

CH-FC
Biotecnología
M 773
C. 2

UNIVERSIDAD DE CHILE FACULTAD DE CIENCIAS ESCUELA DE PREGRADO



**“CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y MICROBIOLÓGICA DE LA
FUNCIÓN DE LOS DOMINIOS AMINO Y CARBOXILO TERMINAL
DE FtsZ DE *ESCHERICHIA COLI*”**

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

FELIPE ANTONIO MONTECINOS FRANJOLA

Dr. Octavio Monasterio Opazo
Director de Memoria de Título:

Dra. Rosalba Lagos Mónaco
Co- Directora de Memoria de Título

Septiembre de 2010
Santiago – Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, que el Seminario de Título presentado por el Sr:

FELIPE ANTONIO MONTECINOS FRANJOLA

“CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y MICROBIOLÓGICA DE LA FUNCIÓN DE LOS DOMINIOS AMINO Y CARBOXILO TERMINAL DE FtsZ DE *ESCHERICHIA COLI*”

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

Dr. Octavio Monasterio Opazo
Director Memoria de Título

Juan Monte

Dra. Rosalba Lagos Mónico
Co-Directora Memoria de Título

Rosalba Lagos



Comisión de Evaluación

Dr. Osvaldo Alvarez
Presidente (a) Comisión

Dr. Marcelo Baeza
Evaluador

Santiago de Chile, Septiembre 2010

Biografía



Llegué a este mundo un día viernes 11 de Septiembre del año 1981. Los primeros tres años de mi vida transcurrieron normalmente, en la comuna de Quinta Normal, en compañía de mi padre, mi madre y hermana. En esta primera etapa de mi vida asistí al jardín infantil "Quiko" que se encontraba tan sólo a unas cuadras de la seguridad del hogar. Luego, al nacimiento de mi hermano menor, nuestra familia se re-acomodó en la comuna de Ñuñoa. Ya en nuestro departamento de la calle San Eugenio, ingresé al Instituto Alonso de Ercilla, que nunca más me dejó ir, pues entré en "kinder garden", o algo por el estilo, en el año 1986, y salí del mismo colegio unos 13 años más tarde en el año 1999. Durante mi estadía en el "alonso" la vida fue disciplinada e intensa, una gran etapa de la que guardo buenos recuerdos y grandes amigos. En el año 2000, ingresé a la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular en la Facultad de Ciencias, en el campus Juan Gómez Millas. La etapa más importante de mi vida, la etapa en donde pude dedicarme en plenitud a lo que más me gusta, estudiar, indagar, buscar y encontrar. Mi paso por el pregrado ocurrió sin mayor novedad en lo académico mas en lo humano conocí grandes amigos y amigas que aún conservo y que no quiero perder nunca. Los "pianes" son y serán, y seguiremos nuestras sendas en conjunto queridos amigos. Ya en el fin de mi carrera entré al Laboratorio de Biología Estructural, donde conocí a toda la gente excelente que lo sostiene. No he terminado mi paso por el laboratorio pues aunque hice y terminé mi tesis de ingeniero, sigo con mi tesis de doctorado por uno o dos años más.

Agradecimientos

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a toda la gente que hizo posible la realización de esta tesis. Agradezco a mi familia, a mi hermana y hermano, a mi madre y a mi padre por su cariño y apoyo incondicional. A los amigos y amigas del Laboratorio de Biología Estructural y Molecular (BEM), en cuya compañía mi estadía se transformó en una grata y enriquecedora experiencia. A Andrea Garcés, Jae Yen Shin, Gabriela Mercado, Roselyn Orellana, Macarena Collao y Verónica García. Asimismo quiero agradecer a J.C. Mobarec, Esteban Nova, Mario Tello, Gino Corsini, Erwin Strahsburguer, Rodrigo Díaz, Cesar Díaz, Rodrigo Gallardo, David Weinstein, Alexis Ordenes, Pedro Núñez y Luis Pouchucq. Todos ellos contribuyeron a mi formación y crecimiento. Quiero agradecer especialmente a la Dra. Rosalba Lagos ("la profe") y al Dr. Octavio Monasterio ("el profe") por darme un espacio en el equipo del BEM y aceptarme como uno más del grupo, por entregarme conocimientos y valores científicos y humanos que me hicieron crecer en el campo profesional y humano. Quiero agradecer a mis amigos de la generación 2000 de la carrera de Ingeniería en Biotecnología, a Francia Decap y su familia maravillosa, a todos los "pantes" que quiero mucho y a toda la gente que de diferentes maneras contribuyeron al desarrollo de esta tesis. Para finalizar quiero agradecer a la mujer que más y mejor me ha acompañado y comprendido en esta última etapa de mi vida, Macarena Balanda Diez.

¡Oh, que delicia! Jugar con fuego.

Vicente Huidobro



Dedicado a mi amada madre

Índice de contenidos

Índice de contenidos.....	I
Índice de Tablas.....	III
Índice de Figuras.....	III
Abreviaturas.....	V
Unidades.....	VI
RESUMEN.....	VII
ABSTRACT.....	VIII
INTRODUCCIÓN.....	1
HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS.....	9
MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
RESULTADOS.....	28
Diseño de las secuencias que codifican los dominios amino y carboxilo terminales de EcFtsZ.....	28
Propiedades fisicoquímicas de EcFtsZ y sus dominios aislados.....	29
Alineamiento estructural de los monómeros de EcFtsZ y TmFtsZ.....	33
Alineamiento estructural de los dominios de EcFtsZ y TmFtsZ.....	37
Superficie de interacción interdominio.....	37
Subclonación de los dominios amino y carboxilo terminales de EcFtsZ.....	42
Expresión de EcFtsZ y los dominios aislados.....	44
Caracterización <i>in vitro</i>	47
Purificación de EcFtsZ y de sus dominios amino y carboxilo terminales.....	47
Estructura secundaria de EcFtsZ y los dominios amino y carboxilo terminales...	49
Estado de oligomerización en solución de FtsZ y los dominios amino y carboxilo terminales.....	53

Pruebas de funcionalidad de EcFtsZ silvestre y EcFtsZ reconstituida a partir de sus dominios aislados.....	54
Caracterización del dominio amino terminal renaturado.....	59
Caracterización <i>in vivo</i>	63
Caracterización de la cepa VIP2(DE3).....	64
Viabilidad, crecimiento y morfología de la cepa VIP2(DE3) expresando a los dominios aislados.....	69
DISCUSION.....	72
Secuencia y estructura de los dominios amino y carboxilo terminales de EcFtsZ.....	73
Expresión y purificación de los dominios amino y carboxilo terminales de EcFtsZ....	76
EcFtsZ y los dominos amino y carboxilo en solución.....	78
Una mezcla de los dominios amino y carboxilo terminales de EcFtsZ no restituye la funcionalidad de la proteína <i>in vitro</i>	80
El dominio amino terminal de EcFtsZ se agrega en solución.....	81
La co-expresión de los fragmentos 1-179 y 177-383 de EcFtsZ complementa a la cepa mutante VIP2(DE3).....	83
Modelo de la inhibición de la polimerización de FtsZ por el dominio amino terminal renaturado <i>in vitro</i>	88
CONCLUSIONES.....	89
REFERENCIAS.....	92

Índice de Tablas.

Tabla I	Partidores usados en esta tesis.....	14
Tabla II	Vectores y cepas usados en esta tesis.....	15
Tabla III	Comparación in silico de las secuencia de EcFtsZ, TmFtsZ y sus dominios aislados.....	31
Tabla IV	Propiedades fisicoquímicas de la secuencia de EcFtsZ y sus dominios aislados.....	41

Índice de Figuras.

Figura 1	Alineamiento de secuencia aminoacídica de FtsZ de <i>Escherichia coli</i> , de <i>Thermotoga maritima</i> y de <i>Methanococcus jannaschii</i>	30
Figura 2	Estructura tridimensional de FtsZ de <i>E. coli</i> y <i>T. maritima</i>	32
Figura 3	Estructura de EcFtsZ y TmFtsZ en estado dimérico.....	34
Figura 4	Alineamiento estructural de EcFtsZ y TmFtsZ.....	36
Figura 5	Secuencia de nucleótidos y aminoácidos de los dominios de EcFtsZ...	40
Figura 6	Etapas del clonamiento de los dominios amino y carboxilo terminal de EcFtsZ.....	43
Figura 7	Expresión de EcFtsZ y de sus dominios aislados en BL21(DE3).....	45
Figura 8	SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie de las purificaciones de FtsZ y los dominios amino y carboxilo.....	48
Figura 9	Espectros de dicroísmo circular en el UV lejano y contenido de estructura secundaria de EcFtsZ y los dominios amino y carboxilo.....	50
Figura 10	Estado de agregación en solución de FtsZ y los dominios amino y carboxilo.....	55
Figura 11	Polimerización y actividad GTPásica de EcFtsZ.....	56

Figura 12	Actividad GTPásica y polímeros formados por EcFtsZ reconstituida a partir de los dominios amino y carboxilo.....	58
Figura 13	Caracterización del dominio amino renaturado por dilución rápida.....	60
Figura 14	Caracterización de la agregación del dominio amino.....	62
Figura 15	Propiedades de la cepa VIP2 (DE3) de <i>E. coli</i>	65
Figura 16	Viabilidad y constantes de crecimiento de cultivos líquidos que expresan a EcFtsZ y los dominios amino y carboxilo.....	66
Figura 17	Morfología celular de la mutante termonucla VIP2(DE3).....	68
Figura 18	Efecto de la expresión de EcFtsZ sobre la viabilidad de la cepa VIP2(DE3).....	85
Figura 19	Modelo de la polimerización dependiente de GTP de FtsZ.....	90
Figura 20	Modelo de la inhibición de la polimerización de FtsZ por el dominio amino <i>in vitro</i>	91

Abreviaturas

ASA	Area de accesibilidad al solvente
GDP	<i>Guanosina bi-fosfato</i>
GTP	<i>Guanosina tri-fosfato</i>
IF	Filamentos intermedios
FtsZ	<i>Filamentous thermosensitive protein Z</i>
GFP	Green fluorescent protein
EcFtsZ	FtsZ de <i>Escherichia coli</i>
TmFtsZ	FtsZ de <i>Thermotoga maritima</i>
MjFtsZ	FtsZ de <i>Methanococcus jannaschii</i>
MtFtsZ	FtsZ de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
DNA	Acido desoxirribunucleico
Mg ⁺²	Ión magnesio
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poli(acrilamida)
Amp	Ampicilina
Cm	Cloranfenicol
Tet	Tetraciclina
D.O.	Densidad óptica
Int	Intensidad
V.C.	Volumen de columna
Asp	Aspartato
Mr	Masa molecular relativa
TFE	2'2'2'-trifluoroetanol
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
R.M.S.D.	<i>Root mean square deviation</i>

Unidades

Å	Angstrom
°C	grados Celsius
kDa	kilo Dalton
nm	nanometro
M	Molar
µg	Microgramos
µM	Micromolar
h	horas
min	Minutos
µL	Microlitros
mL	Mililitros
W	Watts
mm	Milimetro
cm	Centímetro
mdeg	miligrados de elipticidad
kpb	kilo pares de bases
ufc	Unidad formadora de colonias
µm	Micrometro
g	Aceleración de gravedad
V	Volts

RESUMEN

FtsZ es la primera proteína en ubicarse en el sitio de división, donde forma el anillo Z. FtsZ es una GTPasa cuyo sitio activo se forma por la asociación de dos monómeros a través de una interacción longitudinal. FtsZ se ensambla *in vitro* en protofilamentos largos de 4 a 8 nm de ancho de una manera GTP-dependiente. La estructura 3D de FtsZ muestra que posee dos dominios, el dominio amino terminal con un plegamiento tipo Rossmann que une una molécula de GTP y el dominio carboxilo terminal que posee un plegamiento tipo corismato mutasa que participa en la interacción con otras proteínas del divisoma. Ambos dominios están involucrados en las interacciones longitudinales durante la polimerización que inducen a la actividad GTPásica. En base a la información estructural y funcional de FtsZ de diferentes organismos, se definió la secuencia de FtsZ de *Escherichia coli* que contiene a los dominios amino y carboxilo. Para probar la hipótesis de que los dominios de EcFtsZ son unidades de plegamiento independientes éstos se clonaron, expresaron y purificaron por separado. Los dominios aislados en solución son inestables y no alcanzan un plegamiento correcto debido a que al separarlos exponen una gran superficie hidrofóbica que corresponde la superficie de interacción interdominio. Los dominios aislados no consiguen restituir la actividad GTPásica de FtsZ *in vitro*. La hipótesis que los dominios aislados en conjunto restituyen la funcionalidad de la proteína nativa se abordó fisiológicamente en la cepa VIP2(DE3), una mutante termonula para el gen *ftsZ*. El análisis *in vivo* mostró que mientras la expresión de los dominios por separado inhibe el crecimiento bacteriano, la co-expresión de los dominios amino y carboxilo juntos complementa a la cepa termonula VIP2(DE3). Los

dominios podrían adquirir un plegamiento funcional en el citoplasma bacteriano debido al efecto de "crowding" intracelular.

ABSTRACT

FtsZ is the first protein to localize at the division site where it forms the Z ring. FtsZ is a GTPase whose active site is formed by the association of two monomers through a longitudinal interaction. FtsZ assembles *in vitro* into long protofilaments 4-8 nm wide in a GTP-dependent manner. The 3D structure shows that FtsZ has two domains, the amino terminal domain with a Rossmann fold type that binds a GTP molecule and the carboxyl terminal domain which has a chorismate mutase folding type involved in the interaction with other divisome proteins. Both domains are involved in longitudinal interactions during polymerization that induce the GTPase activity. Based on structural and functional information of FtsZ from different organisms, the sequence of *Escherichia coli* FtsZ containing amino and carboxyl domains was defined. To test the hypothesis that EcFtsZ domains are indeed independent folding units they were cloned, expressed and purified separately. The isolated domains in solution are unstable and do not reach a correct folding because they exposed a large hydrophobic surface corresponding to the interdomain interaction. Thus, the isolated domains are unable to restore the GTPase activity of FtsZ *in vitro*. The hypothesis that the isolated domains together restored the functionality of the native protein was tested *in vivo* in VIP2 (DE3) strain, a terminally null mutant of the *ftsZ* gene. The analysis showed that while the expression of the separate domains inhibits bacterial growth, the co-expression of amino and carboxyl domains together complement VIP2 (DE3) strain. The domains could acquire a functional folding in the bacterial cytoplasm due to the effect of intracellular "crowding".

INTRODUCCIÓN

Citoesqueleto y División Bacteriana

Los "elementos del citoesqueleto" son una serie de proteínas necesarias para mantener la morfología celular y participan en importantes procesos durante el ciclo de vida de una bacteria. La arquitectura básica de una célula contempla membranas, organelos y citosol. No obstante, cada tipo celular exhibe un diseño distintivo por la forma y distribución de sus organelos. La base estructural de distintos diseños celulares es el citoesqueleto, una red filamentososa que entrama al citosol y provee soporte mecánico a las membranas celulares.

El citoesqueleto de células eucariontes está formado por tres tipos de filamentos que se diferencian en el diámetro, tipo y arreglo de sus subunidades. Los filamentos de tubulina (microtúbulos) conforman el huso mitótico que se usa en la segregación cromosómica durante la división celular. Los microtúbulos son cilindros huecos de 24 nm de diámetro, cuyas paredes están formadas mayormente por 13 protofilamentos adyacentes. Los polímeros se extienden a través de la asociación de heterodímeros de α - y β -tubulina unida a GDP y los extremos más (+) y menos (-) de los protofilamentos se estabilizan con GTP. Los dímeros son liberados desde los extremos después de la hidrólisis del nucleótido. Los microtúbulos exhiben "inestabilidad dinámica" que consiste en el acortamiento repentino de los filamentos a través de un mecanismo denominado colapso catastrófico (Graumann, 2007). Los filamentos de actina (microfilamentos), son estructuras dinámicas y se requieren para el movimiento y forma celular. Los microfilamentos tienen de 8 a 9 nm de diámetro y forman una hélice de doble hebra a través de la polimerización de los monómeros unidos a ATP. Los polímeros de actina poseen un extremo (+) donde las subunidades

se unen con mayor velocidad que en el extremo (-). Los filamentos de actina exhiben "treadmilling", que se refiere a la polimerización neta en el extremo (+) y a una despolimerización neta en el extremo (-). Por último, los filamentos intermedios (IF) son elementos del citoesqueleto que proveen soporte mecánico a la célula y sirven para el posicionamiento de algunos organelos. Los IF muestran una estructura con forma de cuerda ("coiled-coil") de 10 nm de diámetro. Los IF están menos conservados que actina y tubulina debido a que existen muchas secuencias que pueden formar hebras "coiled-coil" (Lodish, 2003).

El citoesqueleto bacteriano tardó en describirse debido a la ausencia de técnicas adecuadas para su estudio. La primera descripción de un elemento del citoesqueleto bacteriano se hizo con FtsZ (Lutkenhaus y col., 1980). Posteriormente, se comprobó el requerimiento de FtsZ en la división bacteriana (Pla y col., 1991; Dai y Lutkenhaus, 1991). Sin embargo, cuando se determinó la localización subcelular de FtsZ (en el ecuador de la bacteria) se hizo aparente su verdadera función (Addinall y Lutkenhaus, 1996; Sun y Margolin, 1998). Las bacterias tienen una organización subcelular que se mantiene por un grupo de proteínas que forman polímeros y participan en procesos dinámicos dependiendo de su función. Se han identificado al menos tres clases de polímeros que guardan homología con los elementos del citoesqueleto eucarionte: las tubulinas y actinas bacterianas y los miembros de la familia ParA/MinD. Las tubulinas bacterianas, FtsZ y BtubA/BtubB, se encuentran estrechamente relacionadas en las bacterias. Además, se han descrito miembros divergentes que participan en la mantención y replicación de plasmidios (TubZ y RepX). Las actinas bacterianas, MreB, FtsA y ParM, participan en varios procesos como la división celular y mantención de la forma celular. Finalmente, la superfamilia de ATPasas ParA/MinD constituye un amplio y diverso grupo de proteínas donde su

capacidad de formar polímeros es necesaria para la localización de otras proteínas que cumplen funciones importantes en la célula (Pogliano, 2008).

En *Escherichia coli*, la división celular ocurre a través de la invaginación de la membrana en la mitad longitudinal de la célula. Simultáneamente, comienza la síntesis de un septo de péptido-glicano, en el ecuador de la bacteria, que separará a las células hijas. En la septación participan al menos 15 proteínas que se ensamblan jerárquicamente en el sitio de división. Las proteínas que participan son citoplasmáticas, de membrana y periplasmáticas y cada una de ellas se ubica en torno a un polímero con forma de anillo ubicado en el sitio de septación de la célula. De este modo, al observar la localización subcelular mediante microscopía de fluorescencia la distribución de algunas de ellas aparece como un anillo en el centro de la bacteria. De todos estos "anillos", el de distribución más definida es el de FtsZ, también llamado "anillo Z". Cuando la célula se divide el anillo desaparece y también lo hace el complejo de proteínas que lo acompaña (Errington y col., 2003; Vicente y col., 2006).

En *E. coli* las proteínas de división son reclutadas siguiendo un orden jerárquico. El orden es el siguiente: FtsZ, (FtsA,ZapA,ZipA), (FtsE, FtsX), FtsK, FtsQ, (FtsB, FtsL), FtsW, FtsI, FtsN, AmiC, EnvC; donde las proteínas entre paréntesis lo hacen en forma simultánea como complejos. Se piensa que la incorporación de una proteína requiere de la correcta ubicación de todas las anteriores. Sólo ZapA en la secuencia no es esencial. No todas las proteínas del divisoma poseen actividad enzimática sugiriendo un rol estructural o regulador de algunas de ellas en la división (Errington y col., 2003).

La proteína FtsZ

Un gen *ftsZ* está presente en casi todas las bacterias y arqueas cuyos genomas se encuentran secuenciados, con excepción de especies del género *Sulfolobus* y en

los organismos *Ureaplasma urealyticum* y *Streptomyces coelicolor* (Vaughan y col., 2004; Graumann, 2007). La elevada similitud de la secuencia aminoacídica de FtsZ de bacterias y arqueas permite agruparlas en una familia de proteínas donde sólo los residuos involucrados en la unión e hidrólisis de GTP aparecen conservados entre FtsZ y tubulina. Se predijo que FtsZ era una proteína de citoesqueleto sobre la base de la conservación de motivos de unión a nucleótido presentes en la secuencia de FtsZ que son característicos de las tubulinas eucariontes ("tubulin signature motif") (de Pereda y col., 1996). Sobre la base de la comparación de la estructura tridimensional se comprobó que FtsZ y tubulina son homólogos estructurales, lo que llevó a considerarlas como integrantes de una familia única sugiriendo un ancestro común (Nogales y col., 1998).

FtsZ en la bacteria

FtsZ es la primera proteína en ubicarse en el ecuador de la célula durante la división celular, para formar el anillo Z, en el mismo sitio donde comenzará a formarse el septo. Una reconstrucción de la contracción del septo durante la citoquinesis, en bacterias expresando la fusión GFP-FtsZ, mostró que el anillo Z fluorescente se contrae junto con la invaginación de la membrana (Sun y Margolin, 1998).

La demostración de que FtsZ es esencial para la división bacteriana provino de la caracterización de una mutante condicional termosensible, donde la copia cromosomal de *ftsZ* se reemplazó por un gen de resistencia a antibiótico, mientras que una copia del gen silvestre se mantuvo en un plasmidio de replicación termosensible. Esta mutante "termonula" es inviable y presenta una elongación anormal a lo largo de su eje axial (fenotipo denominado "filamentoso") en la condición restrictiva por la carencia de FtsZ en el citoplasma bacteriano (Pla y col., 1991). La disminución de la viabilidad celular y la filamentación se deben a que la ausencia de FtsZ impide la

realización de la citoquinesis dejando a las células hijas fusionadas por la membrana plasmática.

FtsZ es una proteína abundante, se estima que hay entre 3.500 y 15.000 moléculas de FtsZ por célula de *E. coli*. FtsZ forma polímeros lineales *in vitro* y se ha sugerido que las estructuras observadas *in vivo* podrían corresponder a estos filamentos. Recientemente, en una crio-tomografía electrónica de células de *Caulobacter crescentus* en división, se observó que la proteína FtsZ se ubica bajo la membrana plasmática, en el sitio de septación, en forma de múltiples filamentos cortos no asociados de aproximadamente 100 nm de largo y 5 nm de ancho cada uno. Estos resultados sugieren que los polímeros observados *in vitro* son similares a los filamentos detectados *in vivo* (Li y col., 2007; Osawa y col., 2005).

FtsZ *in vitro*

FtsZ es una GTPasa cuyo sitio activo se forma por la asociación de dos monómeros a través de la interacción longitudinal que consiste en la interacción de la cabeza de una subunidad con la cola de la siguiente subunidad de manera que puede prolongarse a partir de ambos extremos (cabeza y cola) del dímero de FtsZ (Erickson, 1998; Scheffers y col., 2002). FtsZ purificada se ensambla *in vitro* como protofilamentos largos de 4 a 8 nm de ancho de una manera GTP-dependiente. Aunque la hidrólisis de GTP no es requerida para la polimerización, el ión Mg^{+2} y la hidrólisis del nucleótido son requeridos para la despolimerización de la proteína. La polimerización de FtsZ presenta una concentración crítica indicando que es un proceso cooperativo (Mukherjee y Lutkenhaus, 1999). FtsZ forma una variedad de estructuras en diferentes condiciones, como filamentos simples, filamentos dobles, filamentos curvos, anillos y hojas. La interacción lateral se refiere en FtsZ a cualquier asociación entre protofilamentos, mientras que en tubulina se refiere a la formación de

microtúbulos y hojas a partir de los protofilamentos (Lu y col., 2001; Nova y col., 2007; Beuria y col., 2003; Huecas y Andreu, 2004; Michie y Löwe, 2006). Un dímero de FtsZ y el heterodímero de α - y β -tubulina son muy similares, donde el empaquetamiento de los monómeros y los contactos de la interacción longitudinal son casi idénticos (Oliva y col., 2004). Las evidencias bioquímicas y estructurales coinciden en que tubulina y FtsZ no comparten el mismo tipo de asociación lateral durante la polimerización. La tubulina posee el lazo "M" en su secuencia de amino ácidos que es clave en la formación de las interacciones laterales mientras que la FtsZ no posee este elemento de estructura secundaria en su secuencia, por tanto, no puede establecer interacciones laterales estables *in vitro* (Andreu y col., 2002; Nogales y col., 1998).

Estructura y plegamiento de FtsZ

La proteína FtsZ y la proteína tubulina poseen estructuras similares. En FtsZ el dominio amino terminal posee un plegamiento Rossmann con una molécula de GTP unida y el dominio carboxilo terminal posee un plegamiento tipo corismato mutasa que participa en la interacción con otras proteínas del divisoma (Nogales y col., 1998; Osawa y col., 2005). Aunque presentan baja identidad de secuencia primaria (10-18%), ambas son proteínas homólogas debido al parecido de su estructura terciaria y a que se ensamblan en protofilamentos muy similares *in vitro* (Nogales y col., 1998; Oliva y col., 2004; Michie y Löwe, 2006). En la FtsZ de *Thermotoga maritima* (TmFtsZ) los dos dominios se pliegan en forma independiente y la funcionalidad de la proteína se restituye al juntarlos en solución (Oliva y col., 2004). La interacción que establecen los dominios en la proteína nativa, referida como interfase interdominio, es una interacción de tipo permanente (Díaz-Espinoza y col., 2007).

Definición de dominio proteico

Un dominio proteico es la parte de una secuencia aminoacídica donde su estructura puede evolucionar, funcionar y existir independientemente del resto de la cadena polipeptídica. Un dominio tiene una estructura tridimensional compacta y estable que se pliega independientemente. Los dominios pueden variar en tamaño, desde 25 hasta 500 aminoácidos. Los dominios usualmente forman unidades funcionales, como los dominios de unión a calcio o los dominios de unión a DNA. Debido a que son estables, ellos pueden intercambiarse para hacer proteínas quiméricas (Lodish, 2003).

La prueba de que en FtsZ existen dos dominios proviene de un estudio del mecanismo y arquitectura de los polímeros formados por FtsZ de *Thermotoga maritima* y *Methanococcus jannaschii* (Oliva y col., 2004). Se definió la secuencia de los dominios amino y carboxilo terminales de TmFtsZ y se expresaron aisladamente en forma soluble, ambas proteínas se plegaron independientemente. Mezclas de los dominios reconstituyeron la actividad GTPásica y polimerización de TmFtsZ demostrando que ambos dominios son funcionales cuando se unen y que son esenciales para la actividad de la proteína. En contraste, evidencia *in vivo*, mostró que sólo el dominio amino (aa 1-195 de EcFtsZ) es estable y constituye una entidad de plegamiento independiente (Osawa y Erickson, 2005). Una mutante de FtsZ de *Mycobacterium tuberculosis* donde se quitaron 169 aminoácidos del carboxilo terminal de la secuencia silvestre (MtFtsZ- Δ C169), se expresó en forma soluble y presentó un comportamiento similar al de MtFtsZ silvestre *in vitro*, mostrando que en esta proteína un segmento que abarca el dominio amino y parte del carboxilo se comporta como una unidad de plegamiento independiente (Anand y col., 2004). Sin embargo, a estos resultados se les dio poca importancia debido a que no hicieron experimentos para

diferenciar si la actividad detectada era específica. Además, sobre la base de un análisis de la estructura de MtFtsZ nativa (1RQ7.PDB) se determinó que la proteína mutante sería inestable debido a que expondría una gran superficie hidrófoba (**Borhani y White, 2004**).

Los dominios de una proteína, de acuerdo a lo expuesto anteriormente, presentan una estructura terciaria compacta y son estables en forma independiente. La presencia de dos dominios estables en FtsZ se demostró en la proteína termoestable de *Thermotoga maritima*. En este trabajo se abordó el problema de la existencia de dominios estables e independientes en la estructura de la FtsZ mesófila de *Escherichia coli*.

HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

Sobre la base de los antecedentes mencionados, se definieron las siguientes hipótesis:

Hipótesis nula

Los dominios amino y carboxilo terminales de EcFtsZ son entidades de plegamiento independientes y estables en solución.

Hipótesis de investigación

La interacción permanente de los dominios amino y carboxilo a través de la interfase interdominio es esencial para la función de EcFtsZ.

Objetivo general

Definir y expresar los dominios amino y carboxilo terminales de FtsZ de *Escherichia coli* y realizar una caracterización *in vitro* e *in vivo* que considere la participación de ambos en la función de la proteína nativa.

Objetivos específicos

- Determinar las propiedades estructurales de los dominios *in silico*.
- Subclonar, expresar y purificar a los dominios amino y carboxilo terminales.
- Caracterizar la función de los dominios aislados *in vitro*.
- Caracterizar la función de los dominios aislados *in vivo*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

Los materiales y reactivos más importantes usados en este trabajo son: BSA, persulfato de amonio, azida de sodio, azul de Coomassie R-250, GTP sal sódica, TEMED, EDTA, Tween 20, anticuerpo Ig-G de conejo conjugado con fosfatasa alcalina y RNasa de SIGMA (EE.UU.). Cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de magnesio hexahidratado, ácido bórico, isopropanol, molibdato de amonio, bicarbonato de sodio, fosfato monobásico de potasio, fosfato dibásico de potasio, hidróxido de sodio, ácido clorhídrico, sulfato de amonio, sulfato de níquel, Tris, urea y glicina de Merck (Alemania). Acrilamida, agarosa, DTT, bisulfito de sodio, fenol, dimetilformamida, triton X-100 de Winkler (Chile). Ácido acético, etanol, metanol y acetona de TCL (Chile). Triptona y extracto de levadura de Difco Laboratories (EE.UU.). BCIP, NBT, SDS de Applichem (Alemania). Anticuerpo de cabra contra Ig-G de ratón conjugado con fosfatasa alcalina de Pierce (EE.UU.). Anticuerpo de cabra contra Ig-G de ratón conjugado con peroxidasa y anticuerpo monoclonal anti-histidina de ratón de Santa Cruz Biotechnology (EE.UU.). Bisacrilamida de Bioworld (EE.UU.). DNA polimerasa Taq, didesoxinucleótidos y estándares de masa molecular de Invitrogen (EE.UU.). Cóctel inhibidor de proteasas sin EDTA de Roche (Alemania). Bolsas de diálisis de celulosa de Spectrum (EE.UU.). Columna de exclusión molecular de WATERS (EE.UU.).

Estructuras, modelos y estudios *in silico*

Las estructuras usadas corresponden a: FtsZ del hipertermófilo *Methanococcus jannaschii* (1FSZ, MjFtsZ), FtsZ del mesófilo *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1, PaFtsZ) y FtsZ del hipertermófilo *Thermotoga maritima* (1W5F, TmFtsZ). El laboratorio

de Biología Estructural y Molecular (BEM) dispone de un modelo tridimensional de EcFtsZ obtenido por modelado comparativo a partir de las estructuras cristalinas de FtsZ de *Methanococcus jannaschii* y *Pseudomonas aeruginosa* (Díaz-Espinoza y col., 2007). Se hizo un análisis bioinformático de la estructura 3D de EcFtsZ para escoger el sitio de corte en la secuencia que deja la región de los dominios N-terminal y C-terminal de modo de no afectar los elementos de estructura secundaria. Con este propósito se compararon las estructuras del modelo de EcFtsZ y de la estructura cristalina de TmFtsZ (1W5F.PDB. Los dominios de TmFtsZ y EcFtsZ se alinearon estructuralmente usando el algoritmo CE y STAMP (Shindyalov y Bourne, 1998; Russell y Barton, 1992). Se identificaron las propiedades fisicoquímicas de la interfase de ambos dominios y los residuos involucrados en esta zona. El potencial electrostático se obtuvo con el método de cálculo de Poisson-Boltzman (constante dieléctrica molécula = 2, constante dieléctrica del solvente = 80, Radio del solvente (agua) = 1,4 Å, concentración de sales = 150 mM) y la representación se generó con **MOLMOL 2K.2**. La selección de los residuos de la interfase interdominio y el cálculo del área de interacción de los dominios en la proteína nativa se hizo de acuerdo a lo señalado en Díaz-Espinoza y col., 2007. El sitio de corte en la secuencia aminoacídica de EcFtsZ que permitió separar a ambos dominios, se encuentra entre los residuos 170 y 182 con la secuencia KVLGRGISLLDA que corresponde a un "loop" que une la hélice H6 con la hélice H7 (ver texto). Así, el dominio N-terminal contiene los residuos 1-179 y el carboxilo terminal los residuos 177-383.

Subclonación de los dominios amino y carboxilo terminales de EcFtsZ

El diseño de la estrategia de clonación de los vectores y de las secuencias se realizó *in silico* usando VECTOR NTI 9.0.0 2003. Las condiciones usadas en estos procedimientos corresponden a los protocolos tradicionales de Biología Molecular.

Las secuencias nucleotídicas que codifican a los dominios amino y carboxilo terminales (bases 1-538 y 529-1150 del gen *ftsZ*, respectivamente) se amplificaron por PCR (en un termociclador BIOMETRA T-gradient) desde el plasmidio pMFV57 (tabla II) con los partidores EcFtsZNterm1,2 y EcFtsZCterm1,2, respectivamente (tabla I). En ambos dominios se introdujo la secuencia de colas de histidina (tripletes CAC) en el extremo carboxilo terminal y los sitios de restricción Nde I (Biolabs) y Hind III (Biolabs) en el extremo 5' y 3' del marco de lectura, respectivamente. En el dominio carboxilo terminal, se introdujo un codón para metionina (triplete ATG) en el extremo 5' de la secuencia codificante. Cada amplificado se digirió con Nde I y Hind III y se ligó en el plasmidio de expresión pT7-7 (tabla II), digerido con las enzimas Nde I y Hind III según las instrucciones del fabricante. Los fragmentos quedaron en el marco de lectura bajo el control del promotor T7, inducible por IPTG, este el plasmidio contiene el gen que confiere resistencia a ampicilina y un origen de replicación ColE1 (tabla II, Fig. 6). Los vectores ligados se introdujeron por electroporación en bacterias electrocompetentes XL1-Blue (tabla II) y se seleccionaron desde las colonias resistentes en agar LB-ampicilina (100 µg/mL). Los plásmidos que contienen el fragmento amino y carboxilo se denominaron pECN1 Y pECC2, respectivamente (tabla II). En ambas reacciones de amplificación se utilizó el siguiente protocolo: "hot start": 95 °C por 5 min., desnaturalización 95 °C por 1 min., "annealing" 62 °C por 1 min., extensión 72 °C por 2 min., extensión final 72 °C por 15 min., N° ciclos: 25. En la mezcla de reacción se utilizó la DNA polimerasa *Pfu* Turbo (Stratagene) según las instrucciones del fabricante. Se realizó una segunda clonación para obtener a los dominios en plasmidios con origen de replicación compatible y así, hacer la co-expresión en un mismo cultivo celular.

La secuencia nucleotídica correspondiente al *cassette* de expresión de los plasmidios pECN1 y pECC2, incluyendo el promotor T7, se amplificó usando como partidor sentido a la secuencia del promotor T7 (T7-PRO) y los partidores antisentido de la amplificación previa (EcFtsZ(N,C)term2) (tabla I). Los productos se ligaron por los extremos romos con el plasmidio pACYC184 digerido previamente con Dra I (Biolabs) según las instrucciones del fabricante.

Los vectores ligados se introdujeron por electroporación en bacterias electrocompetentes DH5 α (tabla II) y seleccionaron como colonias resistentes en agar LB-tetraciclina (35 μ g/mL). Se usó en ambas amplificaciones el protocolo: *hot start*: 95 °C por 5 min., desnaturación 95 °C por 1min., *annealing* 60 °C por 1 min., extensión 72 °C por 2 min., extensión final 72 °C por 15 min., N° ciclos: 25. En la reacción se utilizó la DNA polimerasa *Pfu* Turbo (Stratagene) según las instrucciones del fabricante. Los plasmidios derivados de pACYC184 que expresan a los dominios amino y carboxilo terminales bajo el control del promotor T7 se denominaron pAECN1 y pAECC2. Estos confieren resistencia a tetraciclina y poseen un origen de replicación P15A (tabla II, Fig. 6). La dirección del inserto de los vectores derivados de pACYC184 se verificó mediante digestión con enzimas de restricción. La integridad de la secuencia de todos los vectores se verificó por secuenciación y no se observaron mutaciones. El detalle de la secuencia de los dominios se muestra en la figura 5.

Tabla I. Partidores usados en esta tesis

Tabla I. Partidores usados en esta tesis.

Partidor	Secuencia ^a	Característica
EcFtsZNterm1	5'-TCGGGAGAGAAcaTATGTTGAAC-3'	Partidor sentido para amplificar la región codificante del dominio amino desde el vector pMFV57. Agrega el sitio Nde I.
EcFtsZNterm2	5'-TCTAGTGCCCAAGCITTTAGTGGTG GTGGTGGTGGTGCAGCAGGGAGATAC CGCGGC-3'	Partidor antisentido para amplificar la región codificante del dominio amino desde el vector pMFV57. Agrega el sitio Hind III, codón de término de traducción, fusión de 6 histidinas en C-terminal.
EcFtsZCterm1	5'-CTGGGCCGCcaTATgTCCCTGCTGG AT-3'	Partidor sentido para amplificar la región codificante del dominio carboxilo desde el vector pMFV57. Agrega el sitio Nde I.
EcFtsZCterm2	5'-ATGTCAGCCCAAGCITTTAGTGGTG GTGGTGGTGGTGCAGCTTGCTTAC GCAGGAATGC-3'	Partidor antisentido para amplificar la región codificante del dominio carboxilo desde el vector pMFV57. Agrega el sitio Hind III, codón de término de traducción, fusión de 6 histidinas en C-terminal.
T7-PRO	5'-TTAATACGACTCACTATAGG-3'	Partidor para amplificar el "casete" de expresión de los dominios desde los plasmidios de expresión pECN1 y pECC2.

^a Se indican en minúsculas las mutaciones puntuales agregadas, en negrita los codones codificantes introducidos y los sitios de restricción correspondientes se han subrayado.

Tabla II. Vectores y cepas usados en esta tesis

Vector o Cepa	Propiedades relevantes, genotipo	Fuente
pMFV57	Vector de expresión de EcFtsZ derivado de pET28a, Amp(R).	Tesis Jae Yen Shin, 2007.
pT7-7	Vector de expresión alto número de copias, origen de replicación ColE1, Amp(R), MCS.	Tabor S. y col., 1985.
pACYC184	Vector de clonamiento general, número de copias intermedio, origen de replicación pA15, Tet(R), Cm(R).	Rose R. y col., 1988.
pECN1	Vector de expresión del dominio amino de FtsZ (aa. 1-179) clonado en pT7. Amp(R).	Este trabajo.
pECC2	Vector de expresión del dominio carboxilo de FtsZ (aa. 177-383) clonado en pT7. Amp(R).	Este trabajo.
pAECN1	Vector de expresión del dominio amino de FtsZ (aa. 1-179) clonado en pACYC, Tet(R).	Este trabajo.
pAECC2	Vector de expresión del dominio carboxilo de FtsZ (aa. 177-383) clonado en pACYC, Tet(R).	Este trabajo.
XL1BLUE	F ⁻ :Tn10 proA ⁺ B ⁺ lacI ^q Δ(lacZ)M15/recA1 endA1 gyrA96 (Nal ^r) thi hsdR17 (r _K -m _K ⁺) glnV44 relA1 lac.	Stratagene.
DH5 α	F ⁻ endA1 hsdR17 (r _K -m _K ⁺) glnV44 thi recA1 gyrA96 (Nal ^r) relA1 Δ(lacZYa-argF) U169 deoR (Ø80dlacΔ(lacZ)M15)	Invitrogen.
BL21 (DE3)	F-ompT gal [dcm] [lon] hsdSb (rb-mb; E. coli) con DE3, un profago λ que lleva el gen de la RNA polimerasa de T7.	Novagen.
MC1061 (DE3)	araD139 Δ(ara-leu)7697, Δ(lac)X74 galU galK strA con DE3, un profago λ que lleva el gen de la RNA polimerasa de T7.	Tesis Jae Yen Shin, 2007.
VIP2 (DE3)	araD139 Δ(ara-leu)7697, Δ(lac)X74 galU galK strA ftsZ::kan ^r . pLAR9 (rep(ts) ftsZ) con DE3, un profago λ que lleva el gen de la RNA polimerasa de T7.	Tesis Jae Yen Shin, 2007.

Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE) y DNA (Agarosa)

Los cultivos líquidos de la cepa de interés se lavaron tres veces con amortiguador TEN (Tris 50 mM pH 8,0, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM) y se suspendieron en amortiguador de electroforesis (Tris 75 mM pH 6,8, glicerol 10%, SDS 0,3%, 2-mercaptoetanol 0,1%, azul de bromofenol 0,01%) calentando a 95 °C durante 5 minutos. Adicionalmente las muestras se centrifugaron a 10.000xg durante 10 minutos antes de cargar para decantar el material insoluble. Las muestras de proteína purificada se trataron únicamente con amortiguador de electroforesis. Usualmente para el gel resolutivo se usó acrilamida al 10% y la electroforesis se realizó a 100 V (constante) durante 1,5 horas a menos que se detalle una diferencia. Los productos de PCR, las digestiones y las extracciones de DNA plasmidial se analizaron en geles de agarosa al 1% mediante electroforesis en amortiguador TAE (Tris acetato 40 mM y EDTA 1 mM). Previamente, las muestras se trataron con amortiguador de carga (azul de bromofenol 0.25 %, xylene cyanol FF 0.25%, glicerol 30 %). Las electroforesis de DNA se hicieron a 100 V (constante) durante 1 hora. Los geles se revelaron con tinción de Azul de Coomassie y bromuro de etidio para geles de proteína y DNA, respectivamente.

Western-blot

Para determinar la pureza de las muestras y también confirmar la presencia de la proteína de interés en extractos celulares totales se realizaron ensayos de inmunodetección. Para detectar a FtsZ y los dominios amino y carboxilo terminales se utilizó como anticuerpo primario un suero policlonal de conejo anti-FtsZ (fabricado en el laboratorio). Las colas de histidina introducidas en la clonación de los dominios amino y carboxilo terminales se marcaron específicamente con anticuerpos monoclonales de ratón anti-histidina (NOVAGEN). En ambos casos se utilizó un anticuerpo secundario

contra ratón o conejo conjugado con peroxidasa. Se revelaron en placas fotográficas con ECL debido a que entrega mayor sensibilidad.

Las proteínas del gel SDS-PAGE se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (BIORAD) en una reacción de transferencia en Tris 25 mM, glicina 190 mM, metanol 20% a -20 °C durante 1 hora a 100 V (constante). La membrana se bloqueó con TS-leche 5% (Tris 50 mM, NaCl 150 mM) durante 1 hora y se incubó con el anticuerpo primario en TS-leche 5% y se lavó con TS tres veces. Posteriormente, se incubó con el anticuerpo secundario en TS-leche 5% durante una hora y se lavó con TS tres veces. Para revelar las membranas, éstas se incubaron por 3 a 5 minutos con una solución de Tris 100 mM pH 8,0 más 22 μ L del reactivo 1 (ácido cumárico 90 mM en DMSO) más 50 μ L del reactivo 2 (Luminol 250 mM en DMSO). Finalmente, la membrana se expuso sobre placas fotográficas de revelado (KODAK).

Expresión y cinética de crecimiento de FtsZ y los dominios aislados en BL21(DE3)

La expresión de EcFtsZ y los dominios amino y carboxilo terminales se hizo en cepas sobre productoras de *E. coli* BL21(DE3) (O.D._{600nm} 0,7-0,8 a 37 °C) al inducir con IPTG 0,1 mM durante 3 horas en medio LB-ampicilina (100 μ g/mL). Para los ensayos de co-expresión de los dominios se utilizó el inductor a una concentración de 0,5 mM de IPTG durante 3 horas en medio LB-ampicilina (100 μ g/mL) y tetraciclina (35 μ g/mL). La expresión de las proteínas se verificó por SDS-PAGE y *Western-blot*. Las curvas de crecimiento en BL21(DE3) se hicieron preparando una dilución 1:100 de un cultivo líquido de noche de la cepa de interés en medio fresco LB-ampicilina (100 μ g/mL) más 0,1 mM IPTG y se incubó con agitación a 37 °C; se registró la absorbancia a 600 nm en los tiempos señalados.

Ensayos de viabilidad celular en VIP2 (DE3)

La funcionalidad de FtsZ silvestre y FtsZ reconstituida a partir de los dominios se analizó *in vivo* utilizando la mutante VIP2, una cepa descrita anteriormente (Pla y col., 1991). La cepa de *E. coli* VIP2 es una mutante condicional donde la copia cromosomal de *ftsZ* se reemplazó por el gen que confiere resistencia a kanamicina. Esta cepa es viable debido a que *ftsZ* se expresa bajo el control de su promotor natural desde el plasmidio de bajo número de copias pLAR9. Este vector tiene un replicón termosensible y confiere resistencia a cloranfenicol. Así, a 30 °C (temperatura permisiva) el plasmidio se replica normalmente y la célula es viable. Si la temperatura es elevada a 42 °C (temperatura restrictiva), los cultivos de VIP2 se vuelven inviables por la dilución del plásmido pLAR9 debido a que su replicación cesa y la síntesis de FtsZ se detiene luego de 90 minutos.

En el laboratorio, la cepa VIP2 se lisogenizó con el fago λ DE3 y fue caracterizada con vectores de expresión derivados de T7 (Jae-Yen Shin, 2003). El sistema de complementación consistió en evaluar la viabilidad y cinética de crecimiento en la temperatura permisiva donde se expresa FtsZ desde el vector pLAR9. La comparación de estos resultados con lo obtenido en la temperatura restrictiva entregó la información acerca de la funcionalidad del alelo que se probó (Fig. 15). En la cepa VIP2(DE3), se observó una disminución de 4 a 5 órdenes de magnitud en la viabilidad y una disminución de 50% en la constante de crecimiento en la condición restrictiva respecto de la condición permisiva (Fig. 16A, B y C).

Los plasmidios de interés se entregaron mediante electroporación en VIP2(DE3) y se dejó crecer un cultivo líquido hasta fase exponencial. Posteriormente, se prepararon diluciones hasta 10^{-6} y una alícuota de 10 μ L de cada dilución se sembró en triplicado en LB-agar 1,5%. Cada plasmidio probó en duplicado y se dejó creciendo

a 30 °C en LB-agar más kanamicina (100 µg/mL), cloranfenicol (50 µg/mL) y el antibiótico del plasmidio de interés (en la condición permisiva). A 42 °C los cultivos se crecieron en LB-agar más kanamicina (100 µg/mL) y el antibiótico del plasmidio de interés (en la condición restrictiva). En ambos casos las placas se incubaron durante al menos 16 horas y se tituló cada cultivo original. El antibiótico ampicilina (100 µg/mL) se usó para seleccionar los plasmidios pECN1 y pECC2. El antibiótico tetraciclina (50 µg/mL) se usó para seleccionar los plasmidios pAECN1 y pAECC2. Cada ensayo se acompañó de un control positivo con el plasmidio pMFV57 (que expresa a FtsZ silvestre) y de un control negativo, con el plasmidio sin la copia de *ftsZ* silvestre, que permitió determinar la mínima viabilidad de la cepa en la condición restrictiva.

Cinética de crecimiento de los cultivos VIP2(DE3)

Se estudió la cinética de crecimiento de cultivos expresando FtsZ y los dominios aislados y juntos a 30 y 42 °C. 100 mL del medio de cultivo se inocularon con una dilución de 1:50 en la misma condición selectiva que en los ensayos de viabilidad celular. Cada condición se realizó al menos en duplicado. Se registró la densidad óptica a 600 nm para seguir el crecimiento bacteriano y las curvas de crecimiento se ajustaron a un modelo de crecimiento exponencial donde se estimó la tasa de cambio del crecimiento en el tiempo. La región de los datos que corresponde a la fase de crecimiento exponencial se rectificó usando el logaritmo en base 10. A partir de gráficos de $\text{Log}_{10}(\text{D.O.}_{600\text{nm}})$ versus tiempo (min) se obtuvo la pendiente de la recta resultante que corresponde a la constante de crecimiento de cada cultivo.

Morfología celular por microscopía de transmisión

Se estudió la morfología celular de la cepa VIP2(DE3) mediante microscopía de transmisión en un microscopio LSM microsystem (Zeiss). Un cultivo líquido a $\text{D.O.}_{600\text{nm}}$ de 0,7-0,8 de la cepa de interés, se incubó por 3 horas a 30 y 42 °C. Posteriormente,

832 μL del cultivo se mezclaron con 520 μL de formaldehído 37%, más 3.2 μL de glutaraldehído, más 645 μL de amortiguador fosfato (Na_3PO_4 100 mM pH 7,5). La mezcla se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente y posteriormente 30 minutos en hielo. Las células fijadas se lavaron tres veces con 500 μL de amortiguador PBS (Fosfato 20 mM pH 7,4, NaCl 100 mM) y se suspendieron en amortiguador GTE (Tris 20 mM pH 7,5, glucosa 50 mM, EDTA 10 mM); en este punto las muestras se almacenaron a 4 °C. Posteriormente se prepararon frotis desde estos cultivos fijados para la observación y se tomaron las fotografías con el software del equipo.

Purificación EcFtsZ por el método de precipitación de polímeros inducidos con CaCl_2 (Adaptado de Rivas y col., 2000)

Dos litros de cultivo inducidos se centrifugaron a 5.000xg a temperatura ambiente, las células se lavaron con amortiguador TEN (Tris 50 mM pH 8,0, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM) y posteriormente se centrifugaron a 5.000xg durante 10 minutos a 4 °C y se almacenaron a -80 °C. Para iniciar la purificación las células cosechadas se descongelaron en hielo, se suspendieron en 20 mL de amortiguador PEM (PIPES 50 mM pH 6,5, MgCl_2 5 mM, EDTA 1 mM) y se sonicaron con 5 pulsos de 45 Watts durante 20 segundos con intervalos de espera de 1 minuto y un pulso final de 75 Watts durante 20 segundos, todo en hielo (en un sonicador MISONIX sonicator 3000). El lisado celular se centrifugó a 100.000xg (LS-75B Ultracentrifuge, BECKMAN). El sobrenadante se transfirió a un tubo estéril y se añadió GTP y CaCl_2 a una concentración final de 1 mM y 20 mM respectivamente, la mezcla se incubó a 30 °C durante 15 minutos y los polímeros formados se centrifugaron a 10.000xg durante 15 minutos. El precipitado se suspendió en 10 mL de amortiguador PEM por litro de cultivo y se ajustó la concentración de GTP y CaCl_2 a 1 mM y 20 mM respectivamente, la mezcla se incubó a 30 °C durante 15 minutos. Los polímeros formados se

centrifugaron a 10.000xg por 15 minutos a 4 °C. El precipitado se suspendió en 5 mL de tampón PEM y se centrifugó a 10.000xg por 15 minutos a 4 °C para sedimentar el material insoluble. El sobrenadante se cromatografió mediante HPLC (system gold, BECKMAN) en una columna de intercambio aniónico (Q sepharosa, Amersham) con un gradiente lineal de KCl en amortiguador A (50 mM Tris pH 8,0, 1 mM EDTA, 50 mM KCl) para eluir la proteína retenida. El cromatograma se siguió espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a 280 nm, el pico correspondiente a FtsZ (eluye a una concentración de KCl aproximadamente de 350 mM) se recogió en fracciones de 4 mL. La solución de proteína se dializó toda la noche contra 2 litros de amortiguador de diálisis (Tris 50 mM pH 8,0, KCl 250 mM, glicerol 10%). La muestra concentrada se almacenó a -80°C. La concentración de proteína se determinó usando el método de Bradford calibrado para FtsZ. En la figura 8A se muestra el SDS-PAGE con las etapas de la purificación: carriles 1, estándar de masa molecular; 2, sobrenadante del lisado celular; 3, *pellet* del lisado celular; 4, *pellet* de la primera precipitación con Ca^{+2} ; 5, sobrenadante de la primera precipitación con Ca^{+2} ; 6, *pellet* de la segunda precipitación con Ca^{+2} ; 7, sobrenadante de la segunda precipitación con Ca^{+2} ; 8, carga de columna HPLC; 9, pico de elución de FtsZ desde cromatografía intercambio iónico; 10, concentrado FtsZ purificada.

Purificación del dominio amino terminal desde los cuerpos de inclusión

Esta proteína presentó elevados niveles de expresión y se acumuló mayoritariamente en cuerpos de inclusión. En la primera etapa se purificaron los cuerpos de inclusión, en la segunda, se purificó la proteína mediante cromatografía de afinidad desde los cuerpos de inclusión solubilizados en urea.

Para purificar los cuerpos de inclusión, en la primera etapa, dos litros de cultivo inducido se centrifugaron a 5.000xg y se lavaron en 20 mL de amortiguador TEN (Tris

50 mM pH 8,0, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM) y se almacenaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Las células se descongelaron en hielo y se lavaron 3 veces con TEN. Se agregó bisulfito de sodio, DTT, MgCl_2 , lisozima y PMSF a una concentración final de 10 mM, 5 mM, 10 mM, 40 mg/mL y 1 mM respectivamente. La muestra se incubó durante una hora en hielo con agitación ocasional. Luego se agregó 250 μL de ácido deoxicólico 10% y la muestra se incubó por 15 minutos en hielo. Posteriormente se agregó 250 μL de DNAsa 4 mg/mL y se incubó una hora a temperatura ambiente con agitación ocasional. Luego, la mezcla se sonicó para lisar completamente las células con 5 pulsos de 45 Watts durante 20 segundos con intervalos de espera de 1 minuto y un pulso final de 75 Watts durante 20 segundos, todo en hielo (en un sonicador MISONIX sonicator 3000). La mezcla se centrifugó a 10.000xg por 25 minutos. El material insoluble se lavó con TEN 2 veces. Luego se lavó tres veces con amortiguador de lisis (Tris 50 mM pH 8,0, EDTA 100 mM, EDTA 10 mM, triton X-100 1% v/v). Finalmente se realizó un lavado con agua destilada y el material insoluble, que contiene mayoritariamente el dominio amino terminal, se congeló a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

En la segunda etapa, para purificar el dominio amino terminal, los cuerpos de inclusión se suspendieron en 10 mL de amortiguador A más urea 6 M (Tris 50 mM pH 8,0, KCl 50 mM, glicerol 10%) y se centrifugó a 10.000xg para descartar el material no disuelto. Esta solución se ajustó a 5 mM de imidazol y se cargó en la columna de afinidad (NOVAGEN) que estaba previamente equilibrada en amortiguador A más imidazol 5 mM. La cromatografía se trabajó a un flujo de 0,5 mL/min. La columna cargada se lavó con 3 volúmenes de columna (VC) del amortiguador de carga. Posteriormente, se realizaron tres lavados con 3 VC de amortiguador A más imidazol 10 mM, 50 mM y 100 mM respectivamente. Finalmente, la proteína se eluyó de la resina de afinidad con un lavado de 3 VC con amortiguador A más imidazol 0,5 M. El

eluido se dializó toda la noche contra un litro de amortiguador A más urea 6 M para diluir el imidazol y se centrifugó a 10.000xg por media hora para descartar el material insoluble y se guardó a -80°C . La concentración de proteína se determinó usando el método de Bradford calibrado para FtsZ. En la figura 8B se muestra el SDS-PAGE de las etapas de la purificación de amino: carriles 1, estándar de masa molecular; 2, cuerpos de inclusión purificados; 3, lavado con 5 mM Imidazol, 4, lavado con 10 mM Imidazol; 5, lavado con 50 mM Imidazol; 6, lavado con 50 mM Imidazol; 7, lavado con 100 mM Imidazol; 8, lavado con 0,5 M Imidazol.

Purificación del dominio carboxilo terminal desde la fracción citoplasmática

El dominio carboxilo terminal presentó bajos niveles de expresión en comparación al dominio amino terminal y se expresó en forma soluble de manera que la purificación se hizo desde la fracción citoplasmática de los cultivos inducidos. Dos litros de cultivo inducido se centrifugaron a 5.000xg y las células se lavaron con amortiguador A (50 mM Tris pH 8.0, 50 mM NaCl, 10% glicerol). Posteriormente, la suspensión se centrifugó a 5.000xg durante 10 minutos a 4°C y se almacenó a -80°C . Para iniciar la purificación, las células descongeladas en hielo se suspendieron en 25 mL de amortiguador A y se sonicaron (5 pulsos de 45 Watts durante 20 segundos con intervalos de espera de 1 minuto y un pulso final de 75 Watts durante 20 segundos, todo en hielo). Posteriormente, el lisado celular se centrifugó a 100.000xg. El sobrenadante de la ultracentrifugación se ajustó a una concentración 5 mM de imidazol y se cargó en la columna que estaba previamente equilibrada en amortiguador A más imidazol 5 mM. La cromatografía se trabajó a un flujo de 0,5 mL/min. La columna cargada con la proteína se lavó con 3 volúmenes de columna (VC) del amortiguador de carga. Posteriormente, se realizaron tres lavados con 3 VC de amortiguador A más imidazol 10 mM, 50 mM y 100 mM respectivamente. Finalmente, la proteína residual se

eluyó de la resina de afinidad con un lavado de 3 VC con amortiguador A más imidazol 0,5 M. El eluido se dializó contra dos Litros de amortiguador A para diluir el imidazol y se centrifugó a 10.000xg por media hora para descartar el material insoluble y se guardó a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. La concentración de proteína se determinó usando el método de Bradford calibrado para FtsZ. En la figura 8C se muestra el SDS-PAGE de las etapas de la purificación de carboxilo: carriles 1, estándar de masa molecular; 2, sobrenadante del lisado celular; 3, *pellet* del lisado celular; 4, post-columna de la carga del sobrenadante; 5, lavado con Imidazol 5 mM, 6, lavado con Imidazol 10 mM; 7, lavado con Imidazol 50 mM; 8, lavado con Imidazol 100 mM; 9, lavado con Imidazol 0,5 M.

Cinética de polimerización de FtsZ y cinética de agregación del dominio amino terminal seguidas por dispersión de la luz

La cinética de polimerización de FtsZ y la cinética de agregación del dominio amino terminal se determinó por dispersión de luz a 90° en un espectrofluorímetro Perkin Elmer LS-50. Se utilizó una longitud de onda de excitación y emisión de 350 nm, ancho de banda de 5 nm, paso óptico de 1 cm y se registró a intervalos de 2 segundos durante el tiempo especificado usando un filtro atenuador de emisión de 2%, 4% ó 6% dependiendo de la línea base obtenida. Las reacciones de polimerización de FtsZ se hicieron en amortiguador de polimerización (MES 50 mM pH 6,5, MgCl_2 10 mM, KCl 50 mM, GTP 1 mM) a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se usaron concentraciones de proteína y de otros compuestos según se indique. La concentración crítica de FtsZ se calculó como se ha descrito anteriormente (Mukherjee y col., 1999). En los experimentos de cinética de agregación de amino la proteína purificada se reñaturó por dilución rápida en amortiguador de purificación (Tris 50 mM pH 8,0, KCl 50 mM, glicerol 10%) o en amortiguador de polimerización de FtsZ a temperatura ambiente.

Actividad GTPásica

La velocidad de la reacción de hidrólisis de GTP se determinó por el método del verde de malaquita (Lanzetta y col, 1979), donde se utilizaron las siguientes soluciones y procedimientos:

1) Solución de colorante. Se preparó una solución de verde de malaquita al 0.045% (VM) y otra de molibdato de amonio al 4.2% en HCl 4 N (MA), ambas soluciones se mezclaron en una proporción de 3:1, respectivamente. A 5 mL de la mezcla VM-MA se le agregaron 100 μ L de tritón X-100 al 0.02% (TX) y se obtuvo la mezcla VM-MA-TX.

2) Determinación de fosfato libre. Se transfirieron 70 μ L desde la mezcla de reacción de polimerización de FtsZ silvestre y FtsZ reconstituida con los dominios aislados a dos tubos de 1,5 mL y se le agregó ácido perclórico a una concentración final de 10% y se dejó en reposo por 10 minutos a temperatura ambiente. De esta solución se tomaron 50 μ L y se transfirieron a un tubo de 1,5 mL al que se le agregó 800 μ L de la solución VM-MA-TX y se agitó vigorosamente en un agitador *vortex* por un minuto y se le agregaron 100 μ L de amortiguador citrato al 34%. Se esperó 20 minutos antes de medir la D.O. a 630 nm en el espectrofotómetro. La curva de calibración se hizo con fosfato mono potásico en un rango de 0 a 300 μ M. La mezcla de reacción contenía FtsZ o los dominios a la concentración señalada en el amortiguador de polimerización a 30 °C y se inició al agregar el nucleótido a una concentración de 1 mM, de manera similar a lo descrito para los ensayos de polimerización.

Microscopía electrónica

Se estudió la polimerización de FtsZ y de FtsZ reconstituida observando por microscopía electrónica los polímeros inducidos con GTP 1 mM en amortiguador de polimerización. Muestras de 10 μ L de cada condición se agregaron a grillas cubiertas

con Formvar y teñidas negativamente con acetato de uranilo 1%. Las muestras se observaron en un microscopio electrónico modelo Zeiss EM-109.

Espectroscopia de dicroísmo circular

Los espectros de dicroísmo circular se registraron en un espectropolarímetro Jasco J-600. Las muestras se colocaron en una cubeta de 1 mm de paso óptico. Se hicieron tres barridos por muestra en el UV-lejano (190 nm hasta 260 nm) a una velocidad de 20 nm/min, con una sensibilidad de 20 mdeg (milésimas de grado). FtsZ silvestre y el dominio carboxilo terminal se incubaron a temperatura ambiente en Tris 50 mM pH 7,5, el dominio amino terminal se renaturó por dilución rápida en Tris 50 mM pH 7,5, v/v Tween20 0,1% a 4 °C durante 1 hora y se preincubó a temperatura ambiente para la medición. Antes de registrar los espectros de dicroísmo circular la muestra se incubó a temperatura ambiente. A partir de los espectros de dicroísmo circular de FtsZ silvestre y los dominios aislados, se calculó la elipticidad residuo promedio usando el software del equipo y se estimó el contenido de estructura secundaria de cada preparación de acuerdo a **Sreerama y Woody, 2000**.

Cromatografía de exclusión molecular

Se estudió el estado de agregación de FtsZ silvestre y los dominios amino y carboxilo terminales mediante cromatografía analítica de exclusión molecular en HPLC (system gold, BECKMAN). Se utilizó una columna filtración molecular Protein-Pak 125 (WATERS) que posee un rango de fraccionamiento de 1-100 kDa para proteínas globulares. La cromatografía se trabajó a un flujo de 0,5 mL/min a temperatura ambiente con una fase móvil de Hepes 50 mM pH 7,0, KCl 300 mM, EDTA 1 mM a temperatura ambiente y el desarrollo del cromatograma se siguió registrando la absorbancia a 230 nm. La columna se calibró con estándares de masa molecular (SIGMA) (Fig. 6): albúmina de suero bovino de 66 kDa (cuadrado), anhidrasa carbónica

de 29 kDa (triángulo), apoprotinina de 6,5 kDa (círculo), EcFtsZ de 40 kDa (rombo) y Y222W de 40 kDa (hexágono). Los estándares se preincubaron en amortiguador de la fase móvil a una concentración de 2-5 mg/mL y se cargó 50 μ L de muestra. FtsZ y carboxilo se preincubaron a una concentración de 5 mg/mL y se cargó 50 μ L de muestra. Amino se preincubó a una concentración 5 mg/mL y se renaturó por dilución rápida en la columna inyectando 10 a 50 μ L de muestra. En otro experimento, el dominio amino terminal se renaturó por dilución rápida a 4° C, se preincubó a temperatura ambiente y un volumen de 50 μ L se cargó a la columna (ver texto). La masa molecular se calculó interpolando el volumen de elusión en la curva de calibración que corresponde al $\text{Log}_{10}(\text{PM})$ versus volumen de elusión.

Solubilidad del dominio amino termina.

Una muestra de amino purificado se renaturó por dilución rápida y se incubó a temperatura ambiente durante el período señalado en la figura 13A y 13B en el amortiguador de purificación y se tomaron alícuotas diariamente para visualizar la integridad de la preparación por SDS-PAGE.

RESULTADOS

El diseño de la secuencia que codifica los dominios amino y carboxilo terminales de EcFtsZ se hizo comparando la secuencia aminoacídica y la estructura de éstos con los de TmFtsZ. Debido a que no se conoce la estructura tridimensional de EcFtsZ se construyó un modelo de su estructura en estado monomérico, a partir de la estructura cristalina de FtsZ de *Pseudomonas aeruginosa* y *Methanococcus jannaschii*, que se usaron como templados. Adicionalmente, se construyó el modelo de la estructura de un dímero de EcFtsZ a partir de la estructura del heterodímero de α/β -tubulina (Díaz-Espinoza y col., 2007). Los dominios amino y carboxilo terminales se construyeron a partir de la secuencia de EcFtsZ con un único corte. El sitio de corte en la secuencia de EcFtsZ se determinó al hacer un alineamiento estructural de los dominios de EcFtsZ con los de TmFtsZ. Las secuencias de ambos dominios se insertaron en plasmidios de expresión que se caracterizaron *in vitro* e *in vivo*.

Diseño de las secuencias que codifican los dominios amino y carboxilo terminales de EcFtsZ

Alineamiento de las secuencias de EcFtsZ, TmFtsZ y de MjFtsZ. Al comparar las secuencias de los dominios de EcFtsZ y TmFtsZ (Fig. 1 y tabla III), se observa que la secuencia del dominio amino terminal tiene una mayor conservación (54%) respecto a la del dominio carboxilo terminal (37%). Cabe hacer notar que el porcentaje de identidad correspondiente al dominio amino terminal es mayor que el de las proteínas (48%). Se sabe que un alineamiento de secuencias no representa en muchos casos la similitud estructural de las proteínas, por esta razón se hizo una comparación estructural entre el modelo de EcFtsZ y la estructura del cristal de T. maritima.

Propiedades fisicoquímicas de EcFtsZ y sus dominios aislados

Se hizo una comparación estructural entre el modelo de EcFtsZ y la estructura de TmFtsZ debido a que el modelo de EcFtsZ se construyó a partir de la estructura de MjFtsZ. El R.M.S.D. entre el modelo de EcFtsZ y la estructura de MjFtsZ (usada como molde en el modelamiento) es 0,19 Å, indicando que el modelo predice una estructura prácticamente idéntica entre ambas proteínas.

En la figura 2 se muestran las estructuras tridimensionales del modelo de EcFtsZ y del cristal de TmFtsZ. El modelo de EcFtsZ se representa en estado monomérico y la estructura de TmFtsZ como un dímero que tiene sus dominios intercambiados (*domain-swapped*). La estructura del cristal de TmFtsZ (1W5F.PDB) es la única de FtsZ de *Thermotoga maritima* disponible actualmente en la base de datos PDB (Oliva y col., 2007). Se observa una clara diferencia en la disposición del *loop-T7*, que es esencial para la interacción longitudinal responsable de la actividad GTPásica. Con el objeto de analizar en similares condiciones oligoméricas las diferencias estructurales entre el modelo de EcFtsZ y la estructura de TmFtsZ, se compararon las estructuras dimericas de ambas proteínas, como se muestra en la figura 3. Se observa que en el modelo de EcFtsZ cada cadena polipeptídica corresponde a un monómero no así en la estructura del cristal de TmFtsZ, donde parte de la cadena polipeptídica se encuentra en ambos monómeros (*domain-swapped*). Sin embargo, la estructura de un monómero de TmFtsZ se mantiene similar a la del modelo de EcFtsZ mientras que el otro monómero de TmFtsZ muestra una conformación invertida. Por lo tanto, solo se comparará la estructura de los monómeros similares.

Figura 1 Alineamiento de secuencia aminoacídica de FtsZ de Escherichia coli, de Thermotoga maritima y de Methanococcus jannaschii

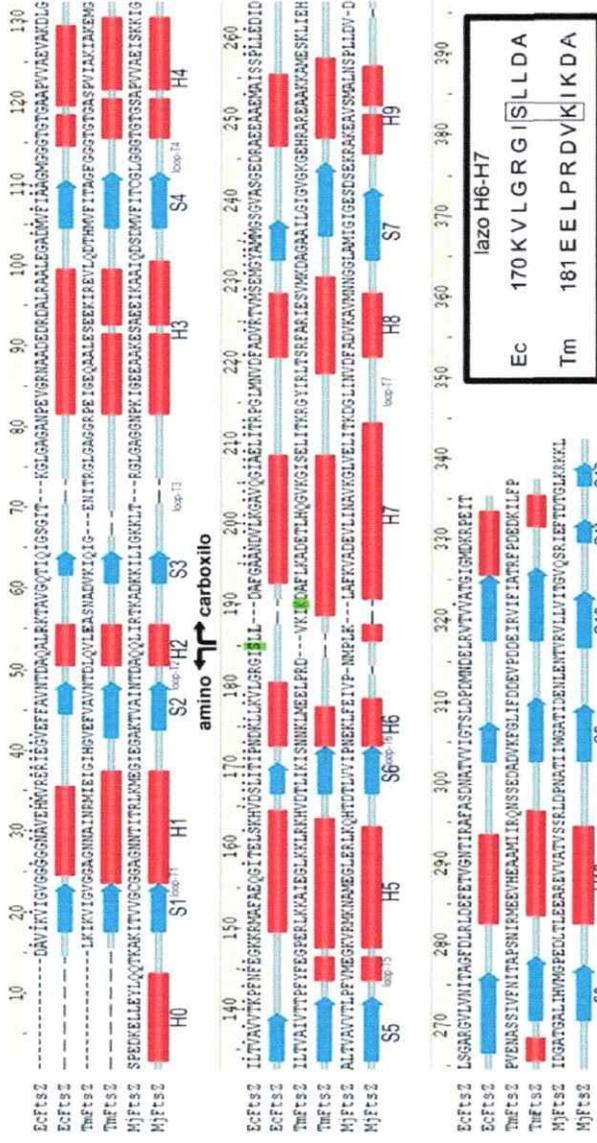


Figura 1. Alineamiento de secuencia aminoacídica de FtsZ de Escherichia coli, de Thermotoga maritima y de Methanococcus jannaschii. Se muestra la secuencia aminoacídica y la topología del modelo tridimensional de FtsZ de *E. coli* (EcFtsZ) y de las estructuras cristalinas 1FSZ.PDB (MjFtsZ) y 1W5F.PDB (TmFtsZ). Las hebras beta y hélices alfa se representan con flechas azules y bloques rojos, respectivamente. En la parte inferior del alineamiento se muestra la nomenclatura de los elementos de estructura secundaria de acuerdo a lo propuesto por **Nogales y col., 1998**. Se destaca en verde la serina 177 de la secuencia de EcFtsZ (este trabajo) y la lisina 188 seleccionada por **Oliwa y col., 2004** en TmFtsZ como frontera de los dominios amino y carboxilo terminales. En el recuadro se muestra un alineamiento de secuencia aminoacídica del lazo no estructurado que une H6 y H7 de EcFtsZ y TmFtsZ, respectivamente. Aquellos residuos que participan en la interfase interdominio (ver texto) se marcan con un punto negro sobre su posición en el alineamiento.

Tabla III. Comparación in silico de las secuencia de EcFtsZ, TmFtsZ y sus dominios aislados

Tabla III. Comparación in silico de la secuencia de EcFtsZ, TmFtsZ y sus dominios aislados.

	<i>E. coli</i>		<i>T. marítima</i>		RMSD [Å] ^e		
	[n° aa] ^a	Δ ASA Interfase Interdominio [Å] ² _b	[n° aa] ^a	Δ ASA Interfase Interdominio [Å] ² _b	Identidad secuencia [%] ^c	Identidad Interfase Interdominio [%] ^d	CE STAMP
FtsZ	383	1540	351	2043	48 (306)	47 (72)	nd 4,00
amino	10 - 179		22 - 190		54 (188)		2,48 3,70
carboxilo	177 - 315		188 - 336		37 (113)		3,57 3,82

^a número total de aminoácidos de la proteína EcFtsZ, TmFtsZ y de los dominios amino y carboxilo terminal del modelo tridimensional y la estructura cristalina, respectivamente.

^b Δ ASA (cambio en el área accesible al solvente) obtenido de Diaz-Espinoza et al. 2007.

^c identidad de la secuencia de aminoácidos de EcFtsZ, TmFtsZ y sus dominios aislados. El valor entre paréntesis indica el número de residuos alineados.

^d identidad de la secuencia de aminoácidos que constituyen la interfase interdominio en el alineamiento de EcFtsZ y TmFtsZ. Se consideraron residuos de la interfase a aquellos aminoácidos que presentaron una diferencia de ASA mayor que 1Å² en los dominios en estado libre y asociado en la estructura tridimensional. Se seleccionaron 72 residuos (figura 1).

^e valor de RMSD calculado con algoritmo CE (versión 1.0.1, 1998) y alineamiento estructural STAMP (VMD 1.8.5, 2006); nd, no determinado.

Figura 2. Estructura tridimensional de FtsZ de *E. coli* y *T. maritima*

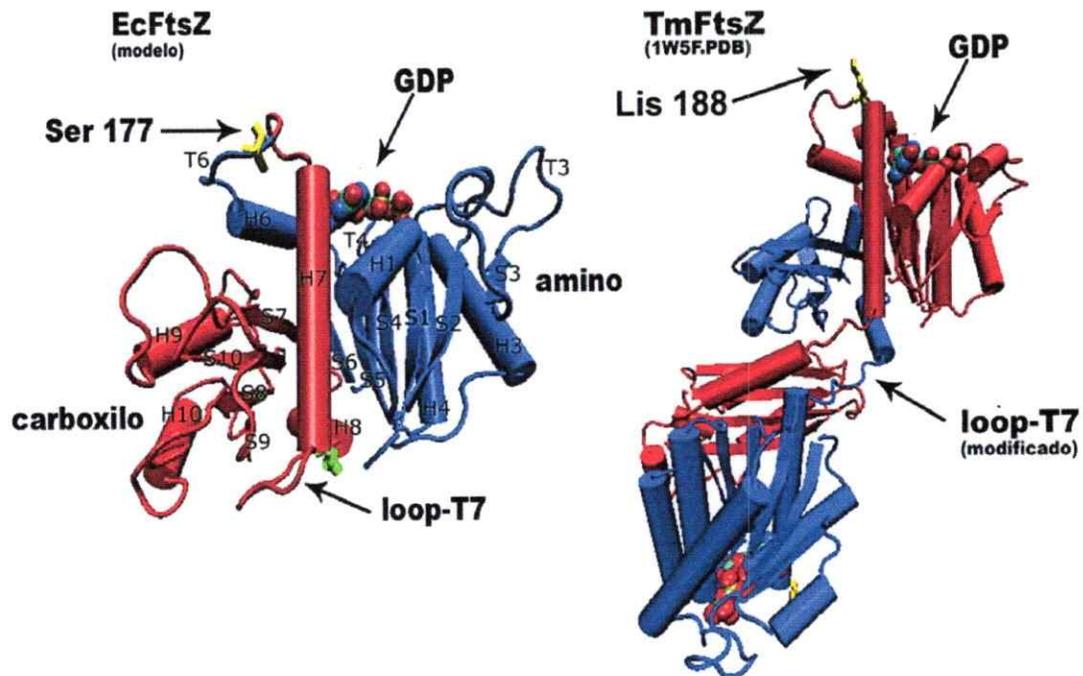


Figura 2. Estructura tridimensional de FtsZ de *Escherichia coli* y *Thermotoga maritima*. En el modelo de EcFtsZ (izquierda) se muestra en azul el dominio amino terminal y en rojo el dominio carboxilo terminal. Adicionalmente se indica el bolsillo de unión del nucleótido con una molécula de GDP. La cadena lateral de la serina 177 (en amarillo) corresponde a la frontera de ambos dominios. En el dominio carboxilo terminal, se indica el *loop-T7*, que contiene el residuo conservado Asp 212 (en verde), necesario para la actividad GTPásica de la enzima (ver texto). En la estructura de TmFtsZ (derecha) se muestra el dímero *domain-swapped* en que los dominios amino y carboxilo terminales de dos cadenas polipeptídicas independientes (coloreadas en azul y rojo) se encuentran intercambiados (Oliva y col., 2004). Se indica el bolsillo de unión del nucleótido con una molécula de GDP y el *loop-T7* modificado por mutación sitio-dirigida en la variante de TmFtsZ. Nótese la diferencia en estructura del *loop-T7* en ambas estructuras.

El dímero de TmFtsZ no polimeriza y no muestra actividad GTPásica como era de esperar, pues se produce una interacción carboxilo-carboxilo entre los monómeros lo que impide el establecimiento de la interacción longitudinal propia del protofilamento de FtsZ (Oliva et al., 2004). La pérdida de la actividad GTPásica se explica porque durante la polimerización, el contacto longitudinal entre monómeros de FtsZ (ver dímero de EcFtsZ) permite que la superficie de del dominio carboxilo terminal del monómero superior, donde reside el *loop* T7 (señalado con flecha negra), contacte el dominio amino terminal del monómero inferior. Esta interacción activa la hidrólisis de GTP mediante la inserción del residuo catalítico aspartato 212, en el bolsillo de unión a nucleótido en el dominio amino terminal (señalado con flecha negra en Fig. 3) (Scheffers y col., 2001 y 2002).

Alineamiento estructural de los monómeros de EcFtsZ y TmFtsZ

La figura 1 muestra que la distribución de la estructura secundaria de ambas proteínas es parecida. No obstante, se observan diferencias en la extensión de H1, S2, S3, S4, S5, S6, H7, H8, S7, y S9 que son más largas en la estructura de TmFtsZ, lo mismo sucede con H6 y S8 en el modelo de EcFtsZ.

La hélice H3 de EcFtsZ muestra una división en dos segmentos en TmFtsZ (lo mismo para MjFtsZ). Una hélice corta entre S5 y H5 en TmFtsZ y MjFtsZ no aparece en el modelo de EcFtsZ; a su vez, una hélice corta entre H9 y S8 en TmFtsZ, no aparece en MjFtsZ ni en el modelo tridimensional de EcFtsZ. Finalmente, las hebras S11 y S12 en el extremo carboxilo terminal de MjFtsZ, aparecen como una hélice en EcFtsZ y TmFtsZ.

Figura 3. Estructura de EcFtsZ y TmFtsZ en estado dimérico

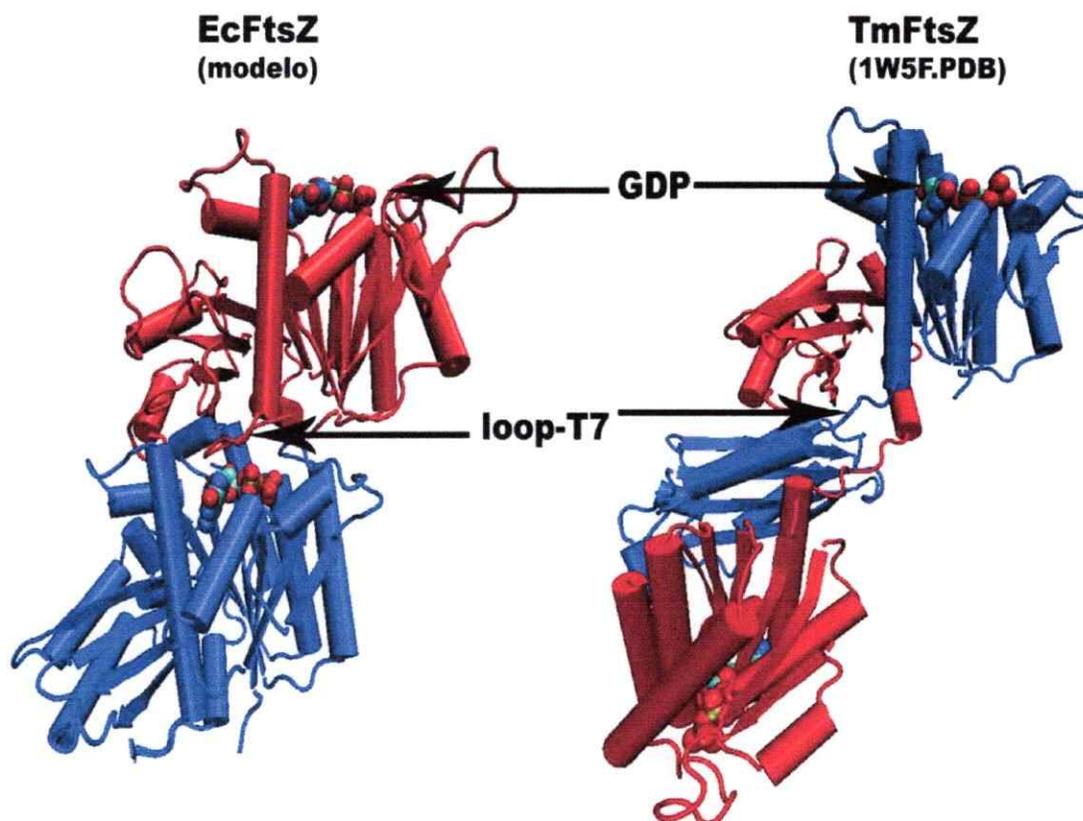


Figura 3. EcFtsZ y TmFtsZ en estado dimérico. A la izquierda se muestra el modelo del dímero de EcFtsZ y a la derecha el cristal del dímero *domain-swapped* de TmFtsZ. En azul y rojo se muestran dos cadenas polipeptídicas independientes para cada caso, donde cada cadena polipeptídica corresponde a un monómero. En la estructura de TmFtsZ se observa que parte de cada una de las cadenas polipeptídicas forman parte de ambos monómeros en el dímero. Se indica el sitio del nucleótido y el *loop-T7* en cada una de las estructuras.

Postulamos que los cambios observados en los elementos de estructura secundaria entre el modelo de EcFtsZ y las estructuras de TmFtsZ y MjFtsZ, se deberían a las diferentes secuencias de estas proteínas.

En la figura 4A se muestra una sobreposición de las estructuras de los monómeros de EcFtsZ y TmFtsZ. La cadena polipeptídica y los elementos de estructura secundaria se colorearon de acuerdo al índice de similitud Q (R.M.S.D. normalizado). Un valor Q=1 indica que las estructuras son idénticas y un valor Q=0 indica que los átomos C-alfa presentan distancias mayores de 8 Å (Eastwood y col., 2000). De acuerdo a este criterio el dominio carboxilo terminal posee regiones que alinearon pobremente en comparación al dominio amino terminal. El *loop*-T7 junto a H8, el lazo conector H9-S7, H10, S9 y H11 (en la parte posterior de la estructura) tuvieron un valor Q cercano a 0 y tienen coloración blanca a rojo. Por otro lado, los elementos de estructura secundaria correspondientes al dominio amino terminal se alinearon bien y el color azul predominó. Usando el alineamiento estructural STAMP (Russell y col., 1992), se encontró una desviación R.M.S. entre ambas proteínas de 4 Å. La desviación obtenida en el alineamiento estructural es elevada considerando que ambas proteínas comparten 48% de identidad de secuencia (tabla III).

El alineamiento estructural mostró que la mayor parte de los elementos de estructura secundaria se encuentran en ambas estructuras, esto sugirió que las diferencias en la orientación y extensión de algunos elementos de estructura secundaria son responsables del elevado valor R.M.S.D. observado con STAMP (ver más adelante).

Figura 4. Alineamiento estructural de EcFtsZ y TmFtsZ

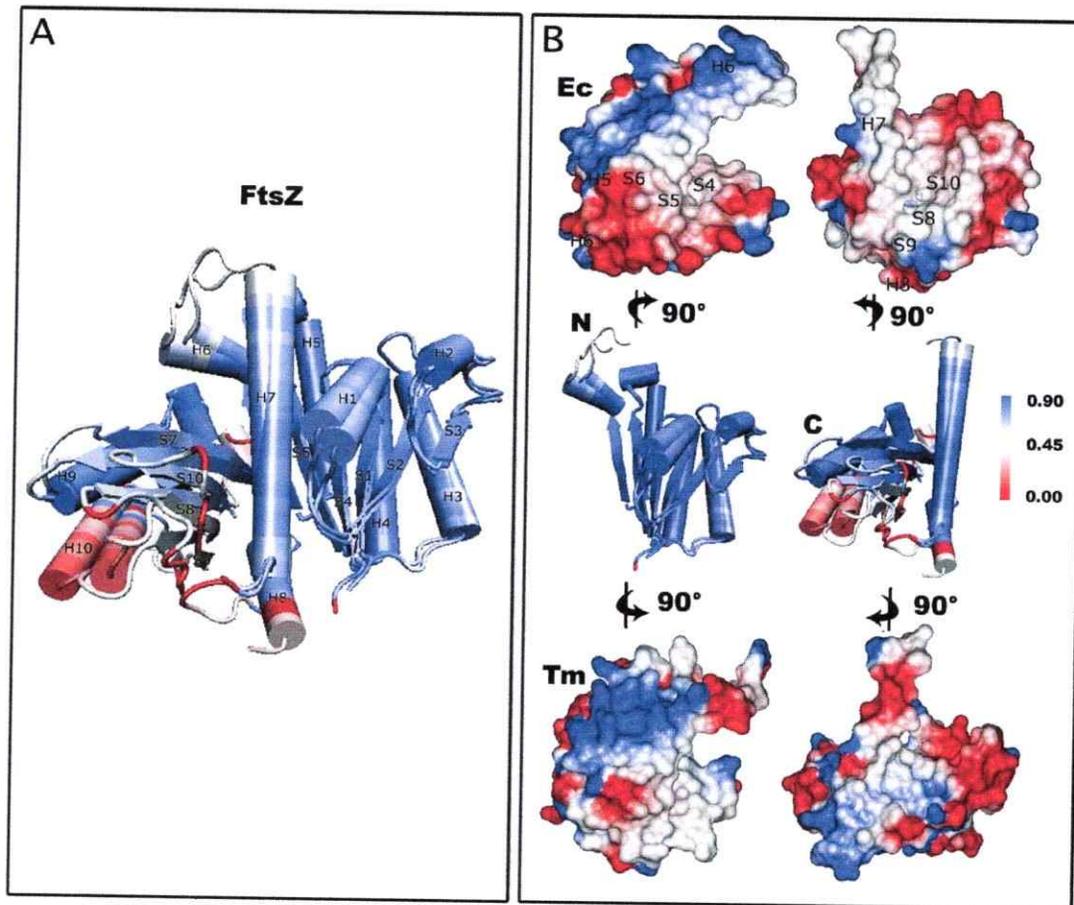


Figura 4. A, Alineamiento estructural de los monómeros de EcFtsZ y TmFtsZ. B, Alineamiento estructural de los dominios amino (N) y carboxilo (C) de EcFtsZ y TmFtsZ. En colores se muestra el RMSD normalizado de los alineamientos de acuerdo a la escala que se muestra en B (ver texto). Arriba y debajo de la superposición de los dominios en B, se muestran el potencial electrostático de superficie y la interfase interdominio de EcFtsZ y TmFtsZ que se muestra hacia el lector, donde el color azul, rojo y blanco indica carga positiva, negativa y neutralidad, respectivamente. Las flechas apuntan hacia el lector.

Alineamiento estructural de los dominios de EcFtsZ y TmFtsZ

Para evaluar la posible influencia de la orientación de los dominios en las estructuras monoméricas sobre la desviación observada, se hizo un alineamiento estructural de los dominios por separado de ambas proteínas. Los alineamientos se hicieron con STAMP y el algoritmo CE (Shindyalov y col., 1998) y la imagen de la superposición creada se muestra en la figura 4B. Los resultados del alineamiento de los dominios se resumen en la tabla III.

Con ambos algoritmos se calculó una desviación R.M.S. de 2,48 y 3,70 Å para el dominio amino terminal de EcFtsZ y TmFtsZ, respectivamente. El alineamiento de los dominios carboxilo terminal mostró una desviación R.M.S. de 3,57 y 3,82 Å, respectivamente (tabla III). Estos resultados muestran que en la estructura del cristal de TmFtsZ una región del dominio carboxilo terminal sería responsable de la mayor desviación observada.

Superficie de interacción interdominio

Para comparar la interfase de interacción de los dominios en el modelo de EcFtsZ y en el cristal de TmFtsZ se determinó el potencial electrostático de la superficie de los dominios. En la figura 4B se muestran las superficies de interacción de cada dominio. Se encontró una región central neutra (apolar) similar en ambos dominios y zonas cargadas hacia la periferia con diferente distribución entre los dominios de EcFtsZ y TmFtsZ. Así, en las zonas cargadas de EcFtsZ, el dominio amino terminal presentó una región negativa correspondiente a H4 y H5 que se encuentra prácticamente ausente en el dominio amino terminal de TmFtsZ. Un parche de carga positiva en la hélice H6 de EcFtsZ se reduce a un pequeño parche negativo en TmFtsZ. En efecto, los residuos K170 y V171 de la hélice H6 de EcFtsZ corresponden

a los aminoácidos de carga negativa E181 y E182 en la secuencia de TmFtsZ (ver recuadro en Fig. 1). En la interfase del dominio carboxilo terminal de EcFtsZ, se observó un parche neutro donde se encuentran H7, S8, S9 y S10 (Fig. 4B). La región neutra correspondiente a H7 en el dominio carboxilo terminal de TmFtsZ está interrumpida por un parche de carga negativa debida a la influencia de E181 y E182 en la cara complementaria del dominio amino terminal. La región correspondiente a H8 y el *loop* T7, de carga negativa en EcFtsZ, fueron reemplazadas por un parche de carga positiva en TmFtsZ. Esto último se debe a mutaciones en el *loop* T7 de TmFtsZ (Oliva y col, 2004).

El potencial de superficie se relaciona con las cadenas laterales de los aminoácidos, entonces es esperable encontrar similitudes a este nivel debido a la elevada identidad de secuencia de ambas proteínas. Para corroborar esta hipótesis, se compararon los aminoácidos que participan en la interfase interdominio de EcFtsZ y TmFtsZ. Los 72 residuos de la interfase se marcaron con un punto negro sobre la secuencia en el alineamiento de la figura 1. Se encontró un 47% de identidad en los aminoácidos de la interfase interdominio entre ambas proteínas, en concordancia con el promedio de similitud de la secuencia completa (tabla III). El área de la interfase interdominio es de 1540 Å² en EcFtsZ y 2043 Å² en TmFtsZ, indicando una interacción de tipo permanente de los dominios en la proteína nativa y que la superficie de interacción interdominio de TmFtsZ es mayor que la de EcFtsZ, lo cual probablemente le confiere una mayor estabilidad térmica.

Características de la secuencia de los dominios aislados

En la figura. 5 se muestra la secuencia nucleotídica y aminoacídica de los dominios amino y carboxilo terminales de EcFtsZ. La secuencia de nucleótidos que

corresponde al dominio amino terminales abarca las bases 1 a 537, mientras que el dominio carboxilo terminal abarca las bases 531 a 1149 del gen *ftsZ*. El dominio amino terminal incluye a los residuos 1 a 179 de la secuencia de FtsZ silvestre y, considerando la cola de seis histidinas introducida en la clonación, tiene 185 aminoácidos. El dominio carboxilo terminal incluye a los residuos 177 a 383 y, con la metionina y la cola de seis histidinas introducidos en el clonación, tiene 213 aminoácidos (tabla IV). La cola de histidinas en ambos dominios se introdujo con el objeto de facilitar la purificación. Para aumentar la eficiencia de traducción del dominio carboxilo terminal se agregó el residuo metionina en el extremo N-terminal de la secuencia. Con las secuencias mostradas en la figura 5 se calculó la masa molecular teórica de las proteínas y, de acuerdo a estos análisis, los dominios amino y carboxilo terminales poseen una masa molecular teórica de 19,3 y 23,1 kDa, respectivamente (tabla IV). Por otro lado, los dominios amino y carboxilo terminales de TmFtsZ presentaron una masa molecular experimental de 19,2 y 17,6 kDa (Oliva y col., 2004). El dominio amino terminal de EcFtsZ y de TmFtsZ tienen una masa molecular parecida debido a la similitud de sus secuencias. En contraste, se encontró una diferencia de 5,5 kDa entre el valor de masa molecular predicho para el dominio carboxilo terminal de EcFtsZ y el valor reportado del dominio carboxilo terminal de TmFtsZ. Esto se debe a que el extremo C-terminal de EcFtsZ es más largo que el de TmFtsZ.

Figura 5. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos de los dominios de EcFtsZ

Secuencia de nucleótidos del dominio amino de EcFtsZ.

ATGTTTGAACCAATGGAACTTACCTTACCAATGACGCGGTGATTAAGTCATCGGCGTCGGC
 GCGCGCGCGGTAATGCTGTTGAACACATGGTGGCGGAGCGCATTGAAGGTGTTGAATTCT
 TCGCGGTAATACCGATGCACAAGCGCTGCGTAAACAGCGGTTGGACAGACGATTCAAAT
 CGGTAGCGGTATCACAAAGGACTGGGCGCTGGCGCTAATCCAGAAGTTGGCCGCAATGCG
 GCTGATGAGGATCGCGATGCATTGCGTGGCGCGCTGGAAGGTGCAGACATGGTCTTTATTG
 CTGCGGGTATGGTGGTGGTACCGGTACAGGTGCAGCACCAGTCGTCGCTGAAGTGGCAA
 AAGATTTGGGTATCCTGACCGTTGCTGTCGTCCTAAGCCTTTCAACTTTGAAGGCAAGAAG
 CGTATGCAATCGCGGAGCAGGGATCACTGAACTGTCCAAGCATGTGGACTCTCTGATCA
 CTATCCCGAACGACAACTGCTGAAAGTTCTGGGCGCGGTATCTCCCTGCTGCACCACCA
CCACCACCAC

Secuencia de aminoácidos del dominio amino de EcFtsZ.

MFPEMELTNDVIKVIKVGGGGGNAVEHVMVRERIEGVEFFAVNTDAQALRKTAVGQTIQIGS
 GITKGLGAGANPEVGRNAEDERDALRAALEGADMVFIAAGMGGGTG TGAAPVVAEVAKDL
 GILTVAVVTKPFNFEGKKRMAFAEQGITELSKHVDSLITIPNDKILKVLGRGISLHHHHHH

Secuencia nucleótidos del dominio carboxilo de EcFtsZ.

ATGTCCCTGCTGATGCGTTTGGCGGAGCGAACGATGTACTGAAAGGCGCTGTGCAAGGTA
 TCGCTGAACTGATTACTCGTCCGGGTTGATGAACGTGGACTTTGCAGACGTACGCACCCTA
 ATGCTGAGATGGGCTACGCAATGATGGTTCTGGCGTGGCGAGCGGTGAAGACCGTGGCG
 GAAGAAGCTGCTGAAATGGCTATCTCTCTCCGCTGCTGGAAGATATCGACCTGTCTGGCGC
 GCGCGGCGTCTGGTTAACATCAGGGGGCTTCGACCTGGCTCTGGATGAGTTCGAAACG
 GTAGGTAACACCATCCGTGCATTGGCTCCGACAACGCGACTGTGTTATCGGTACTTGTCT
 TGACCCGGATATGAATGACGAGCTGCGCGTAACCGTTGTTGCGACAGGTATCGGCATGGAC
 AAACGTCCTGAAATCACTCTGTTGACCAATAAGCAGGTTTCAGCAGCCAGTGATGGATCGCTA
 CCAGCAGCATGGATGGCTCCGCTGACCCAGGAGCAGAAGCCGGTTGCTAAAGTCGTGAAT
 GACAATGCGCCGAAACTGCGAAAGAGCCGGATTATCTGGATATCCAGCATTCTCTGCGTA
 AGCAAGCTGATCACCACCACCACCACCAC

Secuencia de aminoácidos del dominio carboxilo de EcFtsZ.

MSLLDAFGAANDVLKGAVQGIAELITRPGLMNVDFADVRTVMSEMGYAMMGSGVASGEDRAE
 EAAEMAISPLLEDIDLSGARGVLVNIAGFDLRLDEFETVGNITIRAFASDNATVVIGTSLDPDM
 NDELRVTVVATGIGMDKRPEITLVNKKVQVQPVMDRYQHGMAPLTQE QKPVAKVVNDNAPQ
 TAKEPDYLDIPAFLRKQADHHHHHH

Figura 5. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos de los dominios amino y carboxilo terminales de EcFtsZ. Se destacan los elementos introducidos en el clonación: las colas de histidina (tripleto CAC) en el extremo carboxilo terminal de ambos dominios y un residuo metionina (tripleto ATG) en el amino terminal del dominio carboxilo (ver Materiales y Métodos para más detalles).

Tabla IV. Propiedades fisicoquímicas de la secuencia de EcFtsZ y sus dominios aislados

Tabla IV. Propiedades fisicoquímicas de la secuencia de EcFtsZ y sus dominios aislados^a.

	Masa Molecular [kDa]	Punto isoeléctrico	Nº nucleótidos ^b	Nº residuos ^c
FtsZ	40,3	4,65	1 - 1149 (1149)	1 - 383
amino	19,2	6,05	1 - 538 (555)	1 - 179 (185)
carboxilo	23,1	4,69	531 - 1149 (639)	177 - 383 (213)

^a cálculos realizados con ProtParam (www.expasy.org), en los dominios la secuencia incluye metionina e histidinas introducidas para la purificación.

^b nucleótidos del gen *ftsZ* correspondientes al marco de lectura abierto que se encuentra en los plasmidios de expresión. Entre paréntesis se muestra el total de bases del *cassette* de expresión que incluye la metionina (en el dominio C) y colas de histidina (en los dominios N y C).

^c aminoácidos de la proteína FtsZ que corresponden en cada caso. Entre paréntesis se indica el total de residuos de la cadena polipeptídica incluyendo a aquellos introducidos en la clonación.

Específicamente, el dominio carboxilo terminal de EcFtsZ abarca los residuos 177 a 383 (más seis histidinas), mientras que el dominio carboxilo terminal de TmFtsZ a los residuos 188-336 (más seis histidinas), es decir, una diferencia de 58 aminoácidos que corresponden aproximadamente a 6,2 kDa (considerando una masa molecular promedio de 110 Da por aminoácido). Con la secuencia mostrada en la figura 5 se predijo un punto isoeléctrico de 6,1 y 4,7 para los dominios amino y carboxilo terminales de EcFtsZ respectivamente (tabla IV), indicando que la solubilidad del dominio carboxilo terminal sería mayor que la solubilidad del dominio amino terminal en el pH fisiológico de la bacteria (6,5 a 7,5).

Subclonación de los dominios amino y carboxilo terminales de EcFtsZ

La región codificante de los dominios de EcFtsZ se amplificó por PCR en el paso 1 y se clonó en el vector pT7-7, en el paso 2 se amplificó el *cassette* de expresión de los dominios y se clonó en el vector pACYC184. (Fig. 6, para más detalles consultar Materiales y Métodos). Los amplificados del paso 1 corresponden a los dominios amino (N) y carboxilo (C) y se esperaban fragmentos de 588 pb y 673 pb, respectivamente. Los amplificados incluyen a las colas de histidina y a los sitios de restricción introducidos artificialmente. El gel de electroforesis mostró que los productos de PCR migran entre las bandas de 500 y 750 pb del patrón de masa molecular y que el amplificado correspondiente al dominio carboxilo terminal tuvo mayor tamaño que el amino terminal en concordancia con lo esperado (Fig. 6). Los amplificados, previamente digeridos, se ligaron en el vector pT7-7 en los sitios Nde I y Hind III. El vector que expresa al dominio amino terminal se denominó pECN1 y tiene un tamaño de 3 kpb, el vector que expresa al dominio carboxilo terminal se denominó pECC2 y tiene un tamaño de 3,1 kbp.

Figura 6. "Etapas de la clonación de los dominios amino y carboxilo terminales de EcFtsZ".

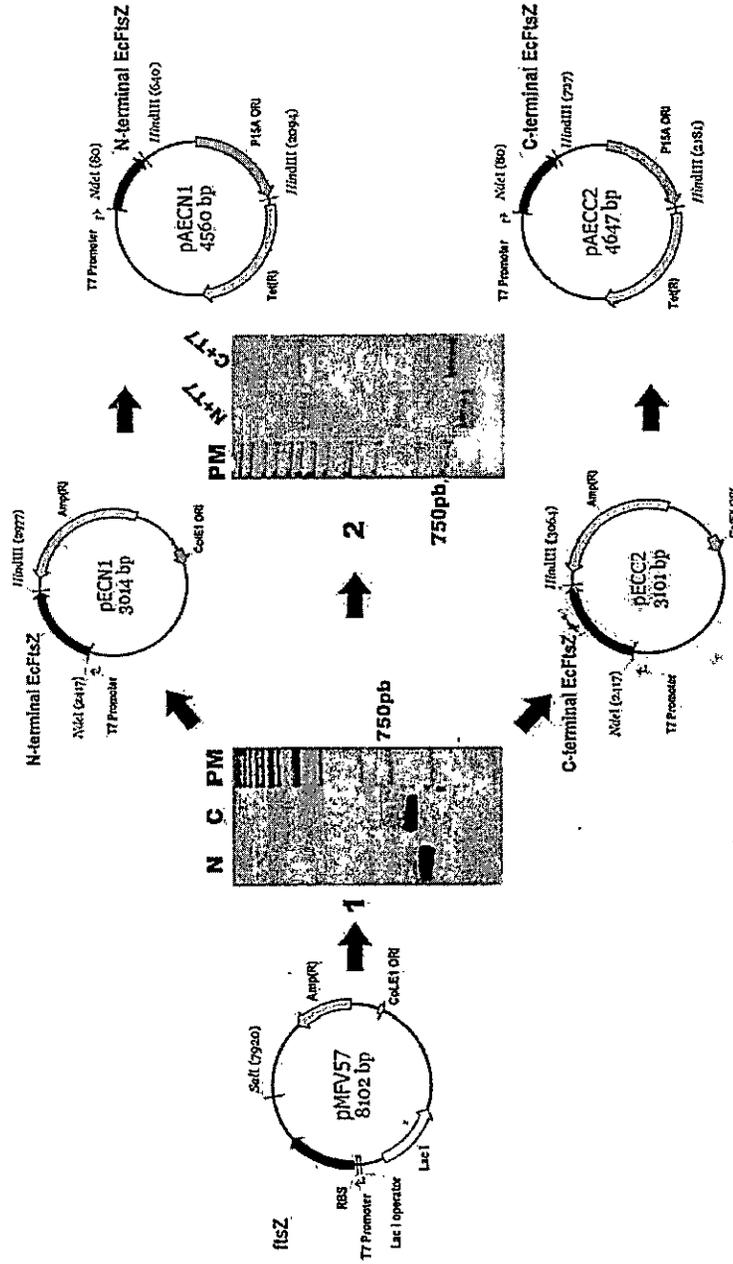


Figura 6. Esquema de las etapas de la clonación de los dominios amino terminal (N) y carboxilo terminal (C) de EcFtsZ. En el paso "1" se amplificó la secuencia codificante de los dominios usando como template el vector pMFV57 (productos visualizados en gel de agarosa 1%) y se clonaron en pT7-7 para generar pECN1 y pECC2. Estos vectores se usaron como template, en el paso "2", para amplificar el cassette de expresión que incluye la secuencia del promotor T7 y la secuencia codificante de los dominios amino (N+T7) y carboxilo (C+T7) (productos visualizados en gel de agarosa 1%) y se transfirieron al vector pACYC184 para generar pAECN1 y pAECC2. Ver Materiales y métodos para más detalles sobre la clonación.

Los amplificadores del paso 2, corresponden al *cassette* de expresión de cada dominio que se obtuvo desde los vectores pECN1 y pECC2 (Fig. 6, ver materiales y métodos). Se esperaban fragmentos de 655 y 741 pb para los dominios amino terminal (N+T7) y carboxilo terminal (C+T7), respectivamente y la electroforesis mostró que las bandas migran de acuerdo con el tamaño esperado. Los productos de PCR se ligaron en pACYC184 en el sitio Dra I. El vector que expresa el dominio amino terminal se denominó pAECN1 y tiene un tamaño de 4,5 kpb mientras que el vector que expresa al dominio carboxilo terminal se denominó pAECC2 y tiene un tamaño de 4,6 kpb. La secuencia de los dominios en los vectores de expresión se comprobó mediante secuenciación.

Expresión de EcFtsZ y los dominios aislados

Se verificó la integridad de los vectores construidos demostrando la expresión de las proteínas correspondientes. Los vectores se introdujeron por electroporación en células electrocompetentes BL21(DE3) y se analizó la expresión de las proteínas en extractos totales mediante *Western-blot* específico para FtsZ. Un cultivo de BL21(DE3)/pMFV57 que expresa a FtsZ silvestre se usó como control interno del ensayo (Fig. 7A). La elevada expresión de proteína del control estuvo acompañada de degradación, probablemente por la actividad de proteasas intracelulares. En los cultivos de BL21(DE3)/pECN1 y BL21(DE3)/pECC2 el *Western blot* con el anticuerpo policlonal anti-FtsZ detectó las bandas de expresión de FtsZ cromosomal y unas bandas de mayor movilidad electroforética que no se marcaron en el extracto control. Las nuevas bandas encontradas corresponden los dominios amino y carboxilo terminales que se expresan aisladamente desde los vectores pECN1 y pECC2. El dominio carboxilo terminal presentó menor movilidad electroforética que el dominio amino terminal indicando que tiene mayor masa molecular en concordancia con lo esperado (ver tabla IV).

Figura 7. Expresión de EcFtsZ y de sus dominios aislados en BL21(DE3)

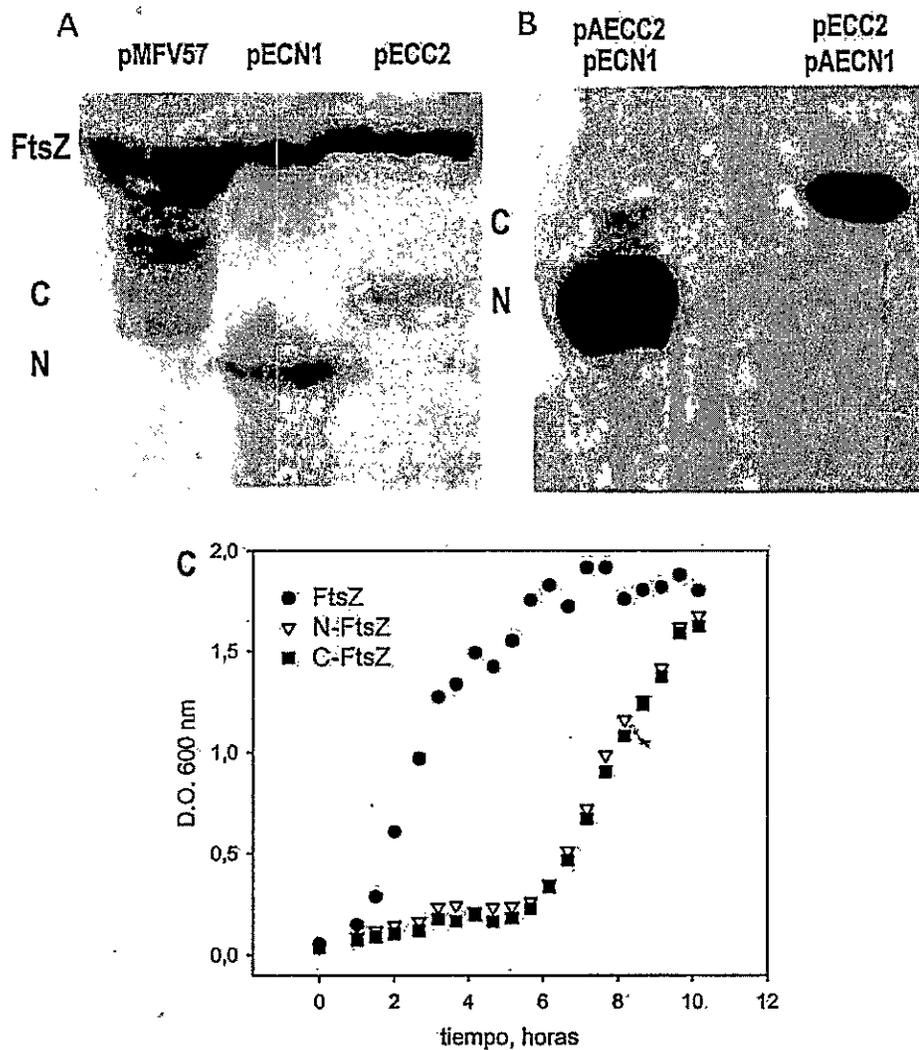


Figura 7. Expresión de FtsZ silvestre y de los dominios amino y carboxilo terminales en BL21(DE3). A, *Western blot* con suero policlonal anti-FtsZ de la expresión de FtsZ (pMFV57) y los dominios amino (pECN1) y carboxilo (pECC2). B, *Western blot* con anticuerpos monoclonales anti-histidina de la co-expresión de los dominios amino (pECN1 y pAECN1) y carboxilo (pECC2 y pAECC2). C, curvas de crecimiento de los cultivos de BL21(DE3) que expresan a FtsZ y los dominios amino y carboxilo terminales en condiciones de inducción.

Considerando la intensidad de las bandas de expresión al cargar la misma cantidad de proteína en los tres pocillos, el dominio carboxilo terminal presentó menor nivel de expresión que el dominio amino terminal (Fig. 7A). Una interpretación alternativa de este resultado es que debido al carácter policlonal del anticuerpo primario, la menor intensidad de la banda del dominio carboxilo terminal se debe a una menor reactividad frente reconocimiento del anticuerpo.

Los vectores pECN1 y pECC2 (derivados de pT7-7) se encuentran en aproximadamente 100 copias por célula en fase exponencial de crecimiento mientras que pAECN1 y pAECC2 (derivados de pACYC184) se encuentran en aproximadamente 10 copias en fase exponencial de crecimiento. Los vectores pT7-7 y pACYC184 son compatibles lo que permitió propagarlos en el mismo cultivo. En la Fig. 7B se muestra un ensayo de co-expresión de los dominios amino y carboxilo terminales en un cultivo de BL21(DE3) transformado con pECN1+pAECC2 ó pECC2+pAECN1. El extracto total se analizó mediante *Western-blot* con anticuerpos monoclonales anti-histidina lo que permitió seleccionar específicamente a los dominios amino y carboxilo terminales de FtsZ. La regulación del número de copias de los vectores compatibles se reflejó en la intensidad de las bandas de la co-expresión, siempre que un dominio se expresó desde el vector de alto número de copias (derivado de pT7-7), este apareció como una banda de gran intensidad y tamaño (Fig. 7B).

Se analizó el efecto de la expresión de FtsZ y los dominios aislados sobre el crecimiento celular en cultivos líquidos de BL21(DE3) en condiciones de inducción (Fig. 7C). La curva de crecimiento del cultivo que expresaba a FtsZ silvestre mostró una fase de retardo durante la primera hora de incubación, una fase exponencial entre la primera y sexta hora y, por último, una fase estacionaria de crecimiento desde la sexta hora de incubación (círculos en Fig. 7C). Este resultado mostró que el nivel de

expresión de FtsZ silvestre en condiciones de inducción no afectó el crecimiento bacteriano. Las curvas de crecimiento de los cultivos de BL21(DE3)/pECN1 y BL21(DE3)/pECC2 presentaron un comportamiento diferente de lo observado en el cultivo control (triángulos y cuadrados en Fig. 7C). Así, se observó una fase de retardo en el crecimiento bacteriano durante las primeras 5 horas de incubación y, posteriormente, se observó un crecimiento lento con una fase exponencial que se extendió desde la sexta hasta la décima hora de incubación. El mayor retardo en el crecimiento de la cepa BL21(DE3) mostró que la expresión de los dominios aislados interfiere en la división celular. Esto último sugiere que los dominios adquirieron una conformación más bien activa en el citoplasma bacteriano *in vivo* y no se degradaron.

Caracterización *in vitro*

La caracterización *in vitro* se hizo para comparar la dependencia de la actividad GTPásica de ambos dominios, pues se encontró actividad GTPásica en presencia de ambos dominios de *Thermotoga maritima* pero no la hubo cuando estaban separados (Oliva et al., 2004).

Purificación de EcFtsZ y de sus dominios amino y carboxilo terminales

EcFtsZ se purificó por el procedimiento de precipitación de los polímeros con cloruro de calcio y se obtuvo una preparación de proteína de pureza mayor a 98% en concordancia con lo descrito por Rivas y col., 2000 (Figs. 8A y 8D).

La purificación del dominio amino terminal se hizo en dos etapas: primero se purificaron los cuerpos de inclusión y se obtuvo un precipitado insoluble que contenía el péptido del dominio amino terminal con una pureza de 90% (Fig. 8B, línea 2). En la

Figura 8. SDS-PAGE teñido con Azul de Coomassie de las purificaciones de FtsZ y los dominios amino y carboxilo terminales

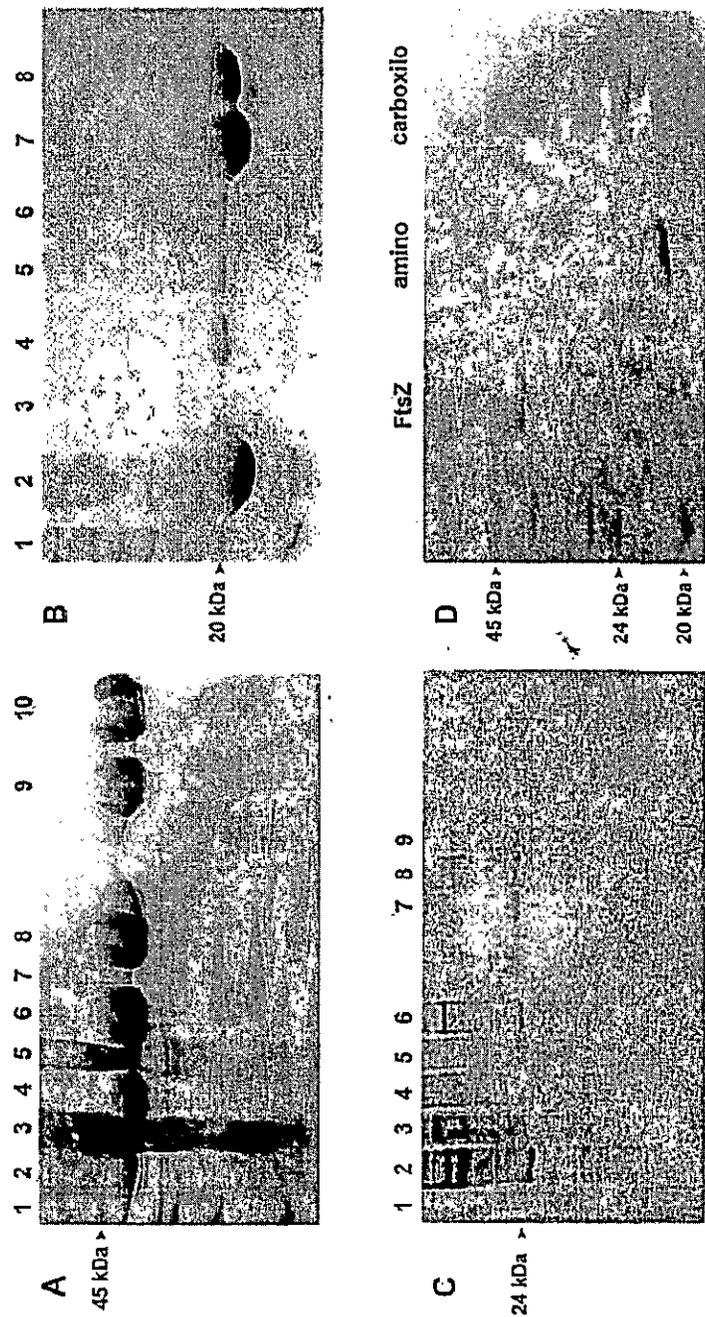


Figura 8. SDS-PAGE teñido con Azul de Coomassie de las purificaciones de FtsZ y los dominios amino y carboxilo terminales. A, etapas de la purificación de FtsZ con el método de precipitación con Ca^{+2} (acrilamida 10%). B, etapas de la purificación del dominio amino terminal por cromatografía de afinidad (acrilamida 15%). C, etapas de la purificación del dominio carboxilo terminal por cromatografía de afinidad (acrilamida 15%); D, SDS-PAGE de las purificaciones de FtsZ ($M_r = 40\text{kDa}$), amino ($M_r = 24\text{kDa}$) y carboxilo ($M_r = 21\text{kDa}$) (acrilamida 10%).

segunda etapa, los cuerpos de inclusión solubilizados con urea 6 M, se purificaron mediante cromatografía de afinidad en condiciones desnaturantes y se obtuvo una preparación del dominio amino terminal con una pureza de 99% (Fig. 8B y 8D). La expresión en cuerpos de inclusión del dominio amino terminal significó una ventaja, pues la primera etapa liberó prácticamente todo el material celular contaminante y permitió que para la segunda etapa de la purificación (cromatografía de afinidad), la muestra inicial tuviera pocas impurezas facilitando la selección por afinidad.

El dominio carboxilo terminal se purificó desde la fracción citoplasmática puesto que se expresaba en forma soluble. Luego de la cromatografía de afinidad, se obtuvo una preparación del dominio carboxilo terminal con 80% de pureza (Fig. 8C y 8D). A diferencia de lo obtenido con el dominio amino terminal, la preparación del dominio carboxilo terminal tuvo menor pureza debido a que se expresó en menor cantidad y en forma soluble junto a las proteínas citoplasmáticas de la célula, lo que dificultó la selección por afinidad en la cromatografía.

La concentración de proteína de las tres purificaciones se determinó por el método de Bradford. Se obtuvo por litro de cultivo, 10 mg de FtsZ, 20 mg del dominio amino terminal (soluble en urea) y 1 mg del dominio carboxilo terminal.

Estructura secundaria de EcFtsZ y los dominios amino y carboxilo terminales

Para determinar el estado del plegamiento de EcFtsZ y de los dominios amino y carboxilo terminales se registraron los espectros de dicroísmo circular en solución y se determinó el contenido de estructura secundaria a partir de los espectros. Los resultados se tabulan en la figura 9.

Figura 9. Espectros de dicroísmo circular en el UV lejano y contenido de estructura secundaria de EcFtsZ y los dominios amino y carboxilo

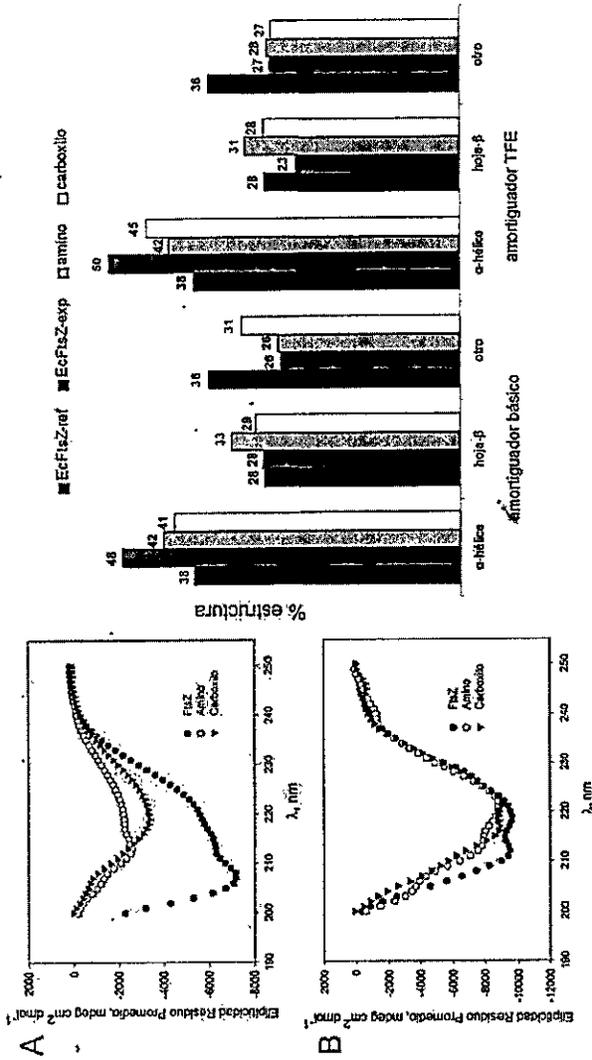


Figura 9. Espectros de dicroísmo circular en el UV lejano y cuantificación de la estructura secundaria de EcFtsZ y de los dominios amino y carboxilo terminales. A, elipticidad molar de FtsZ (12 μM), del dominio amino terminal (52 μM) y del dominio carboxilo terminal (41 μM) en amortiguador básico: Tris 50 mM pH 7,5 a temperatura ambiente. La solución del dominio amino terminal tiene Tween20 0,1 %. B, elipticidad molar de FtsZ (5 μM), el dominio amino terminal (5 μM) y el dominio carboxilo terminal (5 μM) en amortiguador TFE: Tris 50mM pH 7,5, TFE 60% v/v a temperatura ambiente. A la derecha se muestran los resultados de la cuantificación de estructura secundaria a partir de los espectros mostrados en A y B. En la parte superior de cada barra se indica el % de estructura secundaria obtenido, EcFtsZ-ref corresponde a los resultados reportados en Marrington y col., 2004. Para más detalles del procedimiento ver Materiales y Métodos.

El espectro de FtsZ presentó dos mínimos, uno a 208 nm y otro alrededor de 222 nm, indicando que la proteína tiene un plegamiento tipo alfa-beta (Fig. 9A). La cuantificación de estructura secundaria de EcFtsZ mostró mayoritariamente hélice alfa con 48%, 28% de hoja beta y 26% de otro tipo de estructuras secundarias, mostrando algunas diferencias con lo reportado anteriormente (Fig. 9, EcFtsZ-ref). Se observó un contenido de hélice alfa 10% mayor y el otro tipo de estructura disminuyó en 10%, no obstante, el contenido de hebra beta estuvo de acuerdo con lo reportado. Las diferencias observadas en el contenido de estructura secundaria pueden explicarse por la metodología utilizada en la cuantificación debido a que a una inspección visual del espectro reveló correspondencia con lo reportado para EcFtsZ (Rivas y col., 2000).

El dominio amino terminal, renaturado por dilución rápida y estabilizado con Tween20 (ver leyenda de Fig. 9), presentó dos mínimos, uno en 212 y otro en 222 nm indicando que la proteína adquirió un plegamiento de tipo alfa-beta después de la renaturación. El dominio amino terminal mostró mayoritariamente hélice alfa con 42%, 28% de hoja beta y de otro tipo de estructura 26%.

El espectro del dominio carboxilo terminal presentó un mínimo a 219 nm sugiriendo un plegamiento rico en hoja beta. Este resultado no era esperado, pues en el cristal de MjFtsZ el dominio carboxilo terminal presenta similares proporciones de estructura secundaria alfa y beta que el dominio amino terminal (ver topología en el alineamiento de Fig. 1), por tanto, se esperaba un espectro de similares características. La cuantificación de la estructura secundaria mostró que el dominio carboxilo terminal posee 41% de hélice alfa, 29% de hoja beta y 31% de otro tipo de estructura revelando un aumento notorio en el contenido de otros tipos de estructura y hoja beta respecto del dominio amino terminal y de EcFtsZ. Cabe destacar que la porción de secuencia de EcFtsZ que corresponde al dominio carboxilo terminal tiene 68 residuos que no aparecen en el modelo tridimensional construido (equivalente a un 31% de la secuencia

del dominio) y la estructuración que ellos pudieran adquirir daría cuenta de la diferencia encontrada.

Los espectros de ambos dominios demostraron que estos se encontraban plegados, sin embargo, para obtener una señal comparable al espectro de EcFtsZ, se usó una concentración de ellos cuatro veces mayor a la utilizada con EcFtsZ (Fig. 9). Los resultados sugieren que una población mayoritaria de los dominios tiene un estado semi-desplegado en nuestras condiciones experimentales.

Para confirmar que los dominios estaban mal plegados, se agregó el co-solvente TFE a los dominios aislados, y se usó como control a EcFtsZ (Fig. 9B). TFE (2,2,2-Trifluoroetanol) induce la formación de puentes de Hidrógeno de la cadena polipeptídica y, con ello, estabiliza el estado nativo de las proteínas (Roccatano y col., 2002). Para estos ensayos se utilizó la misma concentración de proteína para las tres muestras (5 μ M) y no se usó el detergente Tween20 en la solución del dominio amino terminal. En la Fig. 9B se observan señales de elipticidad comparables entre los espectros de dicroísmo circular de las tres muestras a diferencia del registro en ausencia de TFE. El espectro de EcFtsZ mostró dos mínimos de similar intensidad a 212 y 222 nm indicando un plegamiento de tipo alfa-beta de manera similar a lo observado en ausencia de TFE (Fig. 9B). El espectro del dominio amino terminal presentó dos mínimos en 212 y 222 nm indicando la presencia de estructura tipo alfa-beta (Fig. 9B). El espectro del dominio carboxilo terminal en presencia de TFE mostró dos mínimos, uno a 222 nm y otro a 215 nm sugiriendo cambios en el contenido de estructura secundaria en comparación al espectro en ausencia de TFE que mostró sólo un mínimo a 219 nm (Fig. 9B).

La cuantificación de estructura secundaria en presencia de TFE mostró para EcFtsZ 50% de hélice alfa, 23% de hoja beta y 27% de otro tipo de estructura. En los dominios amino y carboxilo terminales se observó 42 y 45% de hélice alfa, 31 y 28% de hoja beta y, por último, 28 y 27% de otro tipo de estructura, respectivamente (Fig. 9).

Los experimentos de dicroísmo circular en su conjunto mostraron que la estructura de las proteínas en ausencia de TFE es básicamente la misma que en presencia del co-solvente (Fig 9). En cuanto a la estabilidad de los dominios, los resultados sugieren que se pliegan con mayor eficiencia en presencia de TFE.

Estado de oligomerización en solución de FtsZ y los dominios amino y carboxilo terminales

El estado de agregación de las proteínas purificadas se determinó por cromatografía de exclusión molecular (Fig. 10). EcFtsZ en las condiciones experimentales utilizadas se encontró como un monómero de masa molecular aparente de 43 kDa, en concordancia con la masa molecular reportada por **Rivas y col. (2000)** a bajas concentraciones de Mg^{+2} , que corresponde a la de un monómero globular. El dominio amino terminal renaturado por dilución rápida eluyó en el volumen de exclusión de la columna (no mostrado), resultado que indica una agregación de este dominio. Sin embargo, al renaturarlo directamente en la columna, por retención del agente desnaturalante, se encontró una forma globular compacta de 16 kDa. (Fig. 10). Esto sugirió que amino renaturado es una proteína globular y que desde este estado se agrega a formas de mayor masa molecular. El dominio carboxilo terminal se encontró como un oligómero de 54 kDa que podría corresponder a un dímero (Fig. 10). La asociación (o agregación) de los dominios era esperada debido a que exponen una gran superficie hidrofóbica al interrumpir la interacción que establecen en la proteína nativa (ver caracterización estructural *in silico*).

Pruebas de funcionalidad de EcFtsZ silvestre y EcFtsZ reconstituida a partir de sus dominios aislados

FtsZ hidroliza el nucleótido GTP en presencia de Mg^{+2} a pH 6,5 *in vitro*. La activación de la hidrólisis de GTP se debe a la interacción longitudinal entre los dominios amino y carboxilo terminales de dos monómeros de FtsZ. La unión de GTP en el dominio amino terminal induce la polimerización de FtsZ y forma filamentos rectos de una o dos subunidades de ancho *in vitro* (Mukherjee y Lutkenhaus, 1999). Debido a esto, la actividad GTPásica de FtsZ se encuentra ligada a la polimerización.

FtsZ silvestre purificada por el método de precipitación de polímeros con Ca^{+2} se caracterizó *in vitro* de acuerdo a su polimerización y actividad GTPásica. En la figura. 11A se muestra la polimerización seguida por dispersión de luz y el progreso de la actividad GTPásica cuantificado con el ensayo colorimétrico de verde de malaquita (ver Materiales y Métodos). Se observa que la polimerización de EcFtsZ inducida con la adición de GTP, es muy rápida en alcanzar el máximo y se mantuvo estacionaria durante 5 minutos. Posteriormente, se observó la despolimerización de la proteína en dos fases una lenta de 20 a 25 minutos y otra rápida de aproximadamente 15 minutos que acabó completamente a los 50 minutos (línea continua en Fig. 11A). La actividad GTPásica se induce en forma simultánea con la polimerización al agregar GTP 1 mM y mostró una velocidad máxima de $13,7 \pm 3,7 \mu M GDP \text{ min}^{-1}$ que se mantuvo durante los primeros 10 minutos (círculos en Fig. 11A). La velocidad de hidrólisis se mantuvo sólo durante los primeros minutos debido a que el nucleótido es consumido rápidamente, esto indicó que la despolimerización de FtsZ se debió a la disminución en la actividad GTPásica, confirmando que la actividad GTPásica y la polimerización se encuentran ligadas temporalmente.

Figura 10. Estado de agregación en solución de FtsZ y los dominios amino y carboxilo

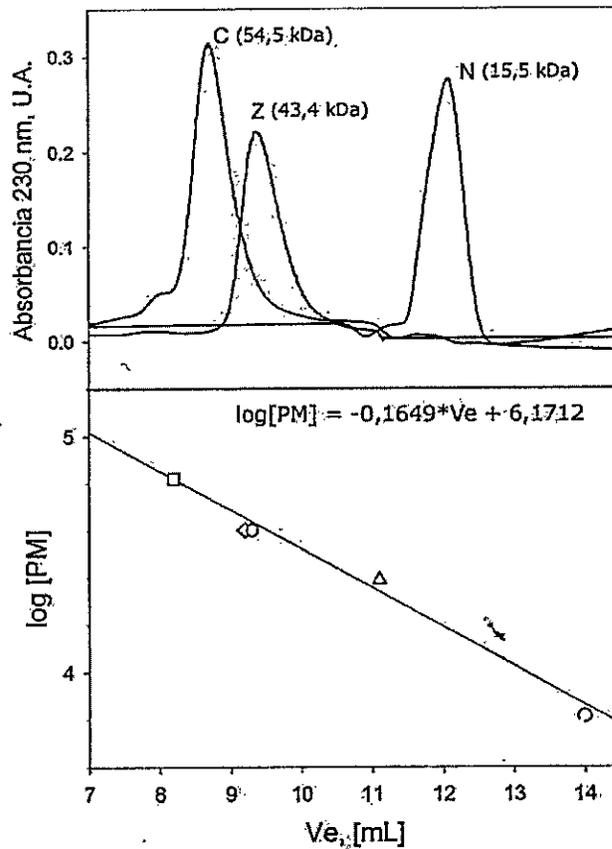


Figura 10. Estado de agregación en solución de FtsZ y los dominios amino y carboxilo terminales purificados. Arriba se muestra el cromatograma de la filtración molecular de FtsZ (Z) y de los dominios amino (N) y carboxilo (C) en Hepes 50 mM pH 7, KCl 300 mM, EDTA 1 mM a temperatura ambiente. Abajo, curva de calibración de la cromatografía con los estándares BSA (66 kDa, cuadrado); FtsZ silvestre (40 kDa, rombo); Y222W (40 kDa, hexágono); Anhidrasa carbónica (29 kDa, triángulo); Aprotinina (6,5 kDa, círculo). De acuerdo a la calibración FtsZ se encuentra en forma monomérica y el dominio carboxilo terminal en forma dimérica; el dominio amino terminal renaturado en la columna corresponde a un monómero compacto, de acuerdo a su volumen de elución.

Figura 11. Polimerización y actividad GTPásica de EcFtsZ

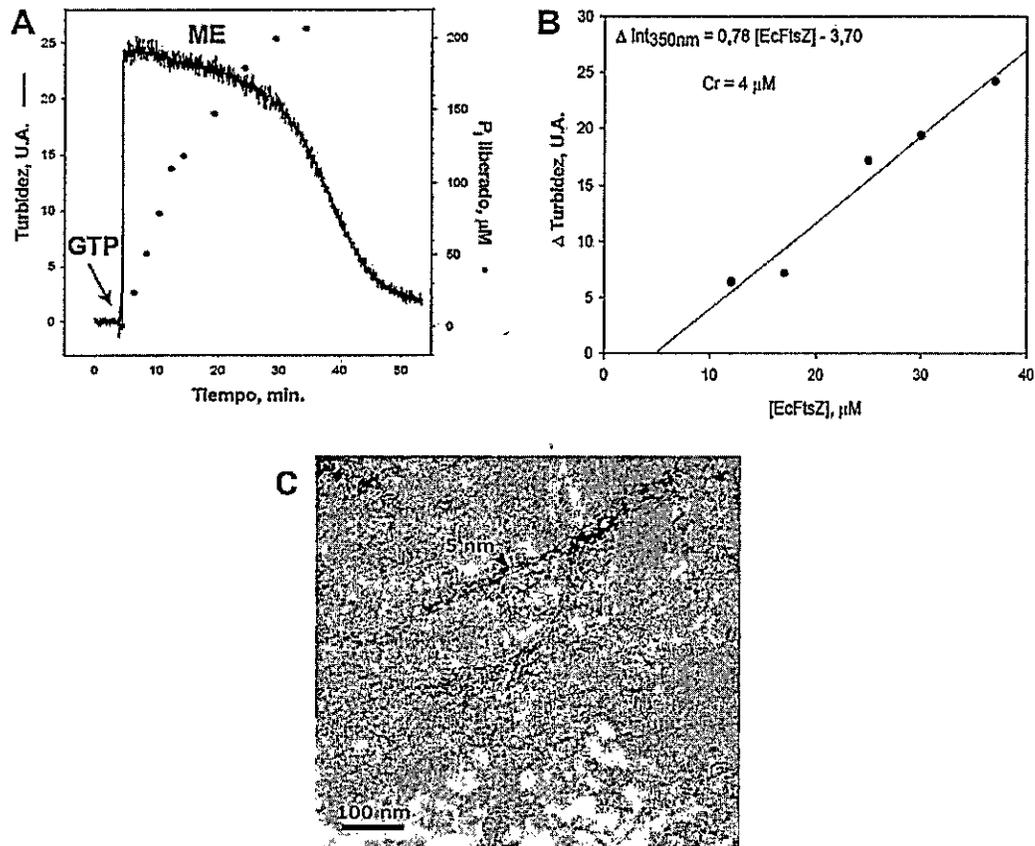


Figura 11. Polimerización y actividad GTPásica de EcFtsZ. A, Turbidez de EcFtsZ 37 μM (línea continua, eje derecho) y curva de progreso de la actividad GTPásica de EcFtsZ 12 μM (círculos negros, eje izquierdo) inducida por la adición de GTP 1 mM en amortiguador de polimerización (MES 50 mM pH 6,5, KCl 50 mM, MgCl_2 10 mM) a 30 °C. B, Concentración crítica (Cr) de la polimerización de FtsZ. C, Micrografía electrónica de los polímeros formados por FtsZ (ME), la flecha negra indica el ancho de un polímero de EcFtsZ. Los parámetros de la actividad GTPásica de EcFtsZ se informan en la figura 12.

A partir de experimentos a distintas concentraciones de proteína se estimó una concentración crítica de polimerización de $4 \mu\text{M}$ (Fig. 11B), en concordancia con un mecanismo de polimerización cooperativo. La micrografía electrónica de los polímeros formados por EcFtsZ *in vitro* (Fig. 11C) muestra filamentos de 5 a 9 nm de ancho que corresponden al diámetro de dos moléculas de EcFtsZ. La proteína purificada por el método de precipitación de polímeros con Ca^{+2} , presentó una actividad específica de $1,13 \mu\text{M GDP } \mu\text{M FtsZ}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (Fig. 11D). Este valor está por debajo de lo reportado para esta purificación por **Rivas y col., 2000**, en donde se obtuvo una preparación de EcFtsZ con una actividad específica de $4,8 \mu\text{M GDP } \mu\text{M FtsZ}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

EcFtsZ reconstituida a partir de los dominios aislados en la misma reacción, presentó una actividad específica de $0,19 [\mu\text{mol GDP } \mu\text{mol dominio}^{-1} \text{ min}^{-1}]$ indicando que no hubo recuperación de la actividad GTPásica al mezclar a los dominios en solución. Este resultado reveló el estado no funcional de EcFtsZ reconstituida *in vitro*. Para determinar si la mezcla de los dominios polimerizaban con GTP se observaron los polímeros formados en una micrografía electrónica y mostró sólo agregados amorfos (Fig. 12C). De la misma manera, en las micrografías de los dominios aislados se encontraron sólo agregados sin forma (no mostrado).

Estos resultados indican que los dominios aislados de EcFtsZ, en estas condiciones experimentales, no polimerizan y por ende, no debieran poseer actividad GTPásica a diferencia de lo que ocurre con TmFtsZ reconstituida. Para mantener el dominio amino terminal de EcFtsZ soluble se utilizó el detergente Tween20, esto se debe a que se observó agregación cuando se renaturó por dilución rápida en ausencia del detergente. Con el objeto de eliminar el detergente se caracterizó la agregación de este dominio.

Figura 12. Actividad GTPásica y polímeros formados por EcFtsZ reconstituida a partir de los dominios amino y carboxilo

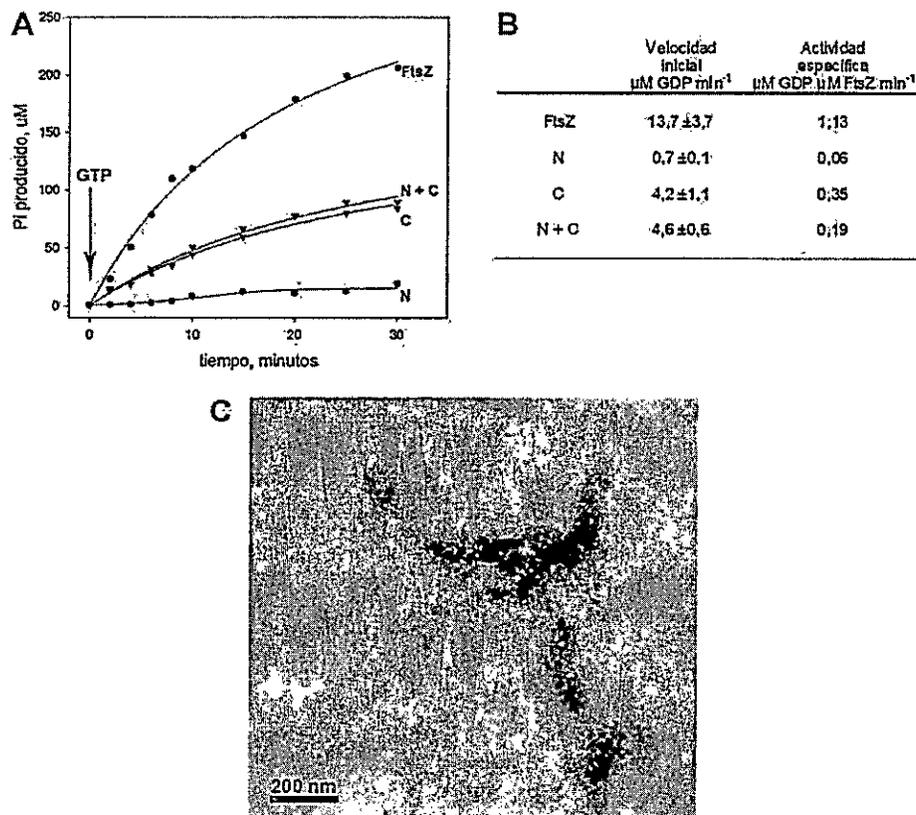


Figura 12. Actividad GTPásica y polímeros formados por EcFtsZ reconstituida a partir de los dominios amino y carboxilo terminales. A, Curva de progreso de la actividad GTPásica de FtsZ $12 \mu\text{M}$ (igual que en la figura 11), amino $12 \mu\text{M}$ (N), carboxilo $12 \mu\text{M}$ (C) y la mezcla de ambos $12 \mu\text{M}$ cada uno (N+C) inducida por la adición de GTP 1 mM en amortiguador de polimerización a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ (para la mezcla del dominio amino terminal el amortiguador contiene Tween20 $0,1\%$ v/v). B, Velocidad y actividad específica de la hidrólisis de GTP de FtsZ, N, C y N+C. C, Micrografía electrónica de los agregados formados por la mezcla de N+C en condiciones de polimerización (igual que en A).

Caracterización del dominio amino terminal renaturado

El dominio amino terminal de EcFtsZ se expresó como cuerpos de inclusión en *E. coli* BL21 (DE3), sin embargo, una pequeña fracción de la proteína se encontró en forma soluble (no mostrado). Para los experimentos que se describen a continuación, una alícuota de la preparación del dominio amino terminal solubilizado en urea 6 M se renaturó por dilución rápida en el amortiguador indicado. Se analizó la estabilidad de la proteína purificada en amortiguador de purificación siguiendo su presencia por SDS-PAGE (teñido con azul de Coomassie), en una muestra renaturada a temperatura ambiente (Fig. 13A) y a 4 °C (Fig. 13B). En ambos ensayos se observó una banda correspondiente al tamaño del dominio amino terminal durante el tiempo (días) en que se incubó la proteína. En el experimento a temperatura ambiente hacia el sexto día se observó una banda de 45 kDa que corresponde a una dimerización del dominio amino terminal (Fig. 13A), mientras que en el experimento a 4 °C la cinética de dimerización se retrasó, pues no se observó la banda de agregación hasta el noveno día (Fig. 13B). Para caracterizar el proceso de agregación desde un punto de vista cinético, el dominio amino terminal renaturado por dilución rápida se incubó a temperatura ambiente y se siguió la agregación mediante turbidimetría a 350 nm (Fig. 13C y D). Se observó que el dominio amino terminal renaturado se encontraba agregado y continuó agregándose lentamente en amortiguador de polimerización. En cambio, al renaturar el dominio amino terminal en el amortiguador de purificación, es decir, diluyendo la urea desde 6 M hasta 0,1 M (una dilución de 50 veces), no se observó un aumento notorio de la turbidez indicando que no había agregación en estas condiciones experimentales.

Figura 13. Caracterización del dominio amino renaturado por dilución rápida

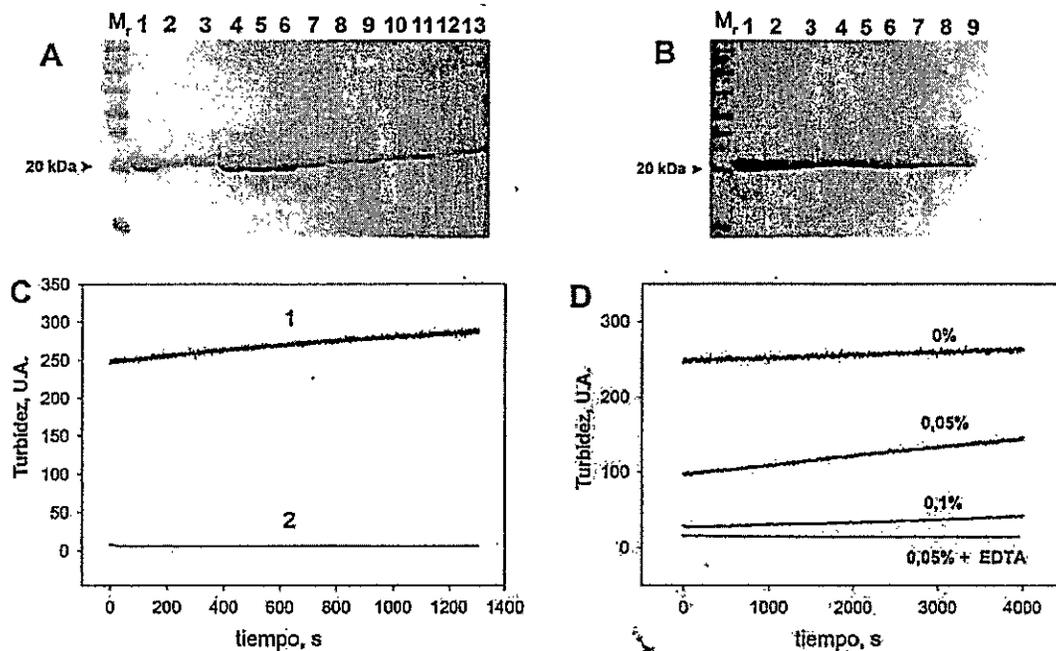


Figura 13. Caracterización del dominio amino terminal renaturado por dilución rápida. Una solución del dominio amino terminal (25 μ M) renaturado por dilución rápida en el amortiguador de purificación (Tris 50 mM pH 8, KCl 50 mM, glicerol 10%) se incubó a temperatura ambiente (A) y a 4 °C (B); Mr, el patrón de masa molecular; los números sobre cada línea señalan los días de incubación. C, cinética de agregación del dominio amino terminal renaturado en amortiguador de polimerización de EcFtsZ (1) y renaturado en amortiguador de purificación del dominio amino terminal (2) seguido por dispersión de luz. D, cinética de agregación del dominio amino terminal en amortiguador de polimerización de EcFtsZ más tres concentraciones (v/v) de Tween20 y en presencia de EDTA 0,1 M.

El dominio amino terminal se expresó como en cuerpos de inclusión probablemente debido a la presencia de una región hidrófoba de la zona de interacción con el dominio carboxilo terminal o a un plegamiento incorrecto. Por esta razón, se analizó la agregación del dominio amino terminal renaturado en presencia del detergente Tween20 (no iónico y no desnaturante).

Se observa en la Fig. 13D que al agregar concentraciones crecientes de Tween20 a la solución en donde se renaturó el dominio amino terminal, la turbidez inicial disminuyó al incrementar el detergente indicando que la interacción que promueve la agregación del dominio amino terminal es de tipo hidrófoba (Fig. 13D). Al renaturar en amortiguador de polimerización de EcFtsZ más 0,1 M EDTA (un quelante de iones Mg^{+2} y Ca^{+2}) a una concentración 0,05% de Tween20, se observó una mínima turbidez sugiriendo que es el catión Mg^{+2} el agente que favorece la agregación. En efecto, en FtsZ de *Methanococcus jannaschii*, el ión Mg^{+2} es suficiente para inducir la polimerización de la proteína sin ligando (Huecas y Andreu, 2004).

Se determinó el efecto de GTP y Mg^{+2} sobre la cinética de agregación del dominio amino terminal renaturado en amortiguador de purificación, es decir, en la condición en que no hay agregación evidente durante un tiempo razonable (Fig. 14A). GTP no produjo cambios significativos en la turbidez de la solución del dominio amino terminal renaturado, mientras que al agregar $MgCl_2$ 10 mM a una mezcla estabilizada del dominio amino terminal (línea base constante), se registró un rápido aumento de la turbidez de la solución y, posteriormente, un estado estacionario. La agregación inducida por $MgCl_2$ se revirtió parcialmente al agregar EDTA 0,1 M (Fig. 14A). Estos resultados mostraron que la agregación del dominio amino terminal es insensible al nucleótido, que el ión Mg^{+2} induce específicamente el proceso de agregación y que los agregados no se despolimerizan una vez formados.

Figura 14. Caracterización de la agregación del dominio amino

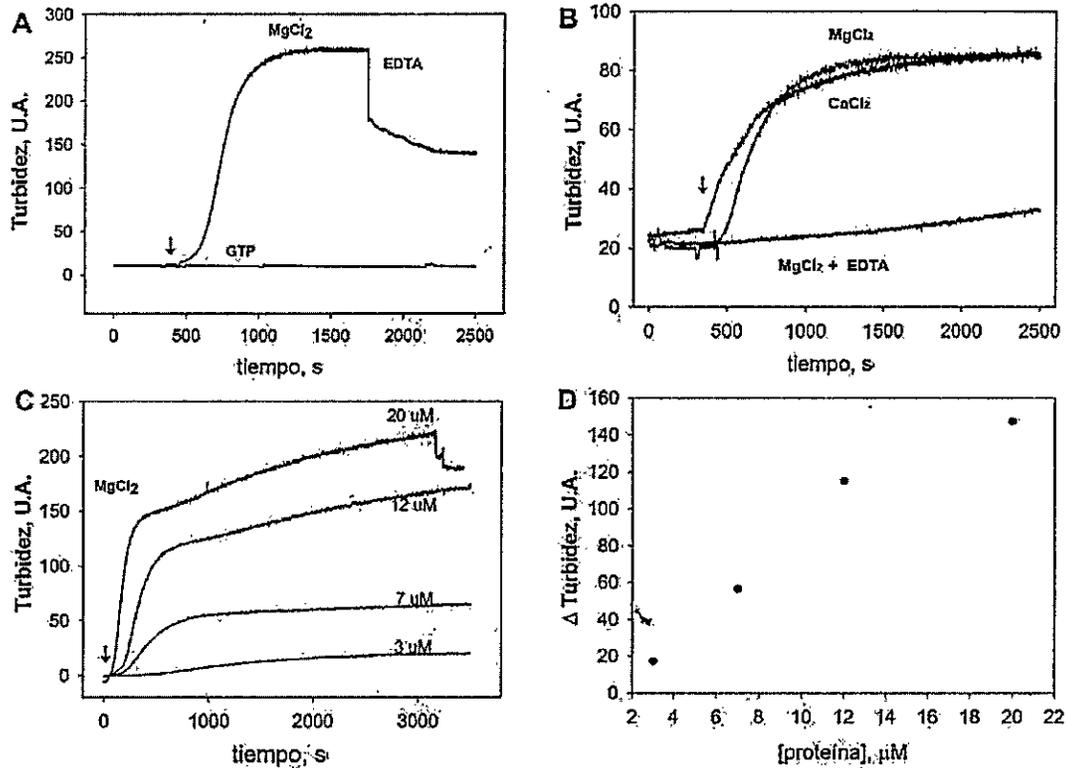


Figura 14. Caracterización de la agregación del dominio amino terminal. A, cinética de agregación a temperatura ambiente del dominio amino (25 μM) en amortiguador de purificación más Tween20 0,05% inducida por MgCl₂ 10 mM ó GTP 1 mM; luego de la estabilización de la turbidez se agregó EDTA a una concentración de 0,1 M. B, agregación del dominio amino terminal (10 μM) en amortiguador de purificación inducida por MgCl₂ 20 mM, CaCl₂ 20 mM y MgCl₂ 20 mM más EDTA 0,1 M. C, efecto de la concentración de proteína sobre la cinética de agregación del dominio amino inducida por 10 mM MgCl₂. D, concentración crítica de la agregación de amino inducida por MgCl₂ a partir de las curvas mostradas en C. Las flechas negras indican el momento en que se agregó MgCl₂, GTP ó CaCl₂.

Para verificar directamente el efecto de Mg^{+2} , se hizo el mismo experimento de renaturación e inducción de la agregación con $MgCl_2$ 10 mM más EDTA 0,1 M (Fig. 14B) y no se observó el mismo aumento de turbidez, confirmando que es el ión Mg^{+2} el responsable de la agregación. Los iones magnesio y calcio favorecen la formación de manojos en la polimerización de FtsZ, este efecto se manifiesta como un aumento exacerbado de la turbidez de la solución en los ensayos de polimerización seguidos por turbidimetría. Para verificar la especificidad de Mg^{+2} se usó calcio a la misma concentración y se observó una cinética de agregación similar a la inducida con 20 mM Mg^{+2} (Fig. 14B). Se determinó el efecto de la concentración de proteína sobre la agregación del dominio amino terminal (Fig. 14C) y se encontró una dependencia lineal de la turbidez con la concentración proteína que intersecta ambos ejes en cero y que pierde la linealidad sobre 12 μM de proteína (Fig. 14D) sugiriendo que la agregación ocurre a través de un proceso isodésmico (sin una etapa de nucleación), que es característico de las agregaciones. El comportamiento del dominio amino terminal con el catión Mg^{+2} sugiere que, en la estructura nativa, este dominio tiene un rol en la polimerización y el proceso cooperativo y reversible de polimerización requiere de la presencia del dominio carboxilo terminal, es decir, del establecimiento de la interacción de ambos dominios.

Caracterización *in vivo*

La reconstitución de la función de EcFtsZ *in vitro* a partir de sus dominios purificados se dificultó por la inestabilidad de ambos dominios en solución (ver caracterización *in vitro*). Debido a esto, se estudió la reconstitución de EcFtsZ desde un punto de vista fisiológico *in vivo* usando la maquinaria de plegamiento de la célula.

Para ello se caracterizó el efecto de la expresión de ambos dominios sobre la viabilidad, cinética de crecimiento y morfología celular de la cepa mutante VIP2(DE3).

Caracterización de la cepa VIP2(DE3)

La cepa VIP2(DE3) es una mutante "termonula" del gen *ftsZ* (Pla y col., 1991). En condición permisiva (30 °C) la cepa creció normalmente con bacterias de forma de bastón, mientras que en la condición restrictiva (42 °C) ocurrió una disminución notoria de la viabilidad y presentó un fenotipo celular filamentososo (Fig. 15). Este efecto se debe a que la síntesis de EcFtsZ en el citoplasma de la cepa mutante se detiene luego de 90 minutos de incubación a 42 °C (ver Materiales y Métodos). Los cultivos a 30 °C presentaron una viabilidad de 2×10^9 ufc/mL (Fig. 16A) y las bacterias mostraron forma de bastón de 1 a 2 micrones de largo sobre su eje longitudinal (Fig. 17A). Los cultivos a 42 °C presentaron una viabilidad de 8×10^4 ufc/mL (Fig. 16A) con bacterias filamentosas de largo de 5 a 20 micrones sobre su eje longitudinal (Fig. 17B). Estos resultados mostraron que a 42 °C, en la cepa termonula, se produce una disminución de hasta 4 órdenes de magnitud en la viabilidad y una drástica filamentación en las bacterias en fase exponencial de crecimiento.

Se caracterizó el crecimiento en cultivos líquidos de la cepa VIP2(DE3) en la condición permisiva y restrictiva y en ambos casos se observó un aumento de la densidad óptica, sin embargo, el cultivo a 42 °C mostró una disminución de la viabilidad conforme aumentaba el tiempo de incubación. Esto coincide con el grupo que construyó la mutante (Pla y col., 1991). Para comparar cuantitativamente las diferencias en el crecimiento, se determinó la constante de crecimiento en la condición permisiva y restrictiva a partir de las curvas de crecimiento. A 30 °C se obtuvo una constante de $1,01 \times 10^{-2}$, mientras que a 42 °C se obtuvo una constante de crecimiento

Figura 15. Propiedades de la cepa VIP2 (DE3) de *E. coli*

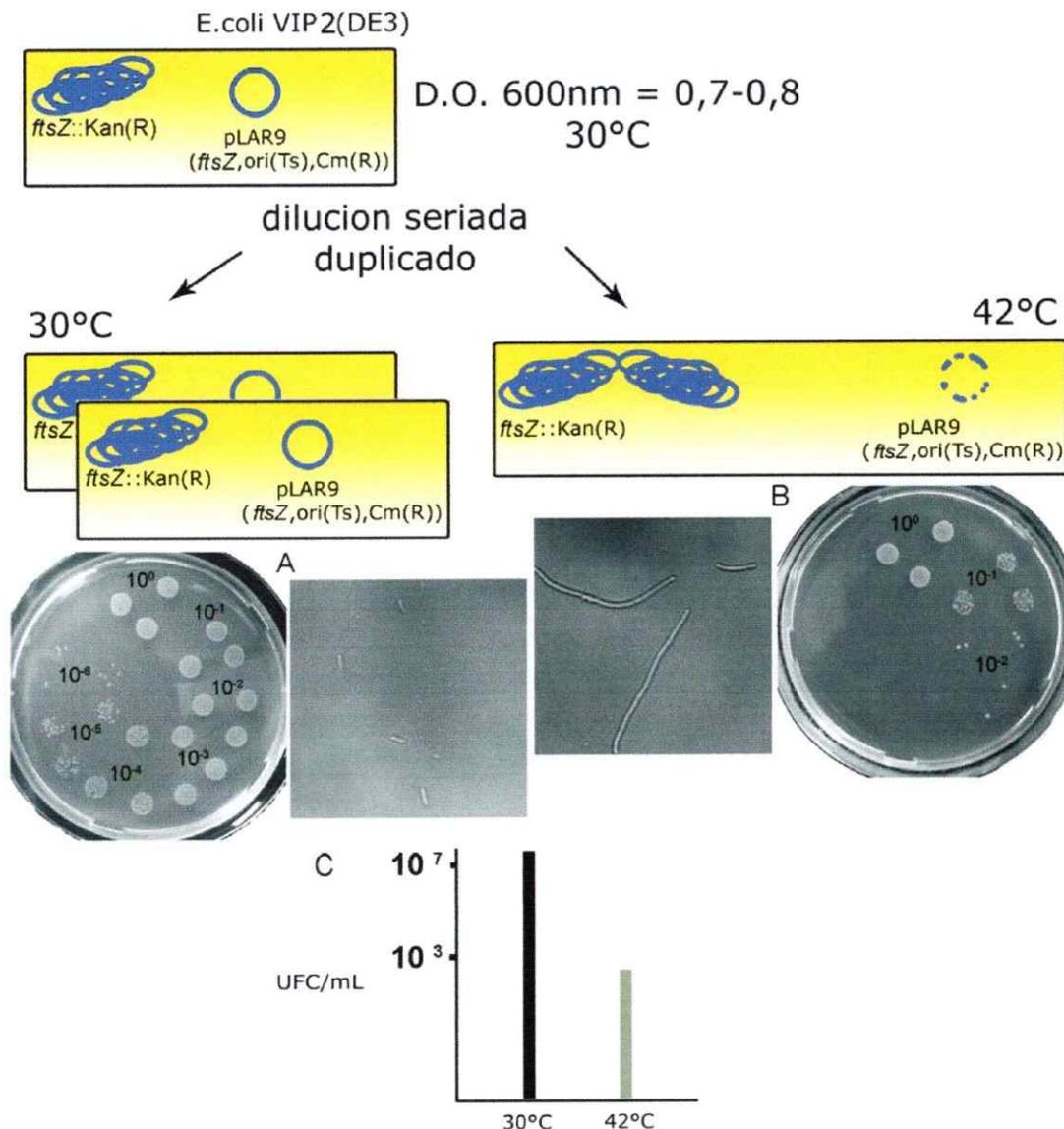


Figura 15. Propiedades de la cepa mutante VIP2 (DE3)-pLAR9 termonula para el gen *ftsZ*. Un cultivo de la cepa VIP2 se creció hasta fase exponencial de crecimiento, a una densidad óptica a 600 nm de 0,7-0,8. Luego, se hizo una dilución seriada desde 10^0 hasta 10^6 y se sembró en duplicado con incubación durante al menos 16 horas a 30 y 42 °C. El conteo de células viables en los duplicados (A y B) entregó la información sobre la cepa sin transformar (control positivo). La carencia de FtsZ se manifiesta como una disminución de hasta 4 órdenes de magnitud en la viabilidad (C) y un fenotipo filamentososo en la morfología celular (B). Estas diferencias permitieron evaluar la viabilidad de la cepa en presencia de los genes mutantes de FtsZ que se logró transformando el vector de expresión correspondiente en la cepa VIP2(DE3)

Figura 16. Viabilidad y constantes de crecimiento de cultivos líquidos que expresan a EcFtsZ y los dominios amino y carboxilo

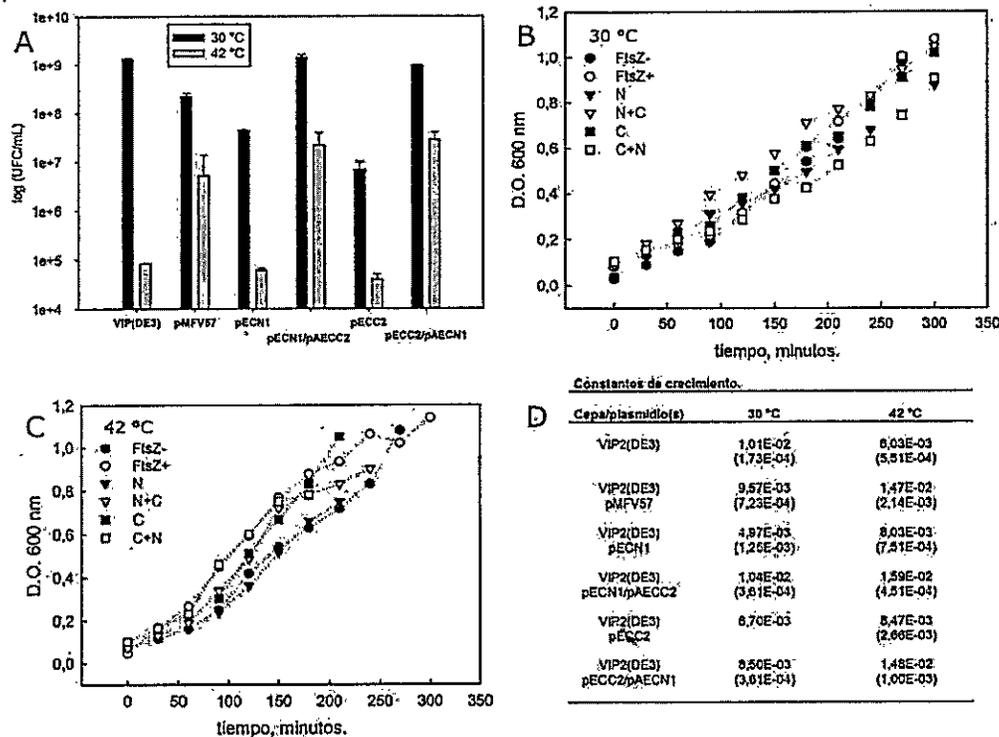


Figura 16. Viabilidad y constantes de crecimiento de cultivos líquidos que expresan a FtsZ silvestre y los dominios amino y carboxilo terminales *in vivo*. A, se determinó la viabilidad de la cepa VIP2(DE3) que expresan a los dominios aislados y co-expresando ambos dominios en la condición permisiva (30 °C) y restrictiva (42 °C), respectivamente. B y C, curvas de crecimiento (sólo fase exponencial) de VIP2(DE3) expresando los dominios por separado y juntos a 30 y 42 °C, respectivamente. D, constantes de crecimiento de la fase exponencial de crecimiento de los cultivos mostrados en B y C. El valor entre paréntesis indica la desviación estándar de al menos dos experimentos independientes, "N+C" corresponde a VIP2(DE3)/pECN1+pAEC2 y "C+N" a VIP2(DE3)/pECC2+pAECN1.

de $6,03 \times 10^{-3}$ (Fig. 16D), que corresponde a una disminución de 50% en la velocidad de crecimiento por la carencia de FtsZ en la condición restrictiva.

Al complementar la cepa VIP2(DE3) con un plasmidio portador del alelo silvestre del gen *ftsZ* (pMFV57), la viabilidad en la condición permisiva alcanzó 3×10^8 ufc/mL con bacterias de 0,5 a 1,5 micrones de largo (Fig. 16A y 17C). En la condición restrictiva la viabilidad alcanzó 8×10^7 ufc/mL con bacterias de 1 a 2 micrones de largo (Fig. 16A y 17D). En los experimentos de crecimiento bacteriano, se observaron constantes de crecimiento a 30 y 42 °C de $9,57 \times 10^{-3}$ y $1,47 \times 10^{-2}$, respectivamente (Fig. 16C). Estos resultados mostraron una recuperación de la viabilidad a 42 °C desde 8×10^4 ufc/mL en la cepa mutante, a 8×10^7 ufc/mL en la cepa que expresaba FtsZ silvestre desde pMFV57 indicando que hubo complementación de la cepa mutante. No se observó una recuperación total de la viabilidad celular debido a que los vectores derivados de pT7 (pMFV57 es un derivado de pET28) presentan elevados niveles de expresión basal en ausencia del inductor. Es sabido que la sobreexpresión de FtsZ puede inducir un efecto dominante negativo en *Escherichia coli* provocando una disminución de la viabilidad y una leve filamentación (Osawa y Erickson, 2005). Al evaluar la constante de crecimiento de los cultivos líquidos a 42 °C, se observó un valor de $6,03 \times 10^{-3}$ en la cepa mutante y un valor de $1,47 \times 10^{-2}$ en la cepa complementada, mostrando un aumento de dos veces en la velocidad de crecimiento en comparación a la cepa mutante en la condición restrictiva (Fig. 16D). Estos resultados mostraron que al complementar la cepa VIP2(DE3) con el vector pMFV57 en la condición restrictiva se produjo una reversión fenotípica de los defectos observados en la morfología y fisiología de la mutante VIP2(DE3).

Figura 17. "Morfología celular de la mutante termonula VIP2(DE3)".

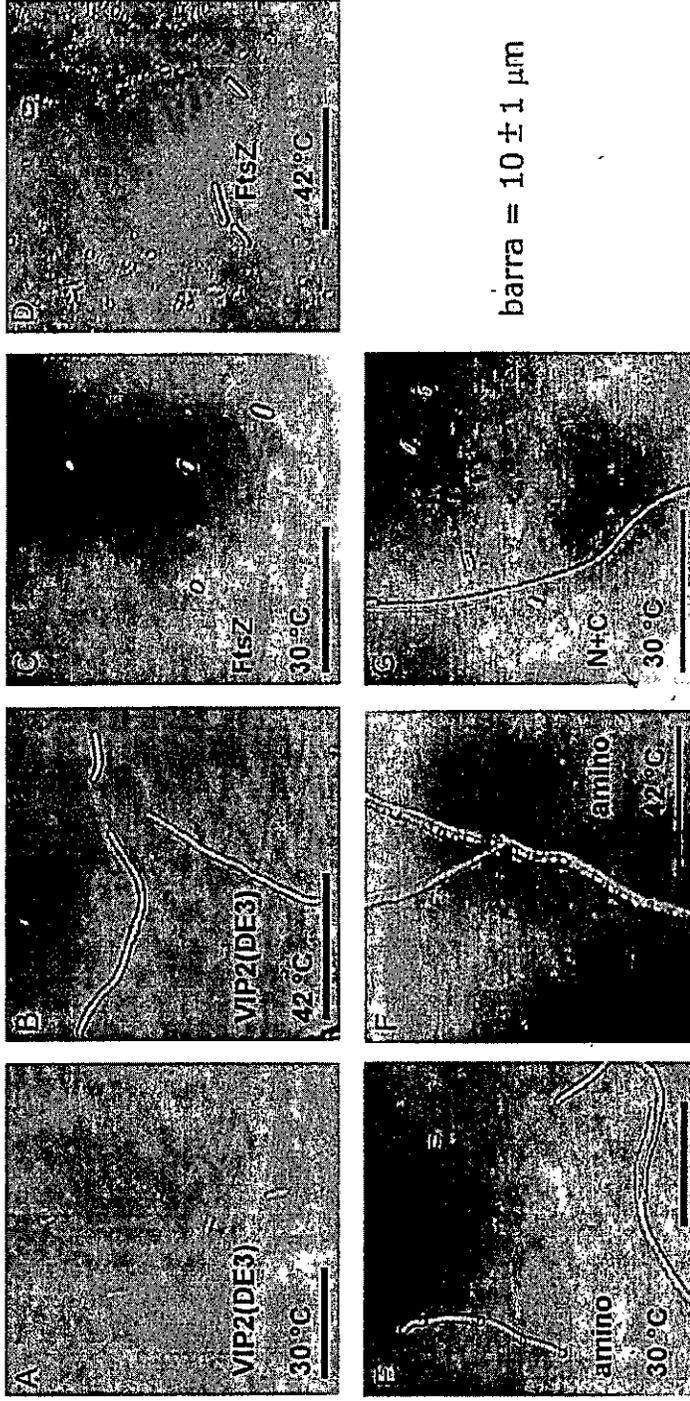


Figura 17. Morfología celular de la mutante VIP2(DE3) visualizada por microscopía de transmisión en condición permisiva y restrictiva. VIP2(DE3) a 30 °C (A) y 42 °C (B); VIP2(DE3)-pMFV57 a 30 °C (C) y 42 °C (D); VIP2(DE3)-pECN1 a 30 °C (E) y 42 °C (F); (G) VIP2(DE3)-pECN1/pAECC2 a 30 °C. Ver Materiales y Métodos para más detalles sobre el procedimiento.

Viabilidad, crecimiento y morfología de la cepa VIP2(DE3) expresando a los dominios aislados

De acuerdo a la caracterización de la cepa termonula VIP2(DE3), el fenotipo mutante se revirtió al proveer una copia del gen *ftsZ* en trans. Debido a esto, se hizo un experimento de complementación *in vivo* en la cepa VIP2(DE3) entregando los dominios amino y carboxilo terminales expresados desde los vectores de compatibles pECN1 (pAECN1) y pAECC2 (pECC2) suponiendo que los dominios tendrían mayor estabilidad en el citoplasma bacteriano debido a que hay chaperonas que facilitan el plegamiento de las proteínas atrapadas en intermediarios semi-desplegados. En estos experimentos se caracterizó la viabilidad, crecimiento celular y la morfología de la bacteria en la condición permisiva y restrictiva de la misma manera que hizo con la cepa VIP2(DE3).

La expresión del dominio amino terminal en la mutante termonula VIP2(DE3)/pECN1 produjo una viabilidad a 30 °C de 7×10^7 ufc/mL, una disminución de dos ordenes de magnitud en la viabilidad respecto de VIP2(DE3), que presentó 2×10^9 ufc/mL en la condición permisiva (Fig. 16A). Además, se observaron bacterias filamentosas de 10 o más micrones de largo en la cepa VIP2(DE3)/pECN1 en la condición permisiva; en estos filamentos se distinguieron gránulos densos distribuidos uniformemente en el citoplasma celular que podrían corresponder a los cuerpos de inclusión del dominio amino terminal (Fig. 17E). Estos resultados indicaron un fenotipo dominante negativo debido a que se observó filamentación y una disminución de la viabilidad en la condición permisiva, es decir, en presencia de FtsZ silvestre. Estos resultados concordaron con la inhibición del crecimiento observada con la cepa de expresión BL21(DE3) (Fig. 7C). En la cepa VIP2(DE3)/pECN1 a 42 °C se observó una

viabilidad de 8×10^4 ufc/mL (Fig. 16A) con bacterias filamentosas de largo mayor a 10 micrones y numerosos gránulos densos en el citoplasma celular (Fig. 17F). Estos resultados demuestran que la expresión del dominio amino terminal es tóxica para la bacteria y que no complementa a la cepa VIP2(DE3).

En los experimentos de crecimiento en cultivos líquidos que expresaban el dominio amino terminal, se observó una constante de crecimiento a 30 y 42 °C de $4,97 \times 10^{-3}$ y $8,03 \times 10^{-3}$ respectivamente (Fig. 16D). Éste resultado indica que la expresión del dominio amino terminal provocó una disminución en la velocidad de crecimiento respecto de la cepa VIP2(DE3) en la condición permisiva, confirmando el fenotipo dominante negativo observado anteriormente.

Al expresar los dominios amino y carboxilo terminales *in trans* en la cepa VIP2(DE3)/pECN1+pAECC2 se observó una viabilidad a 30 y 42 °C de 2×10^9 y 3×10^7 ufc/mL, respectivamente (Fig. 16A). En la condición permisiva se encontraron bacterias filamentosas de tamaño mayor a 10 micrones y bastones de 1 a 2 micrones de largo. En ninguno de los filamentos se observaron gránulos opacos en el citoplasma (Fig. 17G). En los cultivos líquidos de la cepa VIP2(DE3)/pECN1+pAECC2 se obtuvo una constante de crecimiento de $1,04 \times 10^{-2}$ y $1,59 \times 10^{-2}$ a 30 y 42 °C, respectivamente (Fig. 16D). Estos resultados mostraron que la expresión de ambos dominios juntos desde pECN1 y pAECC2 sí complementaron a la cepa termonula.

Tres evidencias apoyan la conclusión sobre la complementación de la función de FtsZ *in vivo* al expresar ambos dominios: primero, se observó un aumento de la viabilidad a la temperatura permisiva de VIP2(DE3)/pECN1+pAECC2 respecto de la VIP2(DE3)/pECN1 desde 7×10^7 a 2×10^9 ufc/mL indicando una reversión del efecto dominante negativo al expresar al dominio amino terminal en los cultivos líquidos. Una posibilidad es que la expresión del dominio amino terminal desde pECN1 disminuya

cuando se expresa el dominio carboxilo terminal simultáneamente desde el vector pAECC2 en la cepa VIP2(DE3), lo que podría explicar la reversión. Otra explicación es que la expresión del dominio carboxilo terminal secuestre al dominio amino terminal para formar una FtsZ reconstituida *in vivo* y evitar el efecto tóxico de su expresión. Segundo, se observó una recuperación de la viabilidad celular en la condición restrictiva (42 °C) en la cepa VIP2(DE3)/pECN1+pAECC2 respecto de la cepa VIP2(DE3)/pECN1 desde 8×10^4 a 3×10^7 ufc/mL, un valor similar a lo observado con la cepa complementada con FtsZ silvestre en la condición restrictiva). Tercero, se observó un aumento de la constante de crecimiento desde $8,03 \times 10^{-3}$ en la cepa VIP2(DE3)/pECN1 a $1,59 \times 10^{-2}$ en la cepa VIP2(DE3)/pECN1+ pAECC2.

Para complementar estos resultados se, co-expresaron los dominios con la otra combinación de vectores de expresión, es decir, con los vectores pECC2 y pAECN1 y se caracterizó la cepa VIP2(DE3)/ pECC2+pAECN1. En la cepa VIP2(DE3)/pECC2, que expresa el dominio carboxilo terminal, se observó una viabilidad a 30 y 42 °C de 8×10^6 y 6×10^4 ufc/mL (Fig. 16A). En los cultivos líquidos se observó una constante de crecimiento de $6,7 \times 10^{-3}$ y $8,47 \times 10^{-3}$ en condición permisiva y restrictiva, respectivamente (Fig. 16D). Al suplementar con el dominio amino terminal la cepa VIP2(DE3)/pECC2+pAECN1, es decir, al proveer ambos dominios usando otra combinación de plasmidios, se observó una viabilidad de 1×10^9 y 5×10^7 ufc/mL a 30 y 42 °C, respectivamente (Fig. 16A). En los cultivos líquidos se observó una velocidad de crecimiento de $8,5 \times 10^{-3}$ y $1,48 \times 10^{-2}$ en condición permisiva y restrictiva, respectivamente. En estos experimentos, se observó una recuperación de la viabilidad y la velocidad de crecimiento al complementar la cepa que expresaba el dominio carboxilo terminal desde pECC2 con el vector que expresaba el dominio amino terminal desde pAECN1. A excepción del fenotipo filamentoso observado en VIP2(DE3)-

pECN1/pAECC2 en la condición restrictiva (Fig. 17G), estos resultados confirmaron la observación que la expresión de los dominios aislados *in trans* complementó la función de FtsZ silvestre en la cepa VIP2(DE3).

DISCUSION

En esta tesis se abordó desde un punto de vista experimental la hipótesis de que FtsZ de *Escherichia coli* separada en sus dominios amino terminal y carboxilo terminal puede restituir su funcionalidad. Sobre la base de la información estructural y funcional de FtsZ de diferentes organismos, se definió la secuencia de FtsZ de *Escherichia coli* que contiene a los dominios amino y carboxilo terminales y se expresaron en forma aislada. Los dominios se caracterizaron *in vitro* e *in vivo* de acuerdo a la función de la proteína.

Los resultados de la caracterización *in vitro* con los dominios amino (aa. 1-179) y carboxilo (aa. 177-383) terminales de EcFtsZ, purificados por cromatografía de afinidad, mostraron que al reunirlos en solución ellos no restituyeron la funcionalidad de la proteína FtsZ nativa. Probablemente la inestabilidad del dominio amino terminal es la causa de este resultado. Los resultados de la caracterización *in vivo* mostraron que al complementar la cepa con ambos dominios las propiedades fisiológicas de la bacteria en condiciones restrictivas son similares a lo observado en la cepa complementada con FtsZ silvestre. Por lo tanto, la actividad de FtsZ *in vivo* sí se restauró al expresar ambos dominios en la cepa VIP2(DE3). Una explicación para estos resultados es que los dominios se pliegan correctamente en el citoplasma bacteriano y que el establecimiento de la interacción entre ambos está favorecida *in vivo*. En cambio, los experimentos con los dominios aislados demostraron que los dominios amino y carboxilo terminales tendieron a oligomerizarse espontáneamente, el dominio amino

terminal en agregados insolubles y el dominio carboxilo terminal permaneció soluble formando dímeros. Ambos dominios se encontraban en un estado semi-desplegado de acuerdo a los experimentos de dicroísmo circular. A continuación se presenta una discusión detallada de los resultados encontrados en este trabajo.

Secuencia y estructura de los dominios amino y carboxilo terminales de EcFtsZ

El modelo tridimensional de EcFtsZ y la estructura cristalina de TmFtsZ representan 79 y 89% de su secuencia completa, respectivamente; tienen los mismos elementos de estructura secundaria y poseen 383 y 351 residuos cada una, respectivamente. Así, estas estructuras podrían carecer de algunos elementos; especialmente EcFtsZ que tiene un extremo carboxilo terminal más largo que TmFtsZ. Los posibles errores estructurales del modelamiento de EcFtsZ se consideraron despreciables debido a la elevada identidad de secuencia que comparte con PaFtsZ (58%) y MjFtsZ (40%), entonces la secuencia representada en el modelo tridimensional de EcFtsZ es probable que muestre fielmente la estructura real (tesis **Andrea Garcés, 2007**).

En el dominio amino terminal de las estructuras de EcFtsZ y TmFtsZ no aparecen representados los primeros 9 y 21 aminoácidos, respectivamente. En la secuencia carboxilo terminal hay 68 y 15 residuos que no aparecen en EcFtsZ y TmFtsZ, respectivamente. La secuencia que antecede a la hélice H0 (aminoácidos 1-20) y la secuencia que sigue después de la hebra S12 (aminoácidos 355-364) en MjFtsZ, se consideró como lazo no estructurado por el grupo que resolvió su estructura (Löwe y col., 1998). En EcFtsZ, los residuos 1 a 9 y 316 a 383 no se modelaron debido a que no están presentes en las estructuras que se usaron como moldes y la conformación que tienen se desconoce. En PaFtsZ, donde no se encontró la hélice H0

en ninguna de las estructuras resueltas hasta ahora, y por lo tanto los primeros aminoácidos no poseen estructura definida, así, se esperaba que al menos los primeros 20 aminoácidos de EcFtsZ no presenten estructuración (Oliva y col., 2007).

La secuencia que codifica para los dominios amino y carboxilo terminales de EcFtsZ se escogió a partir de un alineamiento basado en la estructura tridimensional de EcFtsZ y TmFtsZ (figura 1), donde los dominios amino y carboxilo terminales corresponden a los residuos 1 a 179 y 177 a 383 de la secuencia de EcFtsZ. FtsZ de ambos organismos presentaron 48% de identidad, un resultado esperado considerando que la proteína tiene una función evolutivamente conservada en la división celular de procariontes y arqueas (Vaughan y col., 2004). Al comparar la secuencia de los dominios aislados de EcFtsZ y TmFtsZ se observó que el dominio amino terminal presenta una mayor conservación de secuencia alcanzando 54% de identidad en comparación a 37% para el dominio carboxilo terminal.

Una revisión sistemática de las secuencias de 225 FtsZ de distintos organismos mostró que la proteína FtsZ se puede dividir en cuatro segmentos, tomando como criterio su conservación de secuencia: un segmento N-terminal, de largo variable (5-168 aa.), una región núcleo (del inglés *core*), de largo menos variable (296-324 aa.), una región espaciadora, de largo variable (2-330 aa.), y un extremo C-terminal bastante conservado, de largo menos variable (10-37 aa.) (Vaughan y col., 2004). La región conservada correspondiente a la región núcleo consideró la secuencia contenida entre S1 y S10 de la estructura de MjFtsZ y tiene todos los elementos necesarios para unir e hidrolizar el GTP. Se definió a la región núcleo como la secuencia de MjFtsZ que va desde la isoleucina 40 hasta la valina 340. Otra región bastante conservada correspondió al péptido C-terminal con la secuencia consenso D(E)D(Y/F) LD(E)IPA(P/S)FL que representa un motivo de interacción proteína-

proteína en casi todas las secuencias analizadas. En *E. coli* se analizó la función de esta zona de FtsZ y se encontró que los residuos 316-366 constituyen un espaciador para la cola de interacción con ZipA/FtsA ubicada entre los residuos 366-383, y también se sugirió que la región no estructurada de EcFtsZ constituye un lazo de interacción proteína-proteína (Osawa y col., 2005).

La figura 1 muestra el alineamiento de secuencia basado en la estructura de la región núcleo de EcFtsZ, TmFtsZ y MjFtsZ. Se encontró una identidad de 46% sobre un alineamiento de 310 residuos de *E. coli* para esta región entre EcFtsZ y TmFtsZ, un valor algo menor que la conservación observada con la secuencia completa que fue de 48% (Tabla III). La definición de una región núcleo tiene mayor relevancia evolutiva que la definición de dos dominios en FtsZ puesto que es el segmento conservado más extenso de la secuencia en la mayoría de los casos estudiados (Vaughan y col., 2004). No obstante, se encontró un 54% de identidad de los dominios amino terminales de EcFtsZ y TmFtsZ, mostrando la importancia evolutiva de esta zona dentro del núcleo conservado de las FtsZ.

Debido a las anomalías estructurales presentadas por el cristal *domain-swapped* de TmFtsZ, se analizaron las posibles diferencias con el modelo de EcFtsZ comparando las cadenas de carbonos alfa. Los dominios aislados de EcFtsZ y TmFtsZ se alinearon estructuralmente usando CE y STAMP (Fig. 4 y Tabla III). Con CE, se observó una desviación estructural R.M.S. menor del dominio amino terminal respecto del dominio carboxilo terminal, probablemente por las diferencias encontradas a nivel de secuencia. Al comparar la proteína completa se obtuvo un R.M.S.D. de 4 Å, algo mayor que la desviación observada con los dominios separados. Esto sugirió que los dominios poseen un plegamiento similar pero tienen diferente orientación en la proteína nativa. Oliva y col (2007) mostraron que la orientación del dominio carboxilo terminal

(dentro de la región núcleo) de FtsZ de organismos mesófilos y termófilos presentó variaciones debido a la secuencia más que a cambios conformacionales específicos. **Díaz-Espinoza y col (2007)** mostraron que el dominio carboxilo terminal de FtsZ (un estudio realizado con los cristales de PaFtsZ y MjFtsZ), presentó mayores factores de temperatura cristalográficos que el dominio amino terminal y mayor cantidad de regiones flexibles (**tesis Leonardo Sepúlveda, 2007**). En consecuencia, las diferencias en R.M.S.D. encontradas con los alineamientos del dominio carboxilo terminal de EcFtsZ y TmFtsZ en este trabajo, se deben a una mayor divergencia de la secuencia aminoacídica.

Expresión y purificación de los dominios amino y carboxilo terminales de EcFtsZ

La secuencia del gen *ftsZ* que codifica los dominios amino y carboxilo terminales contiene a los nucleótidos 1-538 y 531-1149, respectivamente. Para evaluar la expresión de los dominios, los vectores transformaron en BL21(DE3) y se encontró que el dominio carboxilo terminal tiene menor migración electroforética que el dominio amino terminal, en concordancia a la predicción de la masa molecular en base a la secuencia aminoacídica. Los vectores pECN1 y pECC2 mostraron mayor nivel de expresión de los dominios que los vectores pAECN1 y pAECC2, respectivamente. Este resultado era esperado debido a la regulación del número de copias de ambos vectores (**Tabor y Richardson, 1985; Chang y Cohen, 1978**).

Osawa y col., 2005, demostraron que la región amino terminal de EcFtsZ (aa. 1-195), causaba un efecto dominante negativo en la bacteria. Se sugirió que podría deberse a la inhibición de la polimerización de FtsZ puesto que el dominio amino terminal posee todos los residuos necesarios para el establecimiento de la interacción longitudinal, entonces generaría un "heterodímero" que bloquea la elongación del

protofilamento. En este trabajo, se evaluó el crecimiento en cultivos líquidos de BL21(DE3), expresando ambos dominios en condiciones de inducción y se encontró que ambos poseen actividad biológica pues produjeron una inhibición del crecimiento durante las primeras horas de incubación. Sin embargo, el crecimiento normal se restituyó después de 6 horas de inducción probablemente por la selección de poblaciones de baja o nula expresión de proteína (Fig. 7C).

EcFtsZ y el dominio carboxilo terminal se expresaron en forma soluble y se purificaron desde la fracción citoplasmática de los cultivos inducidos. En contraste, el dominio amino se expresó como cuerpos de inclusión (Fig. 8B). Usando la secuencia de los dominios amino y carboxilo terminales se hizo una predicción de la masa molecular de las proteínas purificadas y corresponden a 19,3 y 23 kDa, respectivamente. FtsZ purificada presentó una masa molecular aparente de 41 kDa y los dominios amino y carboxilo terminalés una masa molecular aparente de 21 y 24 kDa, respectivamente. Las diferencias observadas entre el valor de la masa molecular esperada y observada estuvieron dentro del error. De acuerdo a la secuencia, el dominio amino terminal tiene un punto isoeléctrico de 6,05 mientras que el dominio carboxilo terminal tiene un valor de 4,69. Entonces, la expresión insoluble del dominio amino terminal podría deberse a la baja solubilidad que predice su punto isoeléctrico en el pH fisiológico de la bacteria que corresponde a 6,5-7,5 (Wilks y col, 2007).

La preparación de FtsZ alcanzó una pureza de 98% de manera similar a lo reportado por Rivas y col., 2000, donde se utilizó el mismo método de purificación. Los dominios amino y carboxilo terminales alcanzaron una pureza de 99 y 80%, respectivamente. Las impurezas presentes en la purificación del dominio carboxilo terminal se trataron de eliminar agregando un paso de filtración en columna (no mostrado). En el cromatograma de la filtración, se encontró que la fracción

correspondiente al pico de mayor intensidad (se supuso que era la señal de un dímero del dominio carboxilo terminal en la figura 10), corresponde a una banda del tamaño del dominio carboxilo terminal y una banda del tamaño de un dímero de carboxilo (no mostrado). Debido a esto, se realizó una electro-elución de la banda correspondiente al dominio carboxilo terminal desde un SDS-PAGE de la purificación. En el gel del dominio carboxilo terminal obtenido con la electroelución, nuevamente se obtuvieron dos bandas indicando que la "contaminación" que apareció en la purificación se debe a una oligomerización del dominio carboxilo terminal resistente al detergente SDS (no mostrado). Se ha reportado que las proteínas de membrana, que exponen grandes superficies hidrofóbicas, a veces se agregan y forman oligómeros resistentes a SDS (Sagné y col., 1996). Los dominios purificados de EcFtsZ mostraron una tendencia a la agregación que se caracterizaba por la formación de oligómeros insolubles en SDS, indicando que la interfase hidrofóbica que exponen al separarlos esta involucrada en el proceso de agregación.

EcFtsZ y los dominos amino y carboxilo en solución

El plegamiento de EcFtsZ purificada por ciclos de polimerización con Ca^{+2} fue caracterizado por Andreu y col. (2002), donde se encontró un espectro de dicroísmo circular con mínimos en 208 y 220 nm. Marrington y col. (2004) calcularon el contenido de estructura secundaria usando el algoritmo CDSSTR (Sreerama y col., 2000) a partir de los espectros de EcFtsZ, lo que permitió comparar los resultados obtenidos en este trabajo.

EcFtsZ presentó un espectro de dicroísmo circular con dos mínimos uno a 208 y otro alrededor 222 nm, y el contenido de estructura secundaria calculado a partir del espectro mostró diferencias significativas con lo publicado. Los dominos amino y

carboxilo terminales también presentaron espectros característicos de proteínas plegadas. Sin embargo, se encontró que los dominios mostraban una señal de elipticidad muy baja, aún cuando se había realizado una cuantificación de la concentración proteína confiable y la solución del dominio amino terminal se encontraba estabilizada con el detergente no desnaturalante Tween20. Sólo se obtuvo una señal de elipticidad clara y de intensidad comparable al control de EcFtsZ cuando se aumentó cuatro veces la concentración de proteína del dominio amino terminal. Esto sugirió que una fracción mayoritaria de la proteína en la solución se encontraba mal plegada o simplemente desnaturalada. Para confirmar esta hipótesis, se indujo artificialmente el plegamiento de los dominios con el co-solvente TFE y se registró su espectro de dicroísmo circular que mostró intensidades comparables a las de FtsZ silvestre (Fig. 9). Esto último confirmó que los dominios se encontraban desplegados. El control de FtsZ mostró que los dominios se plegaban con distintas proporciones de estructura secundaria en presencia de TFE y en ausencia del co-solvente. Esto era esperable pues TFE induce preferentemente la formación de hélice-alfa y hoja-beta en péptidos desnaturalados (Roccatano y col., 2002).

Rivas y col., 2000 determinaron el equilibrio de auto-asociación de FtsZ purificada por el método de precipitación con Ca^{+2} . En estudios de sedimentación al equilibrio encontraron que siempre que se mantenga la concentración de Mg^{+2} muy baja, en forma casi independiente de la fuerza iónica, la proteína es un monómero. No obstante, al aumentar la concentración de proteína, se observó un aumento de la asociación de FtsZ. Para determinar el estado de oligomerización de las proteínas purificadas en esta tesis, se hizo una cromatografía de exclusión molecular de EcFtsZ y los dominios aislados (Fig. 10). FtsZ se encontró mayoritariamente como un monómero en concordancia a lo reportado anteriormente. También el dominio amino

terminal se encontró como un monómero compacto y el dominio carboxilo terminal en estado dímérico. Cabe destacar que el dominio amino terminal se agregó al poco tiempo de realizar la renaturación pues eluyó en el volumen de exclusión cuando se pre-incubó a temperatura ambiente (ver más adelante).

Estos resultados permiten concluir que los dominios amino y carboxilo terminales de EcFtsZ no se plegaron totalmente en las condiciones experimentales usadas. Sin embargo, la fracción de proteína que sí presentó estructura en las purificaciones de los dominios, mostró un espectro de dicroísmo circular propio de proteínas plegadas y un contenido de estructura secundaria esperado (Fig. 9). Evidentemente, la separación de los dominios desde la proteína nativa los hizo inestables en solución. La caracterización *in silico* sugirió que la inestabilidad se debería a que estos exponen una gran superficie hidrófoba correspondiente a la interfase de interacción de los dominios en la proteína nativa.

Una mezcla de los dominios amino y carboxilo terminales de EcFtsZ no restituye la funcionalidad de la proteína *in vitro*

Los dominios amino y carboxilo de TmFtsZ, una proteína termoestable (lo mismo para MjFtsZ), se pliegan independientemente en solución y restablecen la actividad de la proteína nativa sólo con mezclarlos. En cambio, los dominios amino y carboxilo de EcFtsZ no presentaron un comportamiento estable en solución lo que llevó a suponer que no activarían la polimerización ni la actividad GTPásica al mezclarlos como se hizo con los dominios de TmFtsZ. Como muestra la figura 12, al juntarlos no se recuperó una actividad GTPásica mayor que la actividad basal. Cabe destacar que en las reacciones de los dominios aislados no se esperaba actividad significativa y, sin embargo, se encontró actividad en la purificación del dominio carboxilo terminal. Esto

se debió, probablemente, a la presencia de una GTPasa contaminante de la célula que contribuiría con una señal en la detección de fosfatos (ver purificación de los dominios).

Debido a que la hidrólisis del nucleótido no es necesaria para inducir la polimerización de FtsZ (Michie y Löwe, 2006), se observaron los polímeros formados por las mezclas de los dominios amino y carboxilo terminales en el microscopio electrónico y no se observaron verdaderos polímeros en los campos analizados (figura 12C). Estos resultados indicaron que la actividad GTPasa de EcFtsZ reconstituida no se activó debido a que los dominios se encontraban en una conformación no funcional.

El dominio amino terminal de EcFtsZ se agrega en solución

Se mencionó previamente que la solución del dominio amino terminal se estabilizó con el detergente Tween20. Este surfactante es un detergente no iónico y no desnaturalante utilizado frecuentemente para estabilizar proteínas con tendencia a la agregación. La primera evidencia que mostró que el dominio amino terminal se agregaba, se obtuvo con un análisis de la estabilidad de la solución del dominio renaturado. En presencia del detergente se observó una dimerización resistente a SDS del dominio amino terminal renaturado, un resultado similar a la agregación observada en la purificación del dominio carboxilo terminal (ver Resultados). La cinética de agregación del dominio amino fue más lenta que la del dominio carboxilo terminal pues se agregó luego de 6 días de incubación a temperatura ambiente, sin embargo, cuando se incubó a 4 °C no se observó agregación hasta el día 9. Este resultado apoya la idea que la separación de los dominios desde la proteína nativa es responsable de la agregación de los dominios purificados.

Curiosamente, la agregación del dominio amino terminal se aceleró significativamente al diluir rápidamente en amortiguador de polimerización (Fig. 13C).

Para probar la hipótesis que las interacciones hidrófobas median la agregación del dominio amino terminal en el amortiguador de polimerización, se tituló una preparación del dominio amino terminal renaturado con el detergente Tween20 (Fig. 13D). Como se esperaba del aumento de la concentración del detergente, la velocidad de agregación y turbidez inicial disminuyó. Entonces, la principal causa de la agregación observada corresponde a una interacción de tipo hidrófoba que es revertida por la acción del detergente Tween20. Cuando se agregó EDTA a la solución de renaturación, la agregación se abolió. Este resultado mostró que el catión Mg^{+2} era también responsable de acelerar la agregación de esta proteína y que el detergente afectó la cinética debido a que estabilizó las superficies hidrofóbicas que conducen a la agregación del dominio amino terminal renaturado.

Es interesante el hecho que la agregación del dominio amino terminal renaturado se aceleró con Mg^{+2} . Se ha reportado con anterioridad que Mg^{+2} es suficiente para inducir la formación de polímeros en MjFtsZ sin nucleótido (Huecas y Andreu, 2002). Entonces, para comprobar si la agregación del dominio amino terminal inducida con el ión magnesio presentaba un comportamiento similar al de MjFtsZ se realizaron experimentos de "agregación" inducida con $MgCl_2$ 10 mM. Se encontró que la agregación presentaba una saturación y no mostraba una concentración crítica detectable. Estos resultados indican que se trataba de un proceso isodésmico, es decir, carente de una fase de nucleación. Adicionalmente, la agregación se indujo por $CaCl_2$, un conocido inductor de la asociación lateral de FtsZ *in vitro* (Rivas y col., 2000). Esto último sugirió que el dominio amino terminal podría ser el principal actor en la inducción de la asociación lateral de FtsZ silvestre.

La co-expresión de los fragmentos 1-179 y 177-383 de EcFtsZ complementa a la cepa mutante VIP2(DE3)

La falta de actividad de EcFtsZ reconstituida a partir de los dominios aislados sugirió que los dominios no se plegaron en una forma funcional *in vitro*. En contraste, se observó un efecto dominante negativo *in vivo*, lo que sugirió que adquirieron un plegamiento fisiológicamente activo en el citoplasma de la bacteria. Por este motivo, se usó la cepa de complementación VIP2(DE3) que impide la síntesis de EcFtsZ a 42 °C de modo de analizar la viabilidad al complementar con los dominios *in vivo*.

Un resultado que merece atención en los experimentos de complementación, es que la viabilidad de la cepa VIP2(DE3)-pMFV57 (control positivo), en la condición restrictiva, no alcanzó 100% de complementación (Fig. 16A). Se observaron diferencias de 1 a 2 órdenes de magnitud en la complementación del control positivo. Se discutió en los resultados que la sobreexpresión de FtsZ silvestre causa un fenotipo dominante negativo en la bacteria y podría explicar la diferencia en la viabilidad a 30 y 42 °C (Osawa y col, 2005). Otra explicación para este resultado es que el nivel de expresión basal del vector pMFV57 es menor de lo necesario para lograr un 100% de complementación. Para probar este punto, se realizó un experimento de complementación a varios niveles de inducción con IPTG (Fig. 18). En particular, se estudió el intervalo de concentración de IPTG desde 0 a 0,1 mM, que consideró los niveles de inducción utilizados en los experimentos de complementación (sin inductor) y la concentración de IPTG en la que se observó el fenotipo dominante negativo en BL21(DE3) (0,1 mM). La figura 18 muestra que en el intervalo de 0 a 0,01 mM de IPTG se obtiene el mismo resultado en la complementación y sólo con concentraciones mayores a 0,05 mM del inductor, se produjo una disminución de la viabilidad.

Entonces, la expresión basal de los vectores es adecuada para realizar el experimento de complementación (todas las proteínas se encuentran bajo el control del promotor T7).

Cuando se expresaron los dominios amino y carboxilo terminales por separado en la cepa VIP2(DE3), en la condición permisiva se observó un fenotipo dominante negativo en la viabilidad celular y en la velocidad de crecimiento de los cultivos (Fig. 16 y 17). Este resultado concuerda con la inhibición del crecimiento observada en la cepa BL21(DE3) que expresan a los dominios aislados (Fig. 7). Al complementar la cepa VIP2(DE3) con ambos dominios a la vez, desde vectores de expresión compatibles, se observó una reversión del fenotipo dominante negativo y los parámetros de complementación (viabilidad, velocidad de crecimiento y morfología) mostraron que hubo complementación.

Se concluye que los dominios expresados simultáneamente adquirieron un plegamiento funcional *in vivo*. El dominio carboxilo terminal se expresó en forma soluble formando dímeros con un contenido de estructura secundaria propio de una proteína plegada. A parte de estas cualidades no se observó un comportamiento anómalo por parte del dominio purificado. El fenotipo dominante negativo que mostró la expresión del dominio carboxilo terminal *in vivo*, sugiere que tiene una actividad cuya sobreexpresión afecta el crecimiento bacteriano. En este trabajo, la secuencia del dominio carboxilo de EcFtsZ incluyó el carboxilo terminal del núcleo de la proteína (aa. 179-316), un péptido espaciador (aa. 317-366) y, por último, el péptido de interacción proteína-proteína en el extremo carboxilo terminal de la proteína (aa. 367-383) (Vaughan y col., 2004; Osawa y col., 2005).

Sólo el péptido del extremo carboxilo terminal de la proteína, denominado péptido de interacción proteína-proteína tiene una función en la división celular *per se*,

Figura 18. Efecto de la expresión de EcFtsZ sobre la viabilidad de la cepa VIP2(DE3)

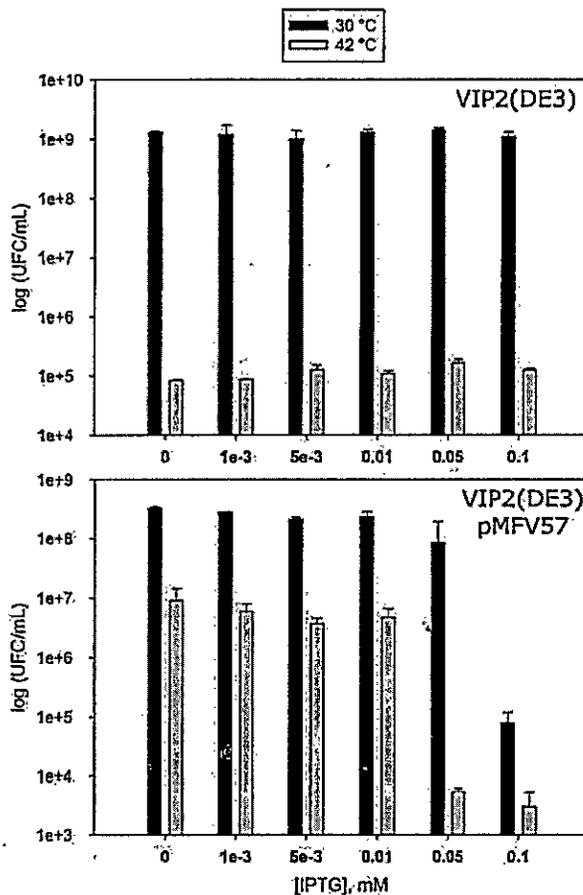


Figura 18. Efecto de la expresión de FtsZ silvestre sobre la viabilidad de la cepa VIP2(DE3). Se evaluó la viabilidad de la cepa VIP2(DE3) a diferentes niveles de inducción con IPTG. Arriba se muestra la viabilidad en condición permisiva y restrictiva del control negativo (VIP2(DE3)) y abajo se muestra la viabilidad en condición permisiva y restrictiva del control positivo (VIP2(DE3)-pMFV57). Sobre 0,01 mM de IPTG, la expresión de FtsZ causó una fuerte disminución de la viabilidad en la condición restrictiva. En el intervalo 0-0,01 mM de IPTG se registró una recuperación de la viabilidad en la cepa complementada respecto de la no complementada en la condición restrictiva (42 °C).

a diferencia del péptido espaciador y de la porción del núcleo del dominio carboxilo terminal (ver más arriba). Este fragmento de FtsZ es reconocido por FtsA y ZipA y su presencia es requerida para la división bacteriana (Ma y Margolin, 1999). Entonces, el mecanismo propuesto para el efecto dominante negativo de este dominio, es que la sobreexpresión del péptido C-terminal secuestra a FtsA y ZipA en el citoplasma reduciendo su biodisponibilidad a niveles que impiden la septación normal. La razón FtsZ:FtsA es importante durante todo el ciclo celular para la viabilidad de la bacteria (Löwe y col., 2004; Errington, 2003). Es importante mencionar que el mecanismo propuesto no requiere que todo el dominio se encuentre plegado correctamente puesto que sólo el extremo carboxilo terminal ejerce la acción. Entonces, el plegamiento del dominio carboxilo terminal en los dímeros observados en solución no necesariamente representa una conformación fisiológicamente relevante o la que tiene el dominio *in vivo*.

En la sobreexpresión del dominio amino terminal también se observó un fenotipo dominante negativo (Figs. 7, 16 y 17). Es menos probable que la interacción con otras proteínas de división esté involucrada en el mecanismo de inhibición del crecimiento por el dominio amino terminal, puesto que no se han reportado funciones moduladores de la actividad de FtsZ que involucre una interacción a través del dominio amino terminal (Errington 2003; Löwe, 2004; Graumann 2007). Sin embargo, en varias de las proteínas que regulan la función de FtsZ no se conoce con exactitud a qué porción de la proteína se unen, entonces esta posibilidad no se puede descartar. La insolubilidad del dominio amino terminal causó que se expresara como cuerpos de inclusión, sin embargo, una pequeña proporción (se estimó 1%) se expresó soluble y pudo purificarse desde la fracción citoplasmática de cultivos inducidos (no mostrado). Para el dominio amino terminal, se propone un mecanismo de inhibición que involucre

la interacción directa con FtsZ. Una discusión del modelo de polimerización de FtsZ y del posible mecanismo de inhibición del dominio amino terminal se presenta al final de la discusión.

El modelo de polimerización de FtsZ se puede resumir en las siguientes etapas (Fig. 19):

- (1) FtsZ-GDP se encuentra en un equilibrio de asociación y disociación, a través de una interacción débil.
- (2) La unión de GTP en el bolsillo de unión del dominio amino terminal estabiliza la asociación de monómeros y dímeros a través de la interacción longitudinal y promueve la elongación de los protofilamentos por un proceso cooperativo. La adición de monómeros ocurre en ambos extremos del polímero. Eventualmente, los protofilamentos pueden asociarse a través de la interacción lateral para formar filamentos dobles.
- (3) En el protofilamento, se forma completamente el sitio activo de hidrólisis de GTP de FtsZ a través de la interacción longitudinal. El sitio activo consiste en el posicionamiento del dominio carboxilo terminal sobre el dominio amino terminal de manera que el *loop* T7, del dominio carboxilo terminal, entra en contacto con el GTP unido y expuesto en el dominio amino terminal.
- (4) Si el nucleótido se encuentra disponible en la solución, éste se intercambia activamente a lo largo del protofilamento. Se establece un estado estacionario durante la polimerización de FtsZ que depende de la concentración de proteína y de GTP.
- (5) No es posible el intercambio de nucleótido en los filamentos asociados lateralmente debido a que el sitio activo se encuentra obstruido.

- (6) Cuando el nucleótido se consume y disminuye el intercambio, entonces FtsZ con GDP unido en el dominio amino terminal desestabiliza la interacción longitudinal y ocurre la despolimerización de la proteína.
- (7) Después de la despolimerización se vuelve a establecer el equilibrio de asociación de FtsZ en solución.

Modelo de la inhibición de la polimerización de FtsZ por el dominio amino terminal renaturado *in vitro*

En este modelo (Fig. 20), las moléculas de dominio amino terminal que se encuentran bien plegadas *in vivo*, interactúan con FtsZ a través de la interacción longitudinal impidiendo la elongación del protofilamento. Este efecto disminuye la biodisponibilidad de FtsZ interrumpiendo la septación. Para probar esta hipótesis, se realizaron experimentos de inhibición de la polimerización de FtsZ por el dominio amino terminal *in vitro* (Fig. 20). Debido a que el dominio amino terminal se mantuvo estable en solución con el detergente Tween20, se realizó un experimento control de polimerización en presencia del detergente y se encontró que no produjo un efecto sustancial en la cinética de polimerización de FtsZ (Fig. 20). Al agregar proporciones estequiométricas del dominio amino terminal y FtsZ se observó una disminución de la polimerización y este efecto era proporcional a la concentración del dominio. Este resultado es una evidencia directa del efecto negativo del dominio amino terminal sobre la capacidad polimerizante de FtsZ *in vitro*. En la figura 20C se muestra un modelo de la interacción que establecería el dominio amino terminal con FtsZ, esta interacción "secuestraría" la proteína impidiendo la polimerización. Es probable que *in vivo* las condiciones de *crowding* del medio induzcan la interacción entre ambos dominios para reestablecer la división celular en ausencia de FtsZ. Se sugiere experimentos futuros

probar la interacción entre ambos dominios en presencia de agentes inductores de *crowding* como Ficol 40 y otros de acción conocida.

CONCLUSIONES

La FtsZ de *Escherichia coli* (EcFtsZ) ha sido ampliamente caracterizada *in vitro* e *in vivo* y se conocen en gran medida los principios tanto bioquímicos como fisiológicos de su función. Sin embargo, la relación de su estructura con su función no ha sido completamente dilucidada pues la estructura 3D de EcFtsZ no ha sido resuelta hasta ahora, no obstante, tenemos un modelo 3D de su estructura que representa con alta fidelidad la estructura real de la proteína. La estructura de EcFtsZ posee dos dominios, el amino que abarca los residuos 1 a 179 y el carboxilo que abarca los residuos 177 a 383 de la secuencia completa. Un análisis de la FtsZ de distintos organismos muestra que el dominio amino terminal es más conservado que el dominio carboxilo terminal. Los dominios amino y carboxilo terminales de EcFtsZ aislados en solución son inestables y no alcanzan un plegamiento correcto debido a que al separarlos exponen una gran superficie hidrófoba que corresponde la superficie de interacción interdominio que es de tipo permanente. Debido a esto, los dominios aislados no consiguen restituir la actividad GTPásica de FtsZ *in vitro*. El análisis del rol fisiológico de los dominios aislados en la función de EcFtsZ se estudió *in vivo* con la cepa termonula VIP2(DE3). Mientras la expresión de los dominios por separado inhibe el crecimiento bacteriano, la co-expresión de los dominios amino y carboxilo terminales juntos complementa a la cepa termonula VIP2(DE3). Los dominios podrían adquirir un plegamiento funcional en el citoplasma bacteriano debido al efecto de *crowding* intracelular. A futuro, proponemos estudiar *in vitro* el efecto de *crowding* sobre los dominios por separado y juntos.

Figura 19. Modelo de la polimerización dependiente de GTP de FtsZ.

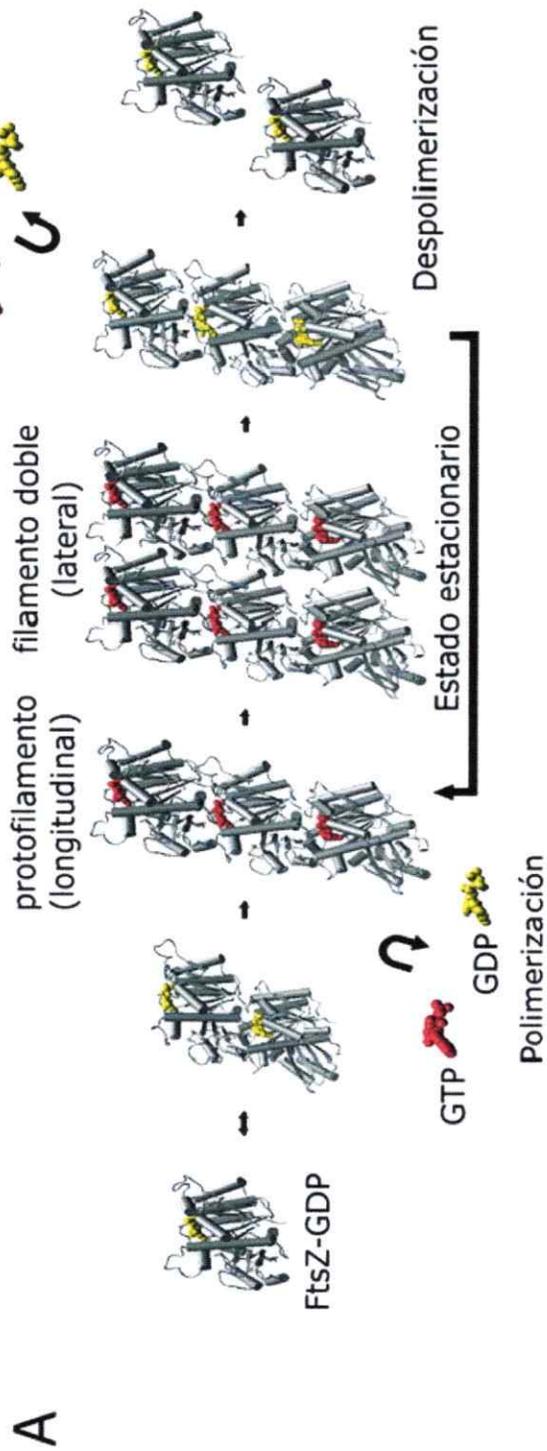


Figura 19. Modelo de la polimerización GTP-dependiente de FtsZ. A, FtsZ-GDP establece un equilibrio de oligomerización *in vitro*. Al adicionar GTP (rojo) a una solución de FtsZ sobre la concentración crítica, se forma el protofilamento a través de la interacción longitudinal. Los polímeros interactúan a través de la interacción lateral y forman filamentos dobles que se disocian rápidamente debido a la hidrólisis del nucleótido a su forma GDP (amarillo). El nucleótido hidrolizado se intercambia por GTP en los protofilamentos y comienza un nuevo ciclo de polimerización dando origen al estado estacionario. Cuando el nucleótido es consumido, ocurre la despolimerización de la proteína y se reestablece el equilibrio de oligomerización en solución.

Figura 20. Modelo de la inhibición de la polimerización de FtsZ por el dominio amino *in vitro*.

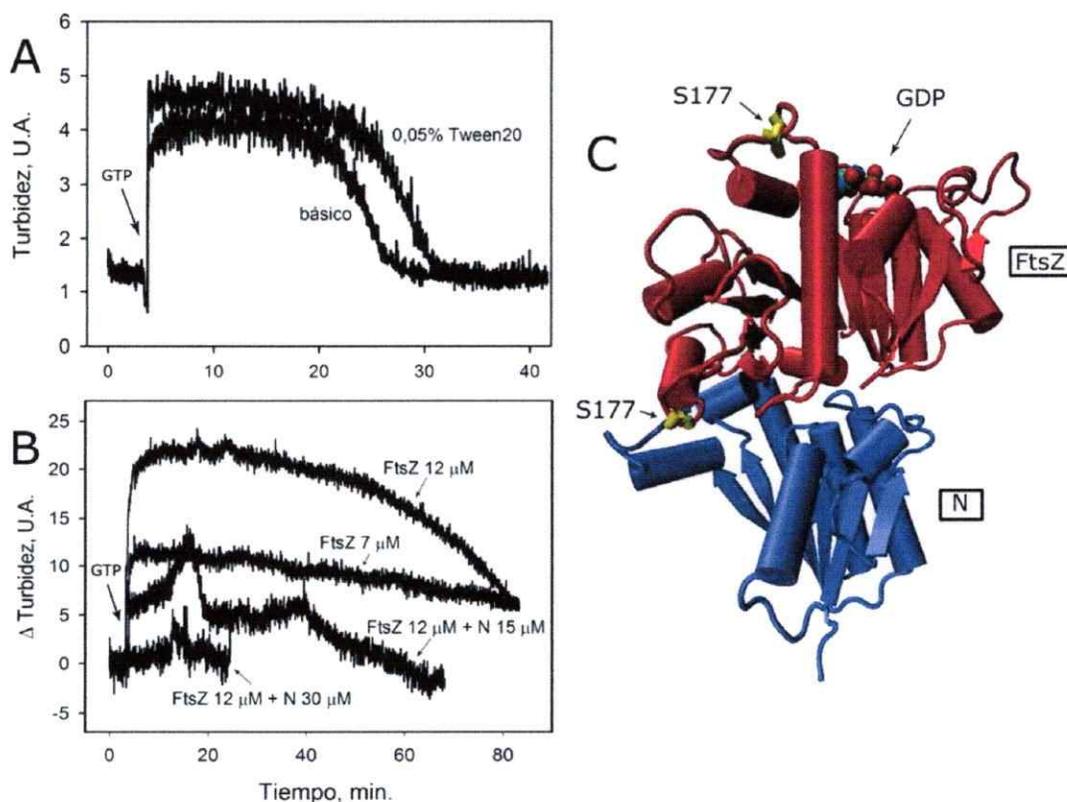


Figura 20. Modelo del mecanismo de inhibición de la polimerización de FtsZ por el dominio amino terminal *in vitro*. A, cinética de polimerización de FtsZ silvestre (25 μ M) inducida por GTP 1 mM en amortiguador de polimerización (básico) en presencia y ausencia del detergente no iónico no desnaturalante Tween20 a 30 °C. B, polimerización de FtsZ silvestre en presencia y ausencia del dominio amino en amortiguador de polimerización más 0,05% Tween20 (ver gráfico para más detalles). Se observó una inhibición de la polimerización de FtsZ silvestre cuando se preincubó con proporciones estequiométricas del dominio amino terminal. C, Modelo tridimensional de un "heterodímero" de FtsZ-amino que bloquea la elongación del protofilamento. En rojo se muestra una molécula de FtsZ y en azul el dominio amino terminal de EcFtsZ, ambos emulando la interacción longitudinal. En amarillo se muestra S177, el residuo frontera de los dominios y, el nucleótido GDP unido en el bolsillo de unión del dominio amino terminal de EcFtsZ.

REFERÊNCIAS

1. Addinall S.G., Lutkenhaus J. 1996. FtsZ-spirals and -arcs determine the shape of the invaginating septa in some mutants of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* 22(2):231-237.
2. Anand S.P., Rajeswari H., Gupta P., Srinivasan R., Indi S., Ajitkumar P. 2004. A C-terminal deletion mutant of *Mycobacterium tuberculosis* FtsZ shows fast polymerization in vitro. *Microbiology* 150:1119-1121.
3. Andreu, J., M., Oliva M., A., Monasterio, O. 2002. Reversible unfolding of FtsZ cell division proteins from Archaea and Bacteria: comparison with eukaryotic tubulin folding and assembly. *Journal of Biological Chemistry* 277: 43262-43270.
4. Beuria T., Krishnakumar S., Sahar S., Singh N., Gupta K., Meshram M., Panda D. 2003. Glutamate-induced assembly of bacterial cell division protein FtsZ. *Journal of Biological Chemistry*. 278(6):3735-3741.
5. Borhani D.W., White E.L. 2004. Polymerization of C-terminally truncated *Mycobacterium tuberculosis* FtsZ is unlikely to be physiologically relevant. *Microbiology* 150:3904-3906.
6. Chang A., Cohen S. 1978. Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. *Journal of Bacteriology* 134(3):1141-1156.
7. Dai K., Lutkenhaus J. 1991. *ftsZ* is an essential cell division gene in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 173(11):3500-3506.
8. de Pereda J.M., Leynadier D., Evangelio J.A., Chaçon P., Andreu J.M. 1996. Tubulin secondary structure analysis, limited proteolysis sites, and homology to FtsZ. *Biochemistry* 35:14203-14215.

9. Díaz-Espinoza R., Garcés A., Arbildúa J., Montecinos F., Brunet J., Lagos R., Monasterio O. 2007. Domain folding and flexibility of *Escherichia coli* FtsZ determined by tryptophan site-directed mutagenesis. *Protein Science* 16:1543-1556.
10. Eastwood M.P., Hardin C., Luthey-Shulten Z., Wolynes P.G. 2000. Evaluating protein structure-prediction schemes using energy landscape theory. *IBM Journal of Research and Development* 45(3/4):475-497.
11. Erickson P. 1998. Atomic structure of tubulin and ftsZ. *Trends in cell biology* 8:133-137.
12. Errington J., Daniel R.A., Scheffers D.J. 2003. Cytokinesis in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67(1):52-65.
13. Garcés A. 2007. Predicción y caracterización de las superficies de interacción intramolecular e intermolecular de la proteína FtsZ de *Escherichia coli*. Tesis de Título. Facultad de Ciencias Universidad de Chile.
14. Graumann P. 2007. Cytoskeletal elements in bacteria. *Annual Reviews in Microbiology*. 61:589-618.
15. Huecas S., Andreu J.M. 2004. Polymerization of nucleotide-free. GPD-and GTP-bound cell division protein FtsZ: GDP makes the difference. *FEBS Letters* 569:43-48.
16. Li Z., Trimble M., Brun Y.V., Jensen G.J. 2007. The structure of FtsZ filaments in vivo suggests a force-generating role in cell division. *EMBO Journal* 26:4694-4708.
17. Lodish, Berk, Matsudaira, Kaiser, Krieger, Scott, Zipursky, Darnell. 2003. *Molecular cell biology* 5th edition.
18. Löwe J., Amos L.A. 1998. Cristal structure of the bacterial cell-division protein FtsZ. *Nature* 391:203-206.
19. Lu C., Stricker J., Erickson H. 2001. Site-specific mutations of FtsZ-effects on GTPase and in-vitro assembly. *BMC Microbiology* 1:7.

20. Lutkenhaus J.F., Wolf-Watz H., Donachie W.D. 1980. Organization of genes in the *ftsA-envA* region of the *Escherichia coli* genetic map and identification of a new *fts* locus (*ftsZ*). *Journal of Bacteriology* 142(2):615-620.
21. Ma X., Margolin W. 1999. Genetic and functional analyses of the conserved C-terminal core domain of *Escherichia coli* FtsZ. *Journal of Bacteriology* 181(24):7531-7544.
22. Marrington R., Small E., Rodger A., Dafforn T., Addinall S. 2004. FtsZ fiber bundling is triggered by conformational change in bound GTP. *Journal of Biological Chemistry* 279(47):48821-48829.
23. Roccatano D., Colombo G., Fioroni M., Mark A. 2002. Mechanism by which 2,2,2-trifluoroethanol/water mixtures stabilize secondary-structure formation in peptides: A molecular dynamics study. *Proceedings of the National Academy of the United States of America* 99(19):12179-12184.
24. Michie K., Löwe J. 2006. Dynamics filaments of the bacterial cytoskeleton. *Annual Reviews in Biochemistry* 75:467-492.
25. Mukherjee A., Lutkenhaus J. 1999. Analysis of FtsZ assembly by light scattering and determination of the role of divalent metal cations. *Journal of Bacteriology* 181(3):823-832.
26. Nogales E., Downing K.H. Amos L., Löwe J. 1998. Tubulin and FtsZ form a distinct family of GTPases. *Nature Structural Biology* 5(6):451-458.
27. Nova. E. 2006. Aspectos del mecanismo y la regulación de la actividad GTPásica intrínseca de EcFtsZ y $\alpha\beta$ -tubulina. Tesis de doctorado. Facultad de Ciencias Universidad de Chile.

28. Nova E., Montecinos F., Brunet J.E., Lagos R., Monasterio O. 2007. 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) induces bundling of Escherichia coli FtsZ polymers inhibiting the GTPase activity. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 465:315-319.
29. Oliva M., Cordell S., Löwe J. 2004. Structural insights into FtsZ protofilament formation. *Nature Structural and Molecular Biology* 11(12):1243-1250.
30. Oliva M.A., Trambaiolo D., Löwe J. 2007. Structural insights into the conformational variability of FtsZ. *Journal of Molecular Biology* 373:1229-1242.
31. Osawa M., Erickson H. 2005. Probing domain structure of FtsZ by random truncation and insertion of GFP. *Microbiology* 151:4033-4043.
32. Pla J., Sanchez.M., Vicente M., Aldea M. 1991. Preferential cytoplasmic location of FtsZ, a protein essential for Escherichia coli septation. *Molecular Microbiology* 5(7):1681-1686.
33. Rivas G., López A., Mingorance J., Ferrandiz M.J., Zorrilla S., Minton A.P., Vicente M., Amdreu J.M. 2000. Magnesium-induced linear self-association of the FtsZ bacterial cell division protein monomer. *Journal of Biological Chemistry* 275(16):11740-11749.
34. Rose R. 1988. The nucleotide sequence of pACYC184. *Nucleic Acids Research* 16 (1).
35. Russell R., Barton G. 1992. Multiple protein sequence alignment from tertiary structure comparison: assignment of global and residue confidence levels. *Proteins: structure, function, and genetics* 14:309-323.
36. Sagné C., Isambert M., Henry J., Gasnier B. 1996. SDS-resistant aggregation of membrane proteins: application to the purification of the vesicular monoamine transporter. *Journal of Biochemistry* 316:825-831.

37. Scheffers D.J., de Wit J.G., den Blaauwen T., Driessen A.J.M. 2002. GTP hydrolysis of cell division protein FtsZ: evidence that the active site is formed by the association of monomers. *Biochemistry* 41:521-529.
38. Sepúlveda L. 2007. Estudio de dinámica molecular con solvente implícito de la influencia de la interfase de interacción entre los dominios de la proteína FtsZ en la estabilidad y plegamiento. Tesis de título. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile.
39. Shin, JY. 2003. Caracterización de la viabilidad, la actividad y la polimerización de las mutantes de EcFtsZ E83Q, R85Q y G67P. Tesis de Magister. Facultad de Ciencias Universidad de Chile.
40. Shindyalov I.N., Bourne P.E. 1998. Protein structure alignment by incremental combinatorial extension (CE) of the optimal path. *Protein Engineering* 11(9):739-747.
41. Sreerama N., Woody R. 2000. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Analytical Biochemistry* 287:252-260.
42. Sun Q., Margolin W. 1998. FtsZ dynamics during the division cycle of live *Escherichia coli* cells. *Journal of Bacteriology* 180(8):2050-2056.
43. Tabor S., Richardson C. 1985. A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proceedings of the National Academy of the United States of America* 82:1074-1078.
44. Vaughan S., Wickstead B., Gull K., Addinall S. 2004. Molecular evolution of FtsZ protein sequences encoded within the genomes of Archaea, Bacteria, and Eukaryota. *Journal of Molecular Evolution* 58:19-39.

45. Vicente M., Rico A., Martínez-Arteaga R., Mingorance J. 2006. Septum enlightenment: assembly of bacterial division proteins. *Journal of Bacteriology*. 188(1):19-27.
- 46 Wilks J.C., Slonczewski J.L. 2007. pH of the Cytoplasm and Periplasm of *Escherichia coli*: Rapid Measurement by GFP Fluorimetry. *Journal of Bacteriology*. 189(15):5601-5607.