

UCH-FC
DOC-B.MCN⁴
N 856
c-1

**Aspectos del mecanismo y la regulación de la
actividad GTPásica intrínseca de EcFtsZ y $\alpha\beta$ -tubulina.**

Tesis
entregada a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al grado de
Doctor en Ciencias con mención en Biología Molecular, Celular y Neurociencias
Facultad de Ciencias

Esteban Andrés Nova Martínez



Abril 2006

Director Tesis
Dr. Octavio Monasterio O.

Co-directora de Tesis
Dra. Rosalba Lagos M.

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION

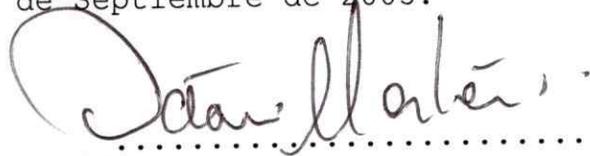
TESIS DE DOCTORADO

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

ESTEBAN ANDRÉS NOVA MARTÍNEZ

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología Molecular, Celular y Neurociencias, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 14 de Septiembre de 2005.

Director de Tesis:
Dr. Octavio Monasterio



.....

Co-directora de Tesis
Dr. Rosalba Lagos



.....

Comisión de Evaluación de la Tesis
Dr. Osvaldo Álvarez (Presidente)



.....

Dr. Emilio Cardemil



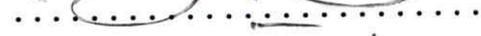
.....

Dr. Víctor Cifuentes



.....

Dr. Carlos Jerez



.....

**A NICOLÁS, MIS PADRES Y ARIADNA
SIN ELLOS NADA HUBIESE SIDO POSIBLE**

Agradecimientos

A mis tutores Dr. Octavio Monasterio y Dra. Rosalba Lagos, quienes han sido excelentes guías y maestros. Gracias por su paciencia.

A José Jaime, es una suerte tener un gran amigo siempre presente en el laboratorio.

A todos los miembros del Laboratorio de Biología Estructural y Molecular especialmente a Jae Yen, César, Mario, Rodrigo, Andrea quienes siempre hicieron del laboratorio un lugar agradable en donde trabajar.

A Gino, Maribel, Rodrigo Díaz, Erwin y especialmente a Marcelo quienes ya partieron, pero siempre me tendieron una mano.

Al Dr. Juan Brunet de la Universidad Católica de Valparaíso quien me ayudó en los experimentos de fluorescencia de DAPI, muchas gracias.

A mis padres Edmundo e Inés quienes siempre me dieron todo su apoyo, sin el cual nada habría sido posible.

A Ariadna por su amor y apoyo.

A Nicolás quien siempre está conmigo.

Índice de Materias

Dedicatoria.....	ii
Agradecimientos.....	iii
Índice de Materias	iv
Lista de Figuras.....	vii
Lista de Tablas.....	ix
Lista de Abreviaturas.....	x
Resumen	xi
Abstract	xiv
Introducción	1
Similitud estructural entre el heterodímero $\alpha\beta$ -tubulina y FtsZ.....	2
Dinámica de la polimerización del heterodímero $\alpha\beta$ -tubulina y FtsZ.....	8
Mecanismo de hidrólisis del GTP.....	11
Regulación de la actividad GTPásica.....	12
Objetivos	16
1. Demostrar que existe una actividad GTPásica intrínseca en los miembros de la familia de las tubulinas.....	16
2. Caracterización estructural de EcFtsZ y sus mutantes EcFtsZ Q47N y EcFtsZ D212G.....	16
3. Caracterización funcional de EcFtsZ y sus mutantes EcFtsZ Q47N y EcFtsZ D212G.....	17
Materiales y Métodos	19
Materiales	19
Cepas Bacterianas.....	19
Plásmidos.....	19
Cepas y plásmidos utilizados en esta tesis.....	21
Partidores mutagénicos.....	22
Medios de cultivo.....	22
Medio Luria-Bertani (LB).....	22
Medio SOB.....	23
Medio SOC.....	23
Medio NZY ⁺	23
Medio sólido LB-agar.....	23
Reactivos.....	24
Métodos	25
Aislamiento y purificación de DNA plasmidial bacteriano (miniprep).....	25
Preparación DNA plasmidial en escala pequeña.....	26
Preparación de células electrocompetentes.....	26
Transformación por electroporación.....	26
Construcción del plásmido pMV57.....	27
Lisogenización con λ DE3.....	27
Construcción de las mutantes de ftsZ de <i>E. coli</i>	28
Secuenciación de los genes mutantes ftsZ Q47N y ftsZ D212G.....	29
Sistema de expresión de proteína recombinante.....	29
Funcionalidad <i>in vivo</i> de los genes de ftsZ mutantes.....	30

Electroforesis en geles de agarosa (geles para DNA plasmidial)	31
Purificación de EcFtsZ por precipitación con sulfato de amonio.....	32
Purificación de MjFtsZ por columnas de Ni ²⁺	33
Purificación del heterodímero $\alpha\beta$ -tubulina de cerebro de pollo.....	35
Cuantificación de EcFtsZ y MjFtsZ.....	37
Cuantificación de $\alpha\beta$ -tubulina.....	38
Determinación de la actividad GTPásica de FtsZ.....	38
Medición de la actividad GTPásica de $\alpha\beta$ -tubulina.....	39
Inmovilización de $\alpha\beta$ -tubulina y EcFtsZ a la resina affi-gel.	39
Polimerización de EcFtsZ y sus mutantes determinados por dispersión de luz.....	41
Medidas de Dicroísmo Circular.....	41
Electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida.	42
Electrotransferencia.....	42
Desarrollo inmunológico de la membrana de nitrocelulosa.....	43
Preparación de muestras de EcFtsZ y sus mutantes para microscopía electrónica.....	44
Preparación de las soluciones con diferentes pH, utilizando amortiguador Tris-maleato.....	45
Digestiones de la $\alpha\beta$ -tubulina con subtilisina.....	45
Medición de la anisotropía de DAPI.....	46
Determinación del sitio de interacción DAPI-EcFtsZ por anclamiento molecular (molecular docking).....	46
Determinación de la distancia entre el DAPI y el triptófano en las mutantes EcFtsZ F135W y EcFtsZ I294W.....	48
Determinación del rendimiento cuántico.....	50
Determinación de la constante de solapamiento.....	50
Resultados	51
Actividad GTPásica de la $\alpha\beta$ -tubulina y la $\alpha\beta$ -tubulina S.....	51
Actividad GTPásica de EcFtsZ y MjFtsZ.....	54
Determinación de la actividad GTPásica intrínseca de $\alpha\beta$ - tubulina y EcFtsZ.....	54
Efecto del pH sobre la velocidad inicial de la actividad GTPásica de $\alpha\beta$ -tubulina y $\alpha\beta$ - tubulina S.....	57
Efecto del tiempo de la digestión de los extremos C-terminales de $\alpha\beta$ -tubulina sobre la actividad GTPásica.	61
Determinación del mecanismo e inducción de la hidrólisis del GTP en EcFtsZ.....	65
Modelo de la estructura tridimensional de EcFtsZ.....	69
Importancia de los aminoácidos conservados en la familia de FtsZ en la hidrólisis de GTP..	69
Purificación de EcFtsZ silvestre y de las mutantes EcFtsZ Q47N y EcFtsZ D212G.	72
Determinación del contenido de estructura secundaria de EcFtsZ, EcFtsZ Q47N y EcFtsZ D212G.....	73
Caracterización de la estructura terciaria de EcFtsZ tipo silvestre y de mutantes EcFtsZ Q47N y EcFtsZ D212G.....	77
Caracterización de la polimerización de EcFtsZ tipo silvestre y de las mutantes EcFtsZ Q47N y EcFtsZ D212G <i>in vitro</i>	79
Determinación de la concentración crítica de EcFtsZ tipo silvestre y de las mutantes EcFtsZ Q47N y EcFtsZ D212G.....	82
Caracterización de la hidrólisis de GTP de EcFtsZ silvestre y de las mutantes EcFtsZ Q47N y EcFtsZ D212G.....	82
Viabilidad de células que portan los alelos EcFtsZ Q47N y EcFtsZ D212G.....	90

Caracterización de la unión de DAPI a EcFtsZ.....	93
Determinación de la constante de disociación del complejo DAPI-EcFtsZ.....	93
Efecto del DAPI sobre la cinética de polimerización y despolimerización de EcFtsZ.....	94
Inhibición de actividad GTPásica de EcFtsZ por DAPI.....	95
Localización del sitio de unión de DAPI en EcFtsZ por "Docking Molecular".....	100
Cálculos de las distancias entre el triptófano de las mutantes EcFtsZ I294W y F135W y el sitio de unión de DAPI.....	100
Determinación de R_0 y eficiencia de la transferencia.....	107
Discusión	112
Actividad GTPásica de $\alpha\beta$ -tubulina, $\alpha\beta$ - tubulina Ca^{2+} , $\alpha\beta$ -tubulina S y EcFtsZ	113
Análisis de las mutantes EcFtsZ Q47N y EcFtsZ D212G.....	116
Determinación del mecanismo e inducción de la hidrólisis de GTP en EcFtsZ.....	118
Unión de DAPI a EcFtsZ.....	125
Conclusiones	128
Referencias	129

Lista de Figuras

Figura 1	Estructura de la β -tubulina (1tub.pdb) y la MjFtsZ (1fsz.pdb).....	6
Figura 2	Alineamiento estructural de las secuencias de la familia de las tubulinas y de FtsZ con estructura tridimensional resuelta.....	7
Figura 3	Curvas de saturación de sustrato para la actividad GTPásica de $\alpha\beta$ -tubulina en ausencia y presencia de Ca^{2+} y para $\alpha\beta$ -tubulina-S.....	53
Figura 4	Efecto de la concentración de GTP sobre la actividad GTPásica de EcFtsZ y MjFtsZ.....	56
Figura 5	Curva de progreso de la actividad GTPásica de $\alpha\beta$ -tubulina y de EcFtsZ inmovilizada a una resina affi-gel.....	58
Figura 6	Efecto del pH sobre la velocidad inicial de la actividad GTPásica de $\alpha\beta$ -tubulina.....	59
Figura 7	Efecto del pH sobre la velocidad inicial de la actividad GTPásica de $\alpha\beta$ -tubulina S.....	60
Figura 8	Efecto del tiempo de la digestión de $\alpha\beta$ -tubulina con subtilisina sobre la actividad GTPásica.....	64
Figura 9	Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de MjFtsZ y EcFtsZ.....	67
Figura 10	Modelos de la estructura tridimensional de EcFtsZ y su evaluación.....	68
Figura 11	Conservación de la glutamina 47 en la familia de FtsZ y su participación en la catálisis.....	71
Figura 12	Conservación del aspártico 212 en la familia de FtsZ y su participación en la catálisis.....	71
Figura 13	Gel SDS-PAGE y "Westernblot" de la EcFtsZ tipo silvestre y de las mutantes.....	75
Figura 14	Contenido de estructura secundaria de EcFtsZ, EcFtsZ Q47N y EcFtsZ D212G.....	76
Figura 15	Efecto de la concentración de EcFtsZ tipo silvestre y mutantes sobre la polimerización inducida por GTP.....	81
Figura 16	Determinación de la concentración crítica de EcFtsZ, EcFtsZ Q47N y EcFtsZ D212G.....	85
Figura 17	Efecto de la concentración de GTP sobre la velocidad de hidrólisis de EcFtsZ, EcFtsZ Q47N y EcFtsZ D212G.....	88
Figura 18	Curva de progreso de la hidrólisis del GTP y de la polimerización de EcFtsZ, EcFtsZ Q47N y EcFtsZ D212G.....	89
Figura 19	Funcionalidad <i>in vivo</i> de EcFtsZ, EcFtsZ Q47N y EcFtsZ D212G.....	92
Figura 20	Espectros de emisión de fluorescencia del DAPI en ausencia y presencia de EcFtsZ.....	96
Figura 21	Determinación de la constante de disociación del DAPI y EcFtsZ.....	97
Figura 22	Efecto del DAPI sobre la polimerización de EcFtsZ.....	98
Figura 23	Inhibición de la hidrólisis del GTP de EcFtsZ por DAPI.....	99
Figura 24	Esquema de cinta del modelo de la estructura tridimensional de EcFtsZ...	103
Figura 25	Modelo de la estructura tridimensional de las mutantes Ec FtsZ F135W y EcFtsZ I294W.....	104
Figura 26	Determinación de las constantes de disociación de los complejos de DAPI con EcFtsZ F135W y EcFtsZ I294W.....	105
Figura 27	Determinación de la constante de recubrimiento $J(\lambda)$ del DAPI	

	con los triptófanos de las mutantes EcFtsZ 135W y EcFtsZ 294W.....	106
Figura 28	Espectros de emisión de fluorescencia del triptófano de las mutantes Ec FtsZ F135W y Ec FtsZ I294W en presencia de DAPI.....	108
Figura 29	Modelo del sitio de unión de DAPI en EcFtsZ.....	111
Figura 30	Esquema simple de la polimerización inducida por GTP de EcFtsZ, EcFtsZ Q47N y EcFtsZ D212G.....	124
Figura 31	Modelo de la estructura tridimensional de EcFtsZ con los 4 probables sitios de unión a DAPI y estructuras flexibles asociadas a la hidrólisis de GTP.....	127

Lista de Tablas

Tabla 1	Valores de K_m y k_{cat} para la $\alpha\beta$ -tubulina, la $\alpha\beta$ -tubulina-S, la EcFtsZ y la MjFtsZ.....	57
Tabla 2	Constantes de unión aparente del DAPI a EcFtsZ silvestre y a las mutantes EcFtsZ Q47N y EcFtsZ D212G.....	78
Tabla 3	Valores de Concentración crítica (Cr), K_M y k_{cat} para EcFtsZ, EcFtsZ Q47N y EcFtsZ D212G.....	83
Tabla 4	Valores experimentales de los parámetros de transferencia de energía de fluorescencia en resonancia (FRET) para determinar la distancia entre el DAPI y los triptófanos de EcFtsZ F135W y EcFtsZ I294W	107
Tabla 5	Distancia de los 4 probables sitios para DAPI y los triptófanos en las mutantes EcFtsZ F135W y EcFtsZ I294W determinados por Autodock 3.05 y distancias experimentales determinadas por FRET entre el triptófano y el sitio de unión de DAPI en estas mutantes.....	110

Lista de Abreviaturas

DNA	Acido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético
GDP	Guanosina 5' difosfato
GTP	Guanosina 5' trifosfato
IPTG	Isopropiltiogalactósido
TRIS	Tris-(hidroximetil)-aminoetano
rpm	Revoluciones por minuto
Å	Angstrom
x g	Número de veces de la aceleración de gravedad
K_m	Constante de Michaelis-Menten
K^o_d	Constante de disociación estándar
k_{cat}	Constante catalítica
$K_{0,5}$	Concentración de ligando que produce la mitad del efecto observado
K_i	Constante de inhibición
rms	"root mean square"
GdmCl	Cloruro de Guanidinio
FRET	Transferencia de energía de fluorescencia en resonancia.

Resumen

La $\alpha\beta$ -tubulina es el principal componente de los microtúbulos, que se encuentra en todas las células eucarióticas y participa en procesos tan importantes como la mitosis, la división celular, la forma y el transporte intracelular. La FtsZ es el componente principal del anillo Z, proteína que participa en la división celular bacteriana. Esta proteína conforma un nuevo tipo de GTPasa y se desconoce el mecanismo molecular de la hidrólisis del fosfato del nucleótido.

Los parámetros cinéticos para la hidrólisis de GTP fueron determinados para $\alpha\beta$ -tubulina, $\alpha\beta$ -tubulina Ca^{2+} y $\alpha\beta$ -tubulina S ($\alpha\beta$ -tubulina sin parte de sus extremos C-terminales), los valores para K_m fueron 8 μM , 16 μM y 21 μM , respectivamente. Los valores de k_{cat} para $\alpha\beta$ -tubulina, $\alpha\beta$ -tubulina Ca^{2+} , $\alpha\beta$ -tubulina S fueron 0,06 min^{-1} , 0,12 min^{-1} y 0,4 min^{-1} , respectivamente. La $\alpha\beta$ -tubulina y la EcFtsZ inmovilizadas muestran una actividad GTPásica, de 0,4 nmoles de GTP ml^{-1} mg^{-1} proteína min^{-1} y 16 nmoles de GTP ml^{-1} mg^{-1} proteína min^{-1} , respectivamente. Por lo que se concluye que existe una actividad GTPásica intrínseca, libre de interacciones proteína-proteína, por lo tanto en el sitio de unión están los requerimientos mínimos para la hidrólisis del GTP y la interacción de estas proteínas en sus respectivos polímeros estimularía la actividad intrínseca de estas proteínas.

Con el fin observar que residuos estarían involucrados en la hidrólisis del GTP, se construyó la estructura de un dímero de FtsZ de *E. coli* (EcFtsZ), por homología estructural con FtsZ de *M. Jannaschii*, con el programa Modeller 6.0. El modelo mostró que en el sitio activo del nucleótido está presente la glutamina 47 (Q47), que

se encuentra a 5 Å del fosfato gamma de GTP. Este residuo es conservado en las proteínas que unen GTP como Ras y Cdc, donde participa en el mecanismo de hidrólisis del nucleótido. También se encontró que el ácido aspártico 212 (D212) de un monómero interactúa con el fosfato gamma del GTP del otro monómero. Este residuo está conservado en todas las FtsZ estudiadas.

Con el objeto de determinar la participación de estos residuos en el mecanismo molecular de hidrólisis de GTP, se construyeron las mutantes de EcFtsZ Q47N y D212G, se purificaron y caracterizaron *in vitro*. La EcFtsZ Q47N mostró una K_m de 97 μM para GTP valor 3 veces mayor que el de EcFtsZ tipo silvestre. Las curvas de progreso de la actividad GTPásica y la cinética de polimerización mostraron un período de latencia que fue inversamente proporcional a la concentración de proteína. El valor de la K_m para GTP de la mutante D212G fue 430 μM , la polimerización y la hidrólisis de GTP fueron mucho menores que los de la proteína silvestre. Estos resultados permiten concluir que el residuo D212 es importante para la polimerización de FtsZ-GTP y que la mutación Q47N desfavorece la hidrólisis del GTP, y le confiere estabilidad a los polímeros formados.

Se determinó en este trabajo que la EcFtsZ une la sonda fluorescente DAPI, se utilizó como sonda fluorescente extrínseca para estudios estructurales, si se produce una variación en la estructura terciaria por efecto de la mutación puntual, el sitio de unión de la sonda se modificaría, presentando una afinidad distinta a la que presenta la EcFtsZ tipo silvestre.

Los resultados mostraron, por primera vez, que DAPI se une a EcFtsZ silvestre y a las mutantes EcFtsZ Q47N y EcFtsZ D212G. Los valores de las constantes de unión

($K_{0,5}$) fueron determinadas por anisotropía de fluorescencia, las tres proteínas presentaron una $K_{0,5}$ del orden de 10^{-6} .

Los filamentos de EcFtsZ formados en presencia del DAPI fueron más estables en el tiempo. El DAPI afectó la hidrólisis, la actividad GTPásica, en presencia de DAPI, fue menor a la observada en ausencia de la sonda, análisis cinéticos a diferentes concentraciones de la sonda mostraron que el DAPI es un inhibidor de tipo incompetitivo, con una K_i de $4,5 \times 10^{-5}$ M.

Se encontraron cuatro posibles sitios de unión de DAPI en la EcFtsZ, usando métodos de "docking" proteína ligando. Uno de ellos resultó ser estructuralmente equivalente al observado en $\alpha\beta$ -tubulina, se midieron las distancias del triptófano de dos mutantes y el DAPI, se modelaron las estructuras tridimensionales de las mutantes y resultaron ser similares a la tipo silvestre. Para la determinación de las distancias se utilizó el método de FRET, como par dador-aceptor, se utilizó el triptófano-DAPI. Se utilizaron las mutantes puntuales de EcFtsZ F135W y I294W, pues EcFtsZ no posee triptófanos en su estructura primaria. Se encontró que en el sitio de unión del DAPI participarían los residuos E118, K121, K155, V157, D158, S159, M217, S218, E219, M220, G221. Este sitio corresponde a un surco apolar, en el cual se ubican los anillos fenil e indol del DAPI, en la parte media de este surco están las lisinas 121 y lis 155, en un extremo del surco se encuentran los residuos ácidos E118, D157 y en el otro extremo está el residuo ácido E219, los cuales podrían estar formando interacciones iónicas con las cargas positivas del DAPI.

Abstract

$\alpha\beta$ -tubulin is the principal component of microtubules in all eukaryotic cells, they participate in important cellular processes like mitosis, cellular division, form and intracellular transport. FtsZ is the principal component of the Z-ring, structure essential for bacterial division. These proteins conform a new family of GTPases and their GTP molecular hydrolysis mechanism is unknown.

For the hydrolysis of GTP the kinetic parameters were measured for $\alpha\beta$ -tubulin, $\alpha\beta$ -tubulin Ca^{2+} and $\alpha\beta$ -tubulin S, whose values for K_m were 8 μM , 16 μM and 21 μM respectively. The values of k_{cat} for $\alpha\beta$ -tubulin, $\alpha\beta$ -tubulina Ca^{2+} and $\alpha\beta$ -tubulin S were 0.06 min^{-1} , 0.12 min^{-1} , 0.4 min^{-1} , respectively.

The $\alpha\beta$ -tubulin and EcFtsZ immobilized showed GTPasic intrinsic activity of 0.4 nmoles of GTP ml^{-1} mg^{-1} protein min^{-1} and 16 nmoles de GTP ml^{-1} mg^{-1} protein min^{-1} respectively. These results allow to conclude that the protein-protein interaction in their respective polymers stimulates the intrinsic GTPase activity of these protein.

In order to observe what residues would be involved in the GTP hydrolysis, a 3D model of EcFtsZ dimer was built, by homology with the crystal structure of FtsZ of *M. jannaschii*, using Modeller 6.0 program. In the nucleotide binding site was possible to observe the amino acid residue glutamine 47 (Q47), was located at 5 Å of the GTP gamma phosphate. This residue is conserved in GTP binding protein like Ras and Cdc, and participate in the nucleotide mechanism hydrolysis. The same model showed that aspartate 212 (D212) residue, of a monomer interacts with the GTP

gamma phosphate of the other monomer, through the longitudinal interaction. This residue is conserved in all FtsZ family.

In order to determine the participation of these residues in the GTP molecular mechanism hydrolysis, the mutants EcFtsZ Q47N and EcFtsZ D212G were built, they were purified and characterized *in vitro*. K_m for GTP of EcFtsZ Q47N was 97 μM , value three times higher than that for EcFtsZ wild type. The progress curve and polymerization kinetic showed a lag period during the polymerization, that was inversely proportional respect to the EcFtsZ Q47N concentration. K_m for GTP of EcFtsZ D212G was 430 μM , the polymerization and the hydrolysis of GTP were lower than EcFtsZ wild type. These results allow to conclude that the residue D212 is important for the polymerization of EcFtsZ-GTP and that the mutation Q47N diminished the hydrolysis of GTP keeping the polymers of this mutant more stable.

The results of this work showed that EcFtsZ has one binding site for the fluorescent probe DAPI in both a monomeric and polymerized. The standard dissociation constant of DAPI for EcFtsZ monomeric was 1.6×10^{-5} .

These characteristics of the fluorescent probe allowed to use it for structural characterization of EcFtsZ Q47N and EcFtsZ D212G, showing that these site in both mutants was the same that of the wild type, due to they showed a similar affinity constant respect to the wild type. These results showed that tertiary structure of mutants around this site did not change with the substitution of amino acids respect to wild type.

However, the polymers of EcFtsZ formed in presence of DAPI were more stable. The GTP hydrolysis in presence of DAPI was lower than that observed in the absence of

the probe. Kinetic analysis of GTPase activity at different concentrations of the probe showed that DAPI is an uncompetitive inhibitor, whose K_i was $4,5 \times 10^{-5}$ M.

The binding site of DAPI in EcFtsZ was characterized through protein-ligand molecular docking. The results showed four possible binding site, where one of these sites was structurally similar to the DAPI binding site in $\alpha\beta$ -tubulin. In order to determinate the distance among tryptophan of the mutants and DAPI, assuming that the 3D structure of the mutants were similar to the wild type, the localization was determinate using FRET (fluorescent resonance energy transfer), The tryptophan-DAPI was used as pair donor-acceptor. Two mutants EcFtsZ F135W and I294W were used because EcFtsZ wild type does not have tryptophan in its primary structure. The results all together showed that in the binding site of DAPI would participate the residues E118, K121, K155, V157, D158, S159, M217, S218, E219, M220, G221. This site matched with an apolar groove, where the indole and phenyl rings of DAPI could be located. In the half of the apolar groove the basics residues K121 y K155 were found, and in one of the ends of the groove the acids residues E118, D157, and in the other end the acid residue E219. These negatively charged residues could be forming an ionic interaction with the positive charge of DAPI.

Introducción

Las α , β , γ , δ tubulinas, las FtsZ y la BtubA y la BtubB forman una nueva familia de GTPasas y todas estas proteínas presentan homología por alineamiento de sus secuencias (Erickson, 1995; Sontag y col., 2005). El heterodímero $\alpha\beta$ -tubulina se encuentra en todas las células eucarióticas, forma parte del citoesqueleto y participa en procesos tan importantes como la mitosis, la división celular, la forma celular y el transporte intracelular (Joshi y col., 1992).

La FtsZ proteína que participa en la división celular, es un homólogo de tubulina presente en todas las archaeas y los procariontes hasta ahora secuenciados, excepto en *Chlamydiae*, *Planctomycetes*, y *Crenacardeota* y en las especies *Ureaplasma urealiticum* (Erickson, 2000; Glockner y col., 2003; Margolin, 2000; She y col., 2001; Vaughan y col., 2004).

Otros homólogos que se encuentran en procariontes, específicamente en *Prostheco bacter dejongeei* (Jenkins y col., 2002) son la BtubA y la BtubB. El análisis de sus secuencias, utilizando el programa Blast, mostró una identidad de secuencia entre 31 a 35 % y 34 a 37 % con α -tubulina y β -tubulina, respectivamente. En cambio, la identidad de secuencia que presentó BtubA y B con FtsZ fue entre 8 a 11 %. La BtubA y la BtubB forman manojos de filamentos, en presencia de GTP y cumplen la función de mantener la forma alargada de la bacteria, mediante la formación de un tallo que se proyecta desde uno de sus extremos (Sontag y col., 2005).

La estructura del heterodímero formado por $\alpha\beta$ -tubulina se determinó con una resolución de 3,7 Å, mediante la difracción de electrones (Nogales y col., 1998b). Otras tres estructuras de FtsZ han sido resueltas. La primera fue la FtsZ de *Methanococcus jannaschii* (MjFtsZ, 1fsz.pdb) a una resolución de 2,6 Å, determinada por difracción de rayos-X (Lowe, 1998; Lowe y Amos, 1998). La otra estructura de FtsZ que ha sido resuelta fue la de *Pseudomonas aeruginosa* (PaFtsZ, 1ofu.pdb), a una resolución de 2,1 Å (Cordell y col., 2003). La última estructura resuelta fue la FtsZ de *Microbacterium tuberculosis* (MtFtsZ, 1rq7.pdb) (Leung y col., 2004), también obtenida por difracción de rayos X, con una resolución de 2,6 Å. Todas las estructuras presentaron el mismo tipo de plegamiento.

Similitud estructural entre el heterodímero $\alpha\beta$ -tubulina y FtsZ

Existe una alta similitud estructural entre las proteínas que pertenecen a la familia de las tubulinas. Las estructuras tridimensionales de β -tubulina y MjFtsZ se muestran en la figura 1. Una nomenclatura común para los elementos de estructura secundaria fue creada por Nogales (Nogales y col., 1998a). Los elementos estructurales comunes entre tubulina y FtsZ corresponden a los dominios amino. El dominio intermedio de tubulina es equivalente al dominio carboxilo terminal de FtsZ. El dominio amino, corresponde al dominio de unión al GTP. Este está conformado por una sábana beta, compuesta por 6 hebras paralelas, que son las S1 a S6, las que se encuentran rodeadas por 6 hélices

alfa, H1 a H6. La hélice alfa H7 conecta el segundo dominio. El dominio carboxilo en FtsZ o dominio intermedio de tubulina, está conformado por las hélices alfa H8 a H10 y la sábana beta paralela, conformada por las hebras beta S7 a S10.

El dominio C-terminal de FtsZ presenta un parecido menor con el dominio intermedio de las tubulinas. El dominio carboxilo terminal de la FtsZ es más pequeño. La tubulina tiene dos extensas alfa hélices que corresponden a H11 y H12, las cuales están por el exterior de este dominio y que se conocen como el dominio C-terminal (Nogales y col., 1998b). La FtsZ presenta un pequeño "beta-hairpin", conformado por S11 y S12.

Si comparamos los elementos estructurales comunes entre β -tubulina y MjFtsZ, de la superposición de estas estructuras, resulta que existen 277 carbonos alfa superponibles, la superposición presentó un r.m.s de 4,3 Å. Al superponer los 178 carbonos alfa de los elementos de estructura secundaria comunes, el r.m.s de la superposición estructural bajó a 2,4 Å. Esta gran diferencia se debe principalmente a las distintas conformaciones de los lazos (Nogales y col., 1998a), todas estas semejanzas permiten afirmar que estas proteínas son homólogas.

Un alineamiento de las secuencias primarias, de algunos miembros de la familia de la tubulina, con estructura tridimensional conocida, se muestra en la figura 2. En el alineamiento se observan algunas diferencias entre estas proteínas. En primer, lugar existe en la MjFtsZ una hélice alfa denominada H0 que es

exclusiva de esta estructura, y que se encuentra en el amino terminal de esta estructura. En la tubulina existe un gran lazo, insertado entre H1 y S2. Las α y β tubulinas presentan una gran inserción en el extremo C-terminal, correspondientes a hélices alfa denominadas H11 y H12 las que no se encuentran en las FtsZ. Las FtsZ presentan un "hairpin" en el C-terminal, el cual no está presente en la α - β tubulina.

La identidad aminoacídica es muy baja, menor al 7 %. Si se analizan los residuos del sitio de unión a nucleótido, el que se encuentra en el dominio amino terminal. La identidad de secuencia en este dominio es de aproximadamente un 10 %. Se

analizó la identidad de secuencia de los lazos que están involucrados en la unión a GTP, el lazo T1 el cual se muestra en la figura 2, entre S1 y H1, tiene dos glicinas conservadas. El lazo T2, el que se encuentra entre S2 y H2 presentó un residuo ácido conservado. El lazo T3 el cual se encuentra entre S3 y H3 presentó una asparragina conservada excepto en 1rq7 (PaFtsZ), la cual fue reemplazada por un residuo aspartato, y también presentó una glicina conservada en todas las secuencias. El lazo T4, que se observa entre S4 y H4, presenta la mayor identidad de secuencia, la que corresponde al motivo característico de la familia de las tubulinas, y corresponde a la secuencia GGTG, seguido de un residuo polar, el que corresponde a una serina en las dos subunidades de tubulina y treonina en las otras tres FtsZ. El lazo T5, el que se encuentra entre S5 y H5, y que participa específicamente en el reconocimiento

del azúcar, no presentó ninguna identidad de secuencia. El lazo T6, que se encuentra entre S6 y H6 presenta un residuo de asparragina conservado en las cuatro estructuras. El lazo T7, que conecta la H7 con H8, está involucrado en las interacciones longitudinales entre las subunidades. Este lazo presentó una asparragina y un ácido aspártico conservados. La conservación de esta región en las FtsZ sugiere fuertemente que el mismo tipo de interacciones ocurren en los filamentos de FtsZ (Nogales y col., 1998a; Romberg y Levin, 2003).

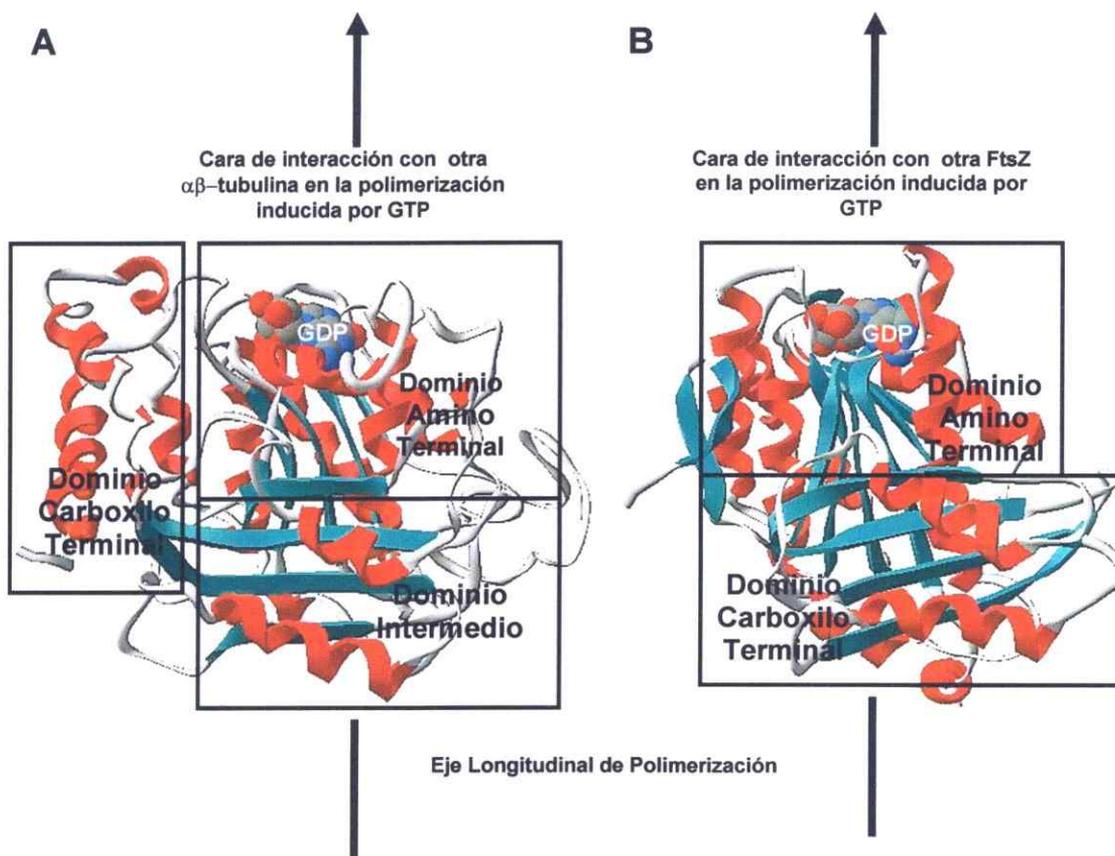


Figura 1. Estructura de β -tubulina (1tub.pdb) y MjFtsZ (1fsz.pdb). Las estructuras están representadas en esquema de cintas. La molécula de GDP está representada en formato CPK. En A β -tubulina y en B MjFtsZ.

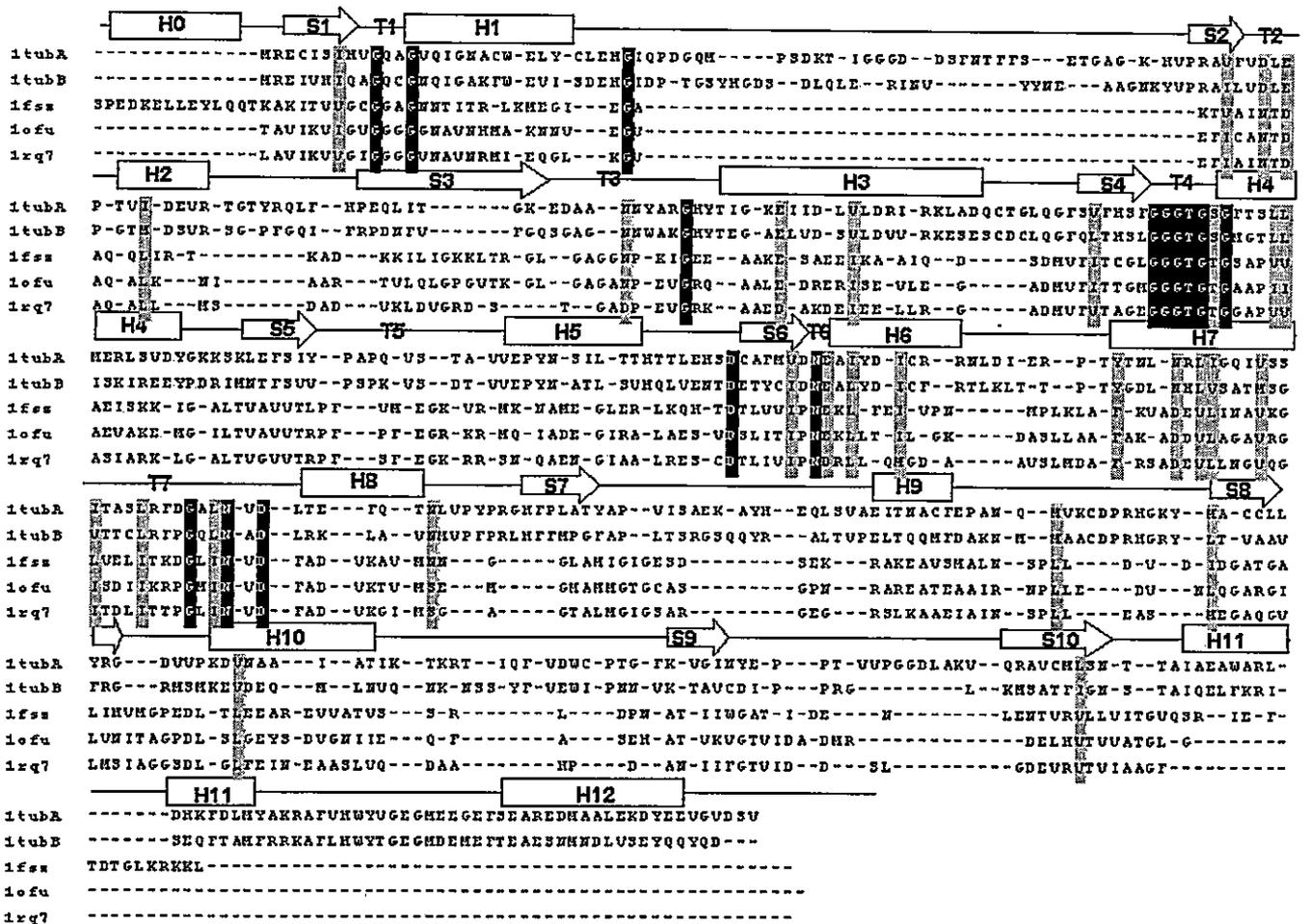


Figura 2. Alineamiento estructural de las secuencias de la familia de las tubulinas y de FtsZ con estructura tridimensional resuelta. El alineamiento estructural se realizó con el programa Modeller. Sobre la secuencia de las proteínas se indica la estructura secundaria. Los rectángulos corresponden a las hélices alfa, las flechas a las hebras beta y la línea que los conecta corresponden a los lazos. En los alineamientos de secuencia las columnas negras indican bloque de secuencia conservados en todas las moléculas. Las columnas en gris corresponden a residuos similares, presentes en todas las moléculas. Las estructuras son: 1tubA corresponde a α -tubulina; 1tubB corresponde a β -tubulina; 1fsz corresponde a MjFtsZ; 1ofu, corresponde a *Ps aureginosa* (PaFtsZ) y 1rq7 corresponde a ftsZ de *Mb tuberculosis*. H1 y H7 participan en el reconocimiento de la base de GTP, T4 participa en el reconocimiento de los fosfatos del GTP, T5 participa en el reconocimiento del azúcar del GTP. H7 es el conector entre los dominios amino y carboxilo terminal.

Dinámica de la polimerización del heterodímero $\alpha\beta$ -tubulina y FtsZ

El heterodímero $\alpha\beta$ -tubulina posee dos sitios de unión a GTP, uno denominado sitio N, que no es capaz de intercambiar el nucleótido, se encuentra en la α -tubulina. El otro sitio para GTP es el denominado sitio E, que es capaz de intercambiar el nucleótido, se encuentra en la β -tubulina (Bhattacharyya y col., 1985; Bramhill y Thompson, 1994; Jayaram y Haley, 1994; Linse y Mandelkow, 1988; MacNeal y Purich, 1977; Shivanna y col., 1993). En la dinámica de la polimerización de los microtúbulos es necesario que la hidrólisis del GTP se produzca, en el sitio E, después de la adición de un heterodímero al extremo de un protofilamento, y que el GDP permanezca en el sitio E de la β -tubulina hasta que el microtúbulo se desensamble y este sitio se exponga al solvente (Erickson y O'Brien, 1992). Se ha postulado que la estructura del microtúbulo se mantiene por la presencia de una tapa de tubulina-GTP en cada extremo. Cuando estas tapas se pierden por la hidrólisis del nucleótido, los microtúbulos se hacen inestables y se despolimerizan (Carlier y col., 1997; Erickson y O'Brien, 1992; Nogales y col., 1998a). Por otro lado, cuando un microtúbulo se quiebra en algún punto, se exponen extremos que poseen β -tubulina-GDP, lo cual los hace inestables y comienzan a despolimerizarse, hasta que se incorporen $\alpha\beta$ -tubulina-GTP en el sitio E, y se reconstituyen las tapas. Estas propiedades constituyen la base de la "inestabilidad dinámica de los microtúbulos". Un solo heterodímero de tubulina-GTP por protofilamento (13 protofilamentos en promedio forman un microtúbulo) es suficiente para

estabilizar el extremo del microtúbulo (Caplow y Shanks, 1996). Es por esto, que la regulación de la actividad GTPásica del heterodímero en solución es tan importante, pues una alta actividad impediría la formación del microtúbulo. Por el contrario, si no hay actividad GTPásica el microtúbulo sería muy estable y los procesos dinámicos que ocurren en la célula no serían posibles.

La forma de la $\alpha\beta$ -tubulina-GTP, mirada desde su eje mayor, es lineal. En cambio, la $\alpha\beta$ -tubulina-GDP tiene una forma curva, siendo el estado basal de la proteína (Shearwin y Timasheff, 1992; Timasheff y col., 1991). El heterodímero polimeriza, en presencia de GTP, para formar los microtúbulos, que son estructuras lineales que son mantenidas por las interacciones laterales entre los protofilamentos y la tapa de $\alpha\beta$ -tubulina-GTP en sus extremos. Cuando las tapas se pierden, ya sea por hidrólisis del GTP o la ruptura de los microtúbulos. Se produce la exposición de zonas con $\alpha\beta$ -tubulina-GDP y aparecen en los extremos protofilamentos curvados (Erickson y O'Brien, 1992), los que despolimerizan el microtúbulo, y dan origen a los anillos de $\alpha\beta$ -tubulina-GDP. Esto indica que cuando los contactos laterales entre las subunidades se pierden, los protofilamentos se separan y se curvan para finalmente despolimerizarse (Mandelkow y col., 1991).

Se ha postulado que la actividad GTPásica se produce sólo cuando existe interacción de dos o más heterodímeros en forma longitudinal al formar oligómeros lineales. Esto implica que el heterodímero en solución no tiene actividad GTPásica (Nogales y col., 1999). En este trabajo de tesis se inmovilizó

$\alpha\beta$ -tubulina, por una unión covalente a un soporte, para impedir la interacción entre los heterodímeros de $\alpha\beta$ -tubulina. El heterodímero inmovilizado presentó actividad GTPásica medible, lo que está en conflicto con el postulado de Nogales (Nogales y col., 1999).

La FtsZ forma polímeros en presencia de Mg^{2+} y GTP, presentan actividad GTPásica (Lu y col., 2000; Mukherjee y Lutkenhaus, 1999; Rivas y col., 2000). Esto ha llevado a concluir que la actividad GTPásica de FtsZ ocurre exclusivamente cuando la proteína forma parte del polímero. Pero la FtsZ no polimerizada presenta una actividad GTPásica al igual que la $\alpha\beta$ -tubulina. El heterodímero $\alpha\beta$ -tubulina y FtsZ son proteínas homólogas que comparten muchas propiedades funcionales. Así los residuos que rodean a los fosfatos del GTP en el sitio E de la $\alpha\beta$ -tubulina y en la FtsZ son similares. También EcFtsZ inmovilizada mostró actividad GTPásica y un aumento de su actividad basal. Por lo tanto el aumento de la actividad GTPásica inducido por la polimerización podría ser explicado por un efecto alostérico similar a lo que sucede en las proteínas que unen GTP (GTP Binding Protein GTPBP), donde la asociación con su respectivo activador, proteína activadora de GTP (GTP activator Protein GAP) aumenta la hidrólisis del GTP entre 2 y 3 ordenes de magnitud (Bourne y col., 1991)

Mecanismo de hidrólisis del GTP

Las estructuras tridimensionales de $\alpha\beta$ -tubulina y MjFtsZ fueron determinadas como complejos GDP, y en ambas se observa que el lazo T4, posee una secuencia de consenso para las tubulinas y para FtsZ que corresponde a $(G/A)GGTG(S/T)G$, y que es el sello propio de esta familia. Los resultados de la comparación estructural muestran que la superposición del motivo Rossman, motivo de unión a GTP (Kull y Fletterick, 1998), entre el heterodímero $\alpha\beta$ -tubulina y la FtsZ presenta un rms de 1,61 Å. En base a estas comparaciones estructurales se puede afirmar que $\alpha\beta$ -tubulina y FtsZ son proteínas homólogas.

El heterodímero $\alpha\beta$ -tubulina y FtsZ son una familia muy divergente de p21^{ras} y de otras proteínas del tipo GTP "Binding Protein" (GTPBP), ya que las GTPBP poseen un sitio de concenso diferente (GX_4GK) en el sitio de unión al nucleótido y presentan un motivo de unión a GTP denominado Walker.

Si se compara la composición de los residuos aminoacídicos del sitio de unión a GTP de Cdc42, que es una GTPBP (Abdul-Manan y col., 1999; Garrard y col., 2003; Morreale y col., 2000), la $\alpha\beta$ -tubulina y la FtsZ, todas estas proteínas tienen una glutamina en una posición equivalente respecto a la posición de GDP en su sitio de unión al nucleótido. Esta glutamina es capaz de fijar una molécula de agua a través de un puente hidrógeno, lo que es esencial para el ataque nucleofílico del agua sobre el γ -fosfato de GTP en la Cdc42 (Chung y col., 1993; Nassar y col., 1998). En la estructura de $\alpha\beta$ -tubulina se observa

también una glutamina (Q11) que está conservada en las tubulinas (Lowe y Amos, 1998). Una glutamina equivalente está presente en las estructuras de FtsZ (Q47 en la EcFTsZ). Por esto postulamos que éste residuo sería esencial en la hidrólisis del GTP en $\alpha\beta$ -tubulina y FtsZ.

Para establecer que éste sería un mecanismo común en la familia de las tubulinas se propuso estudiar el papel de la Q47 en la hidrólisis del GTP por EcFtsZ, la cual está en una posición equivalente a la glutamina 11 en la β -tubulina. Se propuso caracterizar estas mutantes *in vitro*. Se propuso también caracterizar la viabilidad de las bacterias que sólo expresen la EcFtsZ con esta mutación.

Regulación de la actividad GTPásica

La región carboxilo-terminal de la $\alpha\beta$ -tubulina participa en la unión de MAPs y tau, proteínas que tienen gran importancia en la regulación de la polimerización y estabilización de los microtúbulos (Littauer y col., 1986). La unión de Ca^{2+} a esta región inhibe la polimerización de $\alpha\beta$ -tubulina y despolimeriza los microtúbulos previamente formados al inducir la actividad GTPásica (Kirschner y Mitchison, 1986; Solomon, 1977; Soto y col., 1996; Weisenberg y Timasheff, 1970).

La $\alpha\beta$ -tubulina S corresponde al heterodímero sin parte de sus C-terminales. Los extremos C-terminales digeridos tiene un peso entre 2 a 4 Kda (Bhattacharyya y col., 1985). La actividad GTPásica de la $\alpha\beta$ -tubulina S es significativamente mayor que la de $\alpha\beta$ -tubulina inducida por el Ca^{2+} , lo que

sugiere que la región C-terminal de $\alpha\beta$ -tubulina modularía la hidrólisis de GTP localizado en el sitio E de β -tubulina. Los extremos C-terminales interactúan con la $\alpha\beta$ -tubulina S (Ortiz y col., 1993). Además los C-terminales unen Ca^{2+} , el cual es un activador de la hidrólisis de GTP (Soto y col., 1996). Otro papel importante de los C-terminales es que a través de estas estructuras la $\alpha\beta$ -tubulina interactúa con MAP (Mejillano y Himes, 1991). Estas proteínas estabilizan los microtúbulos. La región C-terminal de $\alpha\beta$ -tubulina tiene un papel importante en la estabilización de microtúbulos y la hidrólisis del GTP.

Se ha postulado que la actividad GTPasa aparece sólo cuando hay una interacción de dos o más heterodímeros en forma longitudinal para formar oligómeros lineales (Carrier y col., 1997). Este postulado supone que un residuo catalítico, el ácido glutámico 254, de la α -tubulina interactúa en *trans* con el sitio E de la β -tubulina del heterodímero vecino en el protofilamento, para constituir el sitio activo responsable de la actividad GTPasa (Nogales y col., 1999). En la β -tubulina el residuo equivalente es una lisina, por lo que el GTP, en el sitio N de α -tubulina del heterodímero, no se hidroliza. De acuerdo a este modelo, la actividad GTPasa debiera aparecer sólo cuando hay polimerización.

Este postulado se sustenta en que la polimerización de los microtúbulos, la polimerización de los anillos inducida por Ca^{2+} y la polimerización de $\alpha\beta$ -tubulina S inducen la actividad GTPásica. Sin embargo, se ha demostrado indirectamente la existencia de una actividad GTPásica intrínseca de

$\alpha\beta$ -tubulina independiente del proceso de polimerización (Davis y col., 1994; Soto y col., 1996).

Si consideramos el conjunto de los resultados, podemos postular que el sitio de unión a GTP en $\alpha\beta$ -tubulina y FtsZ posee los residuos necesarios para la hidrólisis del nucleótido, y éstos se encuentran distribuidos de manera tal que la eficiencia catalítica es baja. Cuando se produce la polimerización, ocurriría un cambio conformacional que aumentaría (en forma alostérica) la eficiencia catalítica.

La FtsZ como ya se ha explicado, es una proteína monomérica. Se ha postulado que el residuo de ácido aspártico 212 en EcFtsZ y 238 en MjFtsZ serían homólogos al ácido glutámico 254 de la α -tubulina. La mutante D212G ha sido caracterizada, pero existen ciertas contradicciones con respecto a su capacidad de hidrolizar el GTP. Algunos autores dicen que no hidroliza el GTP (Dai y col., 1994), en contradicción a otros que afirman que esta mutante es capaz de hidrolizar el nucleótido (Mukherjee y col., 2001). Por esta razón es que en este trabajo se caracterizarán la EcFtsZ D212G en cuanto a su capacidad de polimerizar e hidrolizar el GTP *in vitro*, y se determinará también su funcionalidad *in vivo*.

Todos los hechos hasta aquí detallados nos han llevado a postular la siguiente hipótesis:

En la $\alpha\beta$ -tubulina y EcFtsZ existe una actividad GTPásica intrínseca. Esta actividad es estimulada alostéricamente cuando se produce la interacción proteína-proteína, en el proceso de la polimerización inducida por GTP.

Objetivos

1. Demostrar que existe una actividad GTPásica intrínseca en los miembros de la familia de las tubulinas

Existe aún controversia si el heterodímero $\alpha\beta$ -tubulina y, su homólogo en procariontes, la FtsZ tiene actividad GTPásica en solución, libre de interacción proteína-proteína. Para resolver esa duda, se propuso lo siguiente: determinar la actividad GTPásica del sitio E del heterodímero $\alpha\beta$ -tubulina y de FtsZ en forma aislada de manera de impedir la interacción entre proteínas. Para esto se inmovilizará la proteína en una matriz sólida y se caracterizará la dependencia de la actividad de FtsZ, $\alpha\beta$ -tubulina, $\alpha\beta$ -tubulina Ca^{2+} y $\alpha\beta$ -tubulina S. Para caracterizar esta actividad se determinarán sus parámetros cinéticos, K_m , V_{max} y k_{cat} y la dependencia del pH.

2. Caracterización estructural de EcFtsZ y sus mutantes EcFtsZ Q47N y EcFtsZ D212G

La EcFtsZ, la mutantes EcFtsZ Q47N y EcFtsZ D212G se purificarán a homogeneidad, se analizará por geles de poliacrilamida su pureza, se verificará que las proteínas purificadas correspondan a EcFtsZ a través de estudios de "Western blot", utilizando un anticuerpo policlonal contra EcFtsZ. Se caracterizarán los contenidos de estructura secundaria de la EcFtsZ y las mutantes, mediante estudios de dicroísmo circular. Finalmente se caracterizará la estructura tridimensional a través de estudios de unión de la sonda DAPI a

EcFtsZ y sus mutantes y se verá que efectos tiene esta sonda en la funcionalidad de la EcFtsZ, se aprovechará que en el laboratorio existen dos mutantes con un triptófano (W) en sus estructuras primarias para realizar estudios de transferencia de energía de fluorescencia en resonancia (FRET)

3. Caracterización funcional de EcFtsZ y sus mutantes EcFtsZ Q47N y EcFtsZ D212G

El sitio de unión del GTP en el sitio E de $\alpha\beta$ -tubulina y FtsZ posee la propiedad de hidrolizar el nucleótido, a una muy baja velocidad. Los sitios son prácticamente idénticos al comparar MjFtsZ y $\alpha\beta$ -tubulina. Por tanto la FtsZ de *E. coli* es un modelo ideal para entender el mecanismo de la hidrólisis del GTP tanto *in vivo* como *in vitro* en bacterias y extrapolar los resultados a la familia de las tubulinas. Con este propósito se construirá la mutante EcFtsZ Q47N y se le determinará la actividad GTPásica, su capacidad de polimerizar y su funcionalidad *in vivo*.

Como se indicó en la introducción, la mutante EcFtsZ D212G ya ha sido caracterizada. Se encontró que esta mutante es letal para la bacteria y que *in vitro* presenta muy baja actividad GTPásica, aunque tiene la capacidad de unir GTP. El residuo D212 en los modelos de protofilamentos de FtsZ se encuentra a 5 Å del fosfato beta del GDP, de la FtsZ adyacente, por eso se pensó que este residuo era catalítico. FtsZ D212G *in vitro* presentó una baja actividad GTPásica. Esto nos llevó a sugerir que más bien este residuo es el responsable

de la inducción de la actividad. Para probar esto se determinará la actividad GTPásica de la mutante EcFtsZ D212G, donde el residuo de ácido aspártico mutado es equivalente al residuo D254 de α -tubulina. Se caracterizarán los polímeros formados por estas mutantes y su funcionalidad *in vivo*.

Materiales y métodos

Materiales

Cepas Bacterianas

La cepa de *E. coli* BL21 (DE3) (F^- ompT hsdSB (r_B^- m B^-) ga dcm (DE3) que posee en su genoma una copia del gen de la RNA polimerasa T7 inducible por IPTG, se transformó con los plasmidios pMVF56 y pMVF57, ambos conteniendo el gen silvestre de la FtsZ de *E. coli* (EcFtsZ).

La cepa de *E. coli* VIP2 tiene interrumpido el gen de la FtsZ por un gen de resistencia a la kanamicina y es además lacX74, y str^r. Esta cepa fue proporcionada por Dr. Miguel Vicente (Pla y col., 1991) y se transformó a *E. coli* VIP2 (DE3) con el DE3 Lysogenization Kit Novagen® (Madison, WI, USA). Esta cepa fue la utilizada para las pruebas de complementación *in vivo* de las mutantes de FtsZ.

La cepa de *E. coli* XL1-Blue (reaA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI^qZΔM15 Tn 10 (tet^r)], se utilizó para la transformación con los plasmidios mutados. Esta cepa se adquirió como parte del kit de mutagénesis sitio-específica QuickChange de Stratatagen® (La Jolla, CA, USA).

Plásmidos

El plásmido pMVF 56, que es un plasmidio derivado de pET 28a de Novagen (Madison, WI, USA), se utilizó para la sobreexpresión de EcFtsZ. Este plasmidio tiene un tamaño aproximado de 8.000 pares de bases y contiene un

gen cuyo producto confiere resistencia a la kanamicina. Este plásmido fue proporcionado por el Dr. Miguel Vicente (Pla y col., 1991).

El plásmido pMVF57 se creó a partir del pMVF56, cambiando la resistencia de kanamicina a ampicilina, para poder realizar las pruebas de complementación *in vivo*, que se hicieron en *E. coli* VIP2 (DE3), que posee la resistencia a la kanamicina.

El plásmido pMJ0370, es un derivado de pHis17 y fue creado por Löwe (Lowe y Amos, 1998). Tiene resistencia a ampicilina, fue proporcionado por el Dr. Miguel Vicente. Este plásmido contiene el gen de FtsZ de *Methanococcus jannaschii* (MjFtsZ) al cual se le adicionó en el extremo carboxilo terminal una serina, glicina y 6 histidinas, y fue clonado entre los sitios de corte de las endonucleasas NdeI y BamHI. Las histidinas se adicionaron para facilitar la purificación de la MjFtsZ. El gen quedó bajo el control del promotor T7, y para su transcripción fue necesario proveer a la bacteria hospedera de una fuente de la RNA polimerasa del fago T7. En la Tabla 1 se pueden observar las cepas y plásmidos utilizados en esta tesis.

Cepas y plásmidos utilizados en esta tesis

Cepa o Plásmido	Fenotipo o genotipo relevante	Fuente
<i>E. coli</i> XL1-Blue	RecA ⁻ , endA1, gyrA96, thi1, hsdR-17, supE44, relA1, lacq ZΔM15, Tn10	Stratagene
<i>E. coli</i> BL 21	F- ompT, r _B ⁻ m _B ⁻	Novagen
<i>E. coli</i> VIP2(DE3)	FtsZ::kan, lacX74, str ^r	(Pla y col., 1991)
pMFV 56	Plásmido derivado de pET28a que porta el gen de la FtsZ, kan ^r	(Pla y col., 1991)
pMFV 57	Plásmido derivado de pMFV 56, el gen que confiere resistencia a kanamicina fue interrumpido por el gen de β-lactamasa.	Contraído en este trabajo
pMJ0370	Plásmido derivado de pHis17, tiene resistencia a Ampicilina.	(Lowe y Amos, 1998)

Partidores mutagénicos

Los partidores utilizados para introducir mutaciones en el gen de *ftsZ* de *E. coli* fueron los siguientes:

Glutamina 47 por Asparragina:

5'-TAAATACCGATGCAAACGCGCTGCGTAAAAC

3'-ATTTATGGCTACGTTTGCGCGACGCATTTTG

Ácido aspártico 212 por Glicina:

5'-ACGTGGACTTTGCAGGCGTACGCACCGTAAT

3'-TGCACCTGAAACGTCCGCATGCGTGGCATTA

El triplete de bases subrayado corresponde al codón del aminoácido reemplazado, y en negrita aparece la base sustituida.

Los partidores fueron sintetizados por Invitrogen (Carlsbad, CA, USA.) a través de Bios Chile (Chile)

Medios de cultivos

Medio Luria-Bertani (LB)

Los materiales que se utilizaron en la preparación de este medio fueron 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 10 g de cloruro de sodio y se ajustó el pH a 7,5 con hidróxido de sodio 1 N. El medio LB se esterilizó mediante autoclave, se mantuvo a 37 °C, hasta su uso y se le agregó, dependiendo de la cepa que se creció en el medio, ampicilina (amp) 100 µg/mL, kanamicina (km) 50 µg/mL, cloramfenicol (cm) 25 µg/mL.

Medio SOB

Los materiales que se utilizaron en la preparación de 1 L de este medio fueron triptona 20 g, extracto de levadura 5 g, cloruro de sodio 5 g, 10 mL de cloruro de potasio 250 mM y se ajustó el pH a 7 con una solución de NaOH 5 N. El medio SOB se esterilizó mediante autoclave y se mantuvo a 37 °C, hasta el momento de su uso.

Medio SOC

Este medio se preparó a partir del SOB, el que se suplementó con glucosa estéril 10% (p/v), hasta lograr una concentración final de 20 mM.

Medio NZY⁺

Los materiales que se utilizaron en la preparación de 1 L de este medio fueron NZ amina 10 g. (hidrolizado de caseína), extracto de levadura 5 g, cloruro de sodio 5 g., se ajustó el pH a 7,5 con una solución de NaOH 1 N. Se esterilizó mediante autoclave y el medio se suplementó con 12,5 ml MgCl₂ 1 M y 10 ml de glucosa 20 % (p/v) esterilizada.

Medio sólido LB-agar

Los materiales que se utilizaron en la preparación de este medio fueron medio LB suplementado con agar hasta un concentración final de 1 % (p/v). La concentración final fue la misma que se utilizó en los medios líquidos. El

antibiótico fue agregado al medio, cuando este estaba a 50 °C y se adicionaron 20 ml de este medio aún líquido a cada placa Petri.

Reactivos

Los reactivos utilizados en este trabajo fueron: BSA, Subtilisina, Subtilisina-agarosa, persulfato de amonio, azida, imidazol, fosfato di-ácido de potasio, azul brillante de Coomassie R, GTP sal sódica, anticuerpo Ig-G de conejo conjugado con fosfatasa alcalina , x-gal y Rnasa de Sigma (St. Louis, Missouri, EE.UU.). Azul de bromofenol, cloroformo, alcohol isoamílico, isopropanol, etanol, bicarbonato de sodio de Merck (Darmstadt, Alemania). Cloruro de sodio, agar, cloruro de magnesio hexahidratado, dimetilformamida, cloruro de guanidinio, Tris, Glicina, Glicerol, EDTA, fenol, fosfato ácido de sodio, TEMED, IPTG, acrilamida de Winkler (Santiago, Chile). Cloruro de potasio, sulfato de magnesio, cloruro de calcio de Fluka CEIME AG (Messerschmitstr, Suiza). Ácido acético, etanol, metanol, etanol, acetona de TCL (Santiago, Chile). Triptona, extracto de levadura de Difco Laboratories (Detroit, Michigan, EE.UU). Bisacrilamida, DNA polimerasa Taq, los didesoxinucleótidos y los estándares de peso molecular de DNA de 1 Kb de Gibco, BRL (Grand Island, New York, EE.UU). DNA ligasa de Fermentas Incorporated Hanover, MD, EE.UU.). Hidróxido de sodio de J.T. Baker (Estado de México, México). BCIP, NBT de Applichem (Damstadt, Alemania). El agua utilizada en todos los experimentos fue ultrapurificada, tenía una resistencia de 18 megaohms.

Métodos

Aislamiento y purificación del DNA plasmidial bacteriano (miniprep)

El DNA plasmidial se extrajo según el método de lisis alcalina descrito por (Sambrook, 1989). Este método consiste en centrifugar 4,5 ml de un cultivo bacteriano crecido toda la noche en medio LB. El precipitado bacteriano se suspendió en 200 μ l de amortiguador de lisis (glucosa 50 mM, TrisHCl 25 mM pH 8,0, EDTA 10 mM). Después de dejarlo por 5 min a temperatura ambiente se agregó 400 μ l de solución SDS/NaOH (SDS 1%, NaOH 0,2 M) y se mezcló invirtiendo los tubos 10 veces. A continuación se colocó 80 μ l de acetato de sodio (3 M pH 5,2) y se mezcló suavemente por inversión 10 veces. Esta solución se dejó a -20 °C por 15 min, para luego centrifugar a 14.000rpm. El sobrenadante se pasó a un tubo nuevo previamente rotulado, y se agregó 250 μ l de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1) para eliminar las proteínas contaminantes. Cada tubo se agitó con vortex por 10 s y se centrifugó por 5 min en una microcentrífuga. Luego se extrajo la fase acuosa y se puso en un tubo. Los restos de proteínas y el fenol se quitaron añadiendo 250 μ l de cloroformo:isoamílico (24:1). Posteriormente se extrajo la fase superior que contiene el DNA a la cual se agregó 0,6 volúmenes de isopropanol y se dejó a -20 °C por 15 min para precipitar el DNA. El DNA precipitado por centrifugación se lavó con etanol 70% y posteriormente se dejó secar el precipitado en una estufa a 37 °C o en Speed Vac a 35 °C. El precipitado de DNA se disolvió en 30-40 μ l de agua nanopure usando vortex.

Preparación del DNA plasmidial en escala pequeña

El DNA plasmidial de los clones recombinantes se purificó mediante el uso del kit E.Z.N.A.® Plasmid Miniprep Kit de Omega Bio-Tek (Doraville, GA, USA).

Preparación de células electrocompetentes

Estas células se prepararon a partir de un cultivo de crecimiento exponencial activo, obtenido inoculando en medio SOB fresco 1 ml de un cultivo crecido por toda la noche. Las células se cosecharon a una DO_{550} de 0,75 ($3-6 \times 10^8$ cel/ml) en tubos de centrifuga fríos y se lavaron dos veces con glicerol al 10% frío. Al término de los lavados, se ajustó el volumen de la suspensión celular con glicerol al 10% para llegar a una DO_{550} final de 200-250.

Transformación por electroporación

Para realizar la transformación de las células competentes se utilizó un equipo Bio-Rad Gene Pulser acoplado a un controlador de pulso. El aparato se preparó colocando el voltaje a 2500 V, la resistencia a 200 Ohms y la capacitancia a 25 μ Fd. Se mezclaron 20 μ l de células con 1-2 μ l de DNA plasmidial puro, en un tubo Eppendorf y se trasladó la mezcla a la cubeta de electroporación de 0,2 cm de separación de los electrodos. Se agregó 1 ml de medio SOC estéril a la cubeta con las células electroporadas y luego se las incubó a 37°C por 1 h. Las células transformadas se crecieron en una placa con un medio selectivo.

Construcción del plásmido pMVF57

El gen de la β -lactamasa que confiere resistencia a ampicilina, se obtuvo por medio de una reacción de polimerización en cadena y se clonó dentro del plásmido pMVF56 digerido con SmaI. El sitio SmaI se encuentra dentro del gen que confiere resistencia a la kanamicina.

La reacción de ligación se llevó a cabo mediante la ligasa de DNA T4 . Como se trataban fragmentos con extremos romos, se utilizó 5 unidades de ligasa y se incubó a 4 °C durante 24 h. Para corroborar si efectivamente se clonó el gen de la β -lactamasa (931pb) en el plásmido pMVF56 (resistente a kanamicina) se seleccionó la transformante en un medio LB ampicilina 100 μ g/ml. Se realizaron extracciones de DNA plasmidial de colonias que crecieron en este medio de selección y su pureza se analizó mediante electroforesis en geles de agarosa.

Lisogenización con λ DE3

Fueron lisogenizadas dos cepas, VIP2 con la RNA polimerasa de T7 utilizando un kit de novagen: DE3 Lysogenization Kit®. Este kit consiste en la integración específica del profago λ DE3 en el cromosoma de *E. coli*, de manera que el huésped lisogenizado puede ser usado para expresar el gen blanco clonado en un vector de expresión bajo control del promotor de T7. La lisogenización abarca 3 pasos infectivos con λ DE3, el fago Helper y un fago "Selección". Para ello se crecieron las cepas a lisogenizar en medio LB

suplementado con 0,2% maltosa, 10 mM MgSO₄ a 37 °C hasta un OD₆₀₀ de 0,5. Se le agregaron 10⁸ unidades formadoras de placa (ufp) de λDE3, 10⁸ ufp de fago "helper" y 10⁸ ufp de fago "Selección" con 5 µl de célula huésped y se incubó a temperatura ambiente por 10 min. Se sembraron en placas de agar y se incubaron a 37 °C toda la noche. Para verificar si las colonias sobrevivientes habrían integrado el gen de la RNA polimerasa de T7 en el cromosoma, se crecieron las colonias en placas con medio LB suplementado con 0,2 % maltosa, 10 mM MgSO₄ y se incubó a 37° C hasta llegar a un OD₆₀₀ de 0,5. Se mezcló la cepa huésped con el fago "tester" y se incubó a temperatura ambiente durante 10 min. Luego se adicionó agarosa "top" fundida y se traspasó a una placa LB y se incubó a 37° C. La mayoría de las colonias sobrevivientes fueron lisógenicas λDE3 pues observamos placas de lisis en las colonias tratadas con el fago "tester".

Construcción de las mutantes de *ftsZ* de *E. coli*

Se realizaron 2 mutaciones sitio dirigidas para la EcFtsZ, las cuales se llevaron a cabo utilizando el Quik Change XL Site-Directed Mutagenesis Kit®, Stratagene (La Jolla, CA, USA), número de catálogo 200516.

Este protocolo consistió en amplificar con *PfuTurbo* DNA polimerasa® el vector completo utilizando partidores con la mutación deseada, pues el par de partidores utilizados son complementarios a las hebras opuestas del templado. De esta manera el producto de PCR generado es un plásmido

mutado que contiene un corte "nick". Luego se procede a digerir con *DpnI*, esta endonucleasa es específica para DNA metilados y hemimetilados, por lo tanto degradó sólo el templado parental. El plasmidio con el corte que ha incorporado la mutación deseada, se utilizó para transformar células competentes XL1-Blue. Para verificar si los plásmidos contenían las mutaciones deseadas, estas se secuenciaron.

Secuenciación de los genes mutantes *ftsZ* Q47N y *ftsZ* D212G

Una vez comprobadas las mutaciones mediante las pruebas de expresión, se realizaron las secuenciaciones de estos genes para los clones de *EcFtsZ* mutantes denominados E12 y E22. Se eligieron estos clones para ser secuenciados, porque presentaron una mejor sobreexpresión en BL21. Se secuenciaron ambas hebras parcialmente de manera de abarcar todo el gen. En ambos mutantes la secuencia fue idéntica, salvo la mutación puntual deseada. La secuenciación de las bases nitrogenadas del DNA de las mutantes se encargó al laboratorio del Centro de Biotecnología del Dr. Víctor Cifuentes de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile.

Sistema de expresión de proteína recombinante

Para la expresión de las proteínas recombinantes se utilizó el vector de expresión pT7, que confiere resistencia a ampicilina y presenta el promotor del gen $\phi 10$ del fago T7 que es muy fuerte y sólo es reconocido por la RNA

polimerasa del fago. pT7 presenta una región de "polilinker" en el extremo aminoterminal, y previo a esta región tiene un sitio de unión fuerte al ribosoma. La expresión se realizó en la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) (Novagene) que es lisogénica para un derivado del fago lambda que contiene el gen de la RNA polimerasa del fago T7 bajo el promotor *lacUV5*. La inducción se realizó por adición de IPTG. El sistema pT7 no está disponible comercialmente y fue donado por el Dr. S. Tabor.

Funcionalidad *in vivo* de los genes de *ftsZ* mutantes

La cepa *E. coli* VIP2 tiene interrumpido el gen de *ftsZ* por el gen de resistencia a kanamicina, la eliminación del gen de *ftsZ* es letal para la bacteria. Para que estas células sean viables, el gen es suministrado por el pLAR9, que contiene el gen de *ftsZ*, que está regulado por el promotor de *ftsZ* cromosomal. Este plasmidio tiene el gen de resistencia a cloramfenicol y su replicación es termosensible, es decir que sobre los 37° C no hay replicación y las células no son viables. La cepa se lisogenizó con λ DE3, con el fin de incorporar en el cromosoma bacteriano el gen de la polimerasa del fago T7. La cepa *E. coli* VIP2(DE3) transformada con pMFV57 es capaz sólo de expresar el gen *ftsZ* proveniente del plasmidio pMFV57, sobre los 37° C. Se puede evaluar la funcionalidad del gen *ftsZ* o de las mutantes puntuales de este gen presentes en el plasmidio pMFV57, cuando se crece la cepa *E. coli* VIP 2(DE3)

transformada con pMFV57 a 42° C, pues a esta temperatura no se replica pLAR9.

Las cepas de *E. coli* VIP2(DE3) se transformaron con los plásmidos que expresan los genes de *ftsZ* tipo silvestre y mutantes. Se crecieron a 30° C en medio líquido LB con agitación hasta una densidad óptica a 600 nm ($D.O_{600}$) de 0,6. Con este cultivo se inocularon diluciones seriadas entre 10^{-1} y 10^{-6} , por duplicado en cada placa. Las placas se incubaron a 30° C y 42 °C toda la noche y luego se contaron las unidades formadoras de colonias (ufc/ml). Se consideró control positivo a la VIP2(DE3) transformada con pMFV57:*ftsZ* tipo silvestre y crecida a 42° C para calcular el porcentaje de sobrevivencia de las mutantes.

Electroforesis en geles de agarosa (geles para DNA plasmidial)

La concentración de agarosa varió entre 1 y 2 % dependiendo del tamaño de los fragmentos de DNA a separar. La muestra se preparó mezclando el DNA con amortiguador de carga (glicerol al 50%, EDTA 50 mM, Xilén cianol 1 mg/ml, Azul de bromofenol 1,5 mg/ml). La electroforesis se llevó a cabo a un potencial eléctrico de 80-100 V. Una vez finalizada la electroforesis, el gel se tiñó con bromuro de etidio (10 µg/ml) y se puso sobre un transiluminador para observar las bandas de DNA.

Purificación de EcFtsZ por precipitación con sulfato de amonio

El método de purificación fue descrito por Mukherjee y Lutkenhaus (Mukherjee y Lutkenhaus, 1998), y se usó con algunas modificaciones. El precipitado bacteriano se suspendió en 25 ml de tampón A (Tris-HCl 50 mM, pH 7,9, KCl 50 mM, EDTA 1 mM, glicerol al 10% v/v). Para romper las células se aplicó ultrasonido, con 5 pulsos de 20 s a 25 watt, con pausa de 1 min, y el sexto pulso de 20 s a 75 watt en un sonicador. Para evitar el calentamiento de la muestra, el proceso se realizó en un baño de hielo. Se centrifugó a 28.000 rpm, a 4 °C durante 90 min (Beckman L5-75B Ultracentrifuge, rotor type 65), se trasvasió el sobrenadante a un vaso de precipitado pequeño, colocado previamente en hielo. Se agregó lentamente 3,46 g de sulfato de amonio (25 % de saturación) en frío agitando con una barra magnética. Se centrifugó la solución a 10.000 rpm a 4 °C, durante 30 minutos. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se disolvió en 3 ml de tampón A. Esta solución se dializó contra 100 volúmenes de tampón A, al menos 4 h (o toda la noche) con 2 cambios a 4 °C.

La muestra dializada se inyectó a la columna de intercambio aniónico (Q-Sepharosa, 25 cm x 4,6mm) mediante un lazo de inyección de 5 ml. Se eluyó la proteína con un gradiente 10-70 % de tampón B (50 mM Tris-HCl pH 7,9, 1M KCl, 1mM EDTA, 10% glicerol) a 1 ml/min a 4 °C, se colectaron fracciones de 3 ml. Las fracciones que contenían proteína se verificaron primero espectrofotométricamente, determinando la absorbancia a 280 nm y la fracciones con mayor absorbancia se analizaron mediante PAGE-SDS. La

fracción correspondiente a la FtsZ, que eluye entre 200-250 mM KCl, se colectó y concentró en Centriprep (Amicon 30 K) hasta alcanzar un volumen de 3 ml.

Las fracciones concentradas que contenían EcFtsZ, obtenidas de la cromatografía en Q-Sepharosa, se inyectaron a la columna Sephacryl S-400. Se eluyó con tampón A a 1ml/min y 4 °C. Se colectaron en fracciones de 3 ml y se monitoreó mediante SDS-PAGE y espectrofotométricamente a 280 nm. Se concentró la FtsZ utilizando Centriprep (4.000 rpm a 4 °C) hasta alcanzar una concentración de al menos 10 mg/ml de proteína. Se dividió en alícuotas que se congelaron inmediatamente por inmersión en nitrógeno líquido y se guardaron a -80 °C.

Purificación de MjFtsZ por columnas de Ni²⁺

Soluciones:

Tampón A: Tris-HCl (pH 8,0) 50 mM, NaCl 300 mM.

Tampón B: Tris-HCl (pH 5,8) 50 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 1 M.

Tampón C: Tris-HCl (pH 8,0) NaN₃ 1 mM, EDTA 1 mM.

Un cultivo de un litro de la cepa *E. coli* (DE3) pMJ0370 se indujo a sobreexpresar la proteína Mj FtsZ con IPTG 0,5 mM, el cual se aplicó durante 4 horas, en fase de crecimiento exponencial del cultivo. Se cosecharon las bacterias por centrifugación, se lavó el precipitado, con Tampón A y se guardó a -80 °C, hasta el momento de la purificación. Se tomó el precipitado congelado, proveniente de un litro de cultivo y se disolvió en Tampón A (20

ml). Las células se rompieron por ultrasonido, con un programa automático de 5 pulsos de 20 s con una potencia de 40 watts. Se utilizó una sonda de 1 cm de diámetro, y para evitar el calentamiento de la muestra, el proceso se llevó en un baño de hielo, esperando 1 min entre cada pulso. El lisado celular se centrifugó a 28.000 rpm, en un rotor 50Ti Beckman, durante 90 min. Se colectó el sobrenadante en un vaso de precipitado limpio. Se le agregó imidazol a una concentración final de 150 mM, se mantuvo la solución en hielo todo el tiempo. Este sobrenadante se pasó a través de una columna HiTraping Quelating® de 5 ml (Pharmacia, Upsala, Suecia), la muestra se cargó con un flujo constante de 1 ml por minuto, una vez cargada la muestra se lavó la columna con 20 mL de Tampón A + imidazol 150 mM. La proteína se eluyó de la columna con un gradiente 15-70 % tampón A y tampón B respectivamente, en un volumen de 40 ml, con un flujo de 1 ml por minuto, este paso se realizó a temperatura ambiente, se colectaron fracciones de 3 ml, se determinó la presencia de proteína midiendo la absorbancia de las fracciones a 280 nm, en un espectrofotómetro UV, para determinar la pureza de las fracciones se realizó un gel PAGE-SDS.

Las fracciones que contenían MjFtsZ se concentraron mediante un centripep 30 K (Amicon), hasta alcanzar un volumen de 2 a 3 ml. La MjFtsZ concentrada se pasó por una columna XK16/70 Pharmacia de Sephacryl 400R, previamente equilibrada con Tampón C y se cromatografió a 1 ml por minuto, a temperatura ambiente. Se recolectaron fracciones de 2-3 ml, a las cuales se les midió la absorbancia a 280 nm. Las fracciones que contenían la

proteína se colectaron y se concentraron nuevamente con el centriprep 30 K de Amicon, hasta alcanzar una concentración mínima de 10 mg/ml.

Purificación del heterodímero $\alpha\beta$ -tubulina de cerebro de pollo

La $\alpha\beta$ -tubulina se purificó a partir de cerebros de pollos recién sacrificados, utilizando el procedimiento previamente descrito por Weisenberg (Weisenberg y col., 1968; Weisenberg y Timasheff, 1970).

Los cerebros se limpiaron de meninges y vasos sanguíneos, luego el tejido se lavó con 2 volúmenes de amortiguador PMS (Fosfato de sodio 10 mM, sacarosa 0,24 M, $MgCl_2$ 0,5 mM, pH 7,0). El tejido se homogenizó en un volumen de PMS en una juguera comercial a máxima velocidad por 45 segundos. La suspensión se centrifugó en una centrifuga Sorvall RC 2B a 10.000 rpm, en un rotor GSA por 30 min a 4 °C. Se colectó el sobrenadante, al que se le agregó 17,7 g de sulfato de amonio por cada 100 ml; bajo agitación suave y continua. La mezcla se dejó precipitar por 10 min luego se centrifugó en las mismas condiciones antes mencionadas. Se colectó el sobrenadante y se agregó 7,1 g de sulfato de amonio por cada 100 ml de solución, se dejó precipitar por 10 minutos y se centrifugó en rotor GSA a 10.000 rpm, por 30 minutos. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se disolvió en el mínimo volumen posible de amortiguador PMG (fosfato de sodio 10 mM, $MgCl_2$ 0,5 mM, GTP 0,1 mM, pH 7,0); se utilizó un homogeneizador Potter de 20 ml. La solución se agregó 50 ml de volumen húmedo de DEAE-

Sephadex previamente equilibrada en PMG. La mezcla se dejó reposar por 5 min y se lavó 2 veces, en un embudo Buchner, con amortiguador PMG que contenía KCl 0,4 M. Las proteínas se eluyeron de la resina utilizando amortiguador PMG que contenía KCl 0,8 M. Al eluido se agregó 24,8 g de sulfato de amonio por cada 100 ml, se dejó reposar por 10 min y se centrifugó en un rotor SS-34 a 10.000 rpm por 30 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se disolvió en el mínimo volumen de PMG e inmediatamente fue aplicado a una columna de Sephadex G-25 medium (3 x 50 cm), equilibrada en el mismo amortiguador. Se colectaron fracciones de 2 ml. Para identificar las fracciones que contenían la $\alpha\beta$ -tubulina, se agregó a cada fracción 2 a 3 gotas de una solución de $MgCl_2$ 0,5 M. Las fracciones que presentaron turbidez se colectaron y fueron centrifugadas en un rotor SS-34 a 10.000 rpm por 10 min a 4 °C, El precipitado de $\alpha\beta$ -tubulina se disolvió en el mínimo volumen de amortiguador de almacenamiento, (PMG , 1 M sacarosa) y se dializó contra el mismo amortiguador por toda la noche. En la mañana del día siguiente, la muestra dializada fue alicuotada en volúmenes de 100 a 200 μ L, se congelaron en nitrógeno líquido y las alícuotas se almacenaron a -80 °C, hasta su posterior uso experimental. El rendimiento promedio de cada purificación, utilizando como material de partida 600 mL de tejido fue entre 120-180 mg de α - y β -tubulina de alta pureza.

Cuantificación de EcFtsZ y MjFtsZ

La determinación de la concentración de la EcFtsZ se cuantificó espectrofotométricamente. El coeficiente de extinción molar teórico de EcFtsZ y sus mutantes se determinó a partir de la secuencia primaria de las proteínas. La EcFtsZ silvestre tiene sólo 3 tirosinas en su secuencia primaria y el nucleótido unido predomina en el espectro de absorción del UV. El contenido del nucleótido se determinó, después de una precipitación de proteínas con ácido perclórico a una concentración final al 7 % (p/v). Para la cuantificación de la concentración del GTP se midió la absorbancia del sobrenadante y se utilizó el coeficiente de extinción de $13.620 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 254 nm. La concentración de EcFtsZ más la del nucleótido se midió en 6 M GdmCl a 280 nm, se utilizó el coeficiente de extinción molecular de la tirosina cuyo valor es $1.280 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 280 nm y se sustrajo la contribución de GDP, utilizando un coeficiente de extinción molar de $8.100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 280 nm para el nucleótido (Rivas y col., 2000). La cuantificación de la concentración de MjFtsZ se realizó espectrofotométricamente, la secuencia aminoacídica de esta proteína tiene una tirosina y un triptófano. Por lo tanto el coeficiente de extinción molar para la MjFtsZ es de $6.970 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 280 nm, se calculó la contribución del GDP a 280 nm tal como se describió anteriormente y a partir de los valores de absorbancia a 280 nm de la MjFtsZ purificada y disuelta en GdmCl 6 M fue posible calcular la concentración de la proteína.

Cuantificación de $\alpha\beta$ -tubulina

Las preparaciones de la $\alpha\beta$ -tubulina se cuantificaron espectróscopicamente, para ello se midió la absorbancia a 280 nm, en GdmCl 6 M. Para el cálculo de la concentración se utilizó el coeficiente de extinción de $1,03 \text{ mg}^{-1} \text{ ml cm}^{-1}$ determinado por Na (Na y Timasheff, 1980).

Determinación de la actividad GTPásica de FtsZ

El ensayo de actividad GTPásica de la FtsZ se realizó en el amortiguador Mes 50 mM pH 6,5, KCl 50 mM, MgCl_2 10 mM, pH 6,5. La reacción se llevó a cabo a 30°C. La reacción se comenzó agregando GTP a una concentración final de 1 mM y se detuvo tomando 100 μL de la mezcla de reacción, que fueron vaciados en un tubo Eppendorf que ya contenía 10 μl de ácido perclórico 70%. La solución ácida precipitó la proteína y dejó en solución los nucleótidos. La mezcla se neutralizó agregando 200 μl de K_2CO_3 1 M, y se centrifugó por 10 min a 5.000 rpm a 4° C. Los nucleótidos se separaron y cuantificaron por cromatografía líquida de alta resolución, los nucleótidos se cuantificaron por absorbancia con un detector UV a 254 nm, se analizaron previamente estándares de GDP y GTP, con los que se realizaron curvas de calibración.

Medición de la actividad GTPasa de $\alpha\beta$ -tubulina

La determinación de la actividad GTPásica de $\alpha\beta$ -tubulina se realizó en amortiguador TEA 10 mM pH 7,2, $MgCl_2$ 0,5 mM y Glicerol 25 %(v/v), la incubación se realizó a 37° C. La reacción se inició al agregar GTP a una concentración final de 0,1 mM. La reacción se incubó a diferentes tiempos, y se detuvo tomando 100 μ L de la solución de reacción, los cuales se depositaron en un tubo Eppendorf que se habían adicionado previamente 10 μ L de ácido perclórico al 70 %. Las muestras se neutralizaron agregando 200 μ L de $KHCO_3$ 1 M y se centrifugaron a 5.000 rpm durante 10 min a 4° C, para eliminar la proteína precipitada y el $KClO_4$. Al sobrenadante se le determinó la concentración de GTP y GDP mediante un método de cromatografía líquida de alta resolución. Las condiciones cromatográficas utilizadas fueron: Fase móvil K_2HPO_4 50 mM, ácido acético 20 mM, tetrabutilamonio fosfato 4 mM. Columna ODS Supelco de 25 cm de largo, diámetro interno 4,6 mm. Longitud de onda de detección fue de 250 nm.

Inmovilización de $\alpha\beta$ -tubulina y EcFtsZ a la resina affi-gel

Las proteínas que se inmovilizaron fueron EcFtsz y $\alpha\beta$ -tubulina, la resina affi-gel tiene un brazo de 15 carbonos y en su extremo posee un grupo succimidil-ester, que es capaz de reaccionar con aminas primarias y secundarias. El medio de incubación que se utilizó fue Hepes 100 mM a pH 7,5, KCl 50 mM. 1 ml de resina, se suspendió en 4 ml de amortiguador de incubación, la

concentración de proteína se ajustó entre 1 a 2 mg/ml, la suspensión se agitó suavemente a 4 °C, durante 1 h. La proteína unida se cuantificó midiendo la diferencia de la concentración de la mezcla antes y después de la incubación de 1 h. Después de la incubación la resina se lavó con un amortiguador Tris 50 mM, pH 7,5, 100 mM KCl, el lavado se realizó en un embudo filtrante, se pasó por la resina al menos 100 ml de amortiguador de lavado, de manera de asegurar que toda la proteína libre adherida inespecíficamente a la resina fuera removida. La resina con $\alpha\beta$ -tubulina o EcFtsZ inmovilizada se equilibró con el amortiguador para la determinación de actividad GTPásica respectivo en el mismo embudo filtrante. Un volumen conocido de resina con las proteínas inmovilizadas se suspendió en un volumen conocido de amortiguador de actividad GTPásica, de manera de poder calcular cuanta proteína había por ml de suspensión de resina al momento de realizar el ensayo de actividad GTPásica y así se calculó la actividad específica de las proteínas inmovilizadas. Se verificó la ausencia de proteína libre determinado la concentración de proteína en el sobrenadante de la resina inmovilizada con proteína, y además se midió la actividad GTPásica de éste, el cual nunca presentó actividad GTPásica detectable.

Polimerización de EcFtsZ y sus mutantes determinados por dispersión de luz

La reacción de polimerización de EcFtsZ y sus mutantes se realizó en el amortiguador Mes 50 mM pH 6,5, KCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM. La reacción se llevó a cabo a 30°C. El ensayo se llevó a cabo en una cubeta de fluorescencia, la cual se puso en un espectrofluorímetro Perkin-Elmer LS50, la dispersión de luz se midió a 350 nm, la longitud de excitación y emisión se programó a ese valor. Se utilizó un atenuador de 2 % antes del detector, las ranuras de excitación y emisión fueron de 5 nm y se registraron los datos cada 1 s. Las concentraciones de proteínas y GTP se especificaron en cada ensayo.

Medidas de Dicroísmo Circular

Los espectros de dicroísmo circular (DC) se tomaron en un espectropolarímetro Jasco 600 (Japón). Los cambios en estructura secundaria se registraron en el intervalo de 210 nm a 250 nm de longitud de onda, se utilizaron cubetas de sílice fundido de 0,1 cm de paso óptico. El ancho de banda utilizado para todas las determinaciones fue de 2 nm con una constante de tiempo de 2 s. Cada espectro tomado representa un promedio de 3 barridos realizados por el instrumento. La temperatura fue de 25 °C durante las mediciones. Las contribuciones originadas por el solvente fueron sustraídas en cada una de las mediciones. Los datos fueron analizados

mediante los programas contenidos en DICROPROT y entre ellos el programa CONTIN fue utilizado para el cálculo del porcentaje de estructura secundaria de las proteínas en estudio.

Electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida

El análisis de proteínas por electroforesis en geles desnaturantes se realizó según Laemmli (Laemmli, 1970). Se utilizó acrilamida al 10% en el gel separador y 4% en el gel concentrador. Las muestras se disolvieron en amortiguador de muestra, Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, SDS 0,1 %, 2-mercaptoetanol 0,1 mM, azul de bromofenol 0,2 % . La muestra se calentó a 100 °C por 5 minutos y luego se cargó en los pocillos. Se corrió la muestra en amortiguador SDS 10 %, Glicina y Tris pH 8,8, a una corriente eléctrica constante de 25 mA, hasta la caída del frente de corrida. El gel se tiñó con azul de coomassie (0,25 g de azul de Coomassie brillante en 90 ml de metanol : agua (1:1 v/v) y 10 ml de ácido acético glacial) durante dos horas con agitación constante y se destiñó con la solución de desteñido (50 % de metanol, 10% ácido acético).

Electrotransferencia

Para corroborar que las proteínas purificadas correspondían a EcFtsZ y a sus mutantes, se realizaron "Westernblots". Primero se retiró el gel de los vidrios e inmediatamente se construyó el sándwich para la transferencia colocando 3 papeles filtro, seguidos del gel, de la membrana de nitrocelulosa y por último

de otros tres papeles filtro. La membrana de nitrocelulosa se sumergió completamente en agua y luego en amortiguador de transferencia (Amortiguador Tris-Glicina 25 mM y 190 mM respectivamente pH 8,8, metanol 20%), así como las hojas papel filtro y las esponjas antes de montar la transferencia. La transferencia se realizó por dos horas a 100 voltios y a -20°C , el amortiguador de transferencia se enfrió previamente.

Desarrollo inmunológico de la membrana de nitrocelulosa

Una vez transferido el gel de proteínas a la membrana de nitrocelulosa, se procedió a revelar ésta. Primero la membrana se bloqueó con leche descremada en polvo 3% en PBS (NaCl 137 mM, KCl 2 mM Na_2HPO_4 10 mM KH_2PO_4 2 mM) por 1 hora a temperatura ambiente, luego se traspasó a una solución de leche 3% en PBS que contiene el anticuerpo primario. La membrana permaneció con el anticuerpo primario dos horas con agitación y a temperatura ambiente. Luego de 3 lavados con amortiguador TS (Tris 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM), la membrana se incubó en leche 3% en TS con el anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa alcalina por 2 horas. La dilución empleada del anticuerpo policlonal anti-FtsZ fue de 1:20.000 y del anticuerpo secundario, de acuerdo al consejo del fabricante (1:10.000).

Para realizar el revelado, se colocó la membrana en 10 ml de amortiguador para fosfatasa alcalina (Tris 100 mM pH 9,5, NaCl 100 mM, MgCl_2 5 mM), complementado con 33 μl de BCIP (0.5 g de 5-bromo 4-cloro 3-indolil fosfato

disuelto en 10 ml de dimetilformamida al 100%) y 66 μ l de NBT (0,5 g de Nitro blue tetrazolium disuelto en 10 ml de dimetilformamida al 70 %). Al cabo de algunos minutos de agitación aparecieron las bandas y posteriormente la reacción se detuvo diluyendo con abundante agua destilada.

Preparación de muestras de EcFtsZ y sus mutantes para microscopia electrónica

Las muestras para microscopia electrónica se prepararon a partir de una muestra polimerizada de FtsZ y mutantes a las concentraciones que se especifican en cada caso. El medio de polimerización contenía Mes 50 mM pH 6,5, KCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM y se incubó a 30 °C durante 2 min. La polimerización se indujo agregando GTP a una concentración final de 1 mM, se dejó incubar por otros 2 min. Luego se tomó 25 μ L de la muestra con los polímeros de FtsZ y se depositaron en una grilla para microscopia electrónica de 400 mesh, se incubó 30 s y se tiñó con acetato de uranilo al 1% en agua, esta solución se pasó previamente por un filtro de 0,22 μ m. En un trozo de parafilm se colocaron 5 gotas de 50 μ l de acetato de uranilo. La grilla fue sumergida una sola vez en cada gota, en la última gota se dejó la grilla sumergida durante un minuto, después de este tiempo el exceso de uranilo se escurrió con papel absorbente y la grilla se depositó en un portagrilla hasta el momento de ser observada en un microscopio electrónico de transmisión Phillips Modelo 300.

Preparación de las soluciones con diferentes pH, utilizando amortiguador Tris-maleato

Para obtener las soluciones a distintos pH, se prepararon dos soluciones: Solución A (0,2 M): 24,2 g de Tris + 23,2 g de ácido maleico o 19,6 g de anhídrido maleico en 100 mL de agua desionizada.

Solución B: 0,2 M de NaOH.

Las distintas soluciones amortiguadoras, se prepararon con 50 mL de Solución A más una cantidad distinta de Solución B, según el pH que se deseaba obtener. Para que todas las soluciones tuvieran la misma fuerza iónica, se calculó el valor para cada uno de ellas y se ajustaron todas a la de mayor fuerza iónica con NaCl, luego se completó a 200 mL con agua desionizada (Dawson, 1972).

Digestiones de $\alpha\beta$ -tubulina con subtilisina

Las digestiones de $\alpha\beta$ -tubulina se realizaron en TEA 10 mM, CaCl_2 0,2 mM, Glicerol 25 %, pH 7,0. La temperatura de digestión fue de 30 °C para la digestión de ambas subunidades de α - y β -tubulina, con subtilisina unida a agarosa, y la reacción se detuvo por centrifugación 5.000 rpm a 4 °C. Cuando se utilizó subtilisina libre (1% p/p, con relación a $\alpha\beta$ -tubulina), la reacción se detuvo con PMSF 1% volumen de mezcla de digestión, de una solución 1% p/v de PMSF en DMSO (Bhattacharyya y col., 1985) .

Medición de anisotropía de DAPI

La anisotropía de DAPI se midió en un espectrofluorímetro Perkin Elmer modelo LS-50, la luz polarizada se obtuvo utilizando los polarizadores de film que tiene el instrumento. La longitud de onda de excitación y emisión fueron 350 y 450 nm, respectivamente. Las ranuras de excitación y emisión fueron de 5 nm.

Con las medidas de anisotropía de la sonda DAPI a distintas concentraciones de EcFtsZ, se calculó la fracción unida a la proteína con la siguiente ecuación:

$$f_u = \frac{r - r_L}{(r_u - r) + R (r - r_L)}$$

En que f_u corresponde a la fracción de DAPI unido, r a la anisotropía de la sonda a una concentración de EcFtsZ cualquiera, r_L es la anisotropía de la sonda libre y r_u

corresponde a la sonda completamente unida (a concentración infinita de EcFtsZ). R es el cociente entre la intensidad de la sonda completamente unida a EcFtsZ y la sonda libre (Lakowicz, 1999).

Determinación del sitio de interacción DAPI-EcFtsZ por anclamiento molecular (molecular docking)

Al modelo de la estructura de EcFtsZ se le asignaron los hidrógenos y las cargas parciales a pH 7,0 mediante el programa DISCOVER, y el campo de

fuerza AMBER del paquete Accelrys InsightII versión 98, para el DAPI se utilizaron las coordenadas del archivo 1D3O.pdb (Larsen y col., 1989).

Para el DAPI, se asignaron las cargas parciales átomo a átomo considerando los valores de cargas parciales para los aminoácidos triptófano, arginina y fenilalanina que presenta el campo de fuerza AMBER. Se ejecutó el programa Autotors que pertenece al paquete Autodock 3.05 y se definieron los carbonos aromáticos. Con este programa esta la posibilidad de asignar enlaces que permiten rotación para el ligando, en este caso no se asignaron rotaciones.

Se agregó solvente al modelo de EcFtsZ con el programa Autodock 3.05. Para generar las grillas de cálculo se consideró una grilla de 126x126x126 puntos y 0,375 Å de separación entre punto y punto. Mediante un programa computacional en idioma Perl elaborado por José Jaime Arbildua, se calculó el número de grillas necesarias con las dimensiones antes mencionadas para cubrir por completo el modelo de EcFtsZ y que cada grilla presentara a lo menos 10 Å de superposición con sus grillas vecinas, para no pasar por alto sitios de unión del ligando que pudieran existir en la interfase de las grillas. Una vez que se obtuvieron las grillas, se procedió a calcular los posibles sitios de interacción para DAPI utilizando el algoritmo Lamarckiano que viene configurado por defecto en Autodock 3.05. Sólo se modificó el número de corridas por grilla a 20. Una vez obtenidos los resultados se hizo una selección visual de los sitios representativos para cada una de las grillas con el programa Swissprot, seleccionando la estructura de DAPI con ΔG de unión más favorable para cada sitio.

Determinación de la distancia entre el DAPI y el triptófano en las mutantes EcFtsZ F135W y EcFtsZ I294W

El fenómeno de FRET ocurre, cuando un fluoróforo que se encuentra en su estado excitado (dador) transfiere su energía a otro fluoróforo (aceptor) a través de una interacción dipolo-dipolo de amplio rango. Esta característica se observa en forma experimental cuando hay un solapamiento del espectro de emisión del dador con el espectro de absorción del aceptor donde la transferencia de energía ocurre sin mediar un fotón y depende de la distancia entre el dador y el aceptor. La aplicación más común de este fenómeno es la medición de la distancia entre dos sitios en una macromolécula (Lakowicz, 1999). Para localizar un sitio de unión es necesario triangular entre las distancias del sitio que se desea determinar y otros dos sitios de localización conocida en la macromolécula. Para conocer la localización de los triptófanos en las mutantes se construyó por medio del programa de homología MODELLER (Sali y Blundell, 1993) un modelo para la estructura tridimensional de EcFtsZ a partir de la estructura cristalográfica de la FtsZ de *M. jannashii*. Con el fin de determinar si las mutaciones afectaron el sitio de unión de DAPI a FtsZ se calcularon las constantes de disociación de la sonda para las mutantes. Para cuantificar el valor del solapamiento se calculó la constante de solapamiento $J(\lambda)$, a partir de la siguiente ecuación:

$$J(\lambda) = \frac{\int_0^{\infty} F_D(\lambda) \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda}{\int_0^{\infty} F_D(\lambda) d\lambda} \quad \text{Ec.1}$$

F_D corresponde a la intensidad de fluorescencia del dador en ausencia del aceptor, en el rango de longitudes de onda donde se solapan los espectros de emisión del dador y de absorbancia del aceptor, ϵ_A corresponde al coeficiente de extinción molecular del aceptor a las mismas longitudes de onda del rango anterior. Los valores obtenidos para las constantes de solapamiento $J(\lambda)$ se utilizaron para calcular el radio de Förster R_0 , el cual corresponde a la distancia a la cual el dador transferiría la mitad de la energía al aceptor. Este valor corresponde a la distancia donde la tasa de transferencia es igual al tiempo de decaimiento del dador en ausencia del aceptor. A esta distancia la mitad de las moléculas del dador decaen por transferencia de energía. El radio de Förster se calculó a partir de la siguiente ecuación:

$$R_0 = 0,211 [\kappa^2 n^{-4} Q_D J(\lambda)]^{1/6}$$

Ec. 2

Donde Q_D es el rendimiento cuántico del dador, κ^2 el factor de orientación, que para un fluoróforo con movimiento isotrópico tiene un valor de 0,66 (Lakowicz, 1999) n es el índice de refracción del medio expresión y $J(\lambda)$ ya fue definida.

Para calcular la distancia entre el triptófano de cada mutante y el sitio de unión de DAPI, se calculó la eficiencia de la transferencia de energía (E), parámetro definido por la ecuación 3.

$$E = 1 - (F_{DA}/F_D) \quad \text{Ec. 3}$$

Donde F_D es la intensidad relativa del dador y F_{DA} es la intensidad relativa del dador en presencia del aceptor. Los valores obtenidos se utilizaron en la siguiente ecuación para obtener las distancias:

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad \text{Ec. 4}$$

Determinación del rendimiento cuántico

El rendimiento cuántico de los triptófanos de cada mutante se calculó a partir de la razón entre la intensidad de fluorescencia a 340 nm de una solución de triptófano libre a pH 7 y la de la mutante con los mismos valores de absorción a 295 nm.

Determinación de la constante de solapamiento

Las constantes de solapamiento se calcularon utilizando un programa de computación en Basic, diseñado por el profesor Juan Brunet.

Resultados

Actividad GTPásica de $\alpha\beta$ -tubulina y $\alpha\beta$ -tubulina S

El heterodímero de $\alpha\beta$ -tubulina presenta actividad GTPásica, asociada a su polimerización. El heterodímero $\alpha\beta$ -tubulina que carece de sus extremos C-terminales se denomina $\alpha\beta$ -tubulina S. Para evaluar el efecto de la concentración de GTP sobre la velocidad de hidrólisis de $\alpha\beta$ -tubulina-S y $\alpha\beta$ -tubulina, en presencia y ausencia de Ca^{2+} 2 mM, se determinó el efecto de GTP sobre la velocidad de hidrólisis del gamma fosfato. En la figura 3 se observa que las curvas presentaron una conducta hiperbólica. Del ajuste de la ecuación de Michaelis y Menten a los valores experimentales de estas curvas, se calcularon los valores de la K_m para GTP de $\alpha\beta$ -tubulina, $\alpha\beta$ -tubulina Ca^{2+} y $\alpha\beta$ -tubulina S, que fueron 8 ± 1 , 16 ± 1 y 21 ± 1 μM , respectivamente. Los valores son el promedio de tres experimentos independientes y se determinaron las desviaciones estándares para cada uno de ellos.

A partir de las velocidades máximas se determinaron las k_{cat} ($V_{\text{máx}} = [\text{Proteína}] \times k_{\text{cat}}$) para $\alpha\beta$ -tubulina, $\alpha\beta$ -tubulina Ca^{2+} 2 mM y $\alpha\beta$ -tubulina-S, los valores fueron $0,06 \pm 0,01 \text{ min}^{-1}$, $0,12 \pm 0,02 \text{ min}^{-1}$ y $0,42 \pm 0,05 \text{ min}^{-1}$, respectivamente. El análisis de los valores de k_{cat} muestra que Ca^{2+} tiene un efecto activador de la hidrólisis de GTP (Tabla 1), pues el valor de k_{cat} en presencia de este catión aumentó al doble. Se observa también una activación al remover los extremos

C-terminales de $\alpha\beta$ -tubulina, pues la k_{cat} para la $\alpha\beta$ -tubulina-S incrementó su valor en 7 veces respecto a $\alpha\beta$ - tubulina.

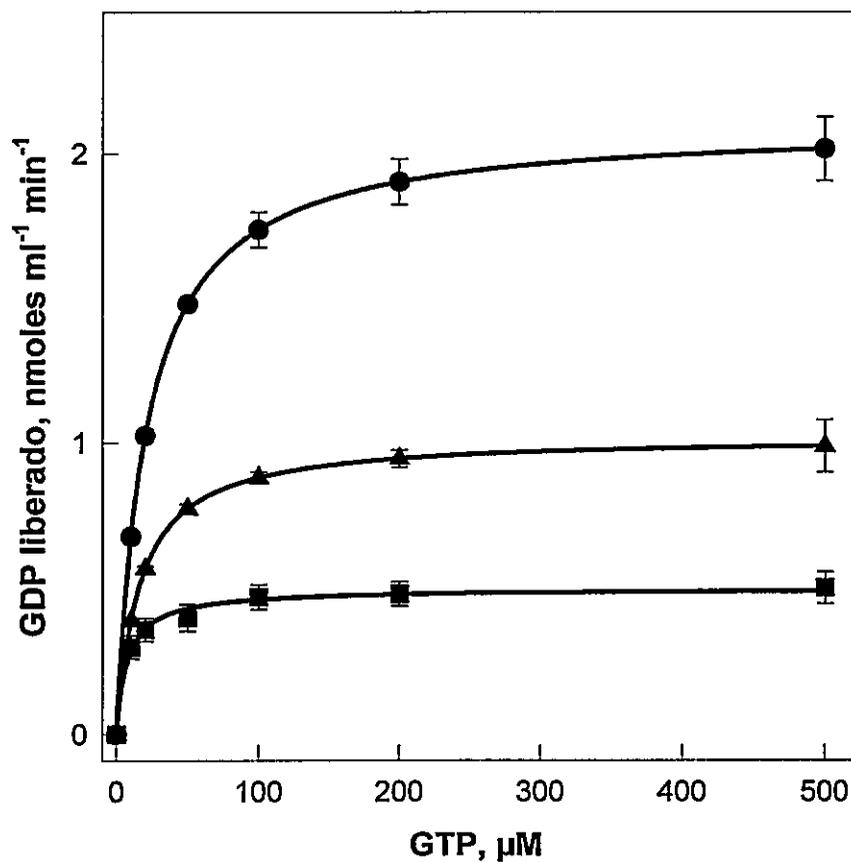


Figura 3. Curvas de saturación de sustrato para la actividad GTPásica de $\alpha\beta$ -tubulina en ausencia y presencia de Ca^{2+} y para $\alpha\beta$ -tubulina-S. El amortiguador utilizado fue TEA 10 mM, MgCl_2 0,5 mM, Glicerol 25 %, la temperatura de incubación fue 37 °C. La concentración de $\alpha\beta$ -tubulina fue de 5 μM (■), $\alpha\beta$ -tubulina 5 μM en presencia de Ca^{2+} 2 mM (▲), $\alpha\beta$ -tubulina -S (●) 5 μM .

Actividad GTPásica de EcFtsZ y MjFtsZ

La EcFtsZ y la MjFtsZ, presentes en bacterias y arqueas, y $\alpha\beta$ -tubulina constituyen una familia de GTPasas (Nogales y col., 1998a). El efecto de la concentración de GTP sobre la velocidad de la hidrólisis del GTP para EcFtsZ y MjFtsZ se muestran en la figura 4 A y 4B. La conducta cinética de ambas proteínas fue hiperbólica, el valor de K_m para EcFtsZ fue de $35 \pm 2 \mu\text{M}$ y para MjFtsZ fue de $16 \pm 1 \mu\text{M}$. Los valores de k_{cat} para EcFtsZ y MjFtsZ fueron $2 \pm 0,1 \text{ min}^{-1}$ y $10 \pm 1 \text{ min}^{-1}$, respectivamente (Tabla 1). Las concentraciones de proteínas utilizadas en estos ensayos fueron 12,5 y 1 μM para EcFtsZ y MjFtsZ respectivamente.

Determinación de la actividad GTPásica intrínseca de $\alpha\beta$ - tubulina y EcFtsZ

Se postula que la interacción longitudinal entre heterodímeros de $\alpha\beta$ -tubulina y EcFtsZ es responsable de la actividad GTPásica (Erickson y O'Brien, 1992; Oliva y col., 2004). Para evaluar esta hipótesis se inmovilizó covalentemente estas proteínas a una resina de affi-gel, con el objeto de evitar las interacciones proteína-proteína. El progreso de la reacción de hidrólisis de GTP catalizada por $\alpha\beta$ -tubulina inmovilizada se muestra en la figura 5A, se calculó la actividad GTPásica específica de $\alpha\beta$ -tubulina inmovilizada, que fue de $0,4 \pm 0,02 \text{ nmoles de GTP ml}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ proteína min}^{-1}$. La concentración de GTP fue de 100 μM . El número de experimentos independientes para el cálculo de este parámetro fue

de 3. La actividad específica para $\alpha\beta$ -tubulina libre en solución fue de $0,6 \pm 0,1$ nmoles de GTP $\text{ml}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína min^{-1} .

La EcFtsZ inmovilizada en la resina affi-gel mostró actividad GTPásica, y el progreso de la reacción de hidrólisis de GTP se muestra en la figura 5B. La actividad GTPásica específica fue 16 ± 1 nmoles de GTP hidrolizados $\text{ml}^{-1}\text{mg}^{-1}$ proteína min^{-1} . La concentración de GTP fue de 1 mM. La actividad específica de EcFtsZ libre en solución fue de 50 ± 5 nmoles de GTP hidrolizados $\text{ml}^{-1}\text{mg}^{-1}$ proteína min^{-1} .

El número de experimentos independientes para el cálculo de este parámetro fue de 3. Como control se midió la actividad GTPásica de la resina affi-gel bloqueada con glicina, la cual no presentó actividad GTPásica, como se observa en las figuras 5 A y B.

La actividad específica de las proteínas inmovilizadas fueron determinadas a concentraciones saturadas de GTP. Esto fue verificado midiendo la actividad a 250 μM de GTP y fue la misma actividad que la medida a 100 μM para $\alpha\beta$ -tubulina y la actividad de EcFtsZ inmovilizada a 500 μM de GTP y fue la misma que a 1 mM.

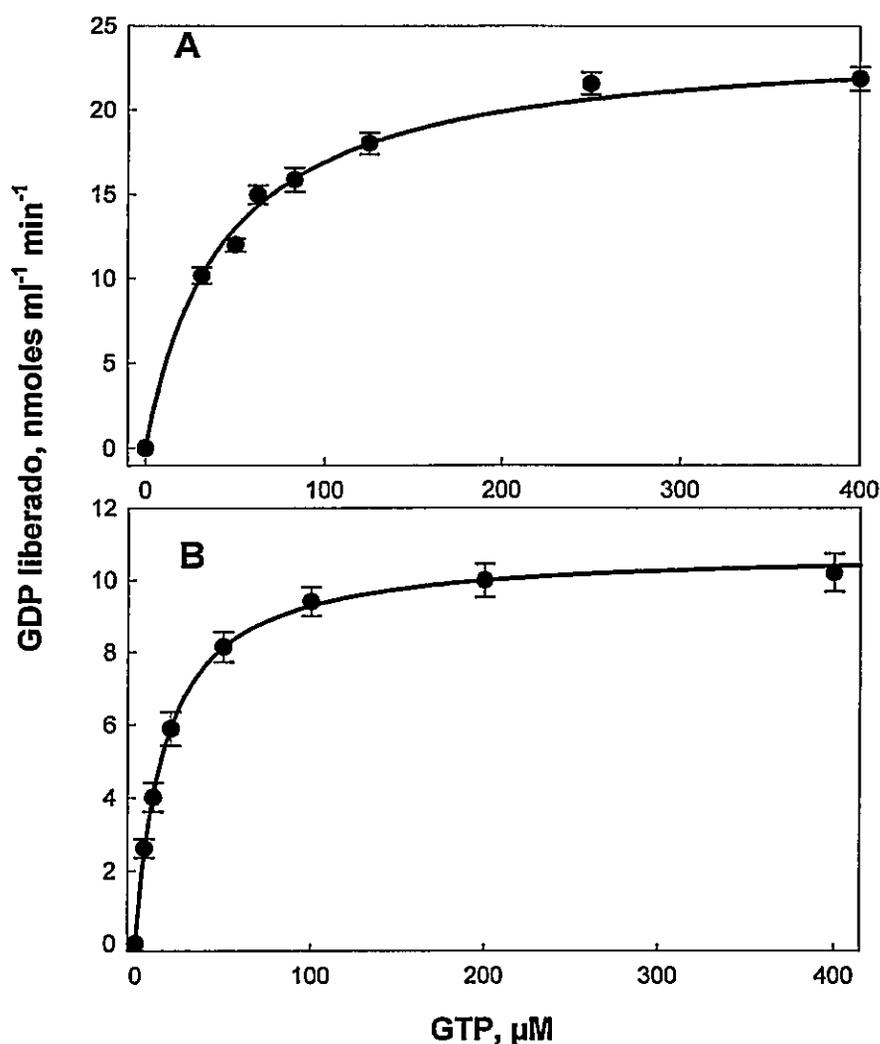


Figura 4. Efecto de la concentración de GTP sobre la actividad GTPásica de EcFtsZ y MjFtsZ. En A se muestra la curva de saturación de GTP de EcFtsZ. El medio de incubación contenía MES 50 mM pH 6,5, KCl 50 mM, MgCl_2 10 mM, la temperatura de incubación fue 30 °C, la concentración de proteína fue de 12,5 μM . En B se muestra la curva de saturación de GTP de MjFtsZ. El medio de incubación fue el mismo, excepto que el KCl fue 2 M, la temperatura de incubación fue de 60 °C, la concentración de proteína fue de 1 μM .

Tabla 1. Valores de K_m y k_{cat} para α - y β -tubulina, $\alpha\beta$ -tubulina-S, EcFtsZ y MjFtsZ.

	K_M μM	Actividad específica nmoles GTP hidrolizados ml^{-1} $mg^{-1}min^{-1}$
$\alpha\beta$ - tubulina	8 ± 1	$0,6 \pm 0,1$
$\alpha\beta$ - tubulina inmovilizada	N.D.	$1,2 \pm 0,2$
$\alpha\beta$ - tubulina Ca^{2+}	16 ± 1	$4,2 \pm 0,05$
$\alpha\beta$ - tubulina S	21 ± 1	$0,4 \pm 0,1$
EcFtsZ	35 ± 2	50 ± 5
EcFtsZ inmovilizada	N.D.	16 ± 1
MjFtsZ	16 ± 1	250 ± 1

N.D.: Valores no determinados.

Efecto del pH sobre la velocidad inicial de la actividad GTPásica de $\alpha\beta$ -tubulina y $\alpha\beta$ - tubulina S

Se determinó el efecto de pH sobre la velocidad inicial de hidrólisis de GTP de $\alpha\beta$ -tubulina. La variación de la velocidad inicial de la actividad GTPásica a distintos pH se muestra en la figura 6. La curva muestra dos pH máximos aproximadamente a 6,2 y 7,3 y un valle a 6,8. La curva se ajustó a una ecuación de doble campana de pH (Cornish-Bowden, 1995). El ajuste mostró 4 valores de pK_a , que fueron; pK_{a1} : $5,6 \pm 0,2$; pK_{a2} : $6,4 \pm 0,2$; pK_{a3} : $7,4 \pm 0,3$; pK_{a4} : $8,3 \pm 0,3$. Los valores de dispersión corresponden a los calculados del ajuste de la curva.

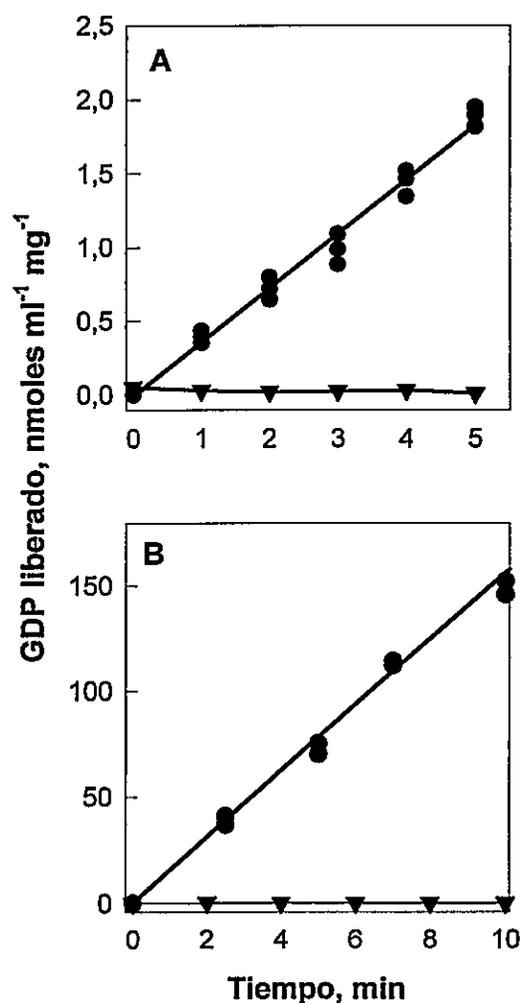


Figura 5. Curva de progreso de la actividad GTPásica de $\alpha\beta$ -tubulina y de EcFtsZ inmovilizada a una resina affi-gel. El heterodímero $\alpha\beta$ -tubulina y EcFtsZ se unieron covalentemente a una resina affi-gel como se describe en Métodos. En A se muestra la actividad GTPásica específica de $\alpha\beta$ -tubulina inmovilizada (●), tres experimentos. La concentración de GTP fue 100 μ M. En B se muestra la actividad GTPásica específica de EcFtsZ inmovilizada (●), dos experimentos. La concentración de GTP fue 1 mM. Se midió la actividad GTPásica como está descrito en Métodos. El control negativo de la actividad GTPásica fue la resina affi-gel bloqueada con glicina (▼).

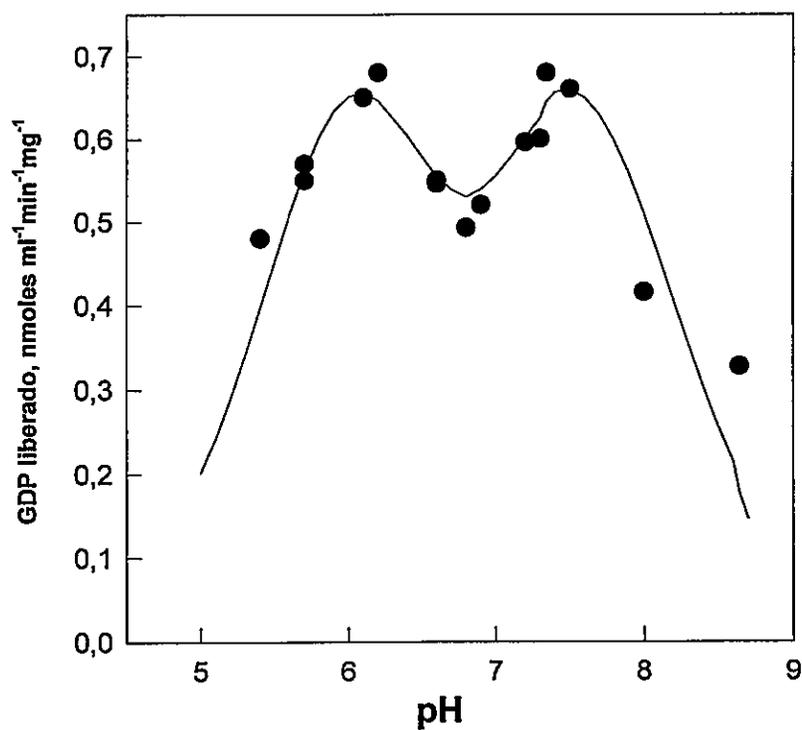


Figura 6. Efecto del pH sobre la velocidad inicial de la actividad GTPásica de $\alpha\beta$ -tubulina. La $\alpha\beta$ -tubulina se incubó en Tris-maleato 25 mM, al pH indicado, con GTP 0,1 mM y $MgCl_2$ 0,5 mM, a 37 °C, se midió la velocidad inicial de hidrólisis de GTP a los diferentes pH.

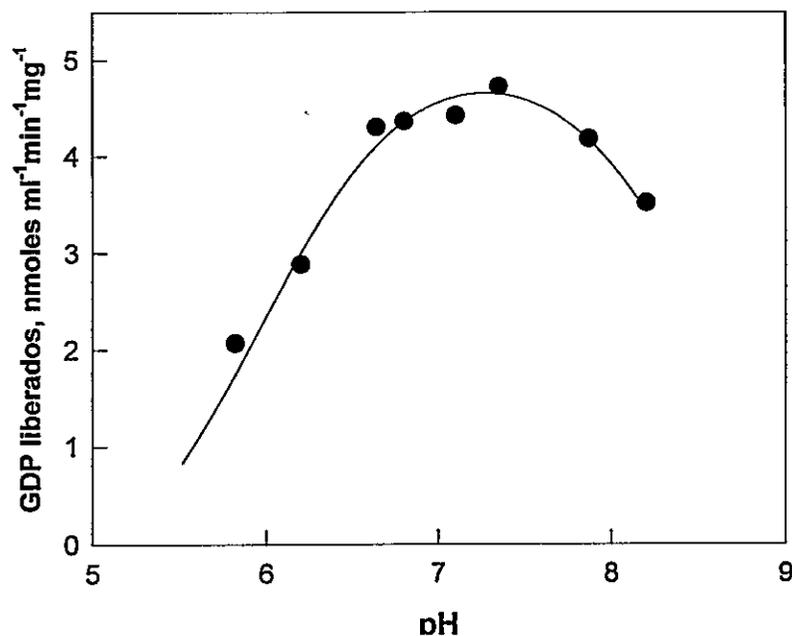


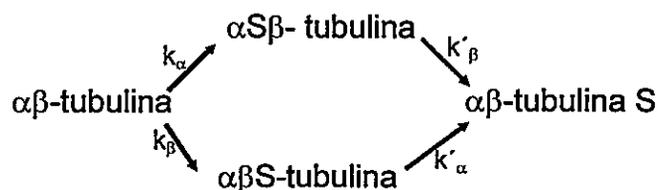
Figura 7. Efecto del pH sobre la velocidad inicial de la actividad GTPásica de $\alpha\beta$ -tubulina S. La $\alpha\beta$ -tubulina S se incubó en Tris-maleato 25 mM, $MgCl_2$ 0,5 mM GTP, 0,1 mM, a 37 °C. Se midió la velocidad inicial de la hidrólisis del GTP a diferentes pH.

Efecto del tiempo de la digestión de los extremos C-terminales de $\alpha\beta$ -tubulina sobre la GTPásica.

Para evaluar el efecto de los extremos C-terminales negativamente cargados sobre la hidrólisis de GTP, se midió el efecto del pH sobre la velocidad inicial de hidrólisis de $\alpha\beta$ -tubulina S. La figura 7 muestra el efecto del pH sobre la actividad GTPásica de $\alpha\beta$ -tubulina-S. La curva presentó sólo un máximo, alrededor de pH 7,2. La curva se ajustó a una ecuación de campana de pH (Cornish-Bowden, 1995). Los valores de pK_a fueron pK_{a1} : $5,8 \pm 0,2$, pK_{a2} : $8,4 \pm 0,3$. La dispersión de estos valores de pK_a fueron determinados a través del ajuste de la ecuación de doble campana de pH. Estos resultados muestran que el máximo de actividad a pH 6,3 en la $\alpha\beta$ -tubulina se perdió cuando se removieron los extremos C-terminales.

Efecto del tiempo de la digestión de los extremos C-terminales de $\alpha\beta$ -tubulina sobre la actividad GTPásica

Con el fin de observar cual es el efecto del tiempo de digestión de los extremos C-terminales sobre la actividad GTPásica, se determinó la actividad de los productos de digestión de la $\alpha\beta$ -tubulina con subtilisina. La reacción de digestión de $\alpha\beta$ -tubulina con subtilisina se detuvo con PMSF, a distintos tiempos, se midió la actividad específica de la hidrólisis GTP de los productos de digestión de la $\alpha\beta$ -tubulina. La cinética de digestión de $\alpha\beta$ -tubulina ocurre en las siguientes etapas:



La velocidad de hidrólisis de GTP es la suma de las velocidades propias de cada especie. Así el aumento de la actividad GTPásica dependió del remanente de $\alpha\beta$ - tubulina y de la aparición de las especies digeridas, $\alpha S\beta$ - tubulina, $\alpha\beta S$ - tubulina y $\alpha\beta$ -tubulina S. El resultado de este experimento se muestra en la figura 8. A tiempo 0, la actividad específica es $0,6 \text{ nmoles GDP ml}^{-1}\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$, esta actividad corresponde sólo a $\alpha\beta$ -tubulina. La digestión de $\alpha\beta$ -tubulina se completa alrededor de los 20 min, esto se observó por geles de poliacrilamida en presencia de SDS (datos no mostrados), la actividad específica a este tiempo fue de $4,6 \text{ nmoles GDP ml}^{-1}\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$, esta actividad corresponde a la $\alpha\beta$ -tubulinaS, a este tiempo la digestión de $\alpha\beta$ -tubulina se completó.

A partir de la cinética de disminución de fluorescencia de DAPI unido a $\alpha\beta$ -tubulina producida por la digestión de con subtilisina (datos no mostrados), se determinaron los valores de las constantes de velocidad de digestión, y fueron $0,03 \text{ min}^{-1}$ y $0,35 \text{ min}^{-1}$ para k_α y k_β respectivamente.

En los primeros tres minutos se observa una rápida activación de la hidrólisis de GTP, en este tiempo de digestión se alcanzó alrededor de un 65 % del máximo de la activación, esto se muestra en el inserto de la figura 8, este porcentaje coincide con el porcentaje de digestión de la β -tubulina, por lo que podríamos

afirmar que la activación de la hidrólisis de GTP estaría dada, principalmente por la remoción del extremo carboxilo terminal de β -tubulina, lo que concuerda con el hecho de que en esta subunidad se encuentra el sitio E para GTP, que es donde ocurre la hidrólisis en $\alpha\beta$ -tubulina.

Explicar la activación de la hidrólisis de GTP producida por la digestión de los extremos C-terminales de tubulina no es posible a partir de la estructura tridimensional conocida del dímero, pues la movilidad de estos extremos impide determinar su posición, por esto es más factible estudiar los residuos de aminoácidos que participan en la hidrólisis de GTP y a partir de su localización determinar la influencia de los extremos C-terminales.

Sin embargo estos estudios se ven limitados en $\alpha\beta$ -tubulina, pues hasta el momento no ha sido posible obtener tubulina recombinante funcional *in vitro*. La EcFtsZ es más apropiada para hacer un análisis molecular, pues se pueden introducir mutaciones y determinar sus efectos sobre la actividad GTPásica, tanto *in vitro* como *in vivo*. La estructura de EcFtsZ no ha sido determinada, por esto a partir de la estructura tridimensional de MjFtsZ, se construyó un modelo por homología de EcFtsZ, y a partir de este modelo se construyó un dímero de EcFtsZ, para el cual se utilizó la estructura de $\alpha\beta$ -tubulina, esto para determinar los residuos que se encuentran cercanos a los fosfatos del GTP, en la interfase de polimerización entre dos monómeros de EcFtsZ y que podrían participar en la hidrólisis del nucleótido.

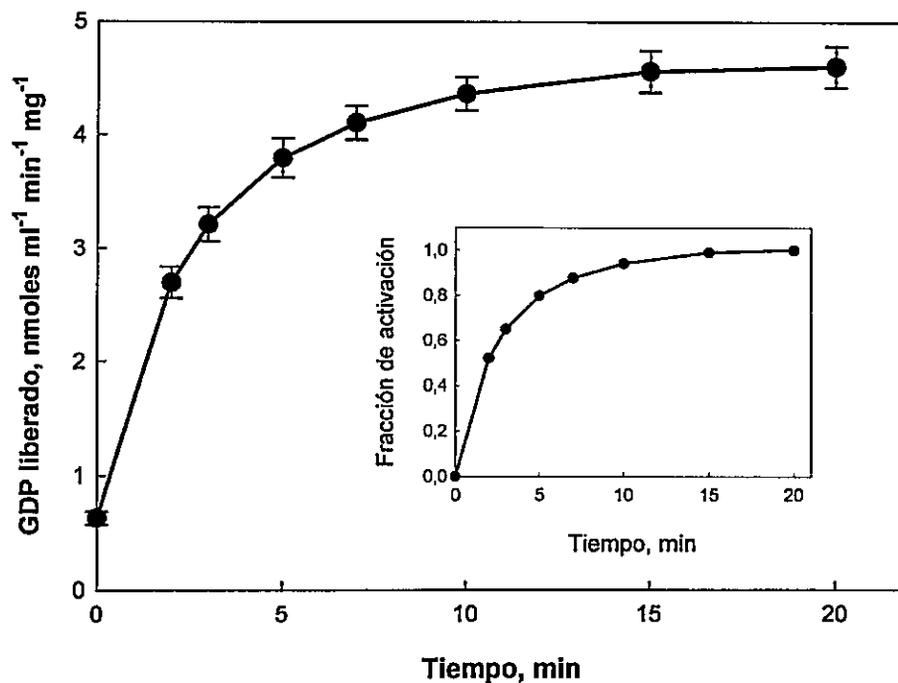


Figura 8. Efecto del tiempo de la digestión de $\alpha\beta$ -tubulina con subtilisina sobre la actividad GTPásica. Se digirieron 2 mg ml^{-1} de tubulina, en una solución que contenía $20 \text{ } \mu\text{g/ml}$ de subtilisina en TEA 10 mM , $0,2 \text{ mM}$ de CaCl_2 y glicerol 25% a $\text{pH } 7,2$, incubada a 30° C . La reacción se detuvo con PMSF a distintos tiempos, y la actividad GTPásica se midió como está descrito en Métodos. Se graficó la velocidad inicial de la actividad GTPásica *versus* el tiempo de digestión.

Determinación del mecanismo e inducción de la hidrólisis del GTP en EcFtsZ

Modelo de la estructura tridimensional de EcFtsZ

Un modelo de la estructura tridimensional de la EcFtsZ se construyó mediante modelamiento por homología. Se utilizó como molde la estructura de la MjFtsZ, disponible en la base de datos PDB con el nombre 1FSZ.pdb (Lowe y Amos, 1998) .

La construcción de un modelo por homología implica tres etapas. Primero, se requiere una proteína homóloga con estructura tridimensional resuelta, para utilizarla como molde. Segundo, se debe realizar un alineamiento entre la secuencia problema y la secuencia de la proteína molde para asignar los aminoácidos que serán estructuralmente equivalentes entre ambas. Finalmente, se genera un modelo tridimensional para la secuencia problema sobre la base en la estructura de la proteína molde.

Para el alineamiento de la secuencia de MjFtsZ con la EcFtsZ se utilizó el programa Clustal, las proteínas presentaron un 43% de identidad de secuencia, el alineamiento se muestra en la figura 9.

A partir del alineamiento de la EcFtsZ con su molde, la estructura de la proteína fue modelada mediante el uso del programa Modeller 6.0 La superposición de los modelos se muestra en la figura 10 A, en la superposición estructural de los cinco modelos se observa, en algunas secciones, una variabilidad posicional (AVP) de la cadena polipeptídica de los distintos modelos, debido a un menor peso de las restricciones impuestas por el programa Modeller 6.0, pues en

estas secciones la similitud entre las secuencias de la MjFtZ y EcFtsZ sería muy baja. El índice $p(G)$, o probabilidad de un plegamiento correcto fue de 0,999 para todos los modelos. La figura 10 B muestra el puntaje promedio para del perfil 3D versus 1D, que generó el programa Verify 3D (Luthy y col., 1992), que fue mayor que 0,1 para el 97 % de las posiciones de secuencia. El modelo que se obtuvo es correcto pues presenta valores óptimos, para todos los parámetros de evaluación que se utilizaron.

ftsZ1	11		DAVIKV	IGVGGGGGNA	VEHMRERIE	GVEFFAVNTD
1fsz	23	SPEDKELLEY	LQOTKAKITV	VGCGGAGNNT	ITRLKMEGIE	GAKTVAINTD
			* * *	. * * * . * *	. . . * * * *	* . * * *
ftsZ1	47	AQALRKTAVG	QTIQIGSGIT	KGLGAGANPE	VGRNAADER	DALRAALEGA
1fsz	73	AQQLIRTKAD	KKILIGKCLT	RGLGAGGNPK	IGEEAAKESA	EEIKAAIQDS
		** * *	* * *	. * * * * *	. * * * *	. . . * * * . .
ftsZ1	97	DMVFIAAGMG	GGTGTGAAPV	VAEVAKDLGI	LTVAVVTKPF	NFEGKKRMAF
1fsz	123	DMVFITCGLG	GGTGTGSAPV	VAEISKKIGA	LTVAVVTLPF	VMEGKVRMKN
		***** . * *	***** . * *	***** . * *	***** * *	*** * *
ftsZ1	147	AEQGITELSK	HVDSLITIPN	DKLLKVLGRG	ISLLDAFGAA	NDVLKGAVQG
1fsz	173	AMEGLERLQ	HTDTLVVIPN	EKLFEIVP-N	MPLKLAFKVA	DEVLINAVKG
		* . * . *	* * * . * *	* * * * * * *	* * * * * *
ftsZ1	227	IAELITRPGL	MNVDFADVRT	VMSEMGYAMM	GSGVASGEDR	AEEAAEMAIS
1fsz	222	LVELITKDGL	INVDFADVKA	VMNNGGLAMI	GIGESDSEKR	AKEAVSMALN
		. * * * . * *	. * * * * * . .	* * * . * * *	* * . * * *	* * * * * *
ftsZ1	277	SPLLEDIDLS	GARGVLVNIT	AGFDLRLDEF	ETVGNTIRAF	ASDNATVVIG
1fsz	272	SPLLD-VDID	GATGALIHVM	GPEDLTLEEA	REVVATVSSR	LDPNATIIVG
		***** . * *	* * * * * . .	* * * * *	* * . . .	***** *
ftsZ1	327	TSLDPDMNDE	LRVTVVATGI	GMDKRPEITL	VTNKQ	
1fsz	321	ATIDENLENT	VRVLLVITGV	QSRIEFTDTG	LKRKKL	
		. . . * * * . * * *	* . . . *	* . *	

Figura 9. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de MjFtsZ y EcFtsZ. Este alineamiento de secuencia fue el utilizado para la construcción del modelo tridimensional de EcFtsZ. La secuencia de MjFtsZ corresponde a la 1fsz. La secuencia de EcFtsZ corresponde a la ftsZ1. El símbolo * corresponde a un aminoácido idéntico en ambas secuencias. El punto indica residuos con propiedades fisicoquímicas conservadas.

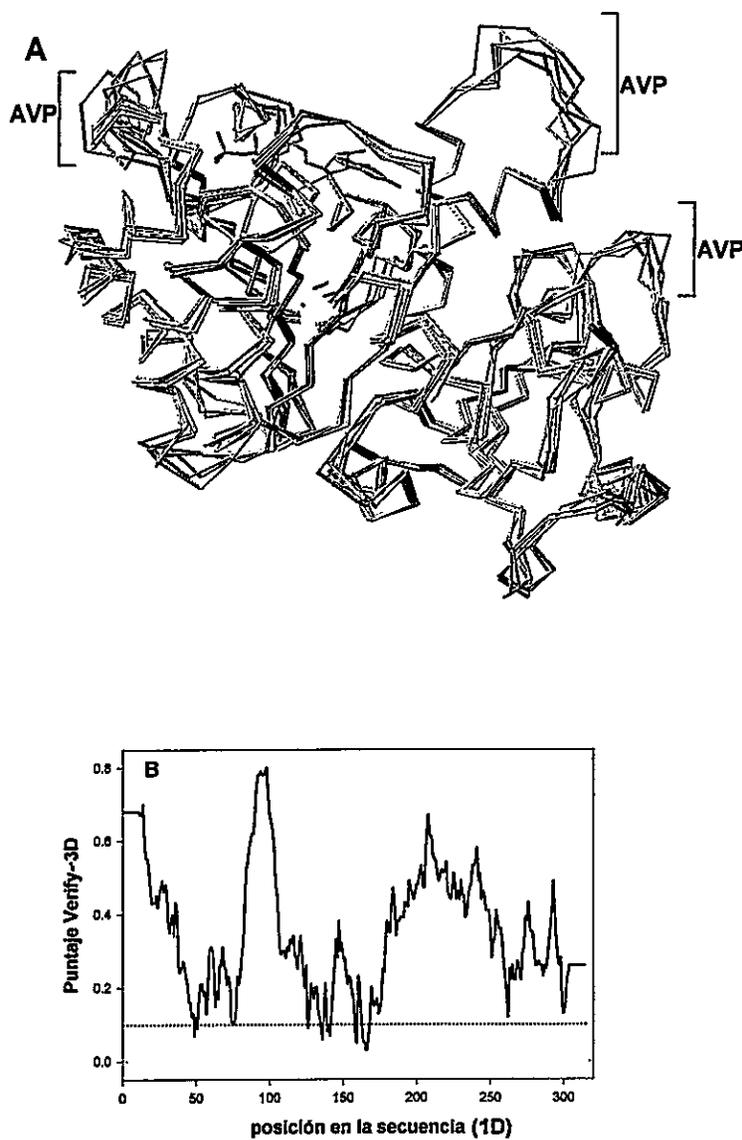


Figura 10. Modelos de la estructura tridimensional de EcFtsZ y su evaluación. A, superposición de la cadena de carbonos α de 5 modelos generados por Modeller 6.0. Se observan algunas secciones con una alta variabilidad posicional (AVP). B Perfil de la evaluación del plegamiento mediante el programa Verify 3D. La línea de puntos indica un puntaje crítico de 0,1 bajo el cual se considera inapropiado.

Importancia de los aminoácidos conservados en la familia de FtsZ en la hidrólisis de GTP

Se buscaron residuos de aminoácidos conservados y comunes en el sitio de unión al nucleótido en MjFtsZ y $\alpha\beta$ - tubulina (Lowe, 1998; Nogales y col., 1998b) y en el modelo de EcFtsZ, con un procedimiento de alineamiento múltiple con otras secuencias de FtsZ. Se encontró una glutamina conservada en la posición 74 de MjFtsZ, que es equivalente a la glutamina en posición 47 del modelo de EcFtsZ, el fragmento de la secuencia que contenía este aminoácido se muestra en la figura 11 A. Se postula que este residuo podría ser el que posiciona una molécula de agua para realizar el ataque nucleofílico que rompe el enlace anhidro entre el fosfato gama y el fosfato beta del GTP (Bourne y col., 1991). La cercanía del residuo conservado de glutamina en la estructura tridimensional de EcFtsZ se observa en la figura 11 B. Para probar esto, se mutó la glutamina 47 por asparragina en EcFtsZ (EcFtsZ Q47N), pues se conoce en detalle la relación entre la actividad GTPasa y la polimerización. Por otro lado, es fácil probar el efecto de esta mutación sobre la viabilidad de la célula y se puede homologar el mecanismo a la familia de las tubulinas.

La secuencia del gen de EcFtsZ Q47N mostró la presencia sólo de esta mutación.

La inducción de la actividad GTPásica estaría mediada por la interacción del residuo aspartato 238 del lazo T7 con el bolsillo nucleotídico de otro monómero de MjFtsZ (Nogales y col., 1998a). En la figura 12 A se observa que este

residuo es equivalente al residuo aspártico 212 en *E. coli*, que se encuentra conservado en la familia de FtsZ.

En la figura 12 B se muestra en el modelo del dímero de EcFtsZ, el que se construyó a partir del modelo de EcFtsZ y la estructura tridimensional de $\alpha\beta$ -tubulina. En la interfase del dímero de EcFtsZ, se observa que el residuo D212 del monómero de arriba está sobre el sitio de GTP, a una distancia de 5 Å del fosfato beta de GTP del monómero de abajo.

El alineamiento de secuencias aminoácídicas, mostró que existe un residuo ácido en α -tubulina (ácido glutámico 254), en una posición equivalente al D212 de EcFtsZ. Como se explicó anteriormente, las proteínas $\alpha\beta$ -tubulina y EcFtsZ inmovilizadas presentan actividad GTPásica. Por este hecho se propuso que este residuo es responsable, más bien, de la activación de la hidrólisis de GTP, cuando se produce la polimerización de protofilamentos inducidos por el GTP, que de la catálisis propiamente tal. Se debe señalar que esta mutante ya ha sido caracterizada (Dai y col., 1994; Mukherjee y col., 2001) pero la información es contradictoria. Experimentos preliminares de α -tubulina recombinante mutada en el ácido glutámico 254 muestran que ésta no es funcional en oocitos de pez cebra (César Díaz, resultados no publicados).

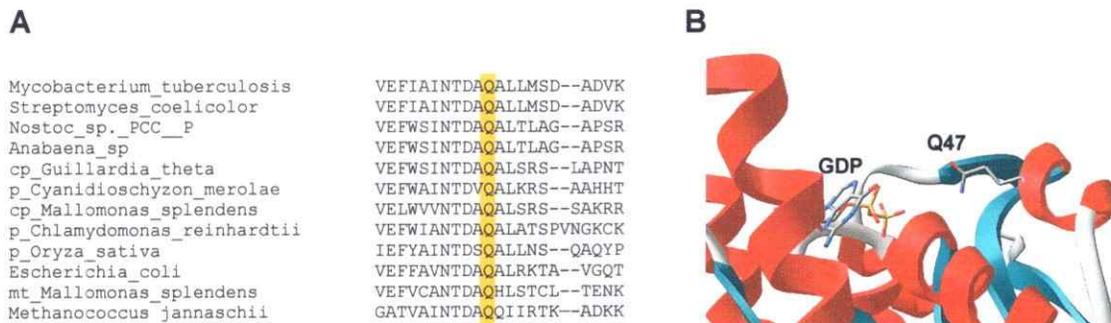


Figura 11. Conservación de la glutamina 47 en la familia de FtsZ y su participación en la catálisis. En A se muestra el alineamiento múltiple de la secuencia aminoacídica de algunos miembros de la familia de las FtsZ alrededor de la glutamina conservada que se destaca en amarillo. En B se muestra el sitio activo de la EcFtsZ, se observa la glutamina 47 y el GDP.

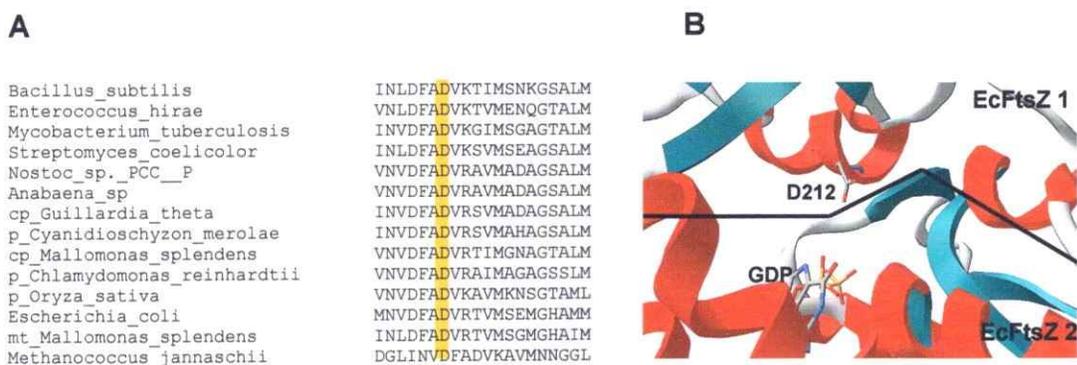


Figura 12. Conservación del ácido aspártico 212 en la familia de FtsZ y su participación en la catálisis. En A se muestra el alineamiento múltiple de la secuencia aminoacídica de algunos miembros de la familia de las FtsZ alrededor del ácido aspártico conservado que se destaca en amarillo. En B se muestra el modelo del dímero de EcFtsZ, se observa el sitio de GDP en la interfase entre dos monómeros (EcFtsZ 1 y EcFtsZ 2) y el ácido aspártico 212 y el GDP.

Purificación de EcFtsZ silvestre y de las mutantes EcFtsZ Q47N y EcFtsZ D212G

Se purificaron estas proteínas, como se describe en Métodos. La pureza de las proteínas se verificó por geles de poliacrilamida con SDS. Los geles de poliacrilamida en presencia de SDS de EcFtsZ silvestre y de las mutantes EcFtsZ Q47N y EcFtsZ D212G se muestra en la figura 13 A. Un duplicado del gel de poliacrilamida en presencia de SDS se transfirió a una membrana de nitrocelulosa y se hizo un "Westernblot", que se reveló con un suero anti-EcFtsZ de conejo. El inmunoblot se muestra en la figura 13 B. Los resultados muestran que las proteínas purificadas son homogéneas y corresponderían a EcFtsZ silvestre, EcFtsZ Q47N y EcFtsZ D212G, pues dieron positivo al ser reveladas con el suero anti-EcFtsZ.

La FtsZ endógena que copurifica con las proteínas mutantes no es posible distinguirla en el gel de SDS-poliacrilamida. No obstante suponemos que la presencia de EcFtsZ silvestre es realmente mínima en las preparaciones de las mutantes, por lo tanto la contribución de la proteína silvestre, en los análisis de polimerización e hidrólisis del nucleótido, sería despreciable. Esta afirmación se basa en lo siguiente, el gen mutante de EcFtsZ está inserto en un plasmidio de alto número de copias (mayor a 20 copias), por lo tanto la proporción mutante/silvestre debería ser al menos de 20 veces, y como el gen de la EcFtsZ plasmidial está bajo el control de uno de los promotores más activos encontrados en la naturaleza (el promotor de la RNA polimerasa del fago T7).

Entonces los niveles de expresión de EcFtsZ mutantes sobre la silvestre deberían aumentar al menos un orden de magnitud.

Para comprobar esta suposición se tituló por inmunoblot, la EcFtsZ constitutiva presente en BL21 y la EcFtsZ sobreexpresada. El resultado mostró que la sobreexpresada tiene un título mayor a la constitutiva entre 64 y 128 veces, por lo tanto la contribución de EcFtsZ tipo silvestre que copurifica con las mutantes debe ser cercano al 1 % (Datos no mostrados).

Determinación del contenido de estructura secundaria de EcFtsZ, EcFtsZ Q47N y EcFtsZ D212G

Se efectuó la caracterización de las estructuras secundarias y terciarias de las mutantes EcFtsZ Q47N y EcFtsZ D212G, pues cualquier efecto sobre la función podría ser consecuencia de un cambio estructural. Para determinar la participación de las propiedades específicas de un residuo aminoacídico en la actividad GTPásica de la EcFtsZ se debe demostrar que la estructura tridimensional de la proteína no ha sido afectada por la mutación.

Para evaluar el contenido de estructura secundaria de EcFtsZ, EcFtsZ Q47N y EcFtsZ D212G se tomaron los espectros de dicroísmo circular. Esta metodología es buena para hacer análisis comparativo del contenido de estructura secundaria y en este caso se compararon los contenidos de estructura secundaria de la proteína silvestre y de las mutantes puntuales. Los espectros de dicroísmo circular de EcFtsZ, EcFtsZ Q47N y EcFtsZ D212G se muestran en la figura 14 A. Se observa que todos ellos presentaron

prácticamente el mismo espectro, con una forma clásica para una proteína con un plegamiento del tipo α/β . Las fracciones de contenidos de estructura secundaria se muestran en la figura 14 B. Las fracciones para cada tipo de estructura secundaria son los mismos en las mutantes, y en la proteína silvestre, por lo tanto podemos afirmar que las mutaciones introducidas no afectan la estructura secundaria de la proteína.

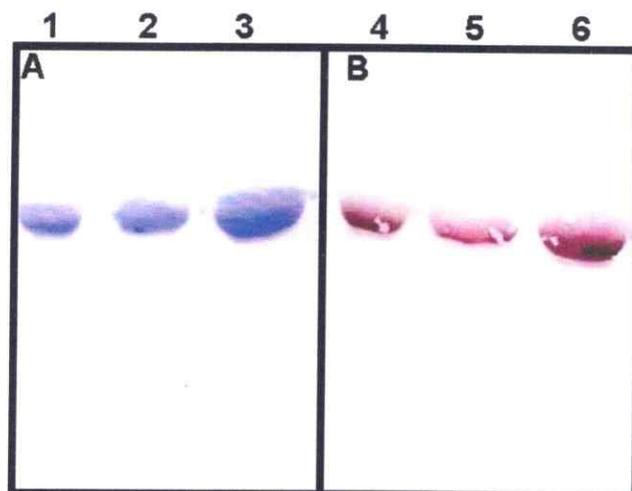


Figura 13. (A) Gel SDS-PAGE y (B) "Westernblot" de la EcFtsZ tipo silvestre y de las mutantes. La electroforesis y las reacciones de inmunoblotting contra un suero policlonal de conejo anti-FtsZ, se llevaron a cabo como se describe en Materiales y Métodos. **A**, Las muestras analizadas en los primeros tres carriles fueron: 1, EcFtsZ tipo silvestre; 2, EcFtsZ Q47N; 3, EcFtsZ D212G. Un duplicado de este gel se utilizó para la transferencia a la membrana de nitrocelulosa. En **B**, las muestras analizadas por inmunoblotting que corresponden a 4, EcFtsZ tipo silvestre; 5, EcFtsZ Q47N; 6, EcFtsZ D212G.

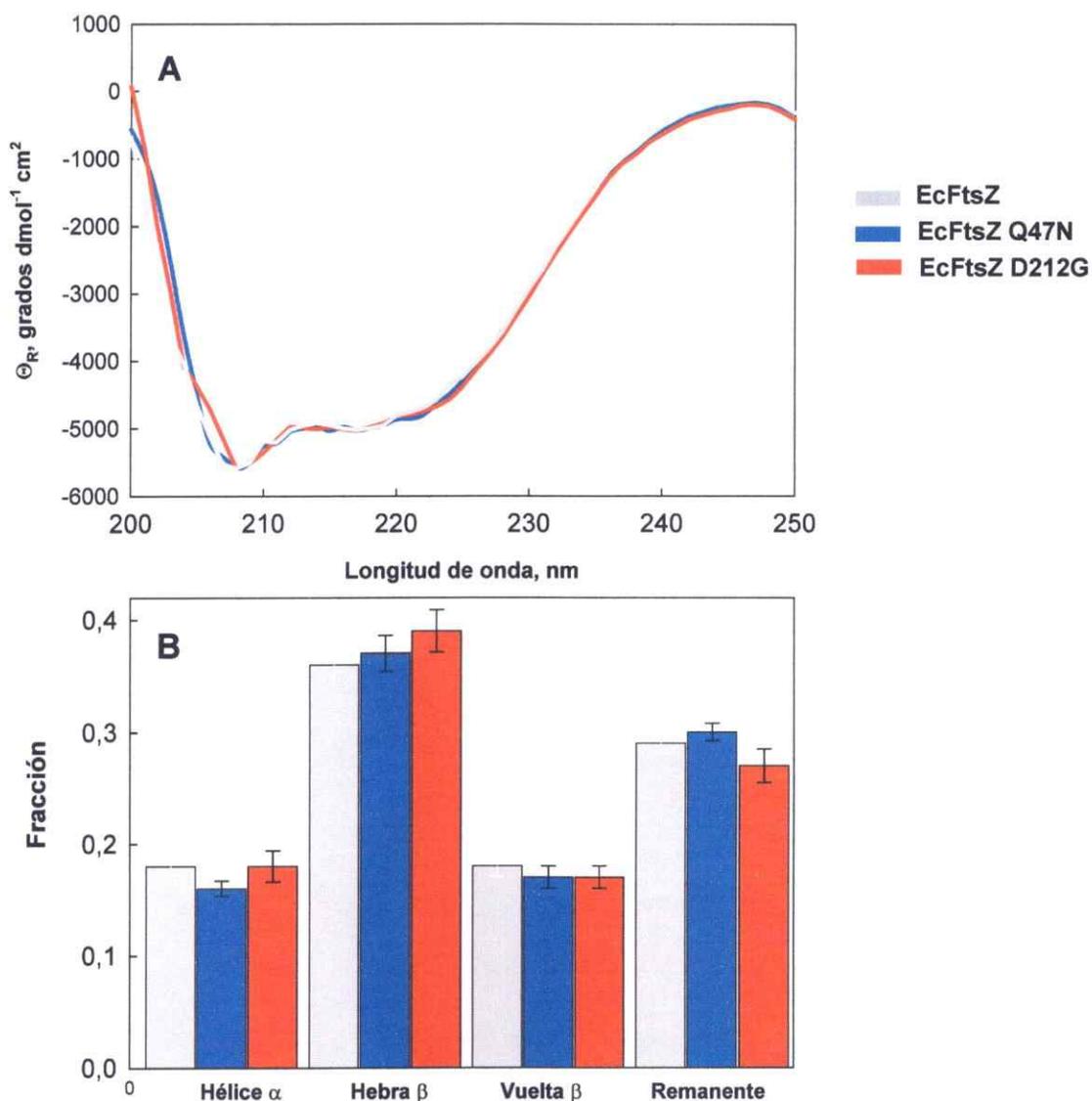


Figura 14. Contenido de estructura secundaria de EcFtsZ, EcFtsZ Q47N y EcFtsZ D212G. En A se observan los espectros de dicroísmo circular de EcFtsZ y las mutantes señaladas. Los espectros se tomaron en Tris 10 mM pH 7,5 , a temperatura ambiente, la concentración de proteína fue de 0,3 mg/ml. En B se observan las fracciones de estructura secundaria para cada una de las proteínas, calculadas a partir del espectro de dicroísmo circular. Para el cálculo se utilizó el programa CONTIN.

Caracterización de la estructura terciaria de EcFtsZ tipo silvestre y de las mutantes EcFtsZ Q47N y EcFtsZ D212G

Las mutantes EcFtsZ Q47N y EcFtsZ D212G tienen el mismo contenido de estructura secundaria, pero no podemos afirmar que la estructura terciaria de estas proteínas mutantes sea la misma de la proteína silvestre. Diferencias en las propiedades funcionales de las mutantes respecto a la silvestre podrían deberse a variaciones en su estructura terciaria.

Estudios de espectroscopia de fluorescencia intrínseca o extrínseca nos permiten determinar si la estructura terciaria de una mutante alrededor de un triptófano está o no alterada respecto a la silvestre. Así, el triptófano ha sido usado como una sonda fluorescente intrínseca, donde las medidas de intensidad, rendimiento cuántico y tiempo de vida permiten comprobar el ambiente que rodea al triptófano en la proteína silvestre y en las mutantes y de este modo demostrar si la estructura terciaria de las mutantes es igual al de la proteína silvestre. Desgraciadamente la EcFtsZ tipo silvestre no posee triptófanos en su estructura primaria, por lo que no es posible realizar este análisis. Por esto, el uso de una sonda fluorescente extrínseca que se una a una región específica permitiría comparar las propiedades de unión de la sonda en la proteína silvestre y sus mutantes. Si se produce una variación en la estructura terciaria por efecto de la mutación puntual, el sitio de unión de la sonda se modificaría, presentando una afinidad distinta con respecto a la que presenta la EcFtsZ tipo silvestre.

La sonda DAPI se une a $\alpha\beta$ -tubulina y como se sabe esta proteína es homóloga a EcFtsZ. Los resultados mostraron, por primera vez, que DAPI se une a EcFtsZ silvestre y a las mutantes EcFtsZ Q47N y EcFtsZ D212G. Los valores de las constantes de unión fueron determinadas por anisotropía de fluorescencia (Lakowicz, 1999), se resumen en la Tabla 2. Se observa que la unión de DAPI a las tres proteínas presentó una $K_{0,5}$ del orden de 10^{-6} M. Una energía libre de unión similar de DAPI a EcFtsZ tipo silvestre y a las mutantes EcFtsZ Q47N y EcFtsZ D212G, indica que la estructura terciaria alrededor del sitio de unión de la sonda, de estas tres proteínas, no se afectaron significativamente por la mutación puntual. Por lo tanto, los cambios funcionales observados en las mutantes son consecuencia del efecto local de la mutación en el sitio de unión del nucleótido.

Tabla 2. Constantes de unión aparente del DAPI a EcFtsZ silvestre y a las mutantes EcFtsZ Q47N y EcFtsZ D212G

Proteína	$K_{0,5}$ μ M
EcFtsZ	$3,2 \pm 0,3$
Ec FtsZ Q47N	$7,7 \pm 1$
EcFtsZ D212G	$2,6 \pm 0,3$

Caracterización de la polimerización de EcFtsZ tipo silvestre y de las mutantes EcFtsZ Q47N y EcFtsZ D212G *in vitro*.

La primera propiedad funcional que se midió a estas mutantes fue la capacidad de polimerizar en presencia de GTP. En la figura 15 se muestran las cinéticas de polimerización. En la figura 15 A se muestran las curvas de polimerización a diferentes concentraciones de la EcFtsZ tipo silvestre. Se observa que la dispersión de luz aumentó abruptamente cuando se agregó el GTP y alcanzó un máximo en "overshoot", disminuyó y que se mantuvo estable hasta los 160 segundos. El valor de la dispersión en la zona estable aumentó proporcionalmente con la concentración de EcFtsZ.

La cinética de polimerización a diferentes concentraciones de la proteína mutante EcFtsZ Q47N, se muestra en la figura 15 B. La línea base se siguió durante 2 min, antes de agregar GTP. Se observa que la curva de polimerización de esta proteína presentó un período de latencia y alcanzó un nivel máximo de dispersión de luz similar al de la proteína silvestre a concentraciones más altas.

Los tiempos de latencia fueron inversamente proporcionales a la concentración de proteína. Es decir en la medida que se aumentó la concentración para esta mutante, el período de latencia disminuyó. Esto indica que existirían varias etapas en la cinética de polimerización. El inicio de la polimerización de la mutante EcFtsZ Q47N podría pasar por una etapa de nucleación, lo

suficientemente lenta para observarla, lo que no ocurre con la EcFtsZ silvestre, donde la etapa inicial es muy rápida.

La cinética de polimerización de la mutante EcFtsZ D212G se muestra en la figura 15 C. Se observa que la polimerización inducida por GTP ocurre en un tiempo muy similar al de la proteína silvestre. Sin embargo los niveles de dispersión

máximos alcanzados fueron mucho más bajos que los de la proteína silvestre y de la mutante EcFtsZ Q47N. Esto indica que el residuo modificado tendría un papel importante en la polimerización.

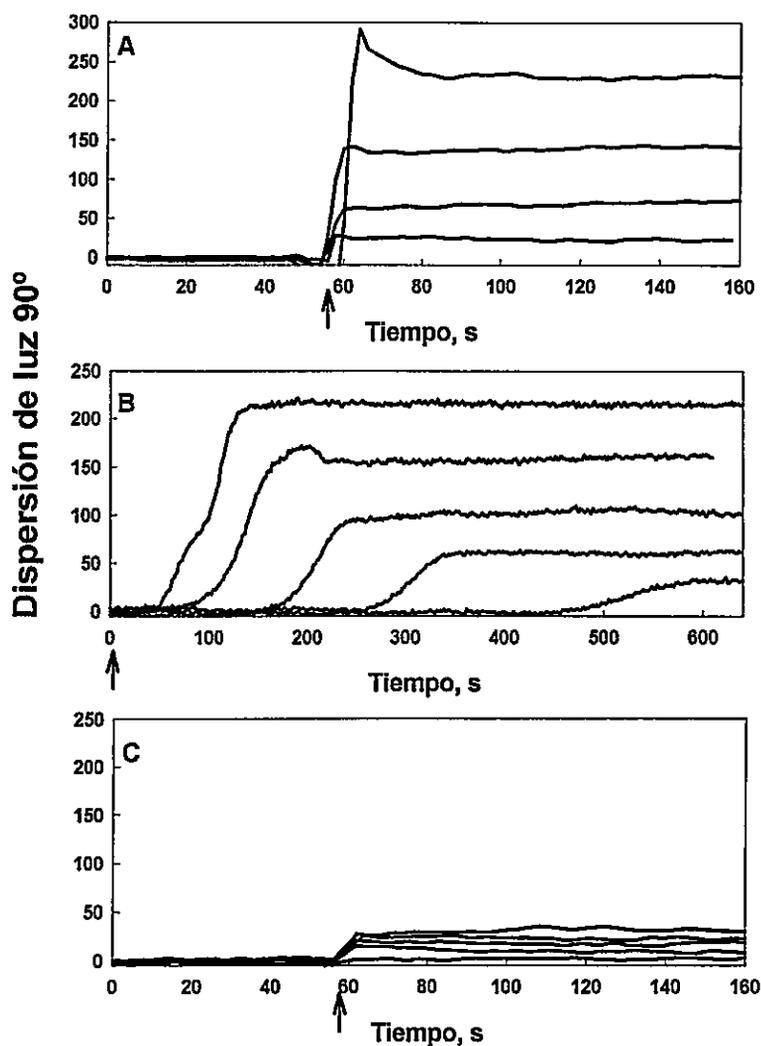


Figura 15. Efecto de la concentración de EcFtsZ silvestre y mutantes sobre la polimerización inducida por GTP. La polimerización de EcFtsz y sus mutantes se midió por dispersión de luz ($\lambda=350$ nm) a 90° . Todas las reacciones de polimerización se llevaron a cabo en MES 50 mM, KCl 50 mM, $MgCl_2$ 10 mM, la temperatura de incubación fue $30^\circ C$. La concentración final de GTP fue de 1 mM, para todas las curvas. El momento en que se agregó GTP esta indicado con una flecha. (A) EcFtsZ tipo silvestre las concentraciones usadas fueron 2, 5, 7,5, 12,5 μM . (B) EcFtsZ Q47N las concentraciones usadas fueron 12, 16, 18, 20, 25 μM . (C) EcFtsZ D212G, las concentraciones usadas fueron 8, 12,5, 15, 20, 22 y 25 μM

Determinación de la concentración crítica de EcFtsZ tipo silvestre y de las mutantes EcFtsZ Q47N y EcFtsZ D212G

La concentración crítica es la concentración mínima requerida para la formación de polímeros. En la figura 16 se observa que al graficar la máxima dispersión de luz en función de la concentración de proteína, se obtuvo una relación lineal y todas las curvas intersectan el eje X a valores positivos. El valor de la concentración crítica se determinó desde los valores de la intersección con este

eje. Se observa que el valor para la EcFtsZ silvestre, fue menor que para las mutantes EcFtsZ Q47N y EcFtsZ D212G. Los valores de la concentración crítica se muestran en la Tabla 3.

Los resultados de la figura 16 también muestran que las rectas para EcFtsZ silvestre y EcFtsZ Q47N tienen pendientes similares, lo que indicaría que los polímeros formados por estas proteínas son similares. La pendiente para la mutante EcFtsZ D212G fue menor, lo que indica un cambio en la cantidad, la forma o en el largo de los polímeros formados por la mutante D212G respecto a los formados por EcFtsZ tipo silvestre y la mutante EcFtsZ Q47N.

Caracterización de la hidrólisis de GTP de la EcFtsZ silvestre y de las mutantes EcFtsZ Q47N y EcFtsZ D212G

La otra propiedad funcional que se determinó fue la dependencia de la concentración de sustrato para la hidrólisis de GTP. Las curvas de saturación se muestran en la figura 17, donde se observa que las tres proteínas analizadas

mostraron un comportamiento hiperbólico. A partir de estas curvas se determinaron los valores de K_m y k_{cat} , que se muestran en la Tabla 3.

Se observa que para las mutantes la K_m aumenta y la k_{cat} disminuye, respecto a la EcFtsZ silvestre. Esto hace que se produzca una disminución de la especificidad (k_{cat}/K_m). Así este valor disminuye aproximadamente a un 1/40 para EcFtsZ Q47N y a un 1/107 para EcFtsZ D212G respecto a los valores de EcFtsZ tipo silvestre.

Si comparamos los valores de K_m y k_{cat} y si recordamos que $K_m = (k_{-1} + k_2)/k_1$ y que la velocidad de difusión de un sustrato para unirse a una enzima oscila entre 10^6 a $10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Eigen y Hammes, 1963; Monasterio, 2001), los valores de k_{-1} oscilan por lo general entre 10^2 a 10^4 s^{-1} (Fersht, 1999), la constante de disociación de GTP es aproximadamente 1×10^{-5} (Dai y col., 1994), por lo tanto k_2 debería oscilar entre 10 y 1000 s^{-1} para la FtsZ silvestre. Por lo tanto, podemos afirmar que $k_{-1} \gg k_2$ y la K_m se asemejaría a la constante de disociación del complejo.

Tabla 3. Valores de concentración crítica (Cr), K_m y k_{cat} para EcFtsZ, EcFtsZ Q47N y EcFtsZ D212G.

	Cr (μM)	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{s}^{-1}\text{M}^{-1}$)
EcFtsZ	$2 \pm 0,3$	35 ± 3	$(3 \pm 0,3) \times 10^{-2}$	857 ± 40
EcFtsZ Q47N	$10 \pm 0,6$	97 ± 4	$(2 \pm 0,2) \times 10^{-3}$	21 ± 1
EcFtsZ D212G	$8 \pm 0,3$	430 ± 20	$(3,5 \pm 0,4) \times 10^{-3}$	$8 \pm 0,5$

Este análisis indica que la mutación D212G afecta más la afinidad del nucleótido a la proteína (K_m aumenta aproximadamente 12 veces respecto al valor de EcFtsZ) y que la catálisis (k_{cat} disminuye a un 1/9 respecto al valor para EcFtsZ) y la mutación Q47N afecta menos la afinidad del nucleótido (K_m aumentó aproximadamente 3 veces respecto al valor de EcFtsZ) que la catálisis (k_{cat} disminuye aproximadamente un 1/16 respecto al valor de EcFtsZ).

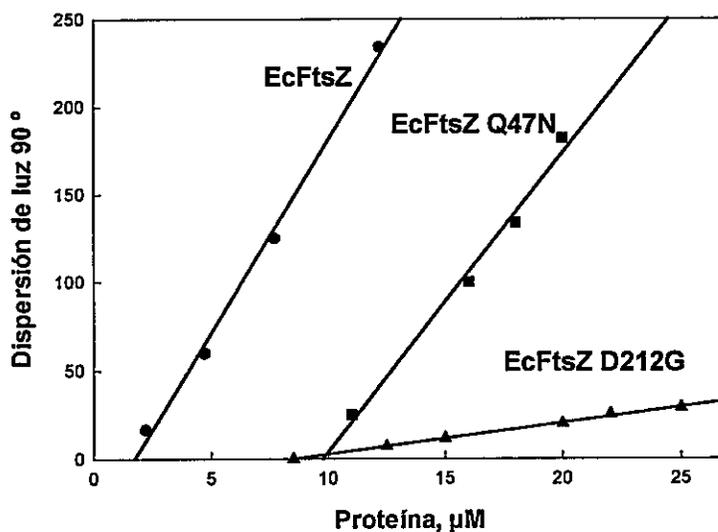


Figura 16. Determinación concentración crítica de EcFtsZ, EcFtsZ Q47N y EcFtsZ D212G. Cada punto representa el máximo de dispersión de la luz producido por la polimerización de la proteína a las diferentes concentraciones de proteínas utilizadas. La intersección con la abcisa corresponde a la mínima concentración necesaria para que ocurra la polimerización. La concentración final de GTP fue 1 mM. EcFtsZ (●), EcFtsZ Q47N (■) las concentraciones usadas fueron 12, 16, 18, 20, 25 μM y EcFtsZ D212G (▲).

El progreso de la hidrólisis de GTP y la cinética de la polimerización y despolimerización de EcFtsZ silvestre y de las mutantes EcFtsZ Q47N y EcFtsZ D212G se determinaron en forma simultánea. En la figura 18 se muestran los resultados de estos experimentos. En la figura 18 A, se indica con una flecha el momento en que se agregó GTP a una concentración final de 1 mM. En la figura 18 A se muestra le EcFtsZ tipo silvestre a una concentración de 12,5 μM , se observa que la cinética de la polimerización es muy rápida y se alcanza un valor máximo que decae lentamente hasta aproximadamente los 8 minutos y allí se observa un aumento exponencial de la velocidad de despolimerización. El progreso de la hidrólisis de GTP presenta dos fases, una rápida que coincide con la presencia de los polímeros y una más lenta (con una pendiente de 11 $\text{nmoles ml}^{-1} \text{ min}^{-1}$), que se inicia aproximadamente cuando se ha alcanzado un 80 % de la despolimerización y perdura aún cuando la dispersión de luz a llegado a cero. Este resultado es consistente con la inducción de la actividad GTPásica por la interacción longitudinal de EcFtsZ en los polímeros (primera fase) e indica que la proteína despolimerizada aún presenta actividad GTPásica en presencia de GDP.

En la figura 18 B se observa que al inducir con GTP la polimerización de la mutante EcFtsZ Q47N a una concentración de 10 μM , la velocidad de polimerización es menor que la de la tipo silvestre y se produce una drástica disminución del máximo de la dispersión de luz, que alcanza alrededor de un 10 % respecto a la proteína silvestre. Se observa un período de latencia de la polimerización y no hay despolimerización hasta los 60 minutos de registro. La

hidrólisis de GTP también presenta un período de latencia que coincide con el anterior y la velocidad disminuye considerablemente respecto a la proteína silvestre.

En la figura 18 C se observa que el período de latencia desaparece, la velocidad de polimerización es mayor que el de la mutante Q47N y que la polimerización es un poco más baja para la mutante EcFtsZ D212G a una concentración de 25 μ M. La cantidad de GTP hidrolizado en 60 minutos es similar a EcFtsZ Q47N.

Los resultados en su conjunto pueden ser interpretados de la siguiente forma: La polimerización de EcFtsZ induce la actividad GTPásica. La mutación Q47N sólo presenta actividad GTPásica en su estado polimerizado y se afecta la cinética de polimerización y la actividad GTPásica. La mutación D212G afecta principalmente a la polimerización, y como la actividad GTPásica se encuentra asociada, esta presenta una conducta cinética similar a la silvestre, pero de extensión mucho menor.

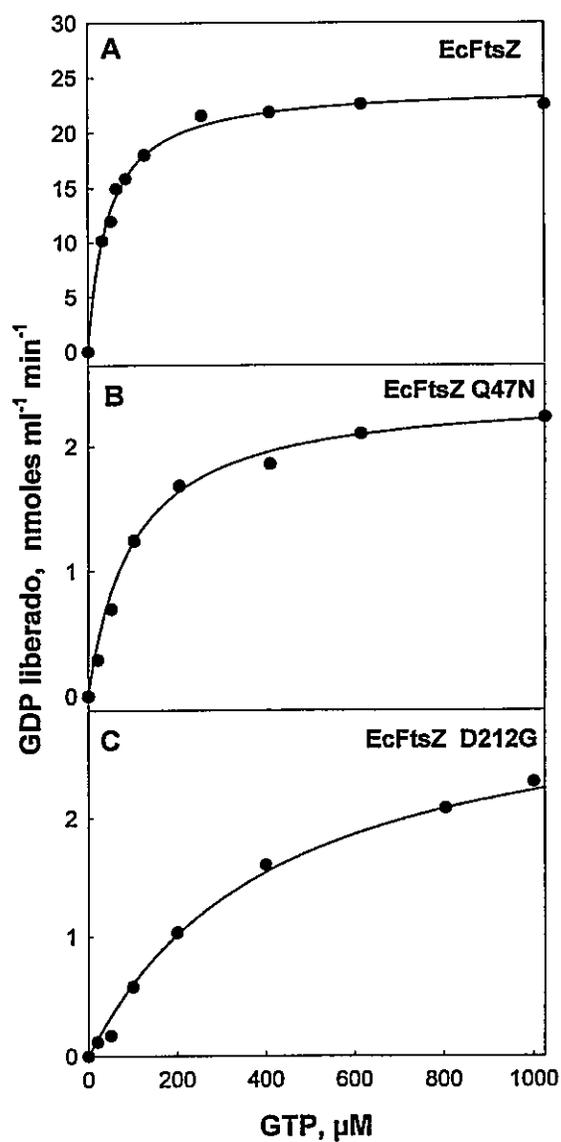


Figura 17. Efecto de la concentración de GTP sobre la velocidad de hidrólisis de EcFtsZ, EcFtsZ Q47N y EcFtsZ D212G. Se determinó la velocidad de hidrólisis de GTP como se describe en Métodos. EcFtsZ 12,5 μM (A), EcFtsZ Q47N 25 μM (B) y EcFtsZ D212G 25 μM (C).

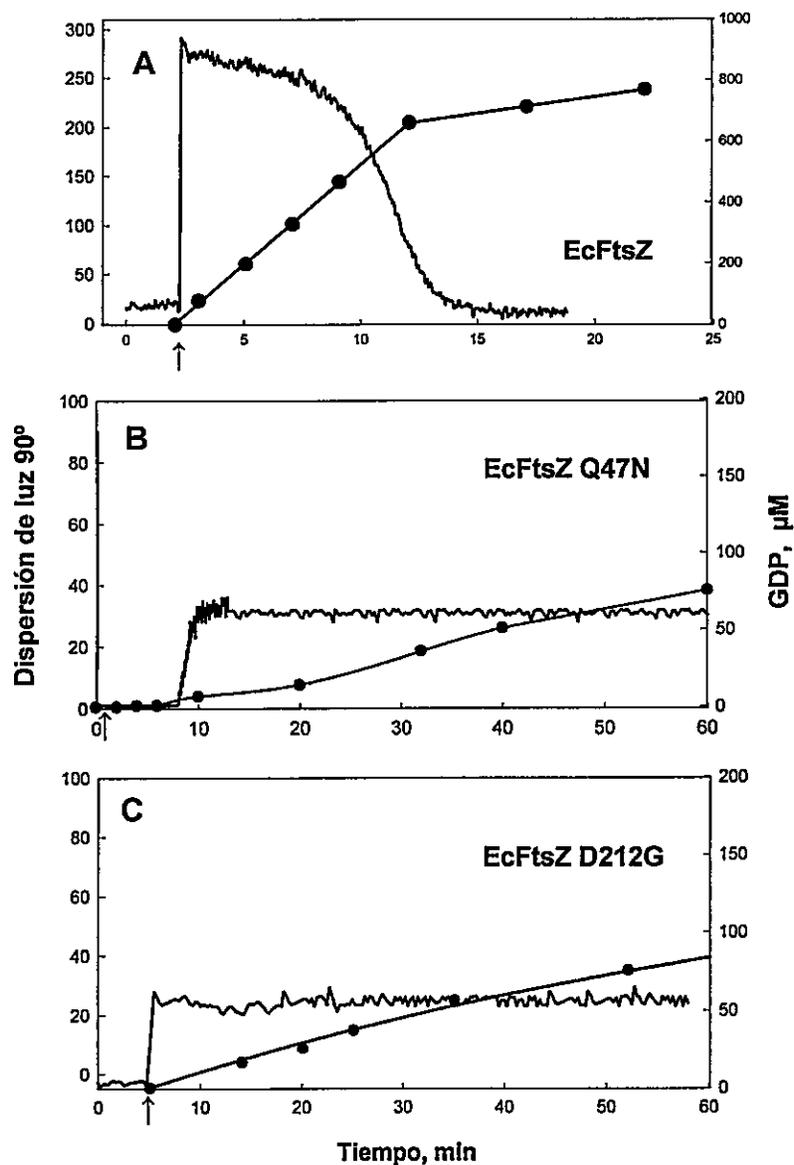


Figura 18. Curva de progreso la hidrólisis de GTP y polimerización de EcFtsZ, EcFtsZ Q47N y EcFtsZ D212G. Se midió en forma paralela, la polimerización de EcFtsZ y las mutantes, a través, de dispersión de luz y la hidrólisis de GTP. La flecha indica el momento cuando se agregó GTP a una concentración final de 1 mM. Se muestra EcFtsZ 12,5 μM en (A), EcFtsZ Q47N 10 μM en (B), EcFtsZ D212G 25 μM en (C).

Viabilidad de células que portan los alelos EcFtsZ Q47N y EcFtsZ D212G

La funcionalidad de EcFtsZ silvestre y las mutantes EcFtsZ Q47N y EcFtsZ D212G se caracterizó por la viabilidad de las células carentes de EcFtsZ y complementadas con EcFtsZ silvestre y las mutantes. Para expresar exclusivamente el gen mutante de *ftsZ*, se construyó la cepa huésped *E. coli* VIP2(DE3), a partir de la cepa *E. coli* VIP.

El resultado de este experimento se muestra en la figura 19. Se determinaron las ufc/ml a 30 °C que representa el número de unidades formadoras de colonias en la condición permisiva y se comparó con las ufc/ml que crecieron a 42°C, que representa el número de formadoras de colonias en la condición restrictiva.

El control positivo del experimento fue la cepa *E. coli* VIP2 (DE3) pMFV57-ftsZ, las ufc/ml a 30° C fueron $(1,02 \pm 0,2) 10^8$. Las ufc/ml a 42° C fue $(1,13 \pm 0,3) 10^7$. El 11,1 % de las células sobrevivió a temperatura restrictiva. El control negativo del experimento fue la cepa *E. coli* VIP2(DE3), las ufc/ml a 30° C fueron $(4,5 \pm 0,6) 10^8$ y las ufc/ml a 42° C fueron $(3,7 \pm 0,5) 10^4$. El 0.008 % de las células sobrevivió a la temperatura restrictiva.

En la cepa *E. coli* VIP2(DE3) pMFV57-ftsZ Q47N, las ufc/ml a 30° C fueron $(1,3 \pm 0,3) 10^8$ y las ufc/ml a 42° C fueron $(1,13 \pm 0,2) 10^7$. El 7,5 % de las células de esta cepa sobrevivieron a la temperatura restrictiva, el valor está dentro del rango observado para el gen tipo silvestre. Esta mutante fue viable, cuando la

proteína mutante FtsZ Q47N se expresó. La cepa *E. coli* VIP2 (DE3) pMFV57-ftsZ D212G, las ufc/ml a 30° C fueron $(1,6 \pm 0,2) 10^8$, las ufc/ml a 42° C fueron $(2,9 \pm 0,6) 10^6$, El 1,8 % de las células sobrevivió. El valor de sobrevivencia para esta cepa, a temperatura restrictiva, fue casi un orden de magnitud menor que el control positivo. Esto indica que esta mutante no es completamente funcional, cuando

se expresa a la temperatura restrictiva. La figura 19 muestra los resultados de sobrevivencia para la EcFtsZ, EcFtsZ Q47N y EcFtsZ D212G a 30°C y 42° C.

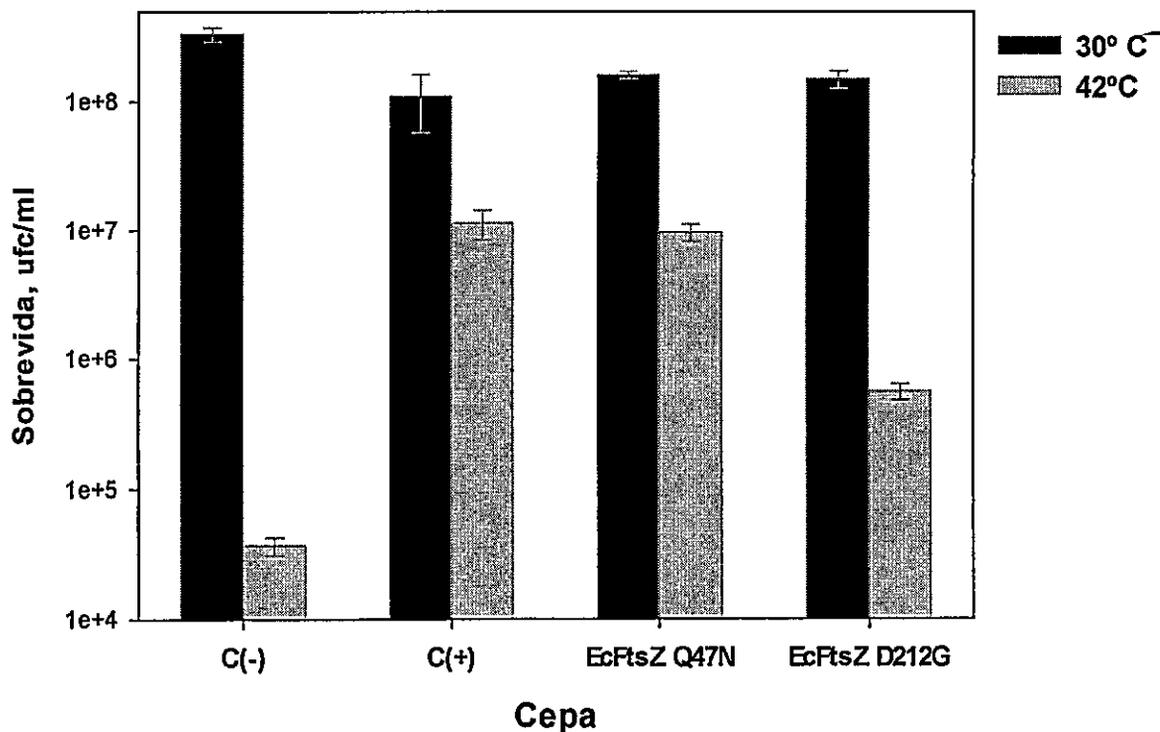


Figura 19. Funcionalidad *in vivo* de EcFtsZ, EcFtsZ Q47N y EcFtsZ D212G. La cepa VIP(DE3) construida en nuestro laboratorio se creció en LB a 30 °C hasta una O.D 600 nm de 0,6. Se plaquearon diluciones seriadas de 10⁻¹ a 10⁻⁶ en una placa agar LB, que se incubó a 42 °C, esta corresponde al control negativo (C-). La cepa VIP(DE3) fue transformada con pMFV57-ftsZ, se creció en LB a 30° C, hasta una O.D. 600 nm de 0,6, se realizaron diluciones seriadas de 10⁻¹ a 10⁻⁶ en una placa agar LB, que se incubó a 42° C, este fue el control positivo (C+). La cepa VIP(DE3) fue transformada con pMFV57-ftsZD212G y pMFV57-ftsZD212G, se creció en LB a 30° C, hasta una O.D. 600 nm de 0,6, se realizaron diluciones seriadas de 10⁻¹ a 10⁻⁶ en una placa de agar LB, que se incubó 42 °C. A partir de la diluciones seriadas se determinó el número de colonias que sobrevive a la temperatura restrictiva de pLAR9 (42° C) .

Caracterización de la unión de DAPI a EcFtsZ

La sonda DAPI ha sido muy útil en el estudio funcional y estructural en $\alpha\beta$ -tubulina (Ortiz y col., 1993). En este trabajo de tesis se demostró que la sonda se unió a la EcFtsZ, por esto se puede utilizar como una sonda para caracterizar la estructura terciaria de las mutantes de EcFtsZ utilizadas en este trabajo, respecto a la EcFtsZ tipo silvestre.

La unión de DAPI a EcFtsZ se determinó por espectroscopia de fluorescencia. La figura 20 muestra los espectros de emisión de fluorescencia de DAPI, en ausencia (A) y presencia de EcFtsZ (B). Se observa un aumento en la intensidad de la fluorescencia y un corrimiento del máximo al azul de aproximadamente 6 nm al triangular los espectros, en el espectro de DAPI en presencia de la proteína. La mayor intensidad en la fluorescencia se debe al aumento en el rendimiento cuántico de DAPI unido a la EcFtsZ, pues las interacciones de la sonda con el solvente se reducen y al excitarse pierde menos energía en choques con el agua, y presenta una mayor intensidad de fluorescencia, cuando está acomplejada con la proteína. El corrimiento hacia el azul se debe a que la sonda en la proteína se encuentra en un ambiente más hidrófobo.

Determinación de la constante de disociación del complejo DAPI-EcFtsZ

Para la determinación de la constante de disociación de DAPI al monómero de EcFtsZ, se utilizó espectroscopia de fluorescencia con luz polarizada, se

determinó el aumento de la anisotropía de la sonda en presencia de concentraciones crecientes de proteína (figura 21). A partir de los valores de anisotropía de la sonda en presencia de las distintas concentraciones de EcFtsZ, se determinaron las concentraciones de DAPI libre y unido a la proteína. Con estos valores se construyó una isoterma de unión (ver Métodos), se hizo un ajuste no lineal de la isoterma, el cual dio como resultado una constante de disociación estándar K^o_d para el complejo DAPI-EcFtsZ de $(1,6 \pm 0,2) \times 10^{-5}$ y un solo sitio de unión. El valor corresponde a un promedio de tres experimentos con su desviación estándar.

Efecto del DAPI sobre la cinética de polimerización y despolimerización de EcFtsZ.

La sonda fluorescente DAPI se une a la proteína EcFtsZ, en su forma polimerizada, como en la forma no polimerizada, con una K^o_d de $1,6 \times 10^{-5}$. La figura 22 muestra que a concentraciones de DAPI mayores a K^o_d , no se afecta la extensión de la polimerización, pero hay un efecto sobre la estabilidad de los polímeros y la velocidad de despolimerización muestra una muy leve disminución. La extensión de la estabilidad de los polímeros se puede explicar por una inhibición de la velocidad de hidrólisis de GTP.

Inhibición de la actividad GTPásica de EcFtsZ por DAPI.

Para evaluar el tipo de inhibición de DAPI sobre la actividad GTPásica de EcFtsZ, se determinó la velocidad inicial de hidrólisis a diferentes concentraciones de DAPI. La figura 23 A muestra que al aumentar la concentración de DAPI hay una disminución de las velocidades máximas. La figura 23 B muestra el gráfico de Dixon y la figura 23 C el gráfico de Cornish-Bowden (Cornish-Bowden, 1995). Ambos gráficos en su conjunto muestran que el comportamiento de la inhibición es de tipo incompetitivo. El valor de la concentración de DAPI en el punto de intersección del gráfico de Cornish-Bowden, que equivale a K_i , fue de $(4,4 \pm 0,5) \times 10^{-5}$ M.

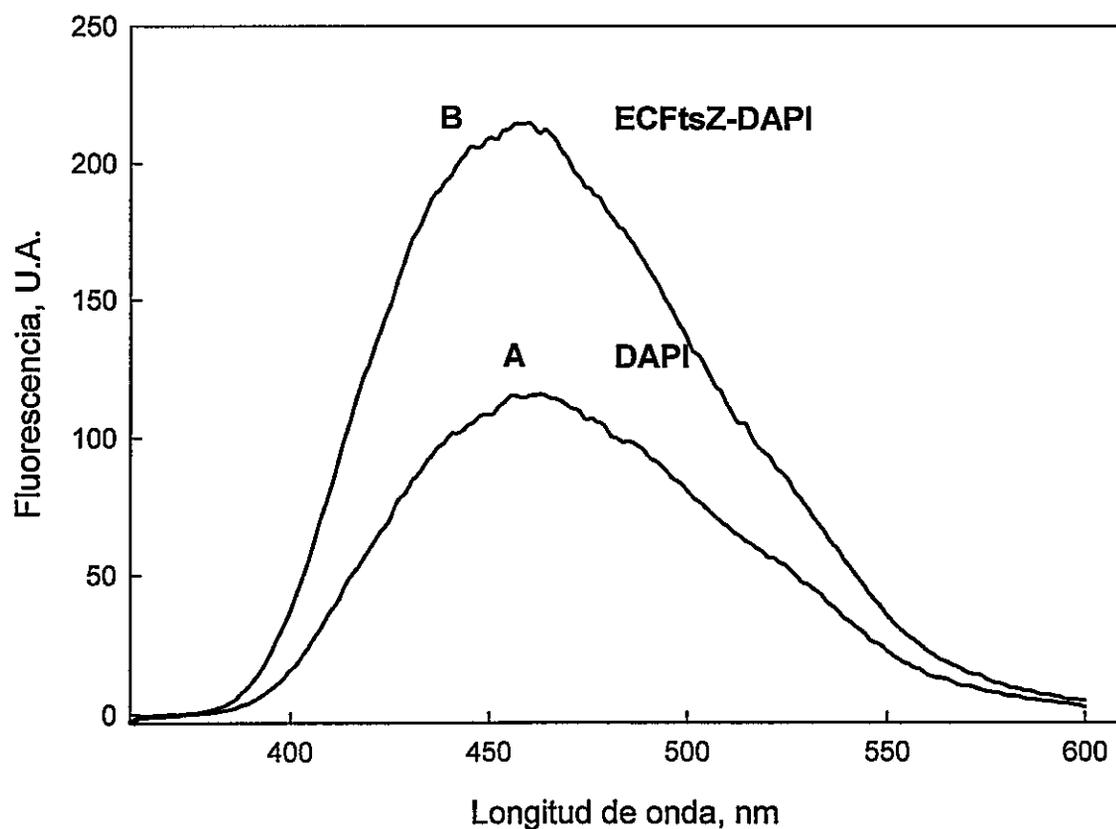


Figura 20. Espectros de emisión de fluorescencia del DAPI en ausencia y presencia de EcFtsZ. Se registró la emisión de fluorescencia entre 360 a 600 nm, con un ancho de banda de emisión y excitación de 5 nm a una longitud de onda de excitación de 350 nm y una concentración de DAPI de 5 μM para el espectro A. El espectro B se registró a una concentración de EcFtsZ de 12,5 μM más DAPI 5 μM .

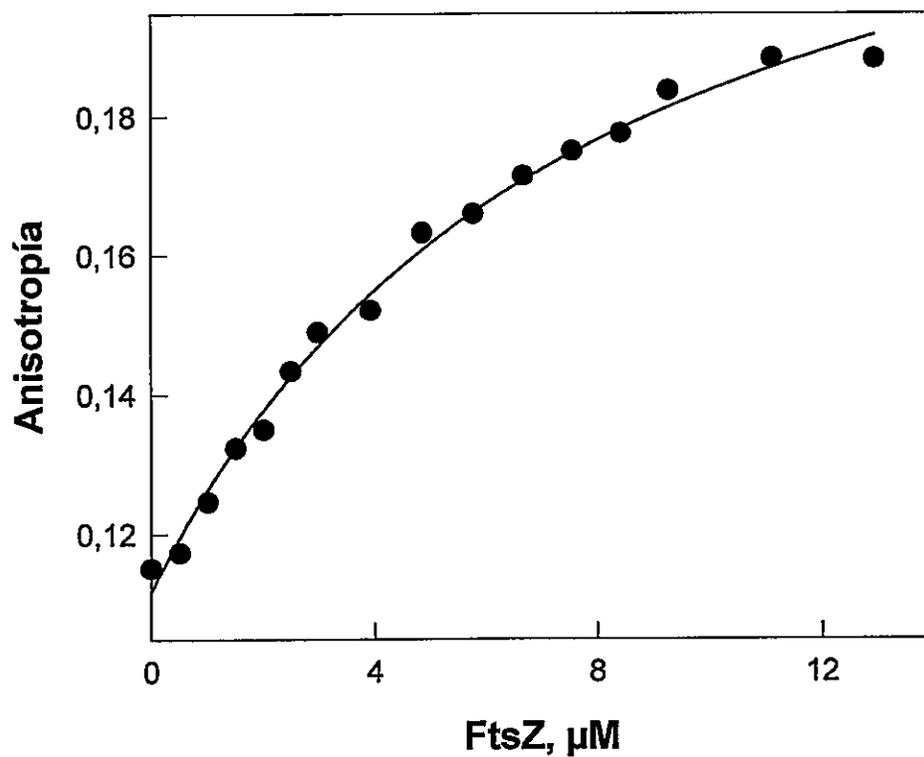


Figura 21. Determinación de la constante de disociación del DAPI y EcFtsZ. Se determinó la anisotropía de DAPI 1 μM en presencia de concentraciones crecientes de EcFtsZ. El medio de incubación se describe en Métodos.

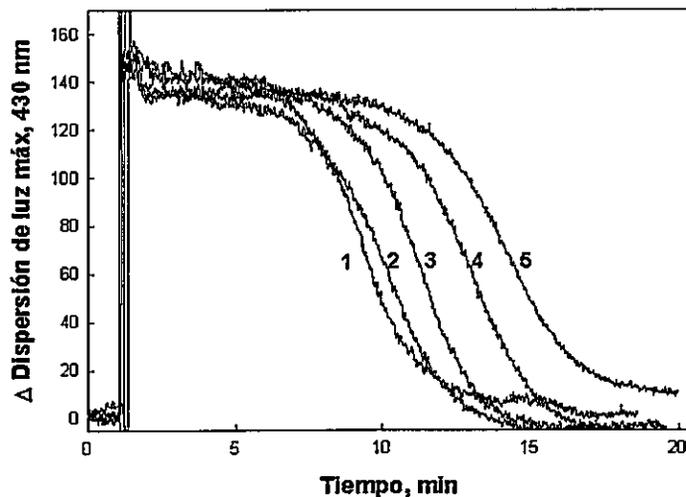


Figura 22. Efecto del DAPI sobre la polimerización de EcFtsZ. La EcFtsZ fue incubada en MES 50 mM pH 6,5, KCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM a concentraciones crecientes de DAPI, a 30 °C. La línea base se registró por 60 s. La polimerización se indujo con GTP 0,4 mM. Las concentraciones de DAPI fueron 0, 10,30, 50, 75 μM para las curvas 1, 2, 3, 4 y 5, respectivamente.

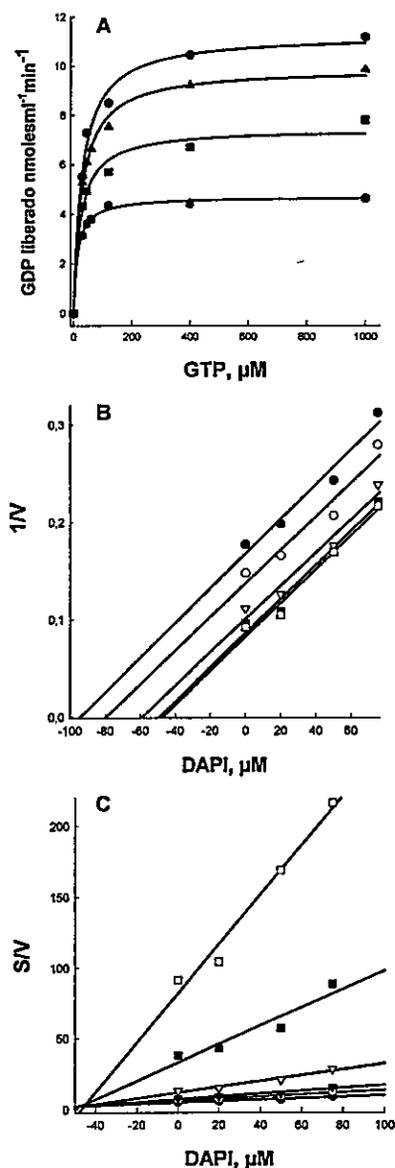


Figura 23. Inhibición de la hidrólisis de GTP de EcFtsZ por DAPI. Curvas de saturación de GTP a distintas concentraciones de DAPI se muestran en A, el medio de incubación se describe en Métodos. La concentración de EcFtsZ en todas las curvas fue 12,5 μM , las concentraciones de DAPI fueron 0 μM (●), 25 μM (▲), 50 μM (■), 75 μM (◆). Para dilucidar el tipo de inhibición, se graficaron las representaciones de Dixon (B) y Cornish-Bowden (C).

Localización del sitio de unión de DAPI en EcFtsZ por “Docking Molecular”

Para localizar el sitio de unión a DAPI en la EcFtsZ se construyó un modelo de la estructura tridimensional de EcFtsZ con el programa Modeller 6.0 (Fiser y Sali, 2003; Sali y Blundell, 1993) a partir la la estructura tridimensional de MjFtsZ, y se utilizó el archivo 1FSZ.pdb, esta estructura se resolvió a una resolución de 2,8 Å (Lowe, 1998; Lowe y Amos, 1998). Con el programa Autodock 3.05 se localizaron los sitios en la estructura tridimensional del modelo, como se muestra en la figura 24.

Los modelos tridimensionales de las mutantes EcFtsZ F135W y EcFtsZ I294W se obtuvieron por homología estructural con MjFtsZ de *M. jannashii* con el programa Modeller. La estructura tridimensional de estos modelos se superpusieron con la estructura modelada de la EcFtsZ tipo silvestre para comprobar que las mutaciones no presentaban un mayor efecto estructural. Los resultados mostraron que todas eran prácticamente idénticas. Los resultados mostraron la presencia de 4 probables sitios de unión de DAPI que se muestran en la figura 24.

Cálculos de las distancias entre el triptófano de las mutantes EcFtsZ I294W y F135W y el sitio de unión de DAPI

Para confirmar en forma experimental la localización del sitio de unión de DAPI en EcFtsZ se aprovechó que Rodrigo Díaz (Díaz, 2005) construyó dos mutantes, donde se reemplazó un residuo aromático por un triptófano, en la

región amino terminal, que se denominó EcFtsZ F135W (Figura 25 A). La otra mutante contenía el triptófano en la región carboxilo terminal y se denominó EcFtsZ I294W (Figura 25 B) (Díaz, 2005). Para la localización del sitio se determinaron las distancias entre los triptófanos de las mutantes y DAPI, pues el triptófano y DAPI constituyen un buen par dador-aceptor para la transferencia de energía de fluorescencia en resonancia (FRET) (Lakowicz, 1999).

Se consideró importante comprobar que las mutaciones no afectaran el sitio de unión de DAPI. Con este fin se tituló la sonda DAPI con cada una de las mutantes, como se hizo para la EcFtsZ silvestre (las curvas de titulación se muestran en la figura 26). Con los valores de anisotropía, se calculó la fracción unida de DAPI para cada una de las mutantes y con estos valores se construyeron isotermas de unión, las cuales se ajustaron a un sitio de unión. Se comprobó que en ambas mutantes la afinidad por la sonda no se alteró significativamente, pues las constantes de disociación estándar de DAPI unido a EcFtsZ F135W y a EcFtsZ I294W fueron de $5,3 \times 10^{-6}$ y $9,2 \times 10^{-6}$, respectivamente.

La transferencia de energía de fluorescencia se puede medir por el apagamiento del dador cuando transfiere energía al aceptor o por la emisión del aceptor cuando se excita por el dador. En este caso no es posible medir la emisión del aceptor, pues DAPI absorbe a 340 nm y presenta su emisión característica con un máximo a 450 nm. Por esto, se midió el apagamiento a 340 nm donde esta el máximo de emisión de triptófano (dador) y hay una buena absorción de DAPI (aceptor). Los espectros de los pares dador EcFtsZ I294W y

EcFtsZ F135W y DAPI se muestran en la figura 27 A y B, respectivamente. En las figuras se observa que hay un muy buen solapamiento entre los espectros de emisión de los triptófanos de las mutantes y el DAPI.

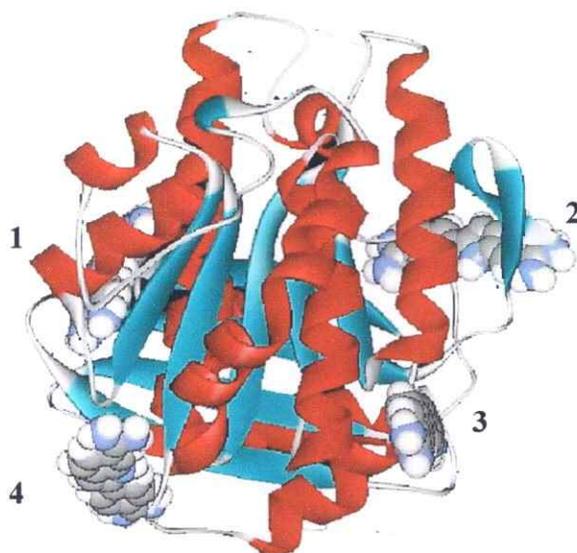


Figura 24. Esquema de cinta del modelo de la estructura tridimensional de la molécula de EcFtsZ. Se muestra el modelo de la estructura tridimensional de EcFtsZ, en formato CPK. Se observan las moléculas de DAPI, en los 4 sitios más probables, encontrados con el programa Autodock 3.05.

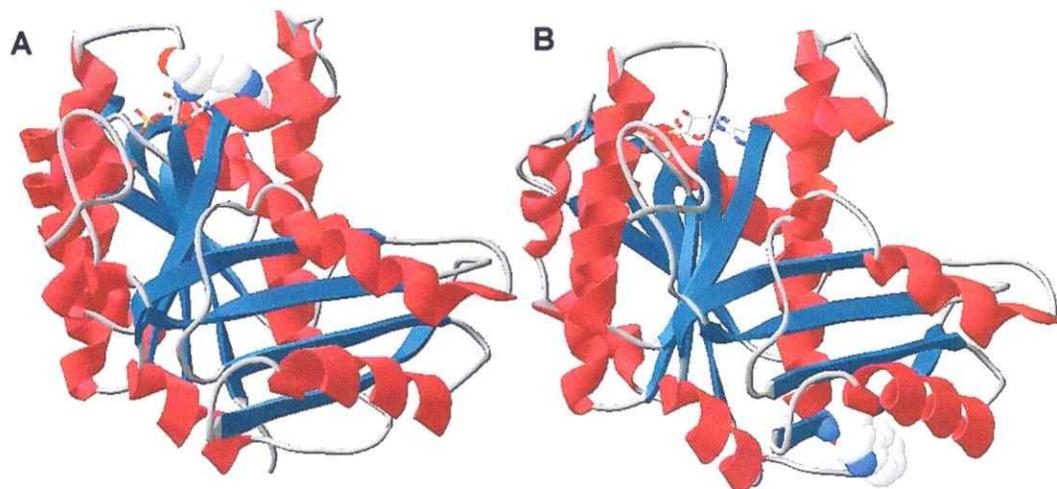


Figura 25. Modelo de la estructura tridimensional de las mutantes Ec FtsZ F135W y EcFtsZ I294W. Los modelos de la estructura tridimensional se obtuvieron utilizando el programa MODELLER y se utilizó como templado la estructura de FtsZ de *M. jannaschii*. Los modelos se evaluaron a través de los programas Prosa y Verify 3D. En formato CPK se muestran los triptófanos. En **A** EcFtsZ F135W y en **B** EcFtsZ I294W.

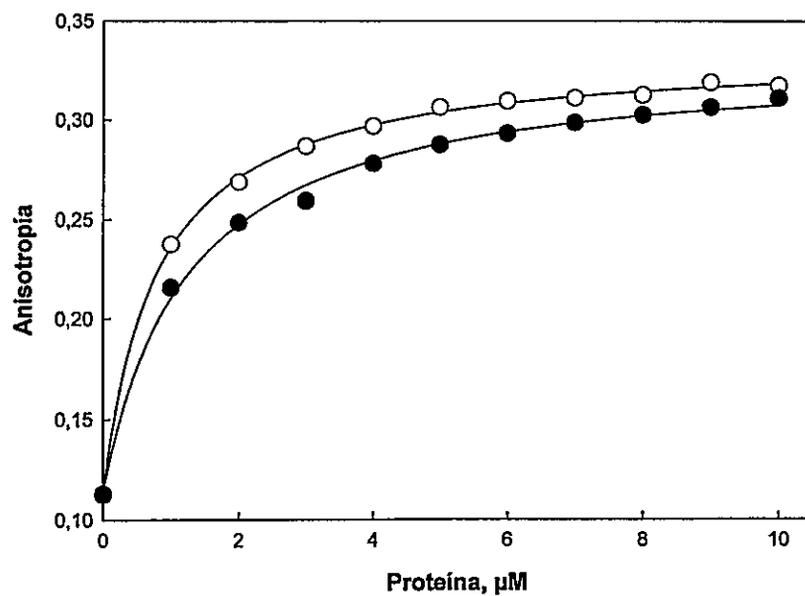


Figura 26. Determinación de constantes de disociación de los complejos de DAPI con EcFtsZ F135W y EcFtsZ I294W. Se determinó la anisotropía de DAPI 1 μM en presencia de concentraciones crecientes de EcFtsZ F135W (\circ) y EcFtsZ I294W (\bullet). El medio de incubación contenía Tris 50 mM pH 7,5, la temperatura de incubación fue 25 $^{\circ}\text{C}$.

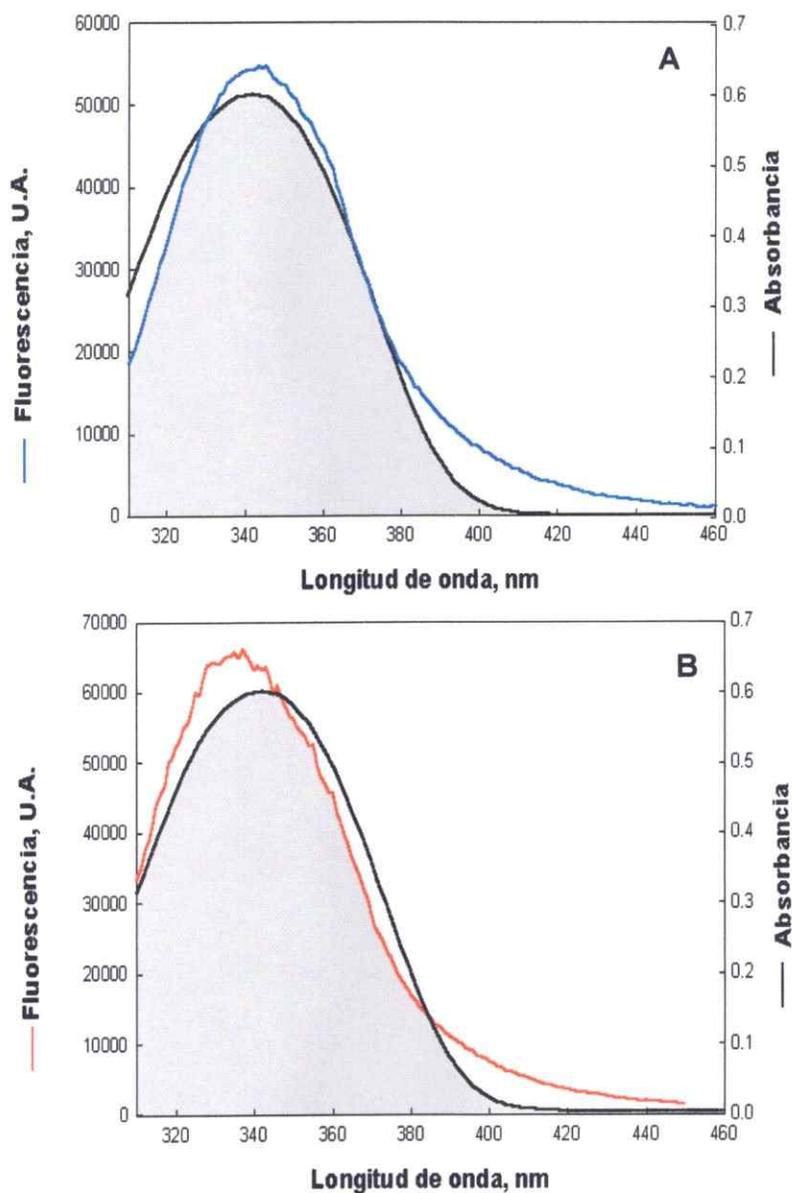


Figura 27. Determinación de la constante de recubrimiento $J(\lambda)$ del DAPI con los triptófanos de las mutantes EcFtsZ 135W y EcFtsZ 294W. Se observa el solapamiento de áreas en sombreado del espectro de fluorescencia del triptófano de EcFtsZ F135W (—) y el espectro de absorción de DAPI 1 μ M (—) en A. El espectro de emisión de fluorescencia del triptófano de EcFtsZ I294W (—) y el espectro de absorbancia de DAPI 1 μ M (—), en B.

Determinación de R_0 y eficiencia de la transferencia

El valor de R_0 se calculó por medio de la ecuación 2 (ver Métodos). El valor de R_0 para la mutante EcFtsZ F135W fue 28 Å y para la mutante EcFtsZ I294W fue 29 Å. Los valores se resumen en la Tabla 5.

La eficiencia de la transferencia de energía se calculó titulando con concentraciones crecientes de DAPI, por separado, cada una de las mutantes en amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 7,5. Se tomaron los espectros de emisión de fluorescencia para determinar el apagamiento de la emisión de los triptófanos de cada mutante cuando la concentración de DAPI se aumentó. Los resultados se muestran en la figura 28 y se observa una disminución de la intensidad de fluorescencia al aumentar la concentración de DAPI. El valor de eficiencia de transferencia para la mutante EcFtsZ F135W fue de $0,39 \pm 0,3$ y para la mutante EcFtsZ I294W fue de $0,79 \pm 0,05$ (Tabla 4).

Tabla 4. Valores experimentales de los parámetros de FRET para determinar la distancia entre DAPI y los triptófanos de EcFtsZ F135W y EcFtsZ I294W.

Parámetro	EcFtsZ F135W	EcFtsZ I294W
$J(\lambda)$	$(2,3 \pm 0,2) \times 10^{-14} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^3$	$(2,3 \pm 0,2) \times 10^{-14} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^3$
Q_D	$0,158 \pm 0,02$	$0,189 \pm 0,02$
E	$0,39 \pm 0,03$	$0,79 \pm 0,05$
R_0	$28 \pm 3 \text{ \AA}$	$29 \pm 3 \text{ \AA}$

$J(\lambda)$ Constante de solapamiento, Q_D Rendimiento Cuántico, E Eficiencia de transferencia. Se muestran los promedios de tres medidas independientes con su desviación estándar, respectiva.

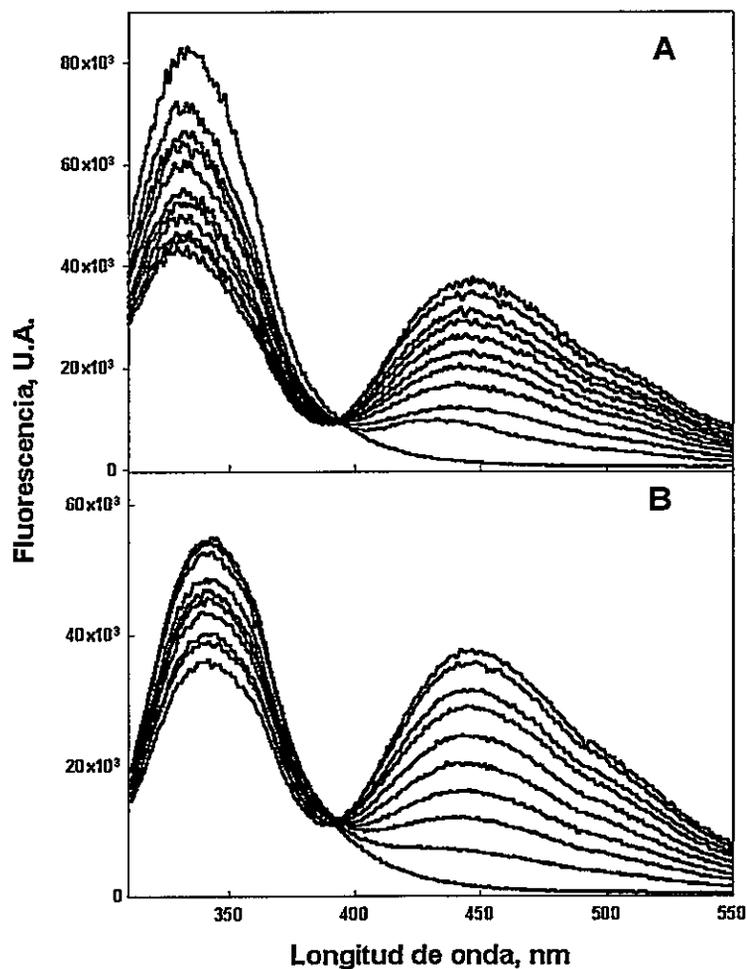


Figura 28. Espectros de emisión fluorescencia de triptófano de las mutantes EcFtsZ F135W y EcFtsZ I294W en presencia de DAPI. Se midieron los espectros de fluorescencia del triptófano para cada una de las mutantes a distintas concentraciones de DAPI. En A EcFtsZ I294W, En B EcFtsZ F135W. El amortiguador fue Tris 50 mM, pH 7,5 y la temperatura fue de 25 °C.

Se calcularon las distancias entre DAPI y los triptófanos de las mutantes las cuales resultaron ser $31 \pm 3 \text{ \AA}$ para la distancia entre el triptófano y el sitio de unión de DAPI en la mutante EcFtsZ F135W y de $25 \pm 3 \text{ \AA}$ para la distancia entre el triptófano y el sitio de unión de DAPI en la mutante EcFtsZ I294W. Estos valores se muestran en la Tabla 5. Los valores obtenidos corresponden a las distancias entre los centros de masa del grupo indol del triptófano y DAPI.

A partir de la superposición estructural del modelo de la estructura tridimensional de EcFtsZ con cuatro sitios de DAPI, obtenida por "docking" molecular, con la estructura tridimensional del modelo de EcFtsZ F135W y de EcFtsZ I294W, se calcularon los pares de distancia desde los centros de masa de W135, W294 y hasta el DAPI localizado en los sitios de unión. Esta superposición generó los pares de distancias que se muestran en la Tabla 5. Estos pares de distancias se compararon con las dos distancias encontradas por transferencia de energía (FRET), las cuales también se muestran en la Tabla 5 y se encontró que la triangulación de las distancias determinadas experimentalmente calzaron mejor con las del sitio número 3 (Figura 24) obtenido por "docking" molecular (Tabla 5).

La región de este sitio en FtsZ coincide con la encontrada en el heterodímero $\alpha\beta$ -tubulina, que se determinó por (Arbildua y col., 2005) "Docking" Molecular y por FRET. En la figura 29 se muestra en detalle la superficie del sitio 3 de EcFtsZ. Se observa que está conformado por un surco relativamente hidrofóbico y en sus extremos existen residuos con carga negativa que

coinciden con las propiedades fisicoquímicas de DAPI que posee dos cargas positivas en sus extremos y la región central hidrofóbica, interaccionaría mejor con el anillo aromático y el indol del ligando.

Tabla 5. Distancia de los 4 probables sitios para DAPI y los triptófanos en las mutantes EcFtsZ F135W y EcFtsZ I294W determinados por Autodock 3.05 y distancias experimentales determinadas por FRET entre el triptófano y el sitio de unión de DAPI en estas mutantes.

Sitio	EcFtsZ F135W, A°	EcFtsZ I294W, A°
1	31	14
2	20	29
3	26 *	29*
4	20	17
FRET	31 ± 3*	25 ± 3*

* Indica la mejor coincidencia de las distancias determinadas por el programa de computación Autodock 3.05 y las determinadas experimentalmente por FRET. Los valores representan el promedio de tres experimentos de FRET independientes y su desviación estándar. Las otras distancias no tienen valores de desviación estándar, porque son distancias calculadas utilizando el programa SwissProt PDB Viewer entre el centro del DAPI y el anillo indol del triptófano.

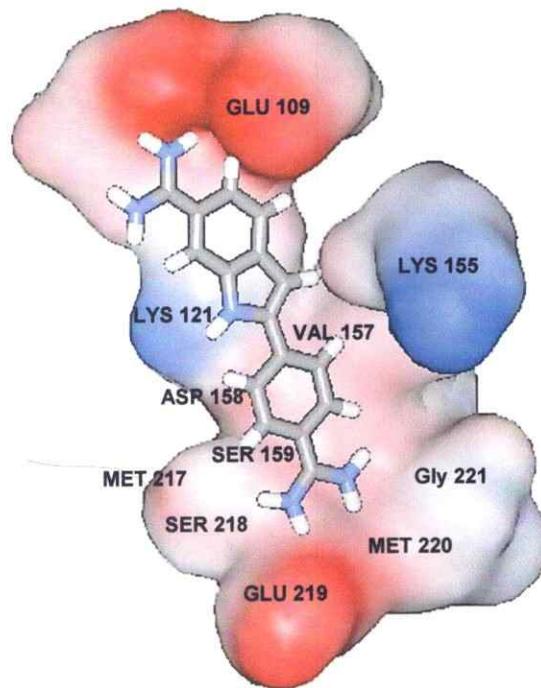


Figura 29. Modelo del sitio de unión de DAPI en EcFtsZ. La estructura tridimensional se modeló con el programa MODELLER, se utilizó como modelo estructural la MjFtsZ, resuelta por difracción de rayos X. La localización del sitio de DAPI se hizo a partir de los resultados de "Docking Molecular" y FRET.

determinó también la localización del sitio de unión en la superficie accesible al solvente de la proteína, mediante "docking" molecular y estudios de FRET, entre triptófano y DAPI.

Actividad GTPásica de $\alpha\beta$ -tubulina, $\alpha\beta$ -tubulina Ca^{2+} y $\alpha\beta$ -tubulina S y EcFtsZ

El heterodímero de $\alpha\beta$ -tubulina presenta actividad GTPásica, la cual es estimulada cuando polimeriza (Erickson y O'Brien, 1992). En $\alpha\beta$ -tubulina la velocidad de hidrólisis de los heterodímeros no polimerizados es muy baja, la que se incrementa cuando se produce la polimerización, el valor de k_{cat} para el heterodímero es $0,054 \text{ min}^{-1}$ (David-Pfeuty y col., 1979), el valor en microtúbulos es 12 a 21 min^{-1} (Melki y col., 1996). En este trabajo de tesis se confirmó que $\alpha\beta$ -tubulina tiene una k_{cat} de $0,06 \text{ min}^{-1}$. Esto se puede deber a que en el medio en que se midió la actividad GTPásica no induce la polimerización, pues no se observó incremento en la dispersión de luz a 90° cuando se agregó GTP (datos no mostrados), entonces este valor de k_{cat} para la actividad GTPásica medida, correspondería a la actividad intrínseca del heterodímero $\alpha\beta$ -tubulina.

En este trabajo de tesis se confirmó que el catión divalente Ca^{2+} induce la actividad GTPásica de la $\alpha\beta$ -tubulina (Soto y col., 1996). Esta inducción no estaría asociada a la polimerización, pues en las condiciones usadas no se observó aumento de la dispersión de luz cuando se agregó el GTP (datos no mostrados), se sabe que el Ca^{2+} inhibe la polimerización de $\alpha\beta$ -tubulina e

Discusión

En este trabajo de tesis se estudiaron algunos aspectos del mecanismo y regulación de la actividad GTPásica intrínseca de EcFtsZ y $\alpha\beta$ -tubulina. El propósito fue establecer algunas bases moleculares de la hidrólisis de GTP para estas proteínas. La presentación de resultados se dividió en tres partes. Primero, se caracterizó la actividad GTPásica de $\alpha\beta$ -tubulina, $\alpha\beta$ -tubulina y $\alpha\beta$ -tubulina S. y EcFtsZ. Se estudiaron estas proteínas por que conforman una nueva familia de GTPasas, y se desconoce las bases moleculares de la hidrólisis del nucleótido. Se determinó la presencia de actividad GTPásica intrínseca, es decir hidrólisis del nucleótido en ausencia de interacciones proteína-proteína entre $\alpha\beta$ -tubulina y EcFtsZ. Segundo, a partir de las estructuras de $\alpha\beta$ -tubulina y FtsZ se construyó un modelo de un dímero de EcFtsZ, con el cual se analizaron los residuos cercanos a los fosfatos, con el fin de determinar cuales podrían estar participando en el mecanismo molecular de la hidrólisis. Se generaron las mutantes EcFtsZ Q47N y EcFtsZ D212G, estas proteínas se analizaron *in vivo* e *in vitro*, con el propósito de determinar a nivel molecular la participación de estos residuos mutados en la hidrólisis de GTP. Tercero, se estudió el efecto que tenía la unión de DAPI a EcFtsZ. Se usó esta sonda para evaluar la integridad de la estructura tridimensional de las mutantes respecto a EcFtsZ tipo silvestre, por medio de los parámetros de unión de la sonda. Se observó que esta sonda unida a EcFtsZ estabilizaba los filamentos inducidos por GTP, a través de una inhibición de la hidrólisis del nucleótido. Se

inducen una rápida despolimerización de los microtúbulos previamente formados y hay una inducción de anillos (Solomon, 1977; Weisenberg y Timasheff, 1970). El Ca^{2+} aumenta la hidrólisis del nucleótido y produciría un cambio conformacional hacia una forma curva (tubulina-GDP) que impide la formación de microtúbulos. La colchicina, una droga antimitótica, produce efectos similares en la $\alpha\beta$ -tubulina (Correia, 1991; Perez-Ramirez y col., 1994), y GTP induce una débil formación de polímeros, en presencia de Mg^{2+} a una concentración de 4 mM. Cabe hacer notar que el medio en que midió la actividad GTPásica en este trabajo contenía 0,5 mM de este ión.

Esta evidencia experimental no es suficiente para concluir que el heterodímero de $\alpha\beta$ -tubulina en solución es el responsable de la actividad GTPásica basal.

El DAPI se une a la $\alpha\beta$ -tubulina y $\alpha\beta$ -tubulina S, en el mismo sitio y con una afinidad similar, pero las propiedades espectrales de la sonda son distintas. Cuando se agregaron los péptidos C-terminales a $\alpha\beta$ -tubulina S, se produjo una reasociación entre $\alpha\beta$ -tubulina S y los péptidos, que aumentó la intensidad de emisión de fluorescencia de la sonda. Los péptidos C-terminales no se unen directamente al sitio del DAPI, de allí que las diferencias espectrales observadas serían provocadas por cambios conformacionales en la $\alpha\beta$ -tubulina (Ortiz y col., 1993). Estos cambios conformacionales se observan cuando se agrega Ca^{2+} o se remueven los C-terminales con subtilisina, (Mukhopadhyay y col., 1990; Perez-Ramirez y col., 1994; Soto y col., 1996). Los cambios conformacionales inducidos por la remoción de los péptidos C-terminales,

provocan que la $\alpha\beta$ -tubulina S polimerice con una concentración crítica mucho menor a la de $\alpha\beta$ -tubulina (Bhattacharyya y col., 1985; Knipling y col., 1999). Entonces, como ya se mencionó, con toda esta información no queda claro si la actividad GTPásica en presencia de inhibidores de la polimerización de microtúbulos es debida a la presencia sólo de heterodímeros, pues se producen polímeros diferentes a los microtúbulos, que pueden inducir la actividad GTPásica. Por esta razón se inmovilizó la $\alpha\beta$ -tubulina a una matriz sólida affigel y se demostró que aún persistía la actividad GTPásica.

La actividad GTPásica de EcFtsZ, como se muestra en la figura 17 A, es mucho mayor que la que presenta $\alpha\beta$ -tubulina, esta diferencia puede explicarse porque el amortiguador experimental que se utilizó para medir la actividad GTPásica de EcFtsZ induce la polimerización, pues siempre se observó un incremento en la dispersión de luz inmediatamente después que se agregó GTP, a diferencia de la determinada para $\alpha\beta$ -tubulina. Otra consideración importante es que el GTP es capaz de intercambiarse por GDP en los polímeros formados por EcFtsZ (Mingorance y col., 2001), a diferencia de la $\alpha\beta$ -tubulina en microtúbulos, que no es capaz de intercambiar el nucleótido, donde sólo se hidroliza en el extremo de crecimiento del microtúbulo (extremo más) (Nogales y col., 1999). Para probar la existencia de una actividad GTPásica libre de interacción proteína-proteína, se inmovilizó también esta proteína a una matriz affigel, la proteína inmovilizada presentó actividad GTPásica.

La $\alpha\beta$ -tubulina inmovilizada tiene una actividad GTPásica específica de 0,4 nmoles de GDP liberados $\text{ml}^{-1}\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$. La EcFtsZ inmovilizada tiene una actividad GTPásica específica de 15 nmoles GDP liberados $\text{ml}^{-1}\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$, este valor es menor al obtenido para esta proteína libre en solución (50 nmoles GDP liberados $\text{ml}^{-1}\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$), la diferencia estaría dada por las interacciones proteína-proteína que ocurren cuando la EcFtsZ polimeriza, y estimula la hidrólisis, pues la actividad GTPásica de esta proteína se midió en condiciones polimerizantes (ver Figura 18 A).

Entonces con este trabajo de tesis podemos afirmar que la $\alpha\beta$ -tubulina y EcFtsZ tiene una actividad GTPásica intrínseca, en ausencia de interacción proteína-proteína y la hidrólisis del GTP es estimulada cuando se produce la interacción proteína-proteína en la polimerización inducida por el nucleótido.

Análisis de las mutantes EcFtsZ Q47N y EcFtsZ D212G

El análisis molecular de la hidrólisis de GTP sólo puede ser hecho en FtsZ, pues hasta el momento no ha sido posible obtener tubulina recombinante funcional *in vitro*. No obstante en el laboratorio se ha determinado en oocitos de pez cebra que la $\alpha\beta$ -tubulina recombinante puede ser replegada (César Díaz resultados no publicados). La actividad GTPásica de EcFtsZ puede ser analizada a nivel molecular, pues en esta proteína se pueden introducir mutaciones y determinar su actividad tanto *in vitro* como *in vivo*. La estructura de EcFtsZ no ha sido determinada, por esto se construyó un modelo de la

estructura tridimensional de EcFtsZ-GDP, y con este modelo se construyó un dímero de EcFtsZ debido a que la interacción proteína-proteína estimula la hidrólisis de GTP. A partir de este modelo se determinó que residuos de aminoácidos, cerca del fosfato beta del GDP, podrían participar en la hidrólisis del nucleótido.

La $\alpha\beta$ -tubulina y FtsZ tienen entre un 8 y 11 % de identidad de secuencia (Sontag y col., 2005). Se sabe bien que la similitud entre estructuras de proteínas homólogas está más conservada que la similitud de secuencia.

La estructura tridimensional del modelo de EcFtsZ fue evaluado utilizando el programa Prosa II y Verify 3D. El modelo cumplió con los requisitos de Prosa II, aunque Verify 3D mostró tres regiones del modelo con bajo puntaje 3D-1D, entre 0 y 0,1, que corresponden a las regiones alrededor de los residuos 50, 135 y 160 (ver Figura 10). Estas posiciones no se encuentran conservadas en el alineamiento y en el modelo corresponden a regiones expuestas al solvente. Las zonas con puntaje superior a 0,1 corresponden a regiones conservadas, ubicadas en el interior de la proteína y en el sitio de unión a GTP. Entonces podemos afirmar que el modelo, generado en este trabajo de tesis, para la estructura tridimensional de EcFtsZ es adecuado. Esto se confirmó cuando se comparó la estructura tridimensional del modelo con la estructura tridimensional de EcFtsZ de mesófilos que fueron resueltas por difracción de rayos X, la superposición estructural del modelo con la estructura de EcFtsZ de *Pseudomonas aureginosa* (Cordell y col., 2003) mostró un rms de 1,2 Å y para

la EcFtsZ de *Microbacterium tuberculosis* (Leung y col., 2000) el rms fue de 1,4 Å. Estos resultados nos permiten afirmar que el modelo de la estructura tridimensional de EcFtsZ-GDP generado a partir de la estructura del termófilo *Methanococcus jannaschii* es correcto.

Determinación del mecanismo e inducción de la hidrólisis de GTP en EcFtsZ

Los parámetros cinéticos mostrados en la Tabla 3 indican que las mutaciones de los residuos EcFtsZ Q47N y EcFtsZ D212G afectan las propiedades catalíticas de EcFtsZ. El residuo Q47 está cercano al fosfato beta del GDP, en el sitio de unión del nucleótido en EcFtsZ, y es conservado en las FtsZ (ver figura 11 A y B). En las GTPBP (GTP binding Protein) como la Cdc42 existe una glutamina que une una molécula de agua a través de un puente hidrógeno, esta molécula de agua es la que realiza el ataque nucleofílico sobre el fosfato gamma de GTP, en el sitio activo de estas proteínas. La mutación de esta glutamina inactiva la hidrólisis del nucleótido (Abdul-Manan y col., 1999). Existe una glutamina conservada en las FtsZ, que se encuentra muy cercana al fosfato beta del GDP, ver figura 11 B, que indicaría que este residuo es esencial para la actividad hidrolítica de GTP, por esto, para probar esta hipótesis se mutó este residuo.

Una glutamina en posición similar se encuentra en la estructura de $\alpha\beta$ -tubulina, la cual está conservada en las α , β , γ y δ tubulinas, como también en la BtubA y BtubB (Erickson, 1995; Sontag y col., 2005).

La EcFtsZ Q47N presentó una K_m para GTP de 97,15 μM , valor que fue casi tres veces mayor que el de la proteína silvestre. Como se explicó en resultados, la K_m en este caso, se asemeja a la constante de disociación del nucleótido, por esto podemos afirmar que la mutante perdió afinidad por su sustrato. La k_{cat} de EcFtsZ Q47N fue 0,12 min^{-1} , 1/16 del valor de EcFtsZ tipo silvestre (2 min^{-1}), de allí que la velocidad de hidrólisis se afectó más que la unión del sustrato, este residuo es más importante para el mecanismo catalítico, que para la unión del sustrato. Esta mutante no presenta actividad GTPásica medible, en ausencia de polimerización, por lo que la actividad GTPásica intrínseca se pierde. Las propiedades catalíticas de la hidrólisis se recuperan sólo cuando se produce la interacción proteína-proteína en la polimerización de esta mutante (ver Figura 18 B). Estos resultados indicarían que la presencia de este residuo no es esencial para la actividad GTPásica inducida por la polimerización. Más aún indican que éste sería responsable de una actividad basal de la proteína no polimerizada, que hemos llamado actividad GTPásica intrínseca.

Los formación de polímeros de EcFtsZ tipo silvestre es inducida por GTP, esta proteína sufre un cambio conformacional que permite su polimerización, este ocurre muy rápidamente, los polímeros son capaces de hidrolizar el GTP y cuando este disminuye su concentración, y predomina la forma GDP, los polímeros se despolimerizan. (Romberg y col., 2001). El esquema de polimerización inducida por GTP para esta proteína se muestra en la figura 30 A.

Los polímeros de EcFtsZ Q47N inducidos por GTP presentaron una morfología similar a los observados para la EcFtsZ silvestre (microscopía electrónica no mostrada), que se confirmó con los gráficos de concentración crítica, pues presentan pendientes similares (ver Figura 16). La cinética de polimerización fue más lenta para la mutante respecto a la silvestre, probablemente debido a que la etapa de nucleación fue más lenta. Un comportamiento típico cuando hay nucleación muestra que el período de latencia es inversamente proporcional a las concentraciones iniciales de proteína. Este es el caso para EcFtsZ Q47N, pues a concentraciones mayores de 25 μM el período de latencia prácticamente desaparece (Ver figura 15 B). Un modelo que explicaría la polimerización inducida por GTP de esta mutante requiere de dos conformaciones para EcFtsZ-GTP, una capaz de polimerizar, y otra que no polimeriza. Así, al aumentar la concentración de proteína más polímeros se forman, y el equilibrio se desvía hacia la conformación capaz de polimerizar. Esta etapa podría ser la limitante o la etapa más lenta. El esquema de polimerización inducida por GTP para esta mutante se muestra en la figura 30 B.

Otro parámetro que se analizó para esta mutante fue la concentración crítica C_r , que es la mínima concentración por sobre la cual se producen polímeros, el valor para esta mutante fue de 10 μM , cinco veces más alta que la C_r de la tipo silvestre.

El estudio de viabilidad de células que portan el alelo EcFtsZ Q47N mostró que la sobrevivencia de células, que sólo expresan esta mutante a la temperatura restrictiva de 42° C, fue similar a la observada para la EcFtsZ tipo silvestre, sin

embargo la actividad GTPásica de EcFtsZ Q47N es baja (1/16 respecto a la tipo silvestre), al parecer la característica más importante de esta mutante es que forma polímeros, esta condición bastaría para que la EcFtsZ Q47N sea funcional *in vivo*. Además se observa que la dinámica *in vivo* de la EcFtsZ no se explicaría por la capacidad de hidrolizar GTP de EcFtsZ tipo silvestre, pues existirían otros factores que participarían en la contricción del anillo Z. El tiempo de vida media de una *E. coli* es de 20 min aproximadamente, el anillo Z se forma inmediatamente la célula se divide (Margolin, 1998), quedan alrededor de 17 minutos para que ocurra el reclutamiento de los otros factores necesarios para que se produzca la contricción del anillo, y se complete el ciclo de división bacteriana. Durante todo este tiempo el anillo debe permanecer estable, ya sea hidrolizando el GTP activamente (EcFtsZ tipo silvestre) o pobremente (EcFtsZ Q47N), lo que no impide la división celular.

La mutación D212G en EcFtsZ afectó las propiedades cinéticas de hidrólisis de GTP. El residuo D212 se encuentra en el lazo T7 en la estructura de EcFtsZ, este lazo se ubica en la interfase entre dos monómeros de EcFtsZ cuando se produce la polimerización (Nogales, 2000). Si se observa la figura 12 B, este residuo está a 5 Å del fosfato gama del otro monómero de EcFtsZ, producto de la interacción longitudinal de EcFtsZ, cuando se produce la polimerización inducida por GTP.

En la β y γ , tubulina, en la BtubA y BtubB es residuo ha sido reemplazdo por un ácido glutámico (Erickson, 2000; Glockner y col., 2003; Margolin, 2000; She y col., 2001; Vaughan y col., 2004).

El análisis cinético de la mutante EcFtsZ D212G *in vitro* mostró un valor para K_m de 430 μM , valor aproximadamente 12 veces mayor que el de EcFtsZ tipo silvestre. Igual que para la mutante EcFtsZ Q47N, en este caso la K_m asemeja a la K_d del GTP, y por lo tanto la unión del sustrato estaría disminuída. Un modelo que explicaría este comportamiento para la EcFtsZ D212G es la producción de agregados inducidos por GTP, que presentan una muy baja dispersión de luz (ver Figura 15 C), y que impedirían el intercambio de GDP por GTP. La presencia de agregados amorfos, pequeños y estables se confirmó por microscopia electrónica (datos no mostrados). La disminución de la velocidad de intercambio GDP-GTP sería la responsable de la baja actividad, que se refleja en una K_m muy grande (430 μM) y una k_{cat} de 0,21 min^{-1} , comparada con la de EcFtsZ silvestre que presenta una K_m y k_{cat} de 35 μM y 2 min^{-1} , respectivamente. El esquema de polimerización inducida por GTP para esta mutante se muestra en la figura 30 C. En el esquema se postula una forma EcFtsZ D212G-GDP inicial, la que en presencia de GTP induce la polimerización de agregados amorfos, que hidrolizan GTP a una muy baja velocidad, y que son muy estables en el tiempo.

Muchas mutaciones se han realizado en el residuo D212, donde se le ha sustituido por una alanina, por un ácido glutámico, por una cisteína y por una

asparragina (Lu y col., 2001; Scheffers y col., 2001). Todas estas mutantes presentaron una baja actividad GTPásica, y algunas de ellas forman filamentos inducidos por GTP, excepto la mutación por alanina (Lu y col., 2001). Se observa que la capacidad de formar polímeros se conserva en la medida que las sustituciones aminoacídicas presenten cierta polaridad. Estos hechos nos indicarían que este residuo interviene en la interacción proteína-proteína y que podría reforzar el mecanismo de hidrólisis de GTP.

El estudio de la viabilidad celular para el alelo EcFtsZ D212 mostró que el porcentaje de sobrevivencia es aproximadamente un orden de magnitud menor que el de la EcFtsZ tipo silvestre, la cepa portadora de esta mutación es capaz de dividirse, con dificultad. Esto se explicaría por la formación de polímeros amorfos y estables *in vitro*, que se inducen por GTP. Por esto la viabilidad se vería reforzada porque al interior de la célula existirían factores que ayudarían a la formación del anillo Z en presencia de la mutante EcFtsZ-D212G.

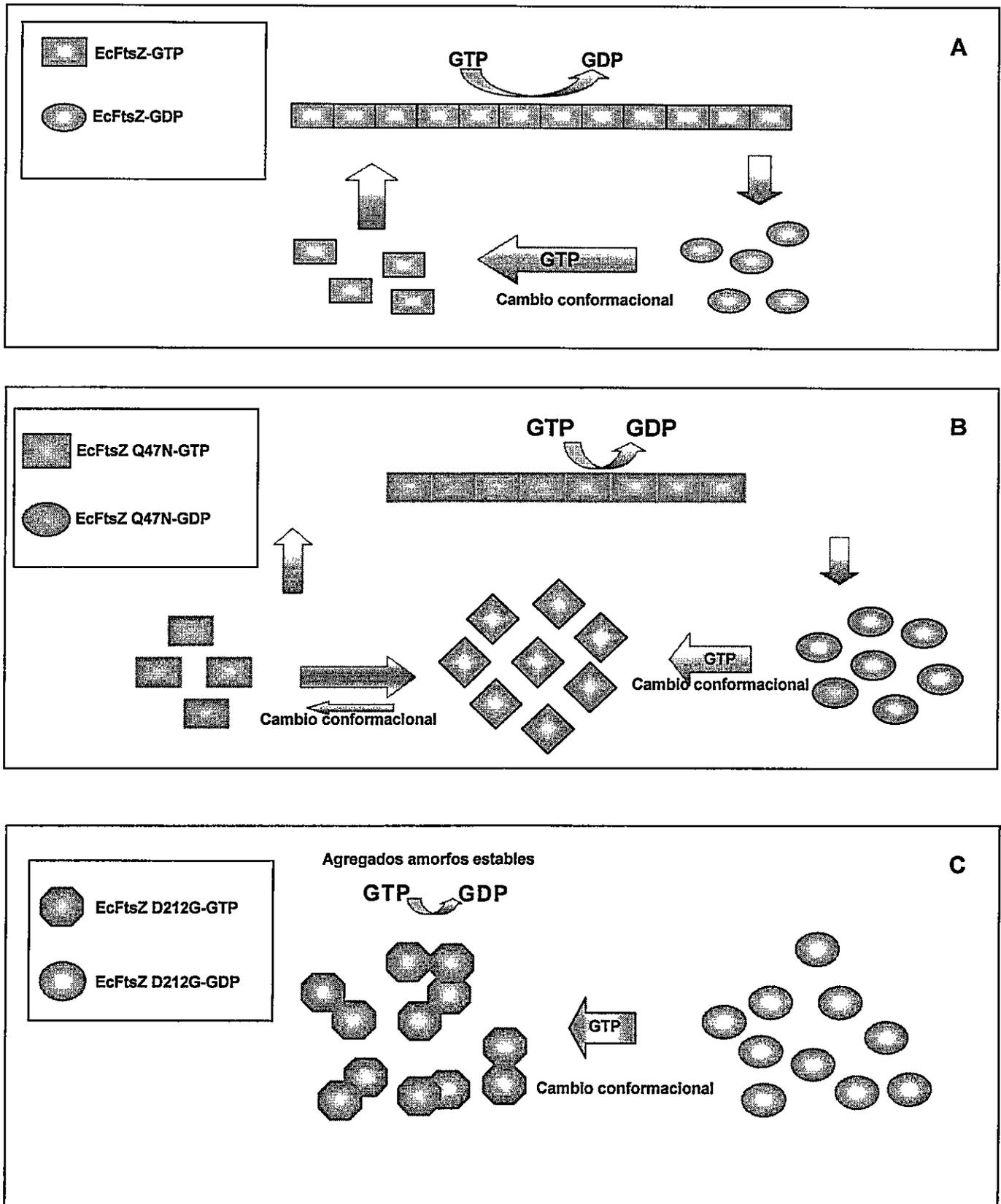


Figura 30. Esquema simple de la polimerización inducida por GTP de EcFtsZ, EcFtsZ Q47N y EcFtsZ D212G. A corresponde al esquema de polimerización de EcFtsZ tipo silvestre. En B se muestra el posible mecanismo para EcFtsZ Q47N y en C para EcFtsZ D212G.

Unión de DAPI a EcFtsZ

La unión de DAPI a FtsZ fue determinada mediante polarización de fluorescencia, y mostró una constante de disociación estándar (K°_d) para este complejo de $1,6 \times 10^{-5}$. La sonda también se unió a los filamentos de EcFtsZ inducidos por GTP con una K°_d de $1,6 \times 10^{-5}$. Esto indica que el sitio de unión a la sonda no se altera al polimerizar la proteína y por esto ha sido utilizada con éxito en la caracterización de la cinética de polimerización de tubulina, que presenta un mecanismo similar para la unión de DAPI (Bonne y col., 1985). DAPI estabilizó los polímeros de EcFtsZ inducidos por GTP, pues se observó un aumento del tiempo en que estos permanecían en el estado estacionario (ver figura 22). Este aumento del estado estacionario se debió a una inhibición de la hidrólisis de GTP. El comportamiento de la inhibición fue de tipo incompetitivo, que es cuando el inhibidor sólo se une al complejo enzima-sustrato (Cornish-Bowden, 1995).

La localización del sitio de unión de DAPI se hizo por FRET y "docking" molecular, y este se encontró en la superficie accesible al solvente de EcFtsZ. El sitio estaría conformado por los residuos E118, K121, K155, Val 157, D158, S159, M217, S218, E219, M220, G221, que forman un surco apolar, en el cual se ubican los anillos fenil e indol del DAPI, en la parte media del este surco están las lisinas 121 y lisina 155, y en uno de los extremos del surco se encuentran los residuos acídicos E118, D157 y en el otro extremo está el residuo acídico E219.

Este sitio de unión de DAPI estaría conformado por residuos que pertenecen al dominio amino y al dominio carboxilo. Esta característica lo hizo útil para comprobar que las mutantes utilizadas en este trabajo conservaron la estructura terciaria de la proteína, pues el sitio de unión mostró características similares en todas las mutantes. Así, las mutantes fueron capaces de unir DAPI con una constante de disociación del mismo orden.

Con el propósito de explicar el mecanismo molecular de la inhibición incompetitiva del DAPI, se sobrepuso el análisis de dinámica esencial del modelo de EcFtsZ realizado por Andrea Garcés (Tesis de pregrado) y el modelo tridimensional de la estructura de EcFtsZ con los cuatro probables sitios de unión a DAPI, que se muestra en la figura 31. En la figura 31 se observa que el sitio de unión de DAPI con mayor cercanía a una sección que presenta movimiento correlacionado inducido por la hidrólisis del GTP, es el sitio 3, el que corresponde al sitio más probable determinado por FRET y "docking" molecular. Así la inhibición incompetitiva de la hidrólisis del GTP de EcFtsZ producida por la presencia de DAPI, se podría explicar por una posible interferencia del DAPI en el sitio 3 con la región que muestra movimiento correlacionado, y que se ubica entre los residuos 200 al 204. El impedimento provocado por DAPI de los movimientos correlacionados inducidos por la hidrólisis del GTP explicarían la inhibición incompetitiva de la hidrólisis del GTP.

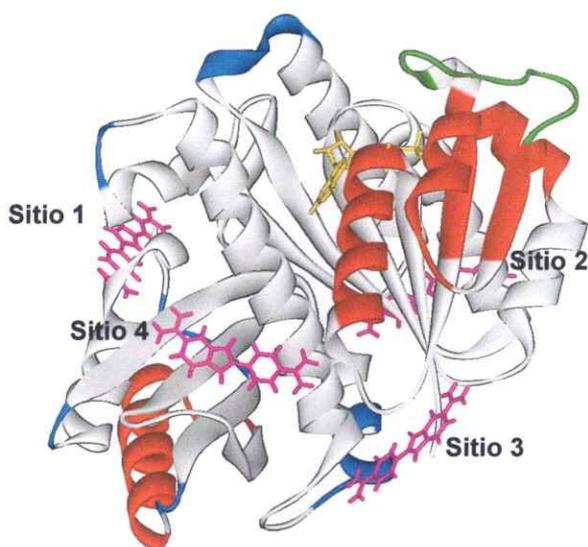


Figura 31. Modelo de la estructura tridimensional de EcFtsZ con los 4 probables sitios de unión a DAPI y estructuras flexibles asociadas a la hidrólisis de GTP. El modelo de EcFtsZ se sometió a un análisis de dinámica esencial. En el modelo se muestran GDP (amarillo), los cuatro posibles sitios para DAPI (rosado) y los movimientos correlacionados inducidos por la hidrólisis de GTP que presentan correlación positiva (azul) y negativa (rojo), respecto al lazo T4 (verde).

Conclusiones

La $\alpha\beta$ -tubulina y EcFtsZ no polimerizadas son GTPásas con una muy baja actividad GTPásica intrínseca. La interacción proteína-proteína estimula la actividad GTPásica, cuando produce la polimerización

La mutante EcFtsZ Q47N no presenta actividad GTPásica intrínseca, la capacidad de hidrolizar el nucleótido aparece sólo cuando esta mutante está en la forma polimerizada. La actividad GTPásica intrínseca en EcFtsZ depende de la presencia de la glutamina 47.

La propiedad más importante que se debe conservar en las mutantes de EcFtsZ es que estas sean capaces de polimerizar, manteniendo esta propiedad las células van a ser capaces de sobrevivir. Una disminución de la capacidad de hidrólisis de GTP no afecta el mecanismo de división celular.

La EcFtsZ en sus dos formas monomérica y polimerizada, une la sonda DAPI con la misma constante de disociación estándar K_d $1,6 \times 10^{-5}$.

El DAPI estabiliza los polímeros de EcFtsZ, mediante una inhibición de tipo incompetitiva de la hidrólisis de GTP. Esta inhibición se podría explicar por un impedimento de los movimientos correlacionados de la región entre los residuos 200 al 204.

Referencias

- Abdul-Manan, N., Aghazadeh, B., Liu, G. A., Majumdar, A., Ouerfelli, O., Siminovitch, K. A., y Rosen, M. K. (1999). Structure of Cdc42 in complex with the GTPase-binding domain of the 'Wiskott-Aldrich syndrome' protein. *Nature*. 399, 379-383.
- Arbildua, J. J., Brunet, J., Jameson, D., López, M., Nova, E., Lagos, R., y Monasterio, O. (2005). Fluorescence Resonance Energy Transfer and Molecular Modeling Studies on 4', 6-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI) Complexes with Tubulin. *Protein Science*. *In Press MS N° 018622*.
- Bhattacharyya, B., Sackett, D. L., y Wolff, J. (1985). Tubulin, hybrid dimers, and tubulin S. Stepwise charge reduction and polymerization. *J Biol Chem*. 260, 10208-10216.
- Bonne, D., Heusele, C., Simon, C., y Pantaloni, D. (1985). 4',6-Diamidino-2-phenylindole, a fluorescent probe for tubulin and microtubules. *J Biol Chem*. 260, 2819-2825.
- Bourne, H. R., Sanders, D. A., y McCormick, F. (1991). The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature*. 349, 117-127.
- Bramhill, D., y Thompson, C. M. (1994). GTP-dependent polymerization of *Escherichia coli* FtsZ protein to form tubules. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91, 5813-5817.
- Caplow, M., y Shanks, J. (1996). Evidence that a single monolayer tubulin-GTP cap is both necessary and sufficient to stabilize microtubules. *Mol Biol Cell*. 7, 663-675.
- Carlier, M. F., Didry, D., y Pantaloni, D. (1997). Hydrolysis of GTP associated with the formation of tubulin oligomers is involved in microtubule nucleation. *Biophys J*. 73, 418-427.
- Chung, H. H., Benson, D. R., y Schultz, P. G. (1993). Probing the structure and mechanism of Ras protein with an expanded genetic code. *Science*. 259, 806-809.

Cordell, S. C., Robinson, E. J., y Lowe, J. (2003). Crystal structure of the SOS cell division inhibitor SulA and in complex with FtsZ. *Proc Natl Acad Sci U S A.* *100*, 7889-7894.

Cornish-Bowden, A. (1995). *Fundamentals of enzyme kinetics*. Edition revised by Athel Cornish-Bowden, Third reprint edn (London, Portland Press Ltd).

Correia, J. J. (1991). Effects of antimetabolic agents on tubulin-nucleotide interactions. *Pharmacol Ther.* *52*, 127-147.

Dai, K., Mukherjee, A., Xu, Y., y Lutkenhaus, J. (1994). Mutations in *ftsZ* that confer resistance to SulA affect the interaction of FtsZ with GTP. *J Bacteriol.* *176*, 130-136.

David-Pfeuty, T., Simon, C., y Pantaloni, D. (1979). Effect of antimetabolic drugs on tubulin GTPase activity and self-assembly. *J Biol Chem.* *254*, 11696-11702.

Davis, A., Sage, C. R., Dougherty, C. A., y Farrell, K. W. (1994). Microtubule dynamics modulated by guanosine triphosphate hydrolysis activity of beta-tubulin. *Science.* *264*, 839-842.

Dawson, C. R. M., Elliot, D. C. Elliot, W. H., y Jones , K. M. (1972). *Data for Biochemical Research*, Ed. Oxford University, U.K.).

Díaz, R. (2005) Tesis en redacción, Pregrado, Universidad de Chile.

Eigen, M., y Hammes, G. G. (1963). Elementary Steps in Enzyme Reactions (as Studied by Relaxation Spectrometry). *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* *25*, 1-38.

Erickson, H. P. (1995). FtsZ, a prokaryotic homolog of tubulin? *Cell.* *80*, 367-370.

Erickson, H. P. (2000). Dynamin and FtsZ. Missing links in mitochondrial and bacterial division. *J Cell Biol.* *148*, 1103-1105.

Erickson, H. P., y O'Brien, E. T. (1992). Microtubule dynamic instability and GTP hydrolysis. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* *21*, 145-166.

Fersht, A. (1999). *Structure and Mechanism in Protein Science* (New York).

Fiser, A., y Sali, A. (2003). Modeller: generation and refinement of homology-based protein structure models. *Methods Enzymol.* 374, 461-491.

Garrard, S. M., Capaldo, C. T., Gao, L., Rosen, M. K., Macara, I. G., y Tomchick, D. R. (2003). Structure of Cdc42 in a complex with the GTPase-binding domain of the cell polarity protein, Par6. *Embo J.* 22, 1125-1133.

Glockner, F. O., Kube, M., Bauer, M., Teeling, H., Lombardot, T., Ludwig, W., Gade, D., Beck, A., Borzym, K., Heitmann, K., y *col.* (2003). Complete genome sequence of the marine planctomycete *Pirellula* sp. strain 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100, 8298-8303.

Jayaram, B., y Haley, B. E. (1994). Identification of peptides within the base binding domains of the GTP- and ATP-specific binding sites of tubulin. *J Biol Chem.* 269, 3233-3242.

Jenkins, C., Samudrala, R., Anderson, I., Hedlund, B. P., Petroni, G., Michailova, N., Pinel, N., Overbeek, R., Rosati, G., y Staley, J. T. (2002). Genes for the cytoskeletal protein tubulin in the bacterial genus *Prostheco bacter*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99, 17049-17054.

Joshi, H. C., Palacios, M. J., McNamara, L., y Cleveland, D. W. (1992). Gamma-tubulin is a centrosomal protein required for cell cycle-dependent microtubule nucleation. *Nature.* 356, 80-83.

Kirschner, M. W., y Mitchison, T. (1986). Microtubule dynamics. *Nature.* 324, 621.

Knipling, L., Hwang, J., y Wolff, J. (1999). Preparation and properties of pure tubulin S. *Cell Motil Cytoskeleton.* 43, 63-71.

Kull, F. J., y Fletterick, R. J. (1998). Is the tubulin/FtsZ fold related to the G-protein fold? *Trends Cell Biol.* 8, 306-307.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227, 680-685.

Lakowicz, J. R. (1999). Principles of Fluorescence Spectroscopy, Second edn, Academic/Plenum Publisher.

- Larsen, T. A., Goodsell, D. S., Cascio, D., Grzeskowiak, K., y Dickerson, R. E. (1989). The structure of DAPI bound to DNA. *J Biomol Struct Dyn.* 7, 477-491.
- Leung, A. K., Lucile White, E., Ross, L. J., Reynolds, R. C., DeVito, J. A., y Borhani, D. W. (2004). Structure of *Mycobacterium tuberculosis* FtsZ reveals unexpected, G protein-like conformational switches. *J Mol Biol.* 342, 953-970.
- Leung, A. K., White, E. L., Ross, L. J., y Borhani, D. W. (2000). Crystallization of the *Mycobacterium tuberculosis* cell-division protein FtsZ. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 56 Pt 12, 1634-1637.
- Linse, K., y Mandelkow, E. M. (1988). The GTP-binding peptide of beta-tubulin. Localization by direct photoaffinity labeling and comparison with nucleotide-binding proteins. *J Biol Chem.* 263, 15205-15210.
- Littauer, U. Z., Givon, D., Thierauf, M., Ginzburg, I., y Ponstingl, H. (1986). Common and distinct tubulin binding sites for microtubule-associated proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83, 7162-7166.
- Lowe, J. (1998). Crystal structure determination of FtsZ from *Methanococcus jannaschii*. *J Struct Biol.* 124, 235-243.
- Lowe, J., y Amos, L. A. (1998). Crystal structure of the bacterial cell-division protein FtsZ. *Nature.* 391, 203-206.
- Lu, C., Reedy, M., y Erickson, H. P. (2000). Straight and curved conformations of FtsZ are regulated by GTP hydrolysis. *J Bacteriol.* 182, 164-170.
- Lu, C., Stricker, J., y Erickson, H. P. (2001). Site-specific mutations of FtsZ effects on GTPase and in vitro assembly, Vol 1).
- Luthy, R., Bowie, J. U., y Eisenberg, D. (1992). Assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Nature.* 356, 83-85.
- MacNeal, R. K., y Purich, D. L. (1977). On the role of the tubulin nonexchangeable GTP site in bovine neurotubule assembly. *J Biol Chem.* 252, 4440-4442.
- Mandelkow, E. M., Mandelkow, E., y Milligan, R. A. (1991). Microtubule dynamics and microtubule caps: a time-resolved cryo-electron microscopy study. *J Cell Biol.* 114, 977-991.

- Margolin, W. (1998). A green light for the bacterial cytoskeleton. *Trends Microbiol.* **6**, 233-238.
- Margolin, W. (2000). Themes and variations in prokaryotic cell division. *FEMS Microbiol Rev.* **24**, 531-548.
- Mejillano, M. R., y Himes, R. H. (1991). Assembly properties of tubulin after carboxyl group modification. *J Biol Chem.* **266**, 657-664.
- Melki, R., Fievez, S., y Carrier, M. F. (1996). Continuous monitoring of Pi release following nucleotide hydrolysis in actin or tubulin assembly using 2-amino-6-mercapto-7-methylpurine ribonucleoside and purine-nucleoside phosphorylase as an enzyme-linked assay. *Biochemistry.* **35**, 12038-12045.
- Mingorance, J., Rueda, S., Gomez-Puertas, P., Valencia, A., y Vicente, M. (2001). Escherichia coli FtsZ polymers contain mostly GTP and have a high nucleotide turnover. *Mol Microbiol.* **41**, 83-91.
- Monasterio, O. (2001). Rate constants determined by nuclear magnetic resonance. *Methods.* **24**, 97-103.
- Morreale, A., Venkatesan, M., Mott, H. R., Owen, D., Nietlispach, D., Lowe, P. N., y Laue, E. D. (2000). Structure of Cdc42 bound to the GTPase binding domain of PAK. *Nat Struct Biol.* **7**, 384-388.
- Mukherjee, A., y Lutkenhaus, J. (1998). Purification, assembly, and localization of FtsZ. *Methods Enzymol.* **298**, 296-305.
- Mukherjee, A., y Lutkenhaus, J. (1999). Analysis of FtsZ assembly by light scattering and determination of the role of divalent metal cations. *J Bacteriol.* **181**, 823-832.
- Mukherjee, A., Saez, C., y Lutkenhaus, J. (2001). Assembly of an FtsZ mutant deficient in GTPase activity has implications for FtsZ assembly and the role of the Z ring in cell division. *J Bacteriol.* **183**, 7190-7197.
- Mukhopadhyay, K., Parrack, P. K., y Bhattacharyya, B. (1990). The carboxy terminus of the alpha subunit of tubulin regulates its interaction with colchicine. *Biochemistry.* **29**, 6845-6850.

- Na, G. C., y Timasheff, S. N. (1980). Thermodynamic linkage between tubulin self-association and the binding of vinblastine. *Biochemistry*. *19*, 1355-1365.
- Nassar, N., Hoffman, G. R., Manor, D., Clardy, J. C., y Cerione, R. A. (1998). Structures of Cdc42 bound to the active and catalytically compromised forms of Cdc42GAP. *Nat Struct Biol*. *5*, 1047-1052.
- Nogales, E. (2000). Structural insights into microtubule function. *Annu Rev Biochem*. *69*, 277-302.
- Nogales, E., Downing, K. H., Amos, L. A., y Lowe, J. (1998a). Tubulin and FtsZ form a distinct family of GTPases. *Nat Struct Biol*. *5*, 451-458.
- Nogales, E., Whittaker, M., Milligan, R. A., y Downing, K. H. (1999). High-resolution model of the microtubule. *Cell*. *96*, 79-88.
- Nogales, E., Wolf, S. G., y Downing, K. H. (1998b). Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography. *Nature*. *391*, 199-203.
- Oliva, M. A., Cordell, S. C., y Lowe, J. (2004). Structural insights into FtsZ protofilament formation. *Nat Struct Mol Biol*. *11*, 1243-1250.
- Ortiz, M., Lagos, R., y Monasterio, O. (1993). Interaction between the C-terminal peptides of tubulin and tubulin S detected with the fluorescent probe 4',6'-diamidino-2-phenylindole. *Arch Biochem Biophys*. *303*, 159-164.
- Perez-Ramirez, B., Shearwin, K. E., y Timasheff, S. N. (1994). The colchicine-induced GTPase activity of tubulin: state of the product. Activation by microtubule-promoting cosolvents. *Biochemistry*. *33*, 6253-6261.
- Pla, J., Sanchez, M., Palacios, P., Vicente, M., y Aldea, M. (1991). Preferential cytoplasmic location of FtsZ, a protein essential for *Escherichia coli* septation. *Mol Microbiol*. *5*, 1681-1686.
- Rivas, G., Lopez, A., Mingorance, J., Ferrandiz, M. J., Zorrilla, S., Minton, A. P., Vicente, M., y Andreu, J. M. (2000). Magnesium-induced linear self-association of the FtsZ bacterial cell division protein monomer. The primary steps for FtsZ assembly. *J Biol Chem*. *275*, 11740-11749.

- Romberg, L., y Levin, P. A. (2003). Assembly dynamics of the bacterial cell division protein FtsZ: Poised at the Edge of Stability. *Annu Rev Microbiol.* 57, 125-154.
- Romberg, L., Simon, M., y Erickson, H. P. (2001). Polymerization of FtsZ, a bacterial homolog of tubulin. is assembly cooperative? *J Biol Chem.* 276, 11743-11753.
- Sali, A., y Blundell, T. L. (1993). Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol.* 234, 779-815.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning, a laboratory manual, second edn*, Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Scheffers, D. J., de Wit, J. G., den Blaauwen, T., y Driessen, A. J. (2001). Substitution of a conserved aspartate allows cation-induced polymerization of FtsZ. *FEBS Lett.* 494, 34-37.
- She, Q., Singh, R. K., Confalonieri, F., Zivanovic, Y., Allard, G., Awayez, M. J., Chan-Weiher, C. C., Clausen, I. G., Curtis, B. A., De Moors, A., y col. (2001). The complete genome of the crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus* P2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98, 7835-7840.
- Shearwin, K. E., y Timasheff, S. N. (1992). Linkage between ligand binding and control of tubulin conformation. *Biochemistry.* 31, 8080-8089.
- Shivanna, B. D., Mejillano, M. R., Williams, T. D., y Himes, R. H. (1993). Exchangeable GTP binding site of beta-tubulin. Identification of cysteine 12 as the major site of cross-linking by direct photoaffinity labeling. *J Biol Chem.* 268, 127-132.
- Solomon, F. (1977). Binding sites for calcium on tubulin. *Biochemistry.* 16, 358-363.
- Sontag, C. A., Staley, J. T., y Erickson, H. P. (2005). In vitro assembly and GTP hydrolysis by bacterial tubulins BtubA and BtubB. *J Cell Biol.* 169, 233-238.
- Soto, C., Rodriguez, P. H., y Monasterio, O. (1996). Calcium and gadolinium ions stimulate the GTPase activity of purified chicken brain tubulin through a conformational change. *Biochemistry.* 35, 6337-6344.

Timasheff, S. N., Andreu, J. M., y Na, G. C. (1991). Physical and spectroscopic methods for the evaluation of the interactions of antimetabolic agents with tubulin. *Pharmacol Ther.* 52, 191-210.

Vaughan, S., Wickstead, B., Gull, K., y Addinall, S. G. (2004). Molecular evolution of FtsZ protein sequences encoded within the genomes of archaea, bacteria, and eukaryota. *J Mol Evol.* 58, 19-29.

Weisenberg, R. C., Borisy, G. G., y Taylor, E. W. (1968). The colchicine-binding protein of mammalian brain and its relation to microtubules. *Biochemistry.* 7, 4466-4479.

Weisenberg, R. C., y Timasheff, S. N. (1970). Aggregation of microtubule subunit protein. Effects of divalent cations, colchicine and vinblastine. *Biochemistry.* 9, 4110-4116.