrana, lo que no ha sido demostrado. En III.1 se demostró que ZipA libre en solución induce las interacciones laterales de EcFtsZ en solución. Para determinar el efecto de ZipA anclada en una membrana de lípidos, sobre la interacción con EcFtsZ tipo silvestre y las mutantes E83Q y R85Q en presencia de GTP se hizo experimento de sedimentación y de dispersión de luz en proteoliposomas (ZipA unida a liposomas).

Con el fin de determinar la interacción de ZipA en los proteoliposomas con EcFtsZ tipo silvestre y las mutantes E83Q y R85Q, se sedimentaron los proteoliposomas en presencia de estas proteínas. Como control se utilizó una solución con liposomas que se trató de la misma manera. En la figura 24 se muestra el contenido de ZipA y de EcFtsZ tipo silvestre y las mutantes en los proteoliposomas (precipitado) y en solución en una condición de no polimerización al separar las proteínas por SDS-PAGE. Se observa solo EcFtsZ tipo silvestre en la solución en presencia de liposomas. En los proteoliposomas, EcFtsZ tipo silvestre y las mutantes E83Q y R85Q se distribuyeron en el sobrenadante y en el precipitado. También se observa que ZipA en presencia de EcFtsZ tipo silvestre y la mutante E83Q solo se encontró en el precipitado,

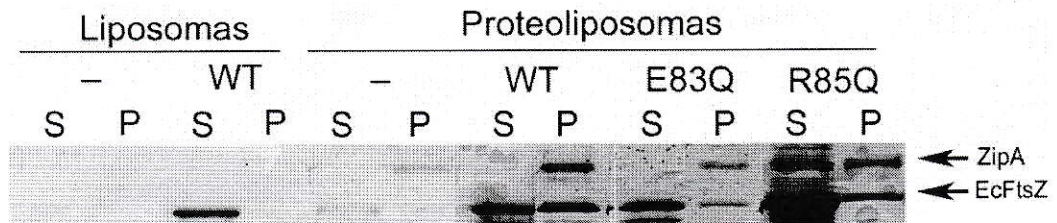


Figura 24. Interacción de EcFtsZ tipo silvestre y las mutantes E83Q y R85Q en proteoliposomas de ZipA y en una solución de liposomas en una condición de no polimerización. EcFtsZ tipo silvestre (WT) o la mutante E83Q (E83Q) o R85Q (R85Q) o sin EcFtsZ (-) en amortiguador fosfato pH 7,0 sin GTP se incubó a 30 °C con liposomas o proteoliposomas de ZipA. Las muestras se centrifugaron y las proteínas del sobrenadante (S) y del precipitado (P) se separaron por SDS-PAGE y las bandas se tiñeron con plata.

sin embargo, en presencia de la mutante R85Q se distribuyó en el sobrenadante y en el precipitado. Los resultados indican que EcFtsZ tipo silvestre y las mutantes E83Q y R85Q interactúan con ZipA de los proteoliposomas en una condición en donde la interacción entre EcFtsZ se encuentra desfavorecida. En la figura 25 A se observa que en amortiguador de polimerización con y sin GTP en presencia de liposomas, EcFtsZ tipo silvestre solo se encuentra en el sobrenadante. Sin embargo, en presencia de los proteoliposomas, con y sin GTP, EcFtsZ tipo silvestre se distribuye tanto en el sobrenadante como en el precipitado (figura 25 B). La distribución de las mutantes E83Q y R85Q en los liposomas, con y sin GTP, muestra que las mutantes se encuentran mayoritariamente en el sobrenadante, donde se visualiza una intensidad de la banda de EcFtsZ similar al de la muestra antes de centrifugar (SP), y una fracción menor en el precipitado (figura 25 A). En presencia de los proteoliposomas, con y sin GTP, ambas mutantes se distribuyen en el sobrenadante y en el precipitado. Además, se observa que para las tres proteínas ensayadas la presencia o ausencia de GTP no altera la co-sedimentación de EcFtsZ con los proteoliposomas. Como control de la presencia de ZipA en los proteoliposomas se observa la banda de esta proteína en todos los precipitados para todas las EcFtsZ ensayadas en presencia y ausencia de GTP (figura 25 C). Los resultados en su conjunto indican que ZipA en los proteoliposomas interactúa con EcFtsZ tipo silvestre y las mutantes E83Q y R85Q y que esta unión es independiente del estado de polimerización de EcFtsZ.

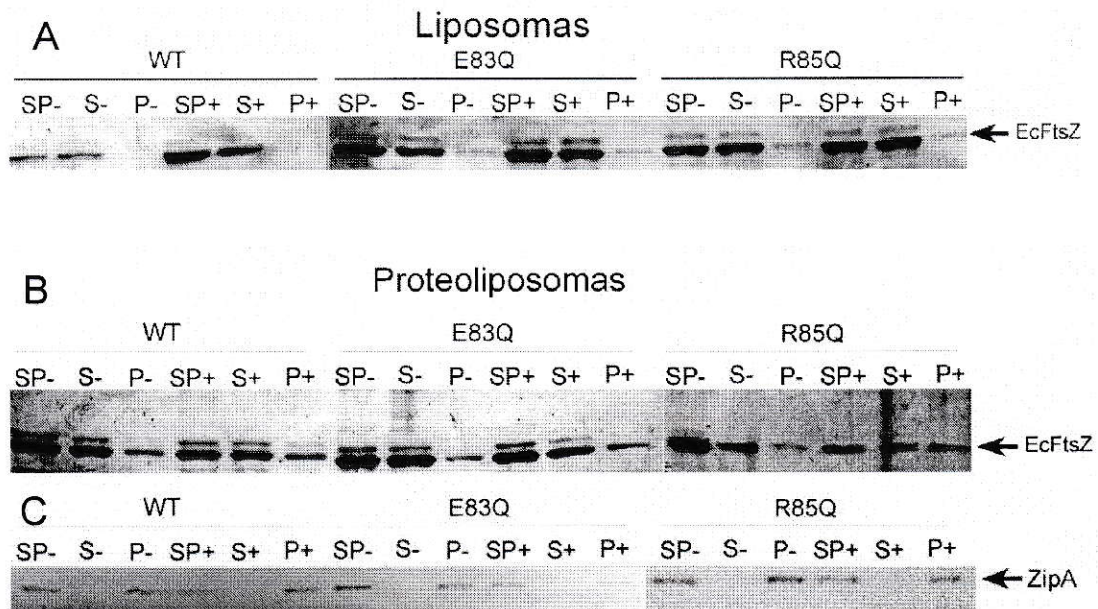


Figura 25. Interacción de EcFtsZ tipo silvestre y las mutantes E83Q y R85Q en proteoliposomas de ZipA y en una solución de liposomas. EcFtsZ tipo silvestre (WT) o la mutante E83Q (E83Q) o R85Q (R85Q) en el amortiguador de polimerización a pH 6,5 se incubó a 30 °C con liposomas (A) o proteoliposomas de ZipA (B y C). Las muestras (SP) se centrifugaron y las proteínas del sobrenadante (S) y del precipitado (P) se separaron por SDS-PAGE y las bandas se tiñeron con plata (A y B) o se detectaron por inmunoblot con anticuerpo policlonal anti-ZipA (C). Los signos “+” o “-” a la derecha de SP, S y P, indican la presencia o ausencia de GTP 2 mM, respectivamente.

Se demostró que ZipA interactúa con cada una de las tres EcFtsZ en solución y en proteoliposomas. En solución el efecto de ZipA sobre el incremento de la polimerización de EcFtsZ mutantes E83Q y R85Q se hizo mayor que el de tipo silvestre (figura 5). Con el propósito de determinar el efecto de ZipA de los proteoliposomas sobre la polimerización de EcFtsZ tipo silvestre y las mutantes E83Q y R85Q se hicieron ensayos de dispersión de luz. En la tabla 4 se observa que para EcFtsZ tipo silvestre y las mutantes, el incremento de la dispersión de luz en presencia de los proteoliposomas es menor que el incremento de dispersión de luz en presencia de los liposomas. Esto indica que la cantidad de los polímeros libres en solución (no adheridas sobre los proteoliposomas) disminuye en presencia de proteoliposomas. Al comparar los incrementos de dispersión de luz entre liposomas y solución (Δ liposomas), la razón entre ambos son menores que la unidad para las tres proteínas. Por esta razón se utilizó estos valores (Δ liposomas) como control para evaluar el efecto de ZipA de los proteoliposomas. El incremento de dispersión de luz de las mutantes en presencia de los proteoliposomas es menor que el de la EcFtsZ tipo silvestre, lo que indica que la interacción de las mutantes en los proteoliposomas es más favorable que la de EcFtsZ tipo silvestre. Este resultado sugiere que las mutantes polimerizan adheridas a los proteoliposomas.

Tabla 4. Influencia de los proteoliposomas y liposomas sobre la dispersión de luz de polímeros en solución de EcFtsZ tipo silvestre y las mutantes E83Q y R85Q inducidos por ZipA.

EcFtsZ	^a Incremento de dispersión de luz de la polimerización	
	Δ Proteoliposomas	Δ Liposomas
WT	146 (0,6 ^b)	230 (0,8 ^c)
E83Q	58 (0,2 ^b)	286 (0,5 ^c)
R85Q	22 (0,2 ^b)	130 (0,6 ^c)

^aDiferencia entre la línea base y el máximo de dispersión de luz al agregar EcFtsZ tipo silvestre o las mutantes E83Q o R85Q a una solución que contiene GTP 1 mM y proteoliposomas o liposomas.

^b Δ proteoliposomas/ Δ liposomas.

^c Δ liposomas/ Δ solución, no se incluye el valor de Δ solución.

III.3. Efecto de las mutaciones E83Q y R85Q de EcFtsZ sobre la localización de ZipA en la célula. La localización de ZipA en el sitio de la división celular depende de la presencia del anillo Z y se piensa que la interacción del dominio carboxilo de la EcFtsZ con el dominio FBP de la ZipA confiere estabilidad al anillo Z y lo ancla a la membrana (Erickson, 2001). Las mutaciones E83Q y R85Q se encuentran sobre la superficie del dominio amino, en el lado opuesto se encuentra la superficie de interacción con la ZipA, por lo cual es poco probable que se interfieran. Se demostró que *in vitro* la mutante E83Q forma láminas inducidas por la ZipA mientras que la mutante R85Q no las forma debido a la baja cantidad de protofilamentos y dobles filamentos. *In vivo* ambas mutantes se localizan en la mitad de la célula con un patrón de distribución diferente (capítulo II). Estos resultados indican que ZipA se reclutaría en forma proporcional a la cantidad de EcFtsZ que se encuentra en la mitad de la célula, así una mutación que altera la formación del anillo debiera disminuir la cantidad de ZipA reclutada en la mitad de la célula. Para demostrar esta hipótesis se determinó la localización de ZipA en células VIP2/pLAR9 complementadas con EcFtsZ tipo silvestre y las mutantes E83Q y R85Q.

En la figura 26 se observa que ZipA cromosomal se expresa en todas las cepas ensayadas. En la figura 27 a, b c y d, se observa que a 30 °C, en las células que expresan EcFtsZ tipo silvestre, las mutantes E83Q y R85Q y el control sin complementar, ZipA se localizó en la mitad de la célula. A 42 °C, las células VIP2/pLAR9 sin complementar muestran que ZipA se localizó en varios

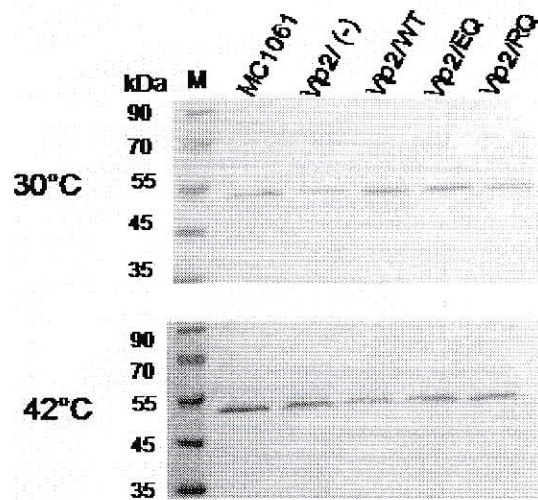


Figura 26. Efecto de la complementación con EcFtsZ tipo silvestre y las mutantes sobre la expresión de ZipA en células VIP2/pLAR9 crecidas a 30 °C y a 42°C. “Inmuno blot” de las proteínas totales, separadas por SDS-PAGE, provenientes de las cepas crecidas a 30 °C y a 42 °C. Las cepas se indican en la parte superior de la figura. Carril M, marcador de masa molecular relativa cuyos valores se indican a la izquierda. MC1061, cepa parental de VIP2/pLAR9; Vip2/(-), cepa VIP2/pLAR9 que contiene el plásmido, pLAR9, termo-sensible a 42 °C; Vip2/WT, Vip2/EQ y Vip2/RQ, corresponden a la cepa VIP2/pLAR9 complementada con la EcFtsZ tipo silvestre y las mutantes E83Q y R85Q, respectivamente.

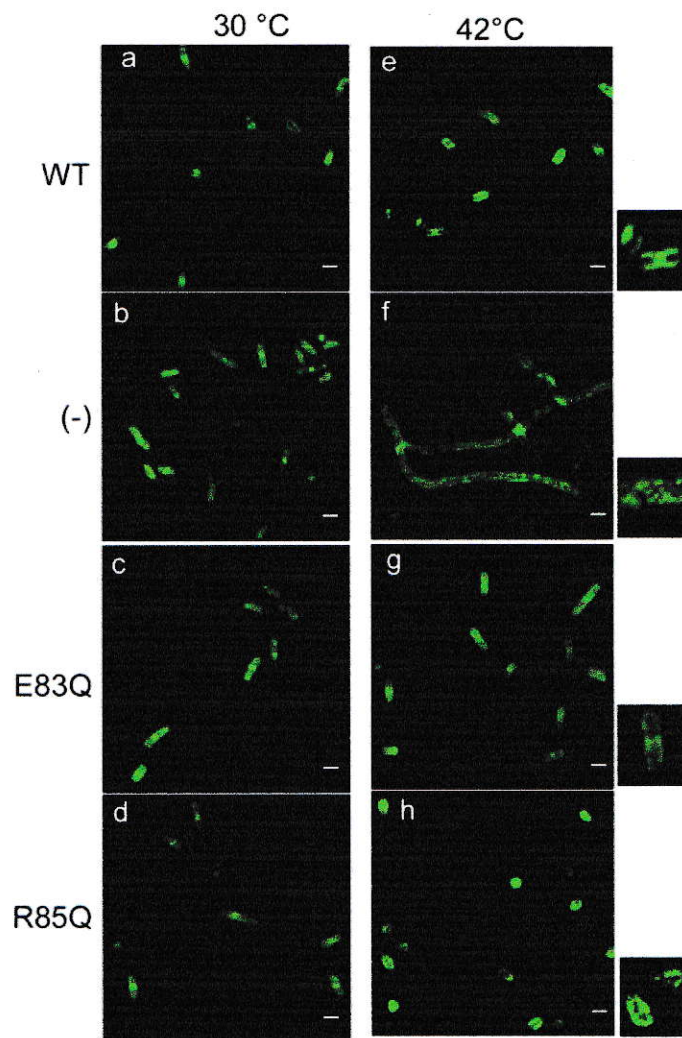


Figura 27. Localización de ZipA en las células VIP2/pLAR9 que expresan EcFtsZ tipo silvestre o las mutantes E83Q o R85Q. Localización de ZipA en las células VIP2/pLAR9 sin complementar (b y f). En células complementadas con EcFtsZ tipo silvestre (a y e), con las mutantes E83Q (c y g) y R85Q (d y h). Estas células se crecieron a 30 °C (columna izquierda) o a 42 °C (columna derecha) y la proteína ZipA se visualizó por inmunofluorescencia con el primer anticuerpo policlonal anti-ZipA y un anticuerpo secundario conjugado con Alexa 488 (verde).

puntos (figura 27 f). La expresión de EcFtsZ tipo silvestre, localizó a ZipA en la mitad de la célula, de manera similar a lo observado a 30 °C. Este resultado confirmó que la localización de ZipA es dependiente de la presencia de EcFtsZ. Las células complementadas con la mutante E83Q a 42 °C, mostraron que ZipA se localiza en la mitad de manera similar a las células que expresan la proteína tipo silvestre (figura 27 g). Sin embargo, la complementación con la mutante R85Q a 42°C, disminuyó el número de células con ZipA localizada en la mitad de las células, figura 27 h.

En la tabla 3 se muestran los valores de la localización relativa de ZipA en la mitad de la célula que expresan EcFtsZ tipo silvestre y las mutantes E83Q y R85Q. Las células que expresan EcFtsZ tipo silvestre mostraron un valor de 0,73 (100 %), las células que expresan la mutante E83Q un valor de 0,72 (99 %) y las que expresan la mutante R85Q un valor de 0,33 (45 %). Esto indica que el anillo Z formado por la R85Q es ineficiente para localizar la ZipA en la mitad de la célula, lugar de septación celular.

En la figura 28 se muestra el patrón de distribución de ZipA a 30 °C y a 42 °C, cuando las células se complementan con EcFtsZ tipo silvestre y las mutantes E83Q y R85Q. A 30 °C, en todos los casos se observó una distribución similar en la mitad de la célula que aumentó cerca de los extremos en el control (-) y en las mutantes. A 42 °C, en el control sin complementar, no se observó una localización preferencial de ZipA. Estas células al ser complementadas con la EcFtsZ tipo silvestre mostraron una localización

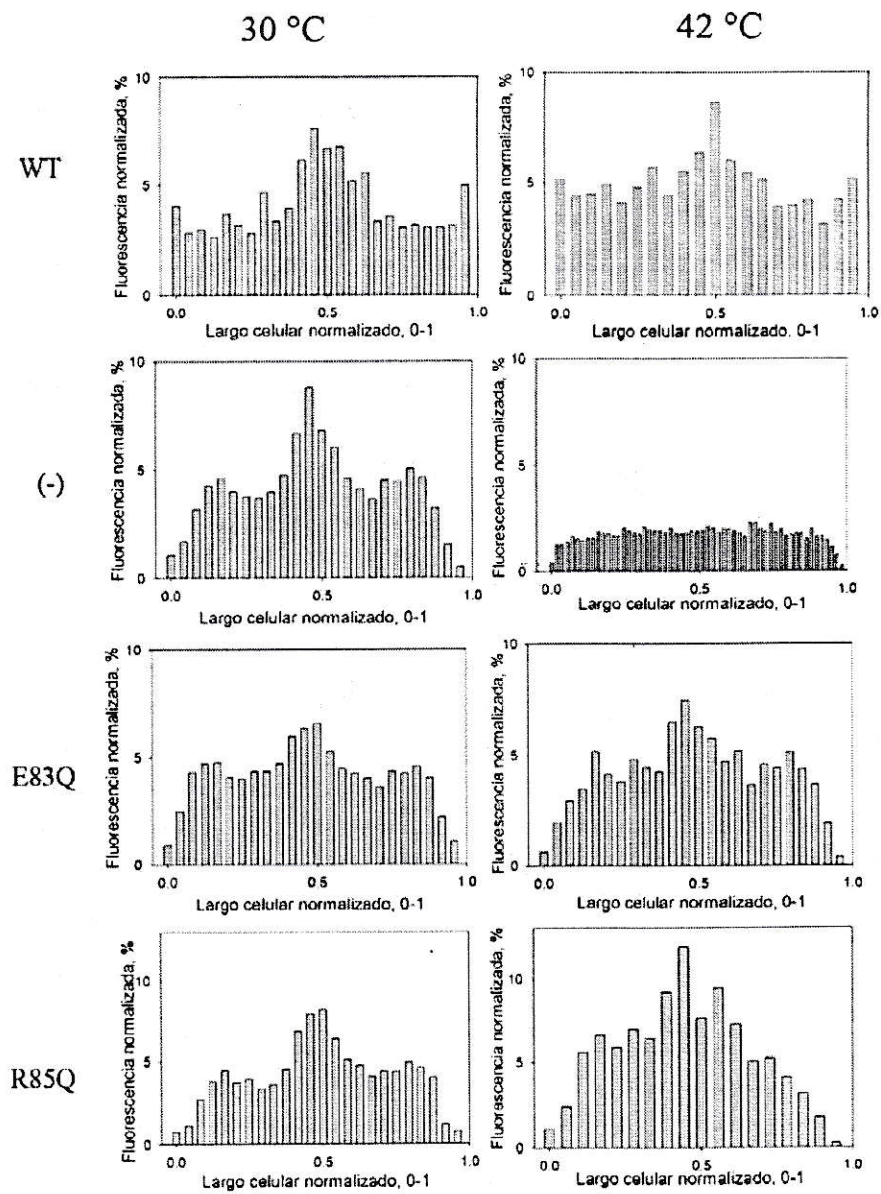


Figura 28. Distribución de ZipA a lo largo del eje longitudinal de la célula. En las imágenes de las células que se muestran en la figura 21 se trazó un vector entre los polos de la célula y se registró la intensidad de señal de fluorescencia en el vector mediante el programa ImageJ. El largo celular se normalizó entre los valores 0 y 1 mediante un programa desarrollado en nuestro laboratorio. La intensidad normalizada para cada una de las cepas se graficó versus el largo celular normalizado.

preferente de la ZipA en la mitad de la célula. La expresión de la mutante E83Q, no modificó el patrón de localización observado a 30 °C. En células que expresan la mutante R85Q, la ZipA se localizó en la mitad de la célula y decayó hacia ambos extremos. En células crecidas a 42 °C al comparar la distribución de ZipA con la de EcFtsZ tipo silvestre y la de las mutantes E83Q y R85Q se observa un patrón similar (figura 17 y 28). Esto indica que la ubicación de ZipA depende de la localización de EcFtsZ tipo silvestre y de las mutantes, lo que sugiere una interacción entre ambas proteínas *in vivo*.

DISCUSIÓN

En esta tesis se utilizó EcFtsZ con las mutaciones puntuales, E83Q y R85Q en la hélice H3 de la superficie lateral, para determinar la importancia de esta superficie sobre la localización de EcFtsZ en la mitad de la célula, la formación y la función del anillo Z. Se demostró que la localización de EcFtsZ en la mitad de la célula no se afecta por las mutaciones laterales E83Q y R85Q (figura 3) aunque *in vitro*, su polimerización se encuentra desfavorecida (figura 5). La interacción de ZipA con la mutante E83Q o con la R85Q produjo un aumento de la polimerización de las proteínas mutantes mayor que el producido en EcFtsZ tipo silvestre por ZipA (figura 5). En presencia de ZipA o calcio, se observó una mayor polimerización y estabilidad de los polímeros de la mutante E83Q respecto a los de tipo silvestre y tuvo un efecto mucho menor sobre la polimerización de R85Q (figura 4 y figura 21 A, B y C). *In vivo*, EcFtsZ tipo silvestre y las mutantes E83Q y R85Q mostraron un patrón de distribución celular diferente entre ellas y ZipA siguió el mismo patrón de distribución de cada proteína (figura 17 y 28). Estos resultados sugieren que la estabilización de los polímeros de la mutante E83Q y la escasa polimerización de la mutante R85Q afectan la dinámica de polimerización propia de la función del anillo Z.

Efecto de las mutaciones E83Q y R85Q de EcFtsZ sobre la polimerización en láminas. La figura 29 muestra que una molécula de EcFtsZ en

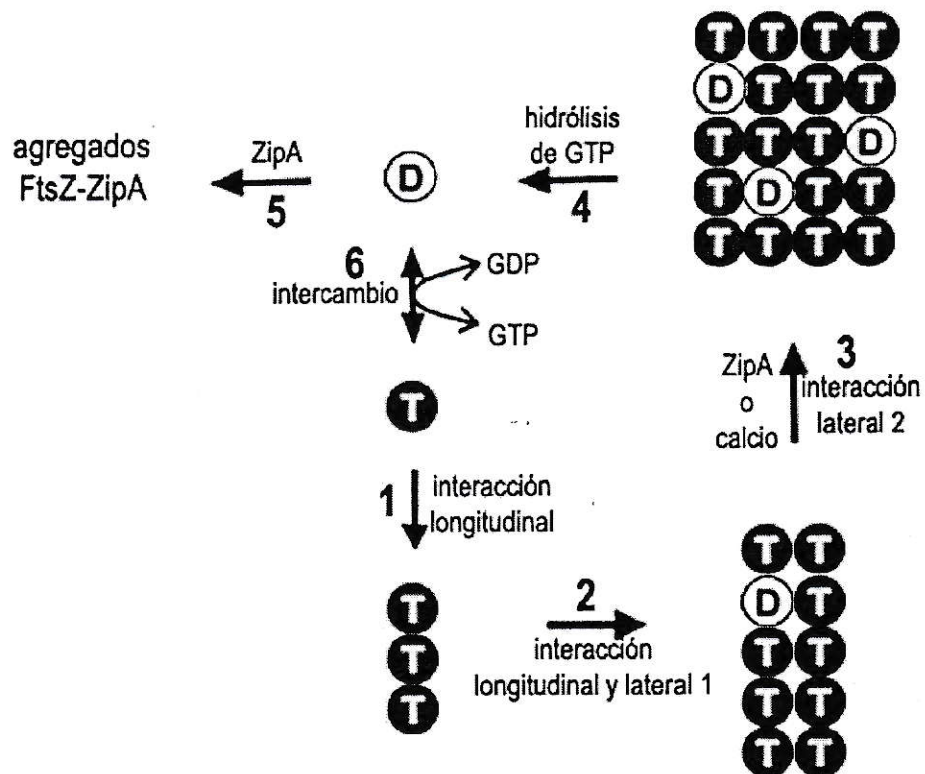


Figura 29. Modelo para explicar el efecto de las mutaciones E83Q y R85Q de EcFtsZ sobre la formación de láminas. Monómeros de EcFtsZ-GTP (T) se polimerizan en protofilamentos cortos por interacciones longitudinales, reacción 1. A estos protofilamentos se unen monómeros de EcFtsZ en la superficie lateral (interacción lateral 1) para formar el núcleo de los dobles filamentos, los cuales crecen longitudinalmente de manera cooperativa, reacción 2. Los filamentos dobles se asocian por interacciones laterales (interacción lateral 2) para formar láminas, que se favorecen con ZipA o calcio, reacción 3. En todos los polímeros ocurre hidrólisis de GTP, lo que induce la despolimerización para producir monómeros de EcFtsZ-GDP (D), reacción 4. La interacción entre EcFtsZ-GDP (D) y ZipA produce agregados, reacción 5. El GDP unido a EcFtsZ se intercambia por GTP, reacción 6. La mutación R85Q inhibe y la E83Q favorece la reacción 2.

presencia de GTP interactúa longitudinalmente para producir los protofilamentos. A estos protofilamentos se unen monómeros de EcFtsZ en la superficie lateral (interacción N-N) para formar el núcleo de los dobles filamentos, los cuales crecen longitudinalmente de manera cooperativa. Los filamentos dobles se asocian por interacción laterales (interacción C-C) para formar láminas. Esta interacción se favorece en presencia de calcio o ZipA (González y *et al.*, 2003). En este proceso de formación de láminas existen varias etapas en donde la polimerización de las láminas se podría afectar. Las mutaciones E83Q y R85Q tendrían un efecto en la interacción lateral N-N. La mutación E83Q favorecería esta interacción lo cual hace que la reacción se desvíe hacia la formación de los filamentos dobles (pues forma polímeros compuestos por 2 o más protofilamentos más estables, figura 4 y 7), esto a su vez favorecería la formación de las láminas en presencia de ZipA o calcio (figura 5). Al contrario, la mutación R85Q desfavorecería la formación de filamentos dobles, acumulándose los protofilamentos cortos (pues presenta una actividad GTPásica pero reducida, figura 9, y forma escasos polímeros cortos, figura 5 y 7) Por esto, ZipA o calcio no tendría efecto sobre la inducción de láminas a través de la interacción lateral C-C.

Modelo molecular de las interacciones laterales entre monómeros de EcFtsZ para la formación de los filamentos dobles. Con el propósito de explicar las interacciones laterales a nivel molecular, se discutirá cómo las mutaciones en las superficies laterales se ajustan a los modelos disponibles de formación

de filamentos dobles (Beuria *et al.*, 2006; Lowe y Amos, 1999). En la tabla 5 se observa que las mutaciones de aminoácidos cargados, D86K, E238A y E250A, afectan la capacidad para formar las láminas y resultados experimentales de polimerización de EcFtsZ en presencia sales, sugieren que esta interacción sería de carácter hidrofóbico (Beuria *et al.*, 2003; Yu y Margolin, 1998). Predicciones *in silico*, de las interacciones laterales (interacciones NC o interacciones entre las superficies izquierda y derecha) de EcFtsZ, para la interacción entre dos protofilamentos, muestran zonas hidrofóbicas y cargadas, donde los aminoácidos R78, R85, D82 y R89 de la superficie izquierda y el aminoácido E152 de la superficie derecha son importantes para la interacción lateral de EcFtsZ (Garcés, 2007). Para explicar el efecto de las mutaciones E83Q y R85Q describiremos las interacciones laterales de acuerdo a los dos modelos antes mencionados.

Los dobles filamentos, "thick filament", postulados por Lowe y Amos (1999), se estabilizan por la interacción lateral entre las superficies del dominio amino de dos protofilamentos paralelos (interacción NN). En los protofilamentos dobles de Beuria, T. y *et al.* (2006), la interacción lateral se produce entre la superficie del dominio amino y la del carboxilo entre protofilamentos paralelos (interacción N-C). En la superficie lateral derecha (dominio carboxilo), la sustitución de aminoácidos ácidos, E238 y E250, por la alanina, induce solo protofilamentos (tabla 5), lo que indica que estos aminoácidos estabilizan la interacción lateral entre protofilamentos. En el modelo de formación de láminas

Tabla 5. Resumen de las propiedades de EcFtsZ con mutaciones puntuales localizadas en la superficie lateral del dominio carboxilo o amino.

Mutación	^a Ubicac.	^b Polím.	^c Comp.	^d Local.	^e Referencia
WT	-	P	+	+	(Redick <i>et al.</i> , 2005; Rueda <i>et al.</i> , 2003) Esta tesis
D86K	H3	2 PF	-	ND	(Lu <i>et al.</i> , 2001)
E83Q	H3	P	-	+	Esta tesis
R85Q	H3	PF y 2PF	-	+	Esta tesis
E238A	H9	PF	-	ND	(Lu <i>et al.</i> , 2001)
E250A	H9-S9	PF	-	ND	(Lu <i>et al.</i> , 2001)

^aUbicación de la mutación sobre la estructura secundaria de EcFtsZ.

^bTipo de polímeros que forma EcFtsZ en amortiguador de polimerización. P, polímero de varios protofilamentos asociados y PF, protofilamento.

^cFuncionalidad *in vivo* de las EcFtsZ, (+) complementa y (-) no complementa a una cepa mutante en *ftsZ*.

^dLocalización en la mitad de la célula. (+) localiza y ND, no determinado.

^eReferencia bibliográfica.

de Lowe y Amos (1999) estos aminoácidos participarían en la interacción lateral entre los filamentos dobles que ocurre a través de la superficie del dominio carboxilo de EcFtsZ. Sin embargo, esto no explica la ausencia de los dobles filamentos, pues las mutaciones E238A y E250A no afectan la superficie lateral izquierda, importante para la formación de dobles filamentos. Este análisis de la información existente en su conjunto no favorece ninguno de los dos modelos de formación de láminas mencionados (Beuria *et al.*, 2006; Lowe y Amos, 1999). Por lo que usaremos ambos modelos para explicar cómo participarían los aminoácidos E83 y R85, en la interacción lateral para la formación de los dobles filamentos.

Consideremos primero el modelo de Lowe y Amos (Lowe y Amos, 1999). En la figura 30 se muestran los aminoácidos de la hélice H3 localizados en la interfase de la interacción lateral del dímero de EcFtsZ planteado por Lowe y Amos. En esta interfase, el glutamato 83 y la arginina 85 de un monómero, se encuentran enfrentados con otros aminoácidos cargados a una distancia menor a 5 Å del siguiente monómero con los que interactuarían lateralmente. Así, se enfrentan E83 con E118 y R85 con E118 y E152. Esto hace pensar que en EcFtsZ tipo silvestre, se produciría una repulsión entre E83 y E118, que al eliminar la carga negativa del E83, favorecería la interacción lateral para formar los dobles filamentos. De manera opuesta, la arginina 85 podría formar un

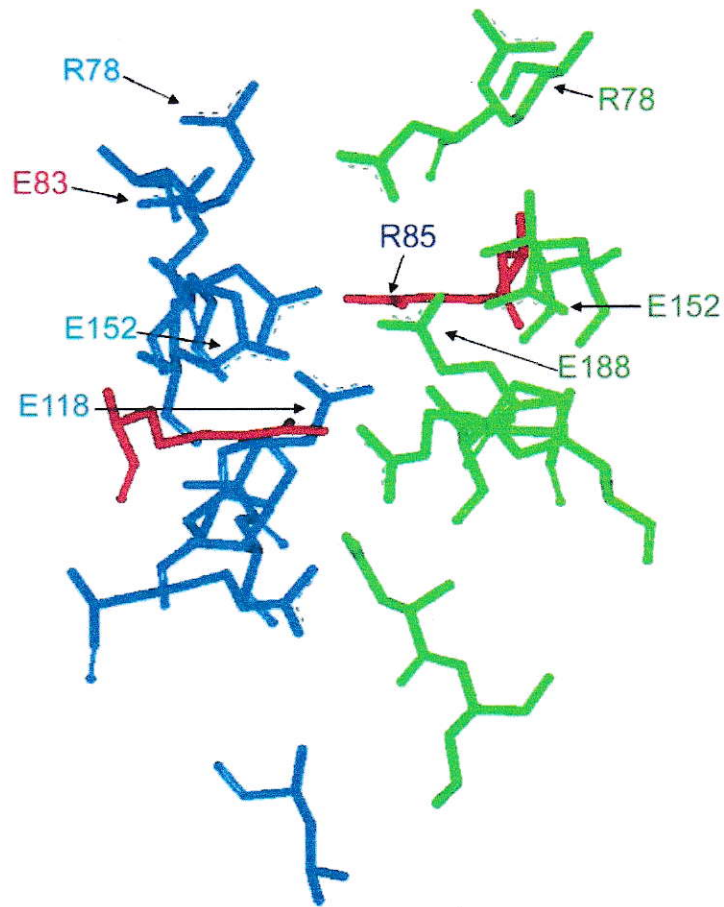


Figura 30. Aminoácidos de la hélice H3 en la interfase de interacción lateral de dos monómeros de EcFtsZ. Interfase de interacción lateral a través de las hélices H3 entre las superficies del dominio amino del modelo de formación de filamentos dobles (Lowe y Amos, 1999). En verde se muestra la H3 de un monómero de EcFtsZ de un protofilamento y en azul del monómero ubicado en el protofilamento adyacente. Los aminoácidos mutados en esta tesis, E83 y R85 se muestran en rojo y en azul, respectivamente. Los aminoácidos que se encuentran a 5 Å de distancia de la cadena lateral de E83 y R85 se señalan con flechas y nomenclatura correspondiente (Garcés, A., 2007)

puente salino con el glutamato 118 o el glutamato 152 en la proteína tipo silvestre, que se anularía con la mutación R85Q y debilitaría la interacción lateral para formar los filamentos dobles. El segundo modelo planteado por predicción *in silico* de la interacción lateral de EcFtsZ sería una asociación paralela entre la superficie del dominio amino (izquierda) de un protofilamento con la superficie del dominio carboxilo (derecha) del otro (Beuria *et al.*, 2006; Garcés, 2007). En este modelo se observa que entre los aminoácidos de la superficie izquierda que participarían está la arginina 85, lo que hace suponer que la sustitución de este aminoácido por glutamina, desfavorecería la interacción entre las superficies del carboxilo de un protofilamento y del amino de otro protofilamento. El modelo también muestra que el glutamato 83 no participaría en una unión de tipo electrostática, por lo tanto, dependiendo del aminoácido que enfrenta podría producir una repulsión si el aminoácido es de carga negativa o se inocuo si es neutra. Los resultados de polimerización indican que podría haber una repulsión, pues al eliminar la carga negativa se favorece la interacción lateral.

Efecto de la localización de las mutantes sobre la viabilidad celular. La localización de EcFtsZ en la mitad de la célula se afecta con mutaciones en la interfase de interacción longitudinal de EcFtsZ, que alteran la formación de protofilamentos y la hidrólisis de GTP, e inducen la filamentación de las células reduciendo la viabilidad celular (Addinall *et al.*, 1996; Addinall *et al.*, 1997; Michie *et al.*, 2006; Redick *et al.*, 2005; Stricker y Erickson, 2003). Esto remarca

la importancia de los protofilamentos en la función del anillo Z. La interfase de interacción lateral se encuentra pobremente caracterizada, por lo que se desconoce la importancia de la superficie lateral de EcFtsZ en la formación y la función del anillo Z. Sin embargo, al hacer un cálculo para determinar cuantos anillos de protofilamentos podrían formarse con la concentración de la proteína intracelular, considerando el perímetro transversal de la célula y que el número de moléculas de EcFtsZ (entre 4000 (Rueda *et al.*, 2003) y 15000 (Stricker, L. y Erickson, H., 1998)), resulta que el anillo Z estaría formado por al menos seis anillos de protofilamentos, con 6000 moléculas (Gonzalez *et al.*, 2003). También se ha planteado la posibilidad que el anillo Z esté formado por decenas de pequeños protofilamentos (Gonzalez *et al.*, 2003; Stricker *et al.*, 2002). Si se considera cualquiera de estos modelos y la formación de láminas de EcFtsZ *in vitro*, se deduce que el anillo Z estaría formado de polímeros estabilizados mediante interacciones longitudinales y laterales. Otras mutantes laterales en EcFtsZ (tabla 5), al igual que E83Q y R85Q, afectan la formación de láminas *in vitro* y no complementan a una cepa de *E. coli* que contiene una mutación en EcFtsZ. Aunque solo en esta tesis se observó que la mutante E83Q y la R85Q se localizaron en la mitad de la célula (figura 17 y tabla 3), podemos deducir que las interacciones laterales son importantes.

Con el propósito de determinar una relación entre la formación del anillo Z y las propiedades funcionales *in vitro* de EcFtsZ, se caracterizó EcFtsZ fusionada a la proteína fluorescente EYFP. EcFtsZ fusionada a la proteína fluorescente EYFP mostró una viabilidad celular similar a las células carentes

de EcFtsZ (figura 14), e *in vitro* mostró una inestabilidad de los polímeros inducidos con GTP (figura 12). Por lo tanto, estos resultados no son suficientes para explicar su efecto sobre la viabilidad celular al igual que las otras mutantes laterales de la tabla 5. Por esto consideramos necesario conocer la localización de EcFtsZ en la célula en conjunto con las propiedades funcionales *in vitro*.

Al analizar los resultados *in vitro* e *in vivo* de las mutantes se sugiere que en el caso de la mutante E83Q, el patrón de distribución concentrado en la mitad de la célula y sus propiedades funcionales *in vitro*, indicarían que esta mutante se recluta como polímeros en la mitad de la célula, en cuyo caso se forma el anillo Z. El patrón de distribución más bien expandido de la mutante R85Q y sus propiedades funcionales *in vitro*, indicaría que no se forma un polímero en la mitad de la célula. De acuerdo con los resultados *in vitro* de polimerización en solución y en proteoliposomas, postulamos que la mutante E83Q se recluta en la mitad de la célula como polímeros, pues polimeriza en presencia de GTP y ZipA induce la formación de láminas. De manera contraria, la mutante R85Q podría reclutarse principalmente por el sistema MinCDE, pues *in vitro* su polimerización está desfavorecida y aumenta levemente en presencia de ZipA. Estos planteamientos se sustentan por lo siguiente.

Polimerización de EcFtsZ en láminas. In vitro, en presencia de GTP, a diferencia de la mutante R85Q, solo la mutante E83Q polimerizó (figura 4). La disminución en la dispersión de luz de la mutante E83Q con respecto a la tipo silvestre sugiere que la interacción entre ellas se encuentra debilitada por lo que

su concentración crítica de formación de polímeros es mayor a la de tipo silvestre (Shin, 2003), pero que estos polímeros son más estables que los de tipo silvestre (figura 4). Al inducir la polimerización con calcio, la mutación E83Q favoreció la formación y la estabilidad de láminas con respecto las de tipo silvestre y la mutación R85Q inhibió la polimerización (figura 6). ZipA aumentó aproximadamente en 30 % la polimerización de la mutante E83Q y disminuyó en 200 % la polimerización de la mutante R85Q, respecto a la tipo silvestre (figura 5, EcFtsZ + ZipA 12 μ M).

Formación del anillo Z. Los resultados de interacción entre EcFtsZ y ZipA en solución se complementaron con los ensayos de interacción entre ambas proteínas en proteoliposomas y la localización de ZipA en las células. Las mutaciones E83Q y R85Q de EcFtsZ no impidieron la interacción con ZipA en proteoliposomas (figura 24) y la similitud de patrón de distribución entre ZipA y EcFtsZ en las células sugieren que ambas proteínas interactúan *in vivo* (figura 17 y 28). Aunque las mutaciones E83Q y R85Q no afectaron la localización de estas proteínas en la mitad de la célula (figura 3), los resultados del patrón de distribución de las mutantes en la célula (figura 17) en conjunto con los resultados *in vitro* de polimerización y actividad GTPásica (figura 5 y 9) hacen suponer que la banda de la mutante E83Q podría estar compuesta por polímeros y la de la mutante R85Q por polímeros más pequeños o más bien oligómeros.

Funcionalidad del anillo Z. Para la funcionalidad del anillo Z es necesaria una dinámica rápida de recambio de subunidades de EcFtsZ, del citoplasma y del anillo Z, que está determinada por la actividad GTPásica de la proteína y el intercambio de GDP y GTP de los polímeros. Una disminución al 10 % de la actividad GTPásica reduce en nueve veces (0,1 %) el recambio de subunidades de EcFtsZ, (Stricker *et al.*, 2002). Si se supone una relación lineal entre la actividad GTPásica y el recambio de subunidades de EcFtsZ y considerando que la mutante E83Q polimeriza *in vivo*, el recambio se reduciría en dos veces, teniendo en cuenta que posee el 59 % de actividad GTPásica con respecto a la tipo silvestre (se deduce de la figura 9). De allí que los polímeros de la mutante E83Q que se localizan en la mitad de las células serían dos veces más estables que los de la tipo silvestre, hecho que se confirma por los resultados de estabilidad *in vitro* de los polímeros de esta mutante (figura 4) que muestran un periodo de estabilidad dos veces el de la tipo silvestre. La estabilidad de la mutante E83Q no se alteraría en presencia de ZipA, pues esta proteína no afectó la actividad GTPásica de EcFtsZ tipo silvestre y la mutante E83Q. El aumento en 2,1 veces de la actividad GTPásica de la mutante R85Q (figura 9), en presencia de ZipA, indica un incremento en la interacción longitudinal, lo que hace suponer que R85Q forma pequeños polímeros u oligómeros en su lugar de localización (figura 17).

Una inhibición de la actividad GTPásica, debido a la inducción de interacciones laterales para formar polímeros estables o a la formación de protofilamentos inestables, inducen la muerte celular (Margalit *et al.*, 2004). Lo

que sugiere que la dinámica de polimerización de EcFtsZ es fundamental para el funcionamiento del anillo Z. La dinámica de polimerización de la mutante E83Q favorece la estabilidad de los polímeros, pues la actividad GTPásica es un 41 % menor que la de tipo silvestre, disminuyendo el recambio de subunidades del polímero. La polimerización de la mutante R85Q está desfavorecida, por lo que disminuye el número de interacciones longitudinales, responsables de la actividad GTPásica (figura 9), así la formación de polímeros funcionales dentro de las células está desfavorecida.

En la mayoría de los casos la alteración en alguna de las proteínas del divisoma origina células filamentosas, lo que indica que la septación celular se encuentra impedida pero la bacteria sigue sintetizando mureína y así la célula sigue elongando (de Pedro *et al.*, 1997; de Pedro *et al.*, 2002; Pichoff y Lutkenhaus, 2002). La expresión de las mutantes E83Q o R85Q no formó células filamentosas (tabla 2), por lo que debería haber una menor velocidad de elongación con respecto a la de septación. Esto se explica por una alteración en el reclutamiento de las proteínas de síntesis de mureína, que la etapa tardía de formación del divisoma que depende de la formación del protoanillo (Rico, 2006). Por esta razón sería interesante explorar la localización de una proteína de la fábrica de peptidoglicanos como FtsI. También sería interesante conocer el efecto de las mutantes laterales de la tabla 5 sobre la morfología celular, su localización y reclutamiento de otras proteínas del divisoma, ya que dos de las mutantes laterales se localizan en la superficie contraria (derecha) a las mutaciones E83Q y R85Q (izquierda). Lo que complementarían con los

resultados de esta tesis para comprender mejor la dinámica de polimerización de EcFtsZ con la función del anillo Z y su consecuencia en la división celular.

Conclusiones

La sustitución de la arginina 85 por la glutamina impide las interacciones longitudinales y laterales de EcFtsZ.

La sustitución del glutamato 83 por la glutamina favorece las interacciones laterales de EcFtsZ.

La localización de EcFtsZ no se afecta por la estabilidad de los polímeros de EcFtsZ.

Una disminución en la polimerización de EcFtsZ disminuye el reclutamiento de ZipA en la mitad de la célula.

Un aumento o disminución de la estabilidad de los polímeros de EcFtsZ afecta la funcionalidad del anillo Z, lo cual disminuye la viabilidad celular.

Bibliografía

- Addinall, S.G., Bi, E., y Lutkenhaus, J. (1996) FtsZ ring formation in fts mutants. *J Bacteriol* **178**: 3877-3884.
- Addinall, S.G., y Lutkenhaus, J. (1996) FtsA is localized to the septum in an FtsZ-dependent manner. *J Bacteriol* **178**: 7167-7172.
- Addinall, S.G., Cao, C., y Lutkenhaus, J. (1997) Temperature shift experiments with an ftsZ84(Ts) strain reveal rapid dynamics of FtsZ localization and indicate that the Z ring is required throughout septation and cannot reoccupy division sites once constriction has initiated. *J Bacteriol* **179**: 4277-4284.
- Addinall, S.G., Cao, C., y Lutkenhaus, J. (1997) FtsN, a late recruit to the septum in Escherichia coli. *Mol Microbiol* **25**: 303-309.
- Beuria, T.K., Krishnakumar, S.S., Sahar, S., Singh, N., Gupta, K., Meshram, M., y Panda, D. (2003) Glutamate-induced assembly of bacterial cell division protein FtsZ. *J Biol Chem* **278**: 3735-3741.
- Beuria, T.K., Shah, J.H., Santra, M.K., Kumar, V., y Panda, D. (2006) Effects of pH and ionic strength on the assembly and bundling of FtsZ protofilaments: A possible role of electrostatic interactions in the bundling of protofilaments. *Int J Biol Macromol*.
- Chen, J.C., y Beckwith, J. (2001) FtsQ, FtsL and FtsI require FtsK, but not FtsN, for co-localization with FtsZ during Escherichia coli cell division. *Mol Microbiol* **42**: 395-413.
- de Pedro, M.A., Quintela, J.C., Holtje, J.V., y Schwarz, H. (1997) Murein segregation in Escherichia coli. *J Bacteriol* **179**: 2823-2834.
- de Pedro, M.A., Holtje, J.V., y Schwarz, H. (2002) Fast lysis of Escherichia coli filament cells requires differentiation of potential division sites. *Microbiology* **148**: 79-86.
- Erickson, H.P. (2001) The FtsZ protofilament and attachment of ZipA--structural constraints on the FtsZ power stroke. *Curr Opin Cell Biol* **13**: 55-60.

- Garcés, A. (2007) Predicción y caracterización de las superficies de interacción intermolecular e intramolecular de la proteína FtsZ de *Escherichia coli*. In *Departamento de biología* Santiago: Universidad de Chile.
- Gonzalez, J.M., Jimenez, M., Velez, M., Mingorance, J., Andreu, J.M., Vicente, M., y Rivas, G. (2003) Essential cell division protein FtsZ assembles into one monomer-thick ribbons under conditions resembling the crowded intracellular environment. *J Biol Chem* **278**: 37664-37671.
- Hale, C.A., y de Boer, P.A. (1997) Direct binding of FtsZ to ZipA, an essential component of the septal ring structure that mediates cell division in *E. coli*. *Cell* **88**: 175-185.
- Hale, C.A., y de Boer, P.A. (1999) Recruitment of ZipA to the septal ring of *Escherichia coli* is dependent on FtsZ and independent of FtsA. *J Bacteriol* **181**: 167-176.
- Hale, C.A., Rhee, A.C., y de Boer, P.A. (2000) ZipA-induced bundling of FtsZ polymers mediated by an interaction between C-terminal domains. *J Bacteriol* **182**: 5153-5166.
- Hale, C.A., y de Boer, P.A. (2002) ZipA is required for recruitment of FtsK, FtsQ, FtsL, and FtsN to the septal ring in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **184**: 2552-2556.
- Jung, H., Tebbe, S., Schmid, R., y Jung, K. (1998) Unidirectional reconstitution and characterization of purified Na⁺/proline transporter of *Escherichia coli*. *Biochemistry* **37**: 11083-11088.
- Lowe, J., y Amos, L.A. (1999) Tubulin-like protofilaments in Ca²⁺-induced FtsZ sheets. *Embo J* **18**: 2364-2371.
- Lu, C., Stricker, J., y Erickson, H.P. (1998) FtsZ from *Escherichia coli*, *Azotobacter vinelandii*, and *Thermotoga maritima*--quantitation, GTP hydrolysis, and assembly. *Cell Motil Cytoskeleton* **40**: 71-86.
- Lu, C., Stricker, J., y Erickson, H.P. (2001) Site-specific mutations of FtsZ--effects on GTPase and in vitro assembly. *BMC Microbiol* **1**: 7.

- Margalit, D.N., Romberg, L., Mets, R.B., Hebert, A.M., Mitchison, T.J., Kirschner, M.W., y RayChaudhuri, D. (2004) Targeting cell division: small-molecule inhibitors of FtsZ GTPase perturb cytokinetic ring assembly and induce bacterial lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 11821-11826.
- Marrington, R., Small, E., Rodger, A., Dafforn, T.R., y Addinall, S.G. (2004) FtsZ fiber bundling is triggered by a conformational change in bound GTP. *J Biol Chem* **279**: 48821-48829.
- Michie, K.A., Monahan, L.G., Beech, P.L., y Harry, E.J. (2006) Trapping of a spiral-like intermediate of the bacterial cytokinetic protein FtsZ. *J Bacteriol* **188**: 1680-1690.
- Mingorance, J., Rueda, S., Gomez-Puertas, P., Valencia, A., y Vicente, M. (2001) Escherichia coli FtsZ polymers contain mostly GTP and have a high nucleotide turnover. *Mol Microbiol* **41**: 83-91.
- 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**: 3179-3191.
- Mukherjee, A., y Lutkenhaus, J. (1994) Guanine nucleotide-dependent assembly of FtsZ into filaments. *J Bacteriol* **176**: 2754-2758.
- Mukherjee, A., y Lutkenhaus, J. (1998) Purification, assembly, and localization of FtsZ. *Methods Enzymol* **298**: 296-305.
- Mukherjee, A., y Lutkenhaus, J. (1999) Analysis of FtsZ assembly by light scattering and determination of the role of divalent metal cations. *J Bacteriol* **181**: 823-832.
- Pichoff, S., y Lutkenhaus, J. (2002) Unique and overlapping roles for ZipA and FtsA in septal ring assembly in Escherichia coli. *Embo J* **21**: 685-693.
- Pla, J., Sanchez, M., Palacios, P., Vicente, M., y Aldea, M. (1991) Preferential cytoplasmic location of FtsZ, a protein essential for Escherichia coli septation. *Mol Microbiol* **5**: 1681-1686.

- RayChaudhuri, D. (1999) ZipA is a MAP-Tau homolog and is essential for structural integrity of the cytokinetic FtsZ ring during bacterial cell division. *Embo J* **18**: 2372-2383.
- Redick, S.D., Stricker, J., Briscoe, G., y Erickson, H.P. (2005) Mutants of FtsZ targeting the protofilament interface: effects on cell division and GTPase activity. *J Bacteriol* **187**: 2727-2736.
- Rico, I.y.V., M. (2006) The order of the ring: assembly of Escherichia coli cell division components. *Molecular Microbiology* **61**: 5-8.
- Rigaud, J.L., y Levy, D. (2003) Reconstitution of membrane proteins into liposomes. *Methods Enzymol* **372**: 65-86.
- 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**: 3344-3351.
- Santra, M.K., Beuria, T.K., Banerjee, A., y Panda, D. (2004) Ruthenium red-induced bundling of bacterial cell division protein, FtsZ. *J Biol Chem* **279**: 25959-25965.
- Scheffers, D.J., de Wit, J.G., den Blaauwen, T., y Driessen, A.J. (2001) Substitution of a conserved aspartate allows cation-induced polymerization of FtsZ. *FEBS Lett* **494**: 34-37.
- Shin, J.Y. (2003) Participación de la hélice H3 y el "loop" que une a la hebra beta S3 en las interacciones de la FtsZ para formar el anillo Z en la división celular de Escherichia coli. In *Dpto. Biología, Facultad de Ciencias* Santiago, Chile: Universidad de Chile, pp. 86.
- Stricker, J., Maddox, P., Salmon, E.D., y Erickson, H.P. (2002) Rapid assembly dynamics of the Escherichia coli FtsZ-ring demonstrated by fluorescence recovery after photobleaching. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 3171-3175.
- Stricker, J., y Erickson, H.P. (2003) In vivo characterization of Escherichia coli ftsZ mutants: effects on Z-ring structure and function. *J Bacteriol* **185**: 4796-4805.

- Wang, X., Huang, J., Mukherjee, A., Cao, C., y Lutkenhaus, J. (1997) Analysis of the interaction of FtsZ with itself, GTP, and FtsA. *J Bacteriol* **179**: 5551-5559.
- Weiss, D.S., Chen, J.C., Ghigo, J.M., Boyd, D., y Beckwith, J. (1999) Localization of FtsI (PBP3) to the septal ring requires its membrane anchor, the Z ring, FtsA, FtsQ, and FtsL. *J Bacteriol* **181**: 508-520.
- Yu, X.C., y Margolin, W. (1997) Ca²⁺-mediated GTP-dependent dynamic assembly of bacterial cell division protein FtsZ into asters and polymer networks in vitro. *Embo J* **16**: 5455-5463.
- Yu, X.C., y Margolin, W. (1998) Inhibition of assembly of bacterial cell division protein FtsZ by the hydrophobic dye 5,5'-bis-(8-anilino-1-naphthalenesulfonate). *J Biol Chem* **273**: 10216-10222.