

UCH-FC  
Biología  
D 542  
C.1

ESCUELA DE PREGRADO – FACULTAD DE CIENCIAS – UNIVERSIDAD DE CHILE



**“ANÁLISIS DEL PLEGAMIENTO Y DE LA ESTABILIDAD DE LOS  
DOMINIOS AMINO Y CARBOXILO DE  
LA PROTEINA FTSZ DE *ESCHERICHIA COLI*”**

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

**RODRIGO CARLOS DÍAZ ESPINOZA**

Dr. Octavio Monasterio Opazo  
Director de Memoria de Título

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Octavio Monasterio Opazo', written over a horizontal line.

**Comisión de Evaluación de la Memoria de Título**

Dr. Osvaldo Alvarez Araya  
Presidente Comisión

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Osvaldo Alvarez Araya', written over a horizontal line.

Dr. Carlos Jerez Guevara  
Corrector

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Carlos Jerez Guevara', written over a horizontal line.

Santiago de Chile, \_\_\_\_\_ 2005

*"An important scientific innovation rarely makes its way by gradually winning over and converting its opponents: it rarely happens that Saul becomes Paul. What does happen is that its opponents gradually die out, and that the growing generation is familiarized with the ideas from the beginning."*

*Max Planck, 1858-1947.*

*..... Dedicado a mis padres y a mi hermano....*

## **Agradecimientos**

En primer lugar quiero agradecer a mis padres y a mi hermano quienes han sido el apoyo fundamental durante toda mi vida, y sin duda lo seguirán siendo en el futuro. Al Dr. Octavio Monasterio por haberme enseñado los primeros pasos en el mundo de la biología estructural, y por haberme acogido en su laboratorio, lugar donde comencé mi camino en la investigación. A la Dra. Rosalba Lagos por su apoyo en todas mis aventuras académicas. A toda la gente del laboratorio de Biología Estructural y Molecular (CEM), quienes otorgan la vida y luz necesaria para seguir adelante en el trabajo. A "OPA" y a la "luna". Y finalmente, de manera especial, a Andrea Garcés, quien ha sido mi compañera en todo aspecto durante este trabajo.

## Biografía



Si existe un lugar confortable donde estar y sentirse querido.... ese es mi hogar, mi familia. Fueron mis padres quienes me trajeron al mundo un 21 de Octubre de 1979 y quienes me han apoyado en todas mis empresas. Toda mi enseñanza escolar y media la realicé en el Liceo Experimental Manuel de Salas. Ahí establecí fuertísimos lazos con mis compañeros de clase, las cuales se mantienen hasta el día de hoy. También nace en esa fecha la banda de rock "Robot The Mimbre", de la cual he sido la primera guitarra hasta el día de hoy. En el año 1997 me tocó emprender un gran rumbo, y una gran responsabilidad al mismo tiempo: el ingreso a la educación superior. Fue en esta etapa donde reafirmaría mi gusto por la ciencia y donde definiría el camino específico de mi investigación, al optar por estudiar Ingeniería en Biotecnología Molecular. El ingreso en la promoción fue auspicioso y alentador así como lo fue el desempeño en cada uno de los cursos, sin contar los innumerables partidos de fútbol del equipo popular "OPA" y los festejos en los "pastos" del campus Juan Gómez Millas. En el ámbito académico los cursos de Fisicoquímica y Biofisicoquímica de Macromoléculas fueron fundamentales en delinear mi próximo y definitivo paso en la ciencia: la Biología Estructural. Fue así como llegué al laboratorio de Biología Estructural y Molecular, bajo el alero del Dr. Octavio Monasterio. Aquí desarrollé mi tesis de pre-grado durante dos años de arduo, pero gratificante trabajo, en los cuales di mis primeros y a la vez esenciales pasos en este fascinante mundo. Fue en este lugar donde surgió en mi mente la necesidad de emprender un nuevo y extremadamente desafiante camino, quizás el salto más grande que he dado en mi vida: ingresar al doctorado en Biología Estructural en la University of Texas Medical Branch en Estados Unidos. Este fue una decisión fundamental en mi carrera, y es desde acá precisamente donde escribo estas líneas, y también se escriben las líneas que van a definir el camino que me queda por seguir.

**FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE**

**ANALISIS DEL PLEGAMIENTO Y DE LA ESTABILIDAD DE LOS  
DOMINIOS AMINO Y CARBOXILO DE  
LA PROTEINA FTSZ DE *ESCHERICHIA COLI***

por

Rodrigo Carlos Díaz Espinoza

Diciembre, 2005

Santiago-Chile

Director de Tesis: Dr. Octavio Monasterio Opazo

## Índice de contenidos

<b>INTRODUCCION.....</b>	<b>1</b>
<b>HIPOTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS.....</b>	<b>8</b>
<b>ESTRATEGIA TEORICA Y EXPERIMENTAL.....</b>	<b>9</b>
<b>MATERIALES Y METODOS.....</b>	<b>11</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>25</b>
<b>Diseño de mutantes.....</b>	<b>25</b>
Modelado de la estructura deEcFtsZ.....	25
Análisis de secuencia.....	27
<b>Purificación.....</b>	<b>34</b>
<b>Caracterización funcional.....</b>	<b>38</b>
Complementación <i>in vivo</i> .....	38
Polimerización.....	40
Actividad GTPásica.....	43
Mutante I294W.....	49
Liberación del nucleótido durante la desnaturación.....	52
Fluorescencia de triptófanos.....	53
<b>Plegamiento.....</b>	<b>57</b>
Fluorescencia.....	58
Cálculo de la energía libre.....	65
Microcalorimetría diferencial de barrido.....	68
<b>DISCUSION.....</b>	<b>74</b>
<b>Diseño de mutantes.....</b>	<b>74</b>
<b>Construcción y purificación de EcFtsZ silvestre y las mutantes.....</b>	<b>75</b>
<b>Caracterización funcional y estructural.....</b>	<b>77</b>
Funcionalidad.....	77
Estructura secundaria.....	86

Liberación del nucleótido durante la desnaturación.....	86
Fluorescencia.....	87
<b>Plegamiento.....</b>	<b>87</b>
Fluorescencia.....	87
Microcalorimetría.....	91
<b>Modelo de plegamiento.....</b>	<b>93</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>101</b>
<b>APENDICE I :</b>	
"Método de extrapolación lineal para el cálculo de la energía libre (MEL)....."	102
<b>APENDICE II</b>	
"Cálculo de la entalpía del desplegamiento de una proteína a partir de Microcalorimetría Diferencial de Barrido (DSC)....."	108
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>111</b>

### Indice de tablas

Tabla 1. "Secuencia de partidores utilizados en la mutagénesis sitio-dirigida".....	13
Tabla 2. "Número de aminoácidos aromáticos presentes en EcFtsZ".....	28
Tabla 3. "Porcentaje de ASA para residuos aromáticos con un valor menor o igual a 40% de ASA".....	28
Tabla 4. "Frecuencia de aminoácidos en diferentes posiciones de un alineamiento de 474 secuencias de FtsZ".....	29
Tabla 5. "Concentración crítica y valores de pendientes para la relación entre la dispersión de luz máxima y la concentración de proteína, de EcFtsZ silvestre y las mutantes que se muestra en la figura 15".....	43
Tabla 6. "Actividad específica y porcentaje de la actividad de EcFtsZ silvestre y mutantes".....	45
Tabla 7. "Estudios funcionales de la mutante F275A/I294W".....	52
Tabla 8. "Propiedades espectrales de la emisión del triptófano en condiciones nativas, obtenidas a partir de los espectros de cada mutante".....	55

Tabla 9. "Ajuste de las curvas de desnaturalación y renaturación de  
mutantes F135W e I294W"..... 67

Tabla 10. "Entalpía del desplegamiento por temperatura de MjFtsZ y EcFtsZ"..... 73

### Índice de figuras

Figura 1. "Optimización de la reacción de PCR"..... 14

Figura 2. "Patrones de restricción del plasmidio pMFV57"..... 16

Figura 3. "Análisis por electroforesis SDS-PAGE de la sobre-expresión  
de la proteína F135W".....18

Figura 4. "Comparación estructural entre EcFtsZ y MjFtsZ"..... 26

Figura 5. "Ubicación de las mutaciones seleccionadas en el  
modelo de la estructura tridimensional de EcFtsZ"..... 33

Figura 6. "Cromatograma de purificación de la proteína mutante F135W"..... 35

Figura 7. "Análisis por electroforesis SDS PAGE del producto de la etapa  
de la cromatografía de intercambio aniónico de la proteína mutante  
F135W"..... 35

Figura 8. "Análisis por electroforesis SDS-PAGE del producto  
de la purificación de la proteína mutante F135W"..... 36

Figura 9. "Análisis por electroforesis SDS PAGE de las proteínas  
purificadas EcFtsZ silvestre y sus mutantes"..... 37

Figura 10. "Gráfico de la sobrevivencia de EcFtsZ silvestre (C+) y sus  
mutantes F40W, F135W, F145W, Y222W, F275W e I294W"..... 39

Figura 11. "Polimerización y despolimerización de EcFtsZ  
silvestre y sus mutantes"..... 41

Figura 12. "Concentración crítica de la polimerización"..... 42

Figura 13. "Actividad GTPásica"..... 44

Figura 14. "Dicroísmo Circular (DC)"..... 48

Figura 15. "Análisis de la mutación I294W"..... 50

Figura 16. "Liberación de GDP"..... 53

Figura 17. "Fluorescencia de los triptófanos"..... 54

Figura 18. "Desnaturación al equilibrio".....	60
Figura 19. "Renaturación al equilibrio".....	61
Figura 20. "Máximos de emisión del mutante F40W".....	62
Figura 21. "Area y máximos de emisión del mutante F275W".....	64
Figura 22. "Ajuste de curvas de desnaturalación y renaturación de mutantes F135W e I294W".....	66
Figura 23. "Energía libre de desnaturalación y renaturación".....	67
Figura 24. "Microcalorimetría diferencial de barrido (DSC)".....	69
Figura 25. "Termograma de desplegamiento de EcFtsZ".....	71
Figura 26. "Termograma de desplegamiento de MjFtsZ".....	73
Figura 27. "Ambiente que rodea al triptófano 145 (W145)".....	80
Figura 28. "Análisis de las mutaciones correlacionadas en EcFtsZ".....	82
Figura 29. "Cambios conformacionales asociados a la hidrólisis del GTP".....	84
Figura 30. "Análisis de flexibilidad de MjFtsZ".....	90
Figura 31. "Desplegamiento hipotético de una proteína (P) de dos dominios separados topológicamente (I y II respectivamente)".....	96
Figura 32. "Modelo del desplegamiento de EcFtsZ".....	99
Figura 1. Apéndice I. "Simulación de un desplegamiento de dos estados".....	103
Figura 2. Apéndice I. "Análisis de la curva de desplegamiento de dos estados"...	104
Figura 1. Apéndice II. "DSC".....	109

## Abreviaturas

ASA:	Area de accesibilidad al solvente
C+/C-:	Control positivo/control negativo del experimento
CaCl <sub>2</sub> :	Cloruro de calcio
Cp:	Capacidad calórica
DC:	Dicroísmo circular
DSC:	Microcalorimetría diferencial de barrido
EcFtsZ:	Proteína FtsZ de <i>Escherichia coli</i>
FtsZ:	<i>Filament Thermosensitive Z protein</i>
MjFtsZ:	Proteína FtsZ de <i>Methanococcus jannashii</i>
GdmCl:	Cloruro de guanidinio
GDP:	Guanosin Bi-fosfato
GTP:	Guanosin Tri-fosfato
IPTG:	Inositol fosfato tio-galactósido
MgCl <sub>2</sub> :	Cloruro de magnesio
MjFtsZ:	Proteína FtsZ de <i>Methanococcus jannashii</i>
PaFtsZ:	Proteína FtsZ de <i>Pseudomonas aurogínosa</i>
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
RMSD:	Desviación promedio de la raíz de los cuadrados (también DMRS)
RPM:	Revoluciones por minuto
SDS-PAGE:	Electroforesis en geles de poliacrilamida.
U.A.:	Unidades arbitrarias
3D:	Tridimensional

## Unidades

Å	Åmtröng
°C	grados Celsius
cal	calorías
g	aceleración de gravedad
kDa	kilo Dalton
nm	nanómetros
M	molar

## ABSTRACT

The cell division protein FtsZ from *E. coli* forms the constrictor ring during the cell division. The ring is made of multiple monomers of FtsZ and each of these units is able to bind and hydrolyze GTP and polymerize *in vitro* and *in vivo*. The 3-D structure of FtsZ from *M. jannashii* (MjFtsZ) was obtained by X-Ray diffraction, showing two domains that are in structural contact: the amine-domain which binds nucleotide (GTP or GDP) and the carboxyl domain which interacts with other monomers of FtsZ and also with regulatory proteins involved in cell division. The FtsZ unfolding is a reversible process. Seven point mutants were made in order to analyze the equilibrium unfolding of EcFtsZ at the domains level, by using fluorescence spectroscopy: F40W, F135W, F145W, Y222W, F275W and I294W. In each mutant a tryptophan was introducing by amino acid substitution either in the amine or the carboxyl domain. The mutant design considered sequence, structural and physical-chemical analysis. The mutants were purified and functionally characterized. The F135W, Y222W and I294W mutants showed a deficiency in complementing *in vivo* the FtsZ absence in *E. coli* strains in which the FtsZ gene was previously deleted. Most mutants were able to hydrolyze GTP and polymerize *in vitro*, but the I294W mutant did not polymerize. The tryptophan 294 of this mutant was shown to be likely involved in an aromatic interaction with phenylalanine 275. In order to test this idea, a new mutant was built: F275A/I294W. The results with this double mutant showed a total reversion of the deficiency observed with the I294W mutant in the *in vivo* complementation experiments, and a partial recovery of the GTPase activity. The native secondary structure as well as the stability of the F135W and I294W mutants was shown to be very similar to that of the wild-type FtsZ (EcFtsZ), as judged by circular dichroism native spectra and the equilibrium

unfolding of each protein. The denaturant-induced unfolding of EcFtsZ showed that the nucleotide is totally released from the protein at 1,2 M GdmCl. The process is associated to a change in the secondary structure. The equilibrium unfolding and refolding of F40W and F135W mutants (located in the amine domain) and F275W and I294W (in the carboxyl domain) by using fluorescence, showed that the highest structural change occurs between 0,1 and 1,8 M GdmCl. A one-transition cooperative unfolding was observed with the proteins that carry a mutation located closer to the inter-domain interface (F135W and I294W). The F40W mutant unfolding showed a constant emission wavelength around 1 M GdmCl, likely associated to the formation of an intermediate. In the unfolding of the F275W mutant, a notorious increase in the fluorescence was detected at the initial concentrations of GdmCl, reaching a peak at 0,6 M GdmCl. This phenomenon is commonly named Hyperfluorescence. The thermal denaturation of EcFtsZ and MjFtsZ was irreversible. Transitions were observed only when GdmCl was added to the system. The heat absorptions were poorly cooperative, suggesting that intermediates are formed during the thermal unfolding. All these results indicate that the folding of FtsZ is at least a two-stage process with intermediates involved. An FtsZ folding model is proposed. The inter-domain interface would be strongly implicated in the global stability of the protein, as well as in the structural and functional connections between the nucleotide binding site in the amine domain and far regions located in the carboxyl domain. An intermediate would be formed by the local denaturation of the most solvent- and denaturant-accessible regions in both domains that are far away from the interface. The folding of each domain is likely a "diffusion-collision" mechanism, whereas the interface folding is more according to a "hydrophobic collapse" process.

## RESUMEN

La proteína FtsZ de *E. coli* (EcFtsZ) forma el anillo constrictor que permite la septación de la célula durante el proceso de división celular. Este anillo está compuesto de múltiples monómeros de FtsZ, que poseen la capacidad de unir e hidrolizar GTP y polimerizar *in vitro* e *in vivo*. La resolución de la estructura cristalina de FtsZ de *M. jannashii*, homólogo estructural de EcFtsZ, mostró dos dominios que se encuentran en contacto estructural: un dominio amino que une nucleótido y un dominio carboxilo que interactúa con otros monómeros de FtsZ y también con proteínas reguladoras de la división celular. El desplegamiento de FtsZ es un proceso reversible. Para analizar el desplegamiento al equilibrio de la proteína en función de sus dominios, seguido por espectroscopía de fluorescencia, se diseñaron y construyeron las mutantes de EcFtsZ F40W, F135W, F145W, Y222W, F275W e I294W que poseen un único triptófano en el dominio amino o en el carboxilo. El diseño incluyó el análisis de secuencias (análisis evolutivo), estructurales y fisicoquímicos. Las mutantes fueron purificadas, y se analizó su funcionalidad. En los ensayos *in vivo* de complementación de la ausencia de EcFtsZ silvestre en cepas modificadas de *E. coli*, las mutantes F135W, Y222W e I294W mostraron deficiencias para suplir su función. Todas las mutantes presentaron actividad GTPásica y fueron capaces de polimerizar *in vitro*, a excepción de la mutante I294W que no fue capaz de formar polímeros bajo las condiciones estudiadas. Se determinó que el triptófano 294 de la mutante I294W podría originar una interacción aromática con la fenilalanina 275, para lo cual se diseñó y construyó el mutante doble F275A/I294W, que revirtió completamente la deficiencia observada en los ensayos de complementación antes mencionados, y de manera parcial las alteraciones en la actividad GTPásica. Los experimentos de

dicroísmo circular indicaron que las mutantes F135W e I294W poseen una estructura nativa similar a EcFtsZ silvestre, y la estabilidad no se alteró a causa de la mutación. A partir de los experimentos de desnaturación química de la EcFtsZ silvestre, se determinó que el nucleótido se separa completamente de la proteína a una concentración de GdmCl de 1,2 M. Este evento está asociado a un cambio en la estructura secundaria. La desnaturación y renaturación al equilibrio de los mutantes F40W, F135W (ambos localizados en el dominio amino), F275W e I294W (dominio carboxilo), seguidas por fluorescencia, mostraron que la mayor variación estructural se produce en el intervalo de concentraciones entre 0,1 y 1.8 M. Las mutantes con las mutaciones ubicadas más cerca de la interfase estructural que existe entre ambos dominios (mutantes F135W e I294W), mostraron un plegamiento de tipo cooperativo de una sola transición. El desplegamiento de la mutante F40W presentó una zona intermedia alrededor de 1 M de GdmCl, caracterizado por una emisión de longitud de onda constante, asociado probablemente a la formación de un intermediario de plegamiento. El plegamiento de la mutante F275W mostró un aumento inusual de la fluorescencia al inicio del proceso, fenómeno denominado en la literatura como hiperfluorescencia, con un pico alcanzado a 0,6 M de GdmCl. La desnaturación térmica de EcFtsZ y MjFtsZ fue irreversible, y sólo se observaron transiciones al agregar GdmCl al sistema. Las absorciones de calor fueron muy poco cooperativas, lo que sugiere que se forman intermediarios estables de plegamiento durante el proceso. Los resultados en su conjunto, indican que el plegamiento reversible de EcFtsZ es un proceso de al menos dos etapas, con la presencia de intermediarios. Un modelo de plegamiento es propuesto. La interfase entre ambos dominios estaría implicada fuertemente en la estabilidad global de la proteína, y permite la conexión estructural y funcional entre el sitio de unión a nucleótido del dominio amino con regiones del dominio carboxilo. Los intermediarios se formarían por una desnaturación local de las zonas

más expuestas al solvente y al agente desnaturante, alejadas de la interfase. El plegamiento a nivel de los dominios de la proteína corresponde más bien a un mecanismo de tipo "difusión-colisión", y la interfase inter-dominio se plegaría mediante un mecanismo de "colapso hidrófobo".

## INTRODUCCION

### División Celular Bacteriana y FtsZ

La división celular es un proceso complejo en el cual participan diversas proteínas, cuya función general es regular espacial y temporalmente las reacciones que conllevan finalmente a la citocinesis. Se sabe que existen diversos tipos de división celular en arqueas, bacterias, mitocondrias, cloroplastos, plantas y animales, que se diferencian principalmente en los mecanismos utilizados para llevar a cabo el proceso, siendo el resultado final, la separación espacial de la célula madre para originar dos células hijas independientes.

La división de la bacteria en la mitad de su eje longitudinal presenta dos tipos de mecanismos, uno donde la célula construye un tabique (*Bacillus subtilis*) y el otro donde se produce septación (*Escherichia coli*). La división celular en *E. coli* se caracteriza por la formación de un anillo que se une a la membrana interna y recluta a las otras proteínas del llamado *divisoma celular* que contrae las membranas y la pared hasta producir la septación celular (Bi y Lutkenhaus 1991). El anillo constrictor (anillo Z) es una estructura polimérica compuesta de múltiples unidades de monómeros de FtsZ (Ward y Lutkenhaus 1985).

La eliminación del gen cromosómico de FtsZ de *E. coli* impide la división celular, y por ende la viabilidad del cultivo bacteriano (Ward y Lutkenhaus 1985). De ahí su carácter de proteína esencial de la división. Desde el punto de vista funcional se demostró que FtsZ posee actividad GTPasa y polimeriza *in vivo* e *in vitro* (de Boer y col., 1992; Mukherjee y Lutkenhaus 1994). Sin embargo, al igual que la tubulina, esta proteína, que forma parte de una familia distinta del resto de las GTPasas, presenta un

mecanismo de hidrólisis de GTP que depende de la interacción entre monómeros (Nogales y col., 1998). El ensamblaje *in vitro* de los protofilamentos rectos de EcFtsZ, requiere la presencia del complejo de coordinación GTP-Mg<sup>+2</sup> en condiciones adecuadas de pH y temperatura (de Boer y col., 1992; Yu y Margolin 1997). Sin embargo, se demostró que la FtsZ del microorganismo hipertermófilo *Methanococcus jannashii* (MjFtsZ) no requiere de GTP para formar estos protofilamentos (Huecas y Andreu 2004). En presencia de GDP se forman protofilamentos curvos (Lu y Erickson 1999).

Se conoce la estructura cristalina de MjFtsZ que fue determinada por difracción de rayos X a una resolución de 2,8 Å (Lowe y Amos 1998). En la estructura se observan dos regiones que corresponden, en la FtsZ de *Termitoga maritima* (van den Ent y Lowe 2000), a los dominios amino y carboxilo terminal. La región amino posee un plegamiento de tipo Rossmann, formado por una sábana de 5 hebras beta que en conjunto con cuatro hélices alfa originan el bolsillo de unión al nucleótido. La región carboxilo terminal posee un plegamiento de tipo "alpha-beta plaits" o pliegues alfa-beta, en el cual se posiciona una sábana compuesta por 4 hebras beta con dos hélices alfa alternadas entre las hebras con un ángulo de inclinación de 90° respecto de la sábana ubicada en el dominio Rossmann. El dominio amino es el encargado de la actividad GTPásica que depende de la interacción con el domino carboxilo del monómero vecino en el protofilamento (Lu y Erickson 1998).

La resolución de la estructura tridimensional de MjFtsZ y de FtsZ del mesófilo *Pseudomonas auroginosa* (PaFtsZ) por difracción de rayos X, junto con la reciente estructura reportada de los microtúbulos a 8 Å de resolución (Lowe y col., 2001), ha permitido profundizar en los mecanismos de polimerización propuestos para el funcionamiento de estas proteínas. Sin embargo, aún existen muchas incógnitas

respecto a la aplicación de estos mecanismos a los procesos que se llevan a cabo *in vivo*.

Recientemente, se reportó la presencia de la proteína GroEL en el sitio de formación del divisoma y en zonas cercanas a él (Ogino y col., 2004). Esta proteína es una chaperona molecular encargada de facilitar el plegamiento de proteínas y también corregir plegamientos erróneos, evitando así la formación de agregados inespecíficos. Esto sienta un precedente tremendamente importante, pues ambos trabajos sugieren que en el divisoma no solo estarían ocurriendo interacciones reguladoras de la formación del divisoma mismo sino también estarían involucrados mecanismos de plegamiento y estabilización de proteínas no reportados anteriormente. Al tomar en consideración que la mayoría de las proteínas bacterianas, incluida FtsZ, son proteínas solubles y capaces de plegarse de manera independiente, la presencia de chaperonas en el sitio de formación del divisoma genera una interesante interrogante respecto del papel del plegamiento en el proceso de la división celular. Se sugirió que la función de la chaperona podría estar implicada a varios niveles, ya sea en la formación del divisoma mismo, en la estabilización del anillo Z o simplemente como mecanismo de regulación del plegamiento o incluso reclutamiento de los componentes del sistema. Así, la caracterización del plegamiento de las proteínas involucradas en este proceso es fundamental para entender el rol de la estabilidad y el plegamiento en la división celular.

### **Plegamiento**

La representación clásica de una proteína incluye una estructura tridimensional particular en el espacio. Esto implica necesariamente la existencia de una estructura definida que es estable en un medio en particular como resultado de su contenido

energético. Este hecho sumado a la existencia de una gran diversidad de estructuras tridimensionales observadas en la naturaleza, sugiere la idea de que existe una especie de propensión interna dada por la secuencia peptídica y sus interacciones tridimensionales. Existe un consenso actualmente en torno a esta idea.

La propensión interna de la proteína hacia una conformación estable y más probable, puede ser explicada desde diferentes aproximaciones, ya sea biológicas, físicas o químicas. Probablemente, la herramienta más sólida para entender el proceso de plegamiento proviene de la termodinámica. De esta forma, es posible decir que la secuencia definida de la proteína es la fuente del camino termodinámico más probable que sigue el proceso de plegamiento, y la conformación preferente final es el ensamble estructural más estable y que probablemente posee el menor valor posible para la función de estado  $G$  respecto del valor asociado al estado desnaturalado. Esto sin duda tiene enormes implicancias no solo desde un punto de vista fisicoquímico sino también biológico, pues la función de las proteínas en cualquier organismo está directamente relacionada con su estructura, y cualquier error durante ese proceso puede ocasionar perturbaciones en la estabilidad metabólica de una célula por ejemplo y la selección natural prescindirá de esta estructura. Todo esto lleva consigo a la idea de que la forma más apropiada de representar a una proteína es precisamente en su estructura más estable, el estado nativo.



El equilibrio mostrado en la ecuación 1 corresponde a la reacción de plegamiento de dos estados de una proteína, donde el estado nativo (N) es termodinámicamente el más estable, de allí que en el equilibrio la población de proteína nativa será mucho mayor que la desnaturalada, en un medio apropiado generalmente

acuoso. Esta representación química es la versión más simplificada del proceso, y como tal constituye más bien la excepción que la regla en el plegamiento, pues en general existe un gran número de caminos alternativos que agregan complejidad a este proceso.

Un intermediario clásico es el "*molten globule*" o glóbulo fundido, una estructura estable que está a medio camino entre el estado desnaturalado y el nativo y que correspondería a un intermediario de plegamiento. Su estructura se caracteriza por poseer un contenido de estructura secundaria muy similar al de la proteína en estado nativo, pero con un alto grado de zonas hidrófobas expuestas al solvente, asociado a cambios importantes en la estructura terciaria. Su participación como intermediario de plegamiento no es clara, pero podría adecuarse mejor como un intermediario en los modelos de plegamiento denominados "difusión-colisión" y "colapso hidrófobo y rearreglo", sin embargo no correspondería a los intermediarios propuestos en el mecanismo de "propagación" (Fersht 1998).

Con el fin de reducir la formación de intermediarios, la mayoría de los trabajos de plegamiento se han realizado en proteínas pequeñas, cuyos pesos moleculares generalmente oscilan entre 10 y 30 kDa. Así, mientras menor es el tamaño, mayor es la simplicidad del proceso de plegamiento, y menor es la probabilidad de encontrar intermediarios. En ausencia de intermediarios, solo es posible encontrar dos estados termodinámicamente estables, el estado nativo y el desnaturalado, como se muestra en la ecuación 1. Esta reacción de dos estados implica que tanto en la pérdida como en la formación de la estructura terciaria no hay estructuras estables en el paso desde el estado nativo al desnaturalado y viceversa. Por lo tanto, basta con desestabilizar un enlace de la estructura nativa para que ésta se pierda en forma cooperativa. Desde un punto de vista energético el plegamiento ocurre en forma simultánea, sin la presencia

de zonas estructurales locales cuyas propiedades energéticas difieran considerablemente del resto de la estructura. Este tipo de plegamiento se denomina cooperativo (ver apéndice 1).

En la proteína, la presencia de regiones que poseen plegamientos diferentes con propiedades termodinámicas y funcionales características y que en forma aislada se pliegan y conservan su función, los denominaremos dominios. De allí que mientras mayor sea el tamaño de la proteína, mayor será la probabilidad de encontrar dominios. Aquellas proteínas que poseen dos o más dominios presentan procesos de plegamiento con más de una transición cooperativa en su curva de desnaturación o renaturación. El número de transiciones en la mayoría de los casos corresponde al número de intermediarios termodinámicos de plegamiento menos 1. Desde un punto de vista cinético, el número de transiciones se corresponde con la presencia de zonas de menor energía en un perfil cinético de energía que en inglés se denomina "funnel" (embudo).

El modelo de la estructura tridimensional de EcFtsZ muestra dos dominios cuando se la compara con la estructura cristalina de MjFtsZ y ambas proteínas se pliegan de manera reversible e independiente en solución por procesos diferentes. Así, MjFtsZ muestra un proceso cooperativo de dos estados y EcFtsZ la presencia de un intermediario de plegamiento (Andreu y col., 2002). La presencia de este intermediario de plegamiento fue confirmada y sus características no se ajustan a la presencia de un glóbulo fundido (Santra y Panda 2003).

La presencia de dos dominios en EcFtsZ y de un intermediario en el proceso de plegamiento, plantea un interesante problema respecto de la relación estructura-función en la proteína. La liberación del nucleótido durante la desnaturación de EcFtsZ está asociada a cambios en la estructura secundaria, a diferencia de MjFtsZ que es

capaz de polimerizar sin la presencia de GTP, indicando que en ambas proteínas la relación estructural con el nucleótido es distinta. Estos resultados indicarían que la presencia del nucleótido en MjFtsZ es prescindible respecto a un cambio en estructura secundaria, pero no muestran qué ocurre con la estructura en el entorno del sitio de unión de GTP. La polimerización *in vitro* de los filamentos rectos de MjFtsZ apoya la idea que la presencia del GTP no es necesaria en esta proteína (Huecas y Andreu 2004). Sin embargo se describió que FtsZ tendría dos conformaciones: una recta en presencia de GTP y otra curva con GDP (Lu y col., 2000). De allí que sería la unión GDP el que induciría un cambio conformacional responsable de la despolimerización. Los resultados en su conjunto muestran que el interruptor para la polimerización y despolimerización depende del estado de fosforilación del nucleótido que induce los cambios conformacionales que afectan la estabilidad de los polímeros. Por lo tanto, este efecto debiera comprometer a ambos dominios de la proteína que debieran actuar en forma concertada. El análisis de la contribución estructural y energética de ambos dominios sobre el plegamiento general de la proteína, permitirá determinar la dependencia de la estabilidad de EcFtsZ en términos de las interacciones inter-dominio.

## HIPOTESIS DE TRABAJO

**H<sub>0</sub>** “El plegamiento no cooperativo de EcFtsZ debiera mostrar intermediarios estables o arreglos estructurales si la estabilidad termodinámica de los dominios amino y carboxilo es diferente y la interacción inter-dominio contribuye de manera significativa a la estabilidad estructural global de EcFtsZ”

**H<sub>1</sub>** “El plegamiento cooperativo de EcFtsZ no debiera mostrar intermediarios estables, si la estabilidad termodinámica de los dominios es similar y la interacción inter-dominio es importante”

## OBJETIVO GENERAL

- Caracterizar y analizar *in vitro* el plegamiento al equilibrio de EcFtsZ para determinar las estabildades de sus dos dominios y las interacciones entre ambos, a través de diferentes aproximaciones experimentales.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Modelar, construir, sobre-expresar, y purificar mutantes de EcFtsZ que poseen triptófano como sonda fluorescente intrínseca de plegamiento.
- 2) Caracterizar la funcionalidad *in vitro* e *in vivo* de las mutantes construidas. Análisis de estructura-función.
- 3) Analizar el plegamiento al equilibrio de mutantes a través de las técnicas espectroscópicas de dicroísmo circular y fluorescencia.
- 4) Caracterizar el plegamiento de EcFtsZ silvestre y MjFtsZ a través de microcalorimetría diferencial de barrido (DSC).
- 5) Proponer un modelo teórico para el plegamiento de EcFtsZ.

## ESTRATEGIA TEORICA Y EXPERIMENTAL

Para abordar el estudio de la estabilidad y plegamiento de EcFtsZ, se diseñó una estrategia general basada en el diseño, construcción, purificación, caracterización estructural y funcional de mutantes en EcFtsZ que poseen un único triptófano como sonda fluorescente, debido a que este aminoácido no se encuentra en la secuencia de EcFtsZ silvestre. La presencia de este residuo fluorescente ha permitido caracterizar la estructura terciaria de varias proteínas, debido a que sus características espectrales son altamente sensibles a las variaciones que experimenta el ambiente que lo rodea. Se introducirá un triptófano en solo uno de los dominios cada vez. Se seleccionarán tres regiones por dominio lo que originará la construcción de seis mutantes puntuales. De esta manera, se podrá conocer el ambiente de tres regiones diferentes por cada dominio durante el plegamiento de EcFtsZ y determinar las estabildades relativas de ambos dominios.

**Diseño y construcción de las mutantes.** Para el diseño de mutantes, se considerarán aspectos evolutivos, estructurales y las características fisicoquímicas de los residuos de los aminoácidos. Con este propósito se hará un análisis de alineación de múltiples secuencias de FtsZ con alto grado de conservación. Se construirán modelos de la estructura tridimensional de EcFtsZ y las mutantes y por último, se considerarán las propiedades de los residuos a mutar y las características físicas y químicas del ambiente que los rodea. Se construirán las mutantes mediante la técnica de mutagénesis sitio-dirigida y la proteína se expresará en altas cantidades en *E. coli* y se purificará a homogeneidad.

**Caracterización de EcFtsZ y las mutantes.** Se determinará las características funcionales de las proteínas mutantes como su actividad GTPásica y la polimerización *in vitro*, y la sobrevivencia de la célula al complementar con las mutantes *in vivo*. La estructura secundaria de las mutantes con defectos en su funcionalidad será analizada por difracción circular para descartar un efecto de la mutación sobre el contenido de estructura secundaria. La caracterización funcional y estructural de EcFtsZ silvestre se utilizará como referencia para analizar los resultados obtenidos con los mutantes.

**Plegamiento y desplegamiento de EcFtsZ mutantes.** Mediante espectroscopía de fluorescencia intrínseca del triptófano se analizará el desplegamiento y replegamiento de las mutantes. La desnaturación y renaturación por agentes caotrópicos (desnaturación y renaturación química) se hará al equilibrio. Por microcalorimetría diferencial de barrido (DSC) se estudiará la presencia de intermediarios de desplegamiento por temperatura de EcFtsZ silvestre y MjFtsZ, a través de un proyecto de colaboración con el Dr. Marcelo Santoro del Laboratorio de Bioquímica e Inmunología de la Universidad Federal de Minas Gerais en Brasil (Proyecto financiado por la Red Latinoamericana de Biología, RELAB).

**Proposición de un Modelo.** Se diseñará finalmente un modelo del plegamiento de EcFtsZ que sea compatible con los resultados obtenidos para EcFtsZ silvestre y los mutantes.

## MATERIALES Y METODOS

**Modelado comparativo.** Para construir un modelo tridimensional (3D) de la estructura de una proteína se utiliza generalmente dos métodos:

- **Modelado *Ab-Initio*.** Corresponde a la generación de estructuras tridimensionales a partir de las propiedades físicas y químicas de los aminoácidos constituyentes y de las interacciones entre ellos.
- **Modelado Comparativo.** Utiliza estructuras tridimensionales conocidas (moldes) para la determinación de nuevas estructuras. Se basa en la identidad de secuencia entre la secuencia problema o *target* y el molde 3D dado por la alineación entre ellos. La generación de restricciones espaciales y energéticas a partir de los moldes permite evaluar la conformación tridimensional de los modelos generados.

Las estructuras de EcFtsZ silvestre y mutantes se determinaron por modelado comparativo, para lo cual se utilizó el programa *Modeller 6,0* (Sali y col., 1995). La alineación múltiple correspondiente a la estructura 1FSZ de MjFtsZ se obtuvo desde la base de datos HSSP (Homology-derived Secondary Structure of Proteins). De aquí se seleccionó las secuencias alineadas de EcFtsZ y 1OFU de PaFtsZ, que se utilizó como archivos de entrada del programa. Las estructuras usadas como moldes para la generación del modelo fueron 1FSZ y 1OFU con un 40% y 60% de identidad respecto de la secuencia de EcFtsZ, respectivamente. Se generó veinte modelos, y se seleccionó aquel de menor valor de pseudo-energía. La evaluación de los modelos se hizo a través del programa *Verify 3D* y *PROSA II*.

**Alineación múltiple de secuencias.** Para analizar la frecuencia de aparición de residuos aromáticos se hizo un BLASTp para buscar las secuencias dentro de la base de datos NR que poseen al menos un 40% de identidad con EcFtsZ. Se seleccionó el GI (código de identificación génica) de cada una de las secuencias para obtener las secuencias completas, que fueron alineadas con ClustalW.

**Frecuencia de residuos.** Para determinar la frecuencia de residuos en cada una de las posiciones en la alineación correspondiente a los residuos candidatos a ser mutados, se usó un programa escrito en lenguaje Perl del laboratorio.

**Análisis de los modelos 3D.** El análisis de los modelos a través del paquete de programas *DS Modeling 1,1* de *Accelrys*, incluyó la determinación del porcentaje de accesibilidad al solvente (ASA), el ambiente fisicoquímico y las interacciones de los residuos de interés.

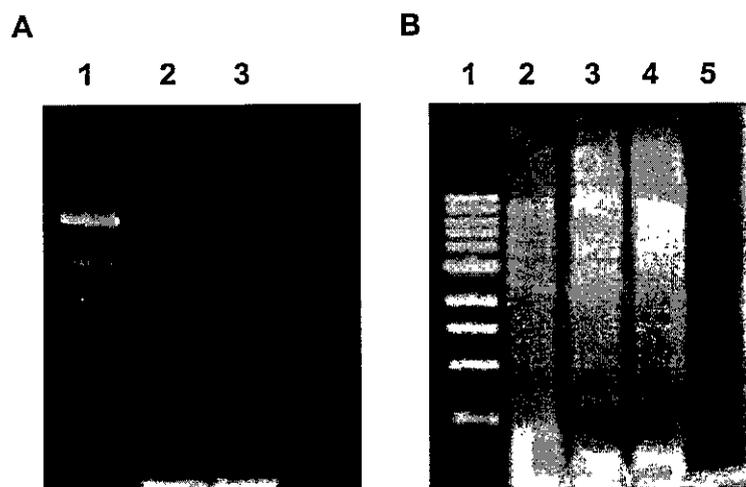
**Mutagénesis sitio-dirigida.** Para realizar la mutagénesis sitio-dirigida se utilizó el plasmidio pMFV57, que posee el gen de FtsZ silvestre unido al promotor perteneciente al fago T7. Este promotor es reconocido por la RNA polimerasa del fago cuya expresión es inducible por IPTG en cepas de *E. coli*, que se utilizará para la sobre-expresión de proteínas exógenas. Este plasmidio posee además el gen de la beta-lactamasa que confiere resistencia al hospedero del vector contra el antibiótico ampicilina y permite seleccionar los clones transformados. La mutación sitio-dirigida se hizo con el "kit" comercial *Quick Change ® XL Site Directed Mutagenesis* (Stratagene) y para cada mutación se diseñó partidores que contenían en su secuencia los codones apropiados (construidos por *Polyscience*).

**Tabla 1.** Secuencia de partidores utilizados en la mutagénesis sitio-dirigida <sup>a</sup>.

<b>Mutación</b>	<b>Partidor*</b>
F40W	5'- CATTGAAGGTGTTGAATTCT <b>GGG</b> CGGTAAATACCGATGCAC -3'
F135W	5'- GCTGTCGTCACCTAAGCCTT <b>GGA</b> ACTTTGAAGGCAAGAAGC-3'
F145W	5'- CAAGAAGCGTATGGCAT <b>GGG</b> CGGAGCAGGGGATC -3'
Y222W	5'- GTAATGTCTGAGATGGGCT <b>GGG</b> CAATGATGGGTTCTGG -3'
F275W	5'- CCTGCGTCTGGATGAGT <b>GGG</b> AAACGGTAGGTAACAC -3'
I294W	5'- CGACAACGCGACTGTGGTTT <b>GGG</b> GTA CTCTCTTGACCCG -3'

<sup>a</sup>Se hizo además partidores complementarios de cada uno para la reacción de mutagénesis sitio-dirigida.

Antes de iniciar el proceso de optimización de la reacción de amplificación de DNA o PCR, se comprobó que los partidores diseñados fueran funcionales, esto es que fueran capaces de unirse al DNA molde en la zona predicha, y así permitir una adecuada amplificación de una zona predeterminada del gen de FtsZ. Para esto, se utilizó otros partidores cuya capacidad de unirse al DNA había sido probada anteriormente en el laboratorio (Fig. 1).



**Figura 1. Optimización de la reacción de PCR (gel de agarosa al 10%).** Se amplificó el plasmidio pMFV57 por PCR utilizando los partidores mutagénicos, para determinar las condiciones óptimas para la mutagénesis sitio-dirigida. **A. Carril 1.** Estándar de pesos moleculares de 1 kDa. **Carril 2.** Producto de PCR de la reacción para el mutante F135W. **Carril 3.** Control negativo (reacción de PCR sin DNA plasmidial). **B. Carril 1.** Estándar de pesos moleculares de 1 kDa. **Carril 2.** Producto de PCR de la reacción con el mutante I294W con 0,5  $\mu$ l de partidor a una concentración de 12 pmol/ $\mu$ l. **Carril 3.** Producto de PCR de la reacción para el mutante I294W con 0,25  $\mu$ l de partidor a una concentración de 12 pmol/ $\mu$ l. **Carril 4.** Producto de PCR de la reacción para el mutante I294W con 1,0  $\mu$ l de partidor a una concentración de 12 pmol/ $\mu$ l. **Carril 5.** Control negativo (reacción de PCR sin DNA plasmidial).

La reacción de PCR correspondiente a la mutación F135W generó un fragmento del tamaño del plasmidio pMFV57 (Fig. 1 A), aplicando las condiciones estándar de reacción sugeridas en el manual del "Kit".

Etapas del PCR y las temperaturas y tiempos de duración establecidas:

- Calentamiento inicial: 95 °C , 5 min
  - Desnaturación : 95 °C, 1min
  - Alineación: 55 °C, 1 min
  - Extensión: 68 °C, 20 min
- } 18 ciclos
- Extensión final: 72 °C, 5 min

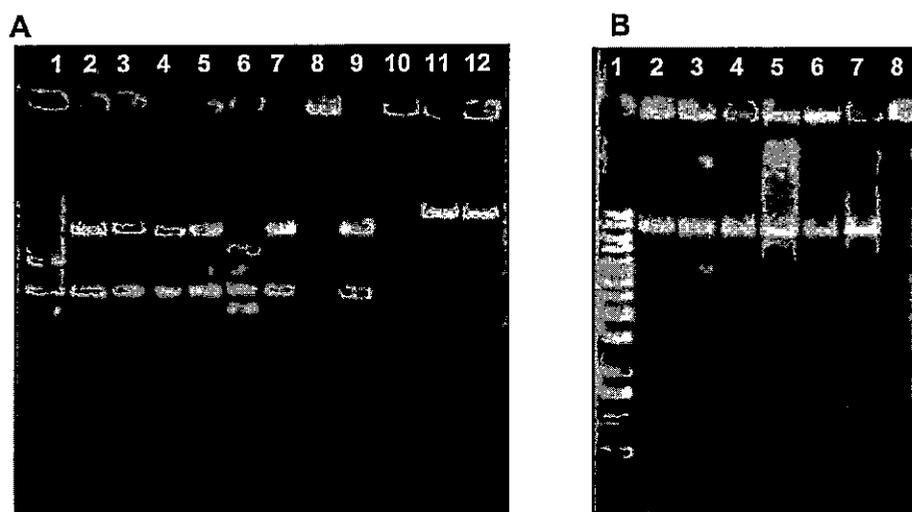
Para el caso de la mutación I294W, se probó tres temperaturas diferentes de alineación, pues no se obtuvo producto de PCR visible con las condiciones usadas para la mutación F135W. Posteriormente, se hizo tres reacciones que diferían en la cantidad de partidor utilizado, para aumentar la eficiencia de la hibridación con el DNA molde (Fig. 1 B).

- Calentamiento inicial: 95 °C , 8 min
  - Desnaturación : 95 °C, 2 min
  - Alineación: 60 °C, 1 min
  - Extensión: 70 °C, 20 min
- } 18 ciclos
- Extensión final: 72 °C, 5 min

Se agregó una cantidad de partidor de 375  $\mu$ moles (25 pmol/ $\mu$ l), pues con ese valor se obtuvo los mejores resultados de amplificación, de acuerdo a figura 1B, carril 4.

A partir de los resultados de la optimización, se inició la mutagénesis sitio-dirigida con las condiciones determinadas. Se purificó el DNA plasmidial de 4 clones seleccionados por cada reacción de mutagénesis sitio-dirigida, y se digirió

con dos enzimas de restricción: *EcoRV* (3 sitios de corte en plasmidio pMFV57), *Hind III* (dos sitios de corte) (Fig. 2).



**Figura 2. Patrones de restricción del plasmidio pMFV57 (gel de agarosa al 10%).**  
**A.** Patrones obtenidos con la enzima *EcoRV*. **Carril 1.** Estándar de peso molecular de 1 kDa. **Carriles 2, 3, 4 y 5.** Clones 1, 3, 5 y 8 provenientes de la mutación F135W. **Carriles 6, 7, 8 y 9.** Clones 1, 3, 5 y 7, obtenidos a partir de la mutación I294W. **Carril 10.** Control negativo (digestión sin molde). **B.** Patrones obtenidos con *Hind III*. **Carril 1.** Estándar de peso molecular de 1 kDa. **Carriles 2,3.** Clones 5,8 provenientes de la mutación F135W. Los clones 1 y 3 se muestran en los carriles 11 y 12 respectivamente de la figura 2A. **Carriles 4, 5, 6 y 7.** Clones 1, 3, 5 y 7, obtenidos a partir de la mutación I294W. **Carril 8.** Control negativo (digestión sin molde).

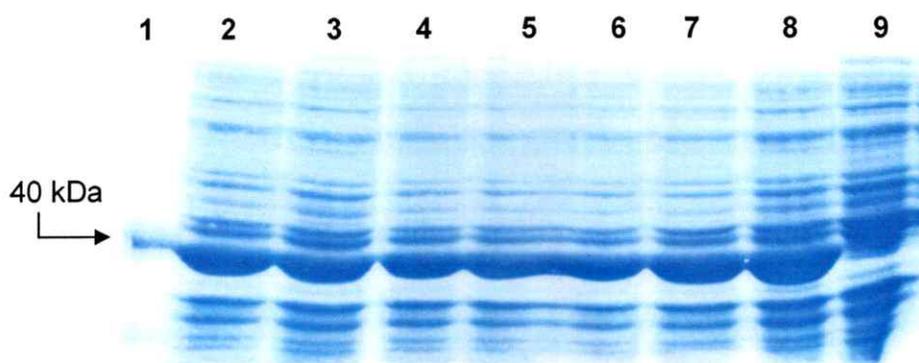
Se escogió algunos de los clones que presentaron los patrones de restricción esperados (Fig. 2). Para la mutación F135W se escogió el clon 1 y para la mutación I294W el clon 3. De manera similar se procedió con los demás mutantes.

La secuencia del gen mutado de EcFtsZ se determinó por secuenciación para confirmar la presencia del codón introducido y descartar otras modificaciones en la secuencia. El DNA de cada mutante se purificó con el "kit" de purificación *Plasmid Miniprep Kit I* (Omega Biotek), se obtuvo un DNA de alta pureza que se secuenció. Con

este mismo DNA se transformaron por electroporación las cepas de *E. coli* BL21 para iniciar los experimentos de sobre-expresión. Para obtener células aptas para la transformación o "electrocompetentes", se creció un cultivo de 100 ml hasta alcanzar una O.D. de 0,7, que se centrifugó a 6000 RPM se descartó la fase soluble y las células precipitadas se suspendió cuidadosamente en glicerol al 10 % (v/v). Este paso se repitió tres veces, y en la última etapa se suspendió las células con glicerol al 10% para obtener una densidad óptica de 2 y se almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$ . La electroporación se hizo por medio de un protocolo convencional para transformar bacterias, bajo las siguientes condiciones de pulso eléctrico: 200  $\Omega$  de resistencia, 250  $\mu\text{F}$  de capacidad y 2500 V de voltaje. Se utilizó placas de agar-LB con ampicilina (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) para seleccionar las colonias transformadas, de estas se seleccionó 4 clones por cada mutación y 4 clones para EcFtsZ silvestre. Cada colonia seleccionada fue picada y traspasada a medio líquido en tubos que contenían caldo de *Luria* (medio de cultivo LB) con ampicilina en un volumen de 5 ml y se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  por una noche ( $\sim 16$  hr). Al otro día, se tomaron 500  $\mu\text{l}$  de cada tubo y se agregaron 500  $\mu\text{l}$  de glicerol 100%, se homogeneizó en un "vortex" y almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

**Sobre-expresión de EcFtsZ silvestre y mutantes.** Para la sobre-expresión de estas proteínas, los tubos que estaban almacenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  se pusieron en un termo y se esperó hasta que comenzara la fusión del hielo para picar las muestras con un asa estéril desde el queque de células resblandecido y los tubos parcialmente descongelados se volvieron a almacenar a  $-80^{\circ}\text{C}$ . La muestra de cada mutante se sembró en un tubo de 5 ml con medio LB-Ampicilina que se agitó vigorosamente. Cada tubo se creció con agitación a  $37^{\circ}\text{C}$  toda la noche. Al día siguiente, se hizo una dilución 1:100 en el mismo medio de cultivo y se dejó incubando con agitación a  $37^{\circ}\text{C}$ . Al alcanzar una densidad óptica (O.D.) de 0,7, cada cultivo se indujo con IPTG a una

concentración final de 0,4 mM agitando por ~ 4 hr a 37 °C. Luego se tomó 1 ml de cada cultivo, se centrifugó por 5 min a 10.000 RPM, y el precipitado se lavó dos veces con amortiguador TEN. El grado de sobre-expresión de cada cultivo, se determinó por electroforesis en SDS-PAGE y se seleccionó 6 clones por mutación para realizar la sobre-expresión. La figura 3 muestra los resultados típicos de un ensayo de sobre-expresión.



**Figura 3. Análisis por electroforesis SDS-PAGE de la sobre-expresión de la proteína F135W.** Carril 1. Muestra de EcFtsZ silvestre purificada. Carril 2-7 Extracto total de células sobre-expresadas, correspondientes a clones con la mutación F135W. Carril 8. Control positivo (extracto total de células sobre-expresadas de un clon transformado con el plasmidio pMFV57 con el gen de EcFtsZ silvestre). Carril 9. Control negativo de sobre-expresión (sobre-expresión de cepa de *E. coli* BL21 sin transformar).

Todos los clones escogidos sobre-expresaron proteína, al compararlos con el control negativo (Fig. 3). La proteína sobre-expresada migró en el gel a la altura correspondiente a EcFtsZ silvestre (previamente purificada en el laboratorio). Esta muestra se usó en todos los ensayos posteriores como control de migración de FtsZ en geles SDS-PAGE. Para cada mutante se escogió aquel clon que presentó visualmente la mejor relación de cantidad de proteína sobre-expresada y cantidad total de proteínas,

con el propósito de obtener mejores resultados en su purificación. No se observó cuerpos de inclusión. Para el caso del mutante F135W, el clon seleccionado fue el clon representado en el carril 7. La sobre-expresión de las demás mutantes se hizo con el mismo procedimiento.

**Purificación.** Para la purificación de las proteínas recombinantes se sobre-expresó cultivos de *E. coli* BL21 transformadas con DNA mutado en dos litros de medio LB-Ampicilina, de acuerdo al protocolo descrito arriba. Para la purificación de cada proteína mutante y de EcFtsZ silvestre se utilizó el método de glutamato (Beuria y col., 2003), adaptado para el laboratorio. Este sistema se basa en la capacidad de EcFtsZ de polimerizar *in vitro* en presencia de GTP. El efecto del glutamato sobre la polimerización es estimular la formación de manojos de filamentos de FtsZ. Esto facilita su precipitación y posterior purificación, además de disminuir la pérdida de proteína en el proceso. De esta manera, es posible seleccionar aquella proteína que es en algún grado funcional del resto de las proteínas, incluida EcFtsZ no funcional y algunas proteínas contaminantes. Se lisó las bacterias a través de dos ciclos de sonicación, luego se centrifugó a 28000 RPM. Con la fase soluble se efectuó un corte con sulfato de amonio al 25% de saturación y el precipitado se centrifugó a 10000 RPM por 30 min a 4 °C. El precipitado se suspendió en buffer A (Tris-HCl 50 mM pH 8,0 EDTA 1 mM KCl 50 mM, glicerol 10% (v/v), y se dializó contra 300 volúmenes toda la noche a 4 °C. Se purificó la muestra por cromatografía de intercambio iónico mediante un equipo de HPLC, utilizando una gradiente de KCl para soltar la proteína retenida en la columna. Las muestras que contenían EcFtsZ soluble, de acuerdo a los picos obtenidos en los cromatogramas de purificación, se mezcló y concentró hasta llegar a 4 ml de volumen final, el cual se agregó a una solución de polimerización que contenía Pipes 50 mM, glutamato 1 M, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, GTP 2 mM. Se condujo la reacción de

polimerización a 37 °C durante 30 min y se centrifugó los filamentos resultantes a 10000 RPM durante 30 min a 27 °C. El precipitado obtenido se suspendió en buffer A y se centrifugó a 10000 RPM por 10 min a 4 °C para precipitar material insoluble. A esta temperatura, los polímeros se desarman y la proteína queda principalmente en estado monomérico. La fase soluble que contenía la proteína se concentró y almacenó a -80 °C.

Para la determinación de la concentración de la proteína purificada se midió la absorbancia a 280 nm y a 254 nm, y se calculó la contribución específica de la proteína y del nucleótido (GDP) a la absorbancia general. Además, se utilizó el método de Bradford adaptado para EcFtsZ como sistema secundario de medición de la concentración (la adaptación es necesaria debido a que se reportó que FtsZ absorbe en distinta proporción que la proteína BSA, cuando esta última se usa como estándar en el método de Bradford, por lo que se requiere una calibración con FtsZ). Este método se estableció como el sistema determinante de medición, ya que disminuye en gran medida la probabilidad de interferencias asociadas a la absorbancia de proteínas contaminantes, que se encuentran en bajísima proporción y que pueden poseer un alto contenido de grupos aromáticos.

**Ensayo de complementación *in vivo*.** Para los ensayos de complementación, se utilizó la cepa de *E. coli* VIP2-  $\Delta$ DE3, cuyo plasmidio termo-sensible pLAR9 contiene el gen de EcFtsZ silvestre, que fue previamente eliminado del cromosoma y clonado en el vector (mutación *ftsZ84*). Este plasmidio posee un origen de replicación termo-sensible, lo que impide la sobrevivencia del vector a temperaturas mayores a 37 °C. El vector posee resistencia al antibiótico kanamicina, que se usa como medio de selección. Cada DNA plasmidial que contiene el gen de EcFtsZ ya sea mutado o silvestre fue introducido por electroporación en células VIP-2 electrocompetentes, de acuerdo al

protocolo descrito más arriba. Se cultivó las células transformadas en 5 ml de LB-Ampicilina-Kanamicina, y se creció a 30 °C con agitación hasta alcanzar una O.D. de 0,6. De cada cultivo se extrajo 10  $\mu$ l y se hizo diluciones seriadas. De cada dilución se plaqueó 10  $\mu$ l en forma de gota en dos placas que contenían LB-Ampicilina-Kanamicina, cada gota por triplicado. Una placa se incubó a 30 °C y la otra a 42 °C, toda la noche y con agitación. Se repitió tres veces el experimento para cada determinación debido a las variaciones leves en las determinaciones de la sobrevivencia.

**Dispersión de la luz.** Se utilizó un espectrofluorímetro Perkin-Elmer LS-50 para determinar la variación de la dispersión de luz asociada a la formación de los polímeros. Para las mediciones se usó una longitud de onda de excitación de 350 nm y atenuadores al 1%. Cada proteína EcFtsZ mutante y silvestre se pre-incubó en una solución de polimerización que contenía MES 50 mM pH 6,5, KCl 50 mM y MgCl<sub>2</sub> 10 mM, a 30 °C. La reacción se inició agregando GTP 1 mM. La concentración de proteína utilizada varió entre 0,1 mg/ml (2,5  $\mu$ M) hasta 1,2 mg/ml (30  $\mu$ M). Se utilizó cubetas de cuarzo de 500  $\mu$ l de capacidad para las mediciones.

**Actividad GTPásica.** Para determinar la actividad GTPásica de cada proteína mutante y EcFtsZ silvestre se hizo de curvas de progreso, y se hizo las mediciones por HPLC en columnas de afinidad C18. Para la reacción de hidrólisis del nucleótido se utilizó una solución de buffer MES 50 mM pH 6,5, KCl 50 mM y MgCl<sub>2</sub> 10 mM. La concentración final de proteína utilizada fue de 12  $\mu$ M, y 1 mM final de GTP. La columna fue previamente calibrada usando concentraciones conocidas de GTP. Se pre-incubó la proteína en la solución por 2 min a 30 °C en baño termo-regulado, y se agregó GTP para iniciar la reacción. Para la detención, se extrajo 100  $\mu$ l de la reacción por cada tiempo y se agregó en un tubo con 10  $\mu$ l de ácido perclórico a una concentración final

de 10% (v/v). Cada muestra se neutralizó con 200  $\mu$ l de  $\text{KHCO}_3$  1,0 M, se centrifugó al vacío (Speed-Vac) por 5 min para eliminar el  $\text{CO}_2$  formado, y se centrifugó a 14.000 RPM por 10 min a temperatura ambiente. Se cargó 20  $\mu$ l de la fase soluble en la columna C18, que separa el GDP del GTP. A partir de las concentraciones de GDP calculadas y normalizadas por la concentración total de nucleótido, se construyó las curvas de progreso para cada mutante, y se determinó la velocidad inicial de hidrólisis.

**Dicroísmo circular (DC).** El agente desnaturante utilizado para los experimentos de desnaturación y renaturación fue Cloruro de Guanidinio (GdmCl). En los experimentos de desnaturación, cada proteína (mutante y EcFtsZ silvestre) se incubó por una hora en hielo a una concentración final de 7,5  $\mu$ M en distintas soluciones de Tris-HCl 50 mM pH 7,5 con concentraciones de GdmCl que iban desde 0 hasta 6 M. Luego se ambientó cada muestra por 15 min, y se hizo la medición en un espectropolarímetro JASCO J-600. Se hizo tres barridos por muestra en el UV-lejano (190 nm hasta 260 nm) a una velocidad de 20 nm/min, con una sensibilidad de 20 mdeg (milésimas de grado). Los espectros de las proteínas nativas se obtuvo a partir de la medición de las soluciones que poseían 0 M de GdmCl. Para las curvas de desnaturación y renaturación, se graficó la elipticidad obtenida a una longitud de onda de 222 nm en cada espectro en función de la concentración del agente desnaturante.

**Liberación del nucleótido (GDP).** Para la liberación del nucleótido unido a la proteína se utilizó tubos concentradores *Microcon* y se midió la absorbancia a 254 nm de la solución filtrada. Estos tubos tienen un *cut-off* o tamaño efectivo (MWCO) de filtración de 10 kDa, de manera que pasa todo (incluido el nucleótido) menos EcFtsZ (tamaño 40 kDa). La medición se hizo en un espectrofotómetro Hewlett Packard 8452A. La proteína (7,4  $\mu$ M) se agregó en 8 tubos que contenían una solución de Tris-HCl 50 mM

pH 8,0, con distintas concentraciones de GdmCl que iban desde 0 hasta 2 M, y se incubó por 1 hr en hielo. Luego cada muestra se introdujo en un tubo *Microcon*, se centrifugó a 7000 RPM por 15 min y se midió espectrofotométricamente.

**Fluorescencia.** El procedimiento, las soluciones y los tiempos de incubación y ambientación utilizados fueron los mismos que los descritos previamente, para los experimentos de desnaturación por dicroísmo circular. Para los experimentos de renaturación, se pre-incubó por 45 min la proteína en una solución de Tris-HCl 50 mM pH 7,5, GdmCl 3 M, y esta solución se diluyó para obtener una concentración de proteína final de 12  $\mu$ M en soluciones de Tris-HCl 50 mM pH 7,5 con diferentes concentraciones de GdmCl, utilizando los mismos tiempos de incubación y ambientación descritos para los experimentos de desnaturación. Para las mediciones se utilizó un espectrofluorímetro Perkin-Elmer LS-50. En cada medición se usó una longitud de onda de excitación de 295 nm, y para los espectros de emisión se hizo tres barridos desde 300 nm hasta 450 nm. Se utilizó generalmente un *slit* o apertura de excitación y emisión de 5,0 nm. La velocidad de barrido fue de 140 nm/min. Se midió los espectros de las proteínas nativas (12  $\mu$ M) en soluciones de Tris-HCl 50 mM pH 8,0. Para las curvas de desnaturación y renaturación, se graficó la intensidad de fluorescencia normalizada obtenida en cada muestra a la longitud de onda correspondiente al máximo de emisión de la muestra nativa, en función de la concentración de agente desnaturante. El cálculo de la diferencia de energía libre de desplegamiento se hizo de acuerdo al método de extrapolación lineal (Santoro y Bolen 1988), mediante la expresión de la intensidad de fluorescencia en función del agente desnaturante  $D$  ( $f(D)$ ) (ver Apéndice I).

**Microcalorimetría diferencial de barrido (DSC).** Para los experimentos de desnaturación por temperatura de FtsZ, se utilizó un microcalorímetro diferencial de barrido VP-DSC de alta sensibilidad (Plotnikov y col., 1997), perteneciente al laboratorio de Bioquímica e Inmunología, a cargo del Dr. Marcelo Santoro, en la Universidad Federal de Minas Gerais, Belo-Horizonte, Brasil. La adquisición de los datos experimentales se efectuó con el software estándar incluido en el sistema. Para las mediciones se diluyó la proteína purificada a distintas concentraciones en soluciones amortiguadoras de Tris-HCl pH 8,0 50 mM, usando eventualmente GdmCl como agente desnaturalante. Se utilizó un intervalo total de temperaturas desde 5 °C hasta 100 °C (EcFtsZ) y desde 5 °C hasta 110 °C (MjFtsZ) de manera de abarcar y explorar el máximo espectro termal posible del equipo. La velocidad de muestreo fue de 1 °C/min, y se desgaseó las muestras al menos 30 min antes de cada medición.

## RESULTADOS

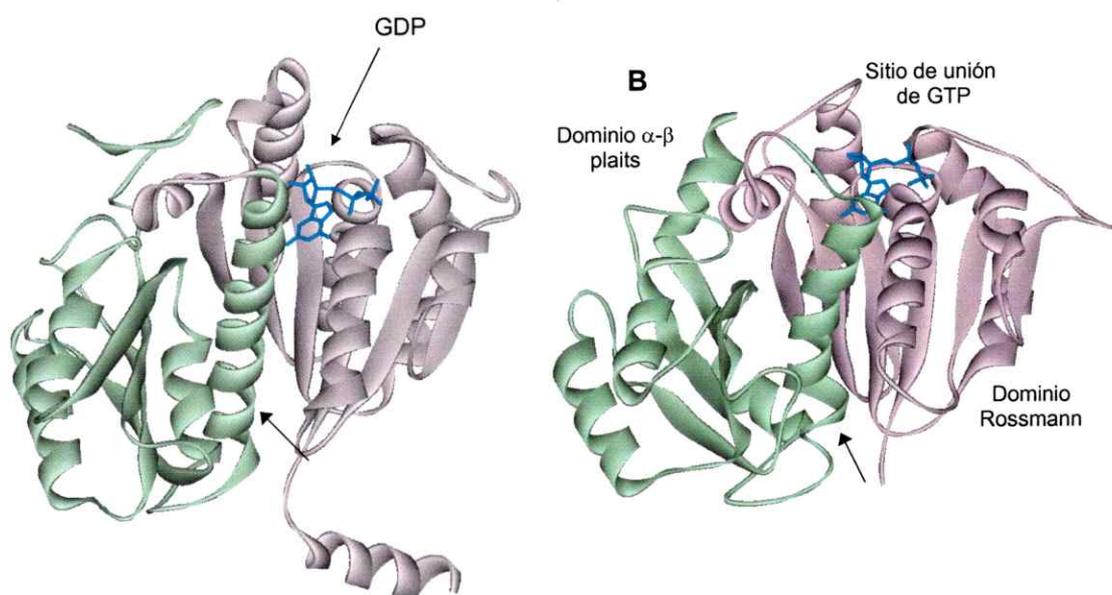
### DISEÑO DE MUTANTES

El criterio general para el diseño de mutantes con un residuo de triptófano localizado en un dominio, ya sea el amino o el carboxilo, fue que este residuo no modificara la estructura, la estabilidad o la función de EcFtsZ. Con este propósito se utilizó tres estrategias para seleccionar los sitios de las mutaciones puntuales, que incluían el análisis de la estructura de un modelo de EcFtsZ, el análisis evolutivo de las secuencias y de las propiedades fisicoquímicas de los residuos mutados.

**Modelado de la estructura de EcFtsZ.** La estructura tridimensional de EcFtsZ no ha sido resuelta por ningún método experimental. Sin embargo, existen métodos alternativos que permiten modelar su estructura a partir de consideraciones teóricas, evolutivas, etc.

Para modelar la estructura tridimensional de EcFtsZ se utilizó Modelado Comparativo, debido a que se encuentran disponibles en la base de datos PDB (Protein Data Bank) la estructura cristalina de MjFtsZ y PaFtsZ resuelta por difracción de rayos X. Ambas poseen un 40% y 60% de identidad de secuencia con EcFtsZ, respectivamente, que es un requisito para generar modelos confiables de estructura tridimensional (Sali y col., 1995).

Se obtuvo 20 modelos finales, de los cuales se seleccionó aquellos de menor pseudo-energía de acuerdo a los valores que entrega el programa Modeller. La calidad del modelo se analizó mediante dos programas de evaluación: PROSA II y Verify 3D. Se escogió finalmente aquel modelo del complejo EcFtsZ-GDP que presentó el mejor perfil energético en los programas de evaluación (Fig. 4).



**Figura 4. Comparación estructural entre EcFtsZ y MjFtsZ.** **A.** Estructura 3D de MjFtsZ (1FSZ) (Lowe y Amos 1998). **B.** Modelo 3D de EcFtsZ obtenida por modelado comparativo. El dominio amino de plegamiento Rossmann se muestra en color rosa y el dominio carboxilo de plegamiento  $\alpha$ - $\beta$  "plaits" en color verde; GDP se muestra como "tubos" azules en el bolsillo de unión del nucleótido. La flecha indica la hélice alfa central que conecta ambos dominios. La imagen fue hecha con DS Modeling v1.1 package (Copyright (C) 2001-2003 by Accelrys).

Debido a la alta identidad de secuencia entre ambas proteínas, la estructura final del modelo mostró un RMSD de 2,7 Å que indica una muy buena similitud estructural con MjFtsZ. En la estructura se observa que el dominio de unión a nucleótido, posee 6 hebras beta que conforman una sábana general en el núcleo del dominio y 6 hélices alfa, algunas de las cuales se presentan intercaladas con las hebras, característico de dos motivos Rossmann conectados. La zona de unión a nucleótido o bolsillo de unión, se encuentra ubicada de manera superficial en forma adyacente a la interfase con el dominio carboxilo. Este dominio conocido como " $\alpha$  $\beta$ -plaits" (pliegues de alfa-beta),

posee una sábana de 4 hebras beta, además de tres hélices alfa. Se observa además que una hélice central cruza de un dominio a otro, formando parte de una interfase que posee una gran cantidad de contactos entre ambos dominios, principalmente interacciones hidrófobas y puentes de hidrógeno.

Los primeros 15 y los últimos 45 aminoácidos de EcFtsZ no fueron modelados porque no están presentes en la estructura tridimensional del molde.

**Análisis de secuencia.** Se describió en la literatura que las mutaciones conservadas, esto es el cambio de un residuo por otro con propiedades fisicoquímicas similares, generalmente no producen efectos importantes sobre la estructura o la función de la proteína. Por esto, se consideró para el diseño de las mutantes principalmente a aquellos residuos en la secuencia de EcFtsZ que fueran similares al triptófano, de forma particular los residuos aromáticos (Phe, Tyr).

Con el modelo tridimensional de EcFtsZ se determinó la ubicación estructural de los residuos aromáticos presentes en su secuencia. Debido a que el triptófano a introducir en la proteína se utilizará para analizar el plegamiento de EcFtsZ, es importante localizar esta sonda en zonas de baja accesibilidad al solvente de manera de observar cambios importantes en los espectros de emisión durante los experimentos de desnaturación. Para estimar el grado de accesibilidad, se realizó cálculos del área de accesibilidad al solvente (ASA) expresado en porcentaje de cada residuo aromático, y se seleccionó aquellos que tuvieran un valor menor o igual a 40% (Tabla 3).

**Tabla 2.** Número de aminoácidos aromáticos presentes en EcFtsZ.

Aminoácido aromático	Cantidad
Fenilalaninas	13 (12 presentes en el modelo)
Tirosinas	1
Triptófanos	0
Total	16

**Tabla 3.** Porcentaje de ASA para residuos aromáticos con un valor menor o igual a 40% de ASA

Residuo	ASA%
Phe 39	4,5
Phe 40	8,2
Phe 99	5,5
Phe 145	6,7
Phe 135	30
Phe 137	25
Phe 210	5,5
Phe 275	5,8
Tyr 222	29,6

A partir de la alineación múltiple de secuencias, se determinó la frecuencia de aparición de aminoácidos en las posiciones de los residuos aromáticos descritos arriba, con el propósito de evaluar el grado de conservación evolutiva en cada posición (Tabla 4).

Tabla 4. Frecuencia de aminoácidos en diferentes posiciones de un alineación de 474 secuencias de FtsZ<sup>a</sup>.

Aminoácido	Posición 39	Posición 40	Posición 99	Posición 135	Posición 137	Posición 145	Posición 210	Posición 222	Posición 275
G	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A	0	7	0	0	1	17	0	5	34
V	0	107	1	0	2	25	0	8	264
L	8	9	0	2	7	38	2	18	15
I	4	184	0	0	0	82	0	27	34
P	0	0	0	0	0	0	0	4	0
F	355	21	466	468	356	31	463	3	60
Y	10	15	0	1	83	8	9	20	13
W	0	30	0	1	13	0	0	0	1
S	0	0	0	0	0	15	0	50	2
T	2	0	0	0	1	37	0	48	7
C	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M	1	5	0	0	6	3	0	23	15
N	0	0	0	0	0	18	0	13	0
Q	0	0	0	0	0	102	0	5	5
K	0	0	0	0	0	18	0	187	0
R	0	14	0	0	2	71	0	41	0
H	1	0	0	0	1	7	0	6	0
D	0	0	0	0	0	0	0	10	0
E	0	0	0	0	0	0	0	6	0

<sup>a</sup> El número de cada posición corresponde al de la secuencia de EcFtsZ.

Se observa que existe un alto grado de conservación de fenilalanina en las posiciones 99, 135 y 210 (Tabla 4). La substitución del residuo Phe 210, situado cerca del aspartato 212, que ha sido definido como un residuo esencial en la función catalítica de EcFtsZ (Yu y Margolin 1997), conlleva una alta probabilidad de afectar la función. La posición Phe135 es muy conservada, pues muestra 468 Phe, 1 Trp y 1 Tyr y la posición Phe 99 es totalmente conservada respecto al cambio por otro residuo aromático. Este aminoácido del dominio amino, se encuentra en un radio de 6 Å respecto a la Phe 210 del dominio carboxilo, distancia adecuada para una interacción entre sus anillos aromáticos. La Phe 39 está conservada aunque en menor grado que las anteriores. En la posición 137 se observa que las propiedades fisicoquímicas de los residuos que se substituyen tienden a mantenerse, pues solo se observan residuos aromáticos. La ubicación 40 resulta interesante, pues se observa entre los residuos aromáticos que el triptófano presenta una alta frecuencia (30 de 392), considerando que este aminoácido es el menos abundante de todos (alrededor de un 1,3%) (Creighton 1993). De este modo la mutación de la Phe 40 por Trp debiera ser inocua.

Con los criterios de selección antes expuestos la estructura tridimensional de cada mutante seleccionada fue modelada para considerar los aspectos estéricos, fisicoquímicos y los posibles arreglos estructurales de importancia asociados a la substitución. Se expone las mutaciones seleccionadas a continuación:

#### **Mutante F40W**

Como ya se mencionó, la Phe 40 fue la que presentó mayor cantidad de sustituciones por triptófanos, lo que sugiere una baja probabilidad de provocar efectos importantes en la estructura o la función de FtsZ al mutar por este residuo en esa posición. Además, la mutación es conservada ya que se mantiene las propiedades

fisicoquímicas del residuo original, y presenta un nivel bajo de accesibilidad al solvente. La fenilalanina posee un volumen de Van der Waals de  $135 \text{ \AA}^3$ , un valor cercano al de triptófano,  $163 \text{ \AA}^3$  (Creighton 1993). El volumen es un factor importante pues al introducir residuos de alto volumen pueden ocurrir impedimentos estéricos no deseados en la región, principalmente contactos no permitidos de los radios de Van der Waals. La hidrofobicidad es otro factor importante, pues la idea de la mutación es no generar alteraciones fisicoquímicas, lo que ocurre por ejemplo al cambiar residuos cargados positivos por negativos, o hidrófobos por residuos polares. La fenilalanina posee una hidrofobicidad de  $-3,15 \text{ kcal/mol}$  (teórica  $-2,27 \text{ kcal/mol}$ ), un valor ubicado muy cerca del calculado para el triptófano en la escala de hidrofobicidad experimental, que posee  $-8,27 \text{ kcal/mol}$  (teórica  $-2,13 \text{ kcal/mol}$ ) (Creighton 1993).

#### **Mutante F135W.**

Esta mutación, aunque contradice los criterios antes mostrados, permite evaluar el modelo, que predice que al cambiar un residuo evolutivamente conservado debiera afectarse la funcionalidad. Sin embargo, el efecto sobre la estructura debiera ser mínimo porque las características fisicoquímicas no son diferentes y el espacio que rodea el residuo es bastante amplio, impidiendo algún efecto estérico.

#### **Mutante F145W.**

Esta mutación es conservada al igual que las mutaciones anteriores. Además, presentó un buen nivel de ocultamiento al solvente. El análisis de secuencia mostró un grado bajo de conservación de residuos para esa posición, con la presencia incluso de residuos cargados en algunas secuencias.

**Mutante Y222W.**

La tirosina 222 no es conservada, se encuentra en una zona alejada del sitio de unión del nucleótido y está situada en un espacio bastante amplio, propiedades que permiten la sustitución por triptófano.

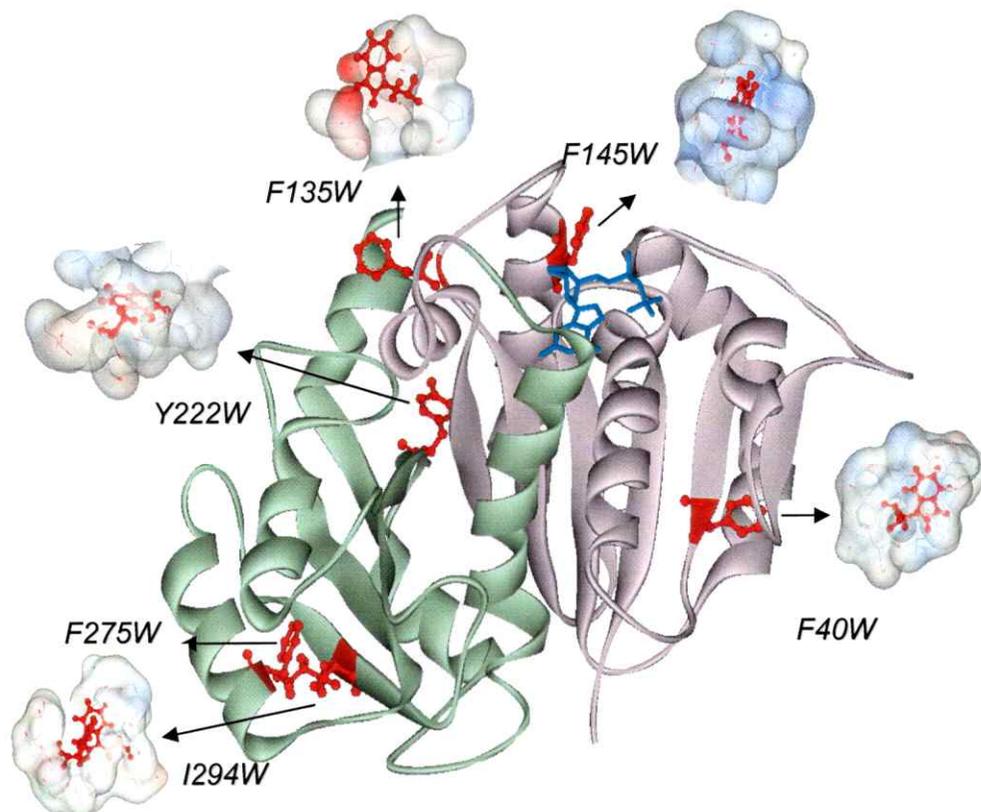
**Mutante F275W.**

Las secuencias en esta posición muestran un alto número de aminoácidos aromáticos e hidrófobos, en algunas se observa un triptófano. El modelo tridimensional de esta mutante no muestra problemas estéricos asociados a la sustitución.

**Mutante I294W.**

El motivo para cambiar la isoleucina 294 por triptófano fue la presencia de este residuo en la misma ubicación en la estructura 3D de MjFtsZ. El aminoácido leucina 294 posee un volumen de  $124 \text{ \AA}^3$  (triptófano  $163 \text{ \AA}^3$ ), y una hidrofobicidad experimental de  $-0,24 \text{ kcal/mol}$  (teórica  $-1,82$ ), de manera que no se debería afectar de manera considerable las propiedades fisicoquímicas de la zona. No se observó contactos de Van der Waals en el análisis del modelo de EcFtsZ.

En la figura 5 se muestra la estructura 3D de EcFtsZ y los triptófanos introducidos en cada mutación puntual.

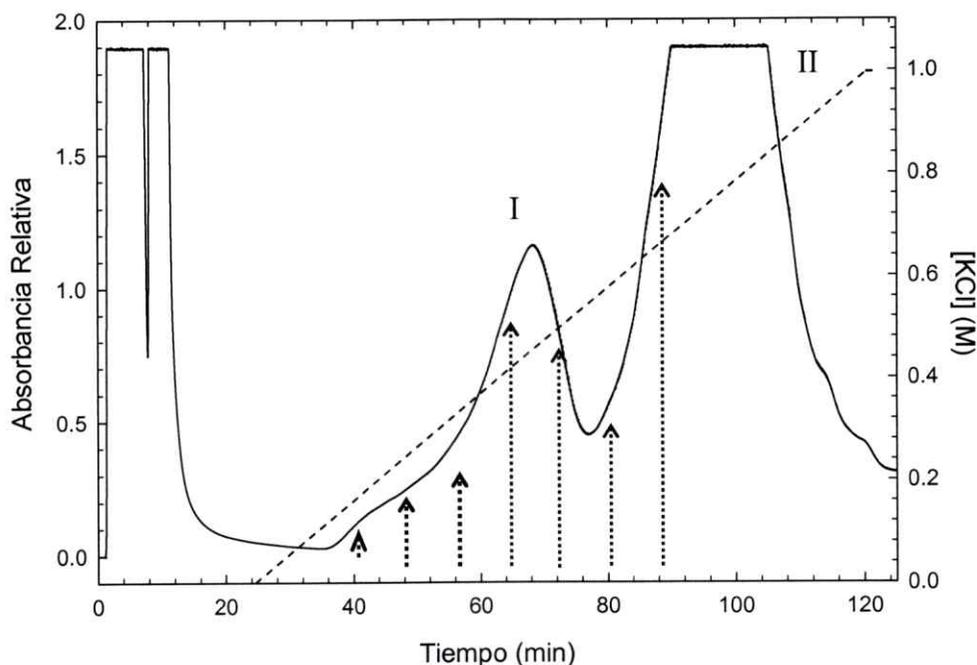


**Figura 5. Ubicación de las mutaciones seleccionadas en el modelo de la estructura tridimensional de EcFtsZ.** En rosa se muestra el dominio amino con GDP unido, en color azul, y en verde el dominio carboxilo. Los residuos seleccionados para las sustituciones por triptófano se marca en rojo. El ambiente que rodea a cada triptófano introducido se representa mediante su potencial electrostático (rojo para cargas negativas, azul para cargas positivas y gris claro para superficies apolares).

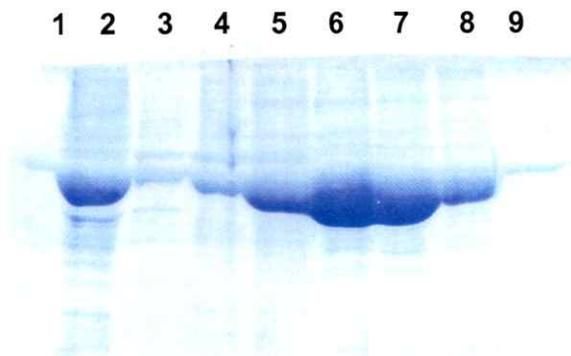
El análisis de potencial que se muestra en la figura 5, indica que cuatro de las seis mutaciones se encuentran en zonas principalmente hidrófobas (F40W, Y222W, F275W e I294W). Las otras dos presentan potenciales negativos (cerca de W135) y potenciales positivos (cerca de W145).

## PURIFICACION

Se purificaró las mutantes y la proteína silvestre por un método bioquímico habitual para purificar EcFtsZ silvestre (precipitación con sulfato de amonio), al que se agregó una etapa de precipitación con glutamato de sodio (ver Materiales y Métodos), que tiene la ventaja de inducir polímeros de FtsZ, los cuales se separó por centrifugación. Describiremos algunas de las etapas claves del proceso aplicado a la purificación de las mutantes. El cromatograma típico obtenido después de pasar la proteína por la columna de intercambio aniónico Mono-Q se muestra en la figura 6. Se observa que parte de la proteína no es retenida por la columna y dos picos principales (uno a los 68 min y el otro a los 100 min) eluyen a una concentración de KCl de 0,43 M y 0,75 M. Los espectros de absorbancia de estas fracciones muestran que el II pico corresponde al nucleótido (GTP o GDP) y la electroforesis SDS PAGE (Fig. 7) muestra que el pico I corresponde a proteínas. La presencia de FtsZ y de otras proteínas en las fracciones correspondientes a los picos I y II se determinó por electroforesis en un gel de SDS-PAGE que se muestra en la figura 7.

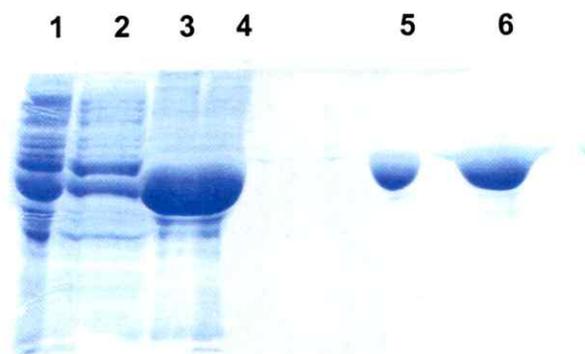


**Figura 6. Cromatograma de purificación de la proteína mutante F135W.** La proteína se inyectó en la columna a tiempo cero, y se colectó las fracciones que eluyeron en volúmenes de 4 ml. La absorbancia fue medida a 280 nm. La línea punteada corresponde a la curva de gradiente de KCl (0 a 1 M de KCL) que permite liberar la muestra adherida a la resina de intercambio iónico. Se muestra los picos de elusión I y II. Las flechas indican los tiempos de las fracciones que se analizó por gel de SDS (Fig. 7).



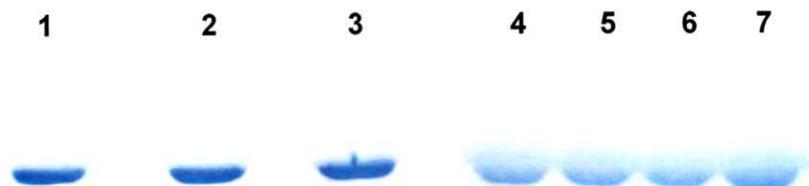
**Figura 7. Análisis por electroforesis SDS PAGE del producto de la etapa de la cromatografía de intercambio aniónico de la proteína mutante F135W.** Carril 1. Estándar de FtsZ (40 kDa). Carril 2. Primera elusión de la columna (primeros 4 min). Carriles 3-9. Elusiones correspondientes a los min 40, 48, 56, 64, 72, 80 y 88 respectivamente, escogidos a partir de los picos obtenidos en el cromatograma (ver flechas en Fig. 6).

Se observa en los carriles 5 a 8, que corresponden a las fracciones del pico I, una banda del tamaño de FtsZ que se hace más intensa en la fracción que corresponde al máximo de absorbancia del pico I (Fig. 7). Una fracción del pico II, carril 9, no incrementa la intensidad de la banda correspondiente a FtsZ. El primer pico, carril 2, corresponde a proteínas, entre ellas FtsZ, que no se unieron a la columna, probablemente por saturación. Para la última etapa de purificación, se mezcló las fracciones desde la 56 hasta la 76, y la mezcla se concentró por centrifugación en tubos Centriprep para polimerizar con glutamato de sodio y centrifugar (ver Materiales y Métodos). Finalmente se concentró por centrifugación (utilizando tubos "Centriprep") la proteína purificada y se almacenó a -80 °C. La pureza de FtsZ en la primera y última etapa de purificación, precipitación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y con glutamato, respectivamente se muestra en el gel SDS-PAGE de la figura 8. Se observa que la pureza de FtsZ aumenta en la primera etapa, carriles 2, 3 y 4, hasta alcanzar más de 98% en la última cuando se compara con el homogeneizado de células (carril 1).



**Figura 8. Análisis por electroforesis SDS-PAGE del producto de la purificación de la proteína mutante F135W. Carril 1.** Fase soluble que resulta de la centrifugación a 28000 RPM del homogeneizado de células (ver Materiales y Métodos). **Carril 2.** Fase soluble de la precipitación por sulfato de amonio al 25% de saturación. **Carril 3.** Precipitado de sulfato de amonio. **Carril 4.** Proteína dializada para eliminar el sulfato de amonio. **Carril 5 y 6.** Después de precipitar con glutamato.

La purificación de las otras mutantes mostró patrones similares de purificación, a excepción de la mutante I294W donde la resolución del cromatograma de la etapa de intercambio aniónico fue menor. Sin embargo, la pureza de esta mutante fue similar a las otras después de la precipitación con glutamato. En la figura 9 se muestra los patrones de electroforesis SDS-PAGE de EcFtsZ silvestre y las mutantes purificadas después de la última etapa de purificación con glutamato. El rendimiento fluctuó entre 10 y 20 mg/litro de cultivo, excepto para la mutante I294W que fue de 5-10 mg/litro de cultivo.



**Figura 9. Análisis por electroforesis SDS PAGE de las proteínas EcFtsZ silvestre y las mutantes. A. Carriles 1, 2 y 3.** EcFtsZ silvestre y mutantes F135W e I294W (8  $\mu$ g), respectivamente. **B. Carriles 4, 5, 6 y 7.** Mutantes F40W, F145W, Y222W y F275W (10  $\mu$ g), respectivamente.

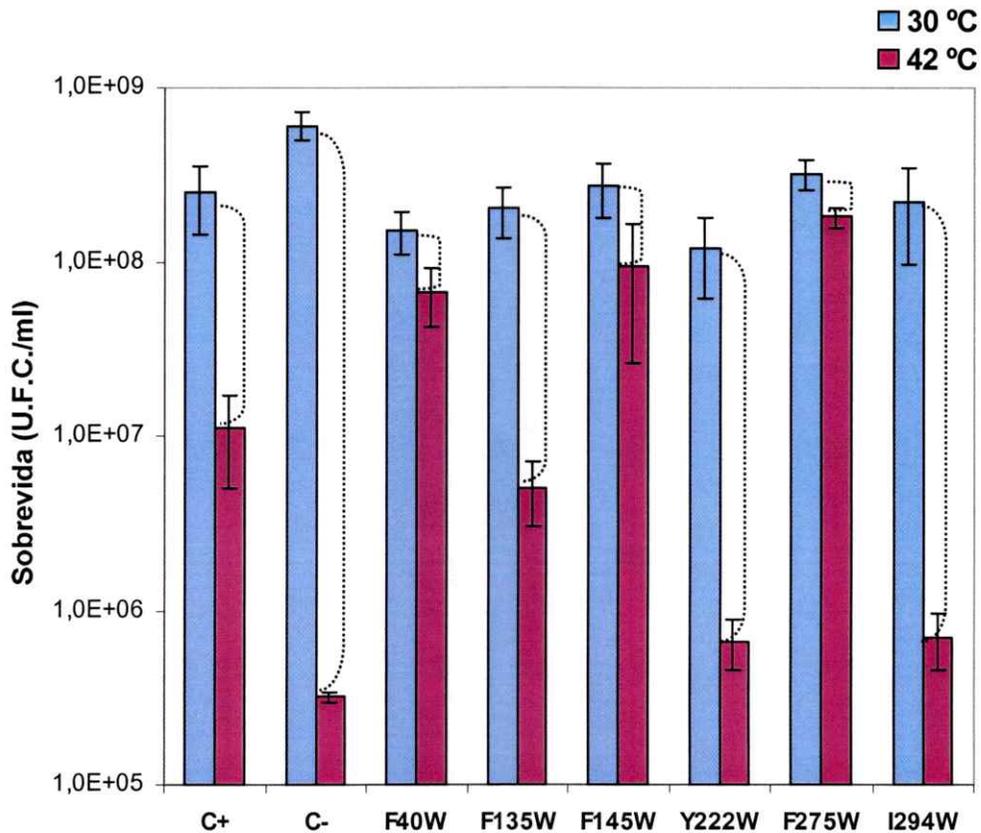
Se observa en la figura 9 que todas las proteínas purificadas presentan una sola banda y que corresponde a una pureza mayor que un 98%, suficiente para cumplir con los objetivos de la tesis. Todas las mutantes mostraron un espectro de emisión de fluorescencia intrínseca característico de triptófano (ver la sección Fluorescencia de Triptófanos más adelante).

## CARACTERIZACION FUNCIONAL

La funcionalidad de los mutantes se analizó por tres métodos: complementación *in vivo*, dispersión de luz y actividad GTPásica. En cada experimento, se usó como referencia los resultados obtenidos en los diferentes ensayos con EcFtsZ silvestre.

**Ensayos de Complementación *in vivo*.** La complementación *in vivo* con las proteínas mutantes permite determinar su capacidad de suplir la ausencia de EcFtsZ silvestre en la célula. Debido a que esta proteína es esencial para la división celular, cualquier alteración de su función se observa en el número de células capaces de crecer a la temperatura restrictiva, donde sólo se expresa el gen de FtsZ (silvestre o mutado) presente en el plasmidio pMFV57 y no aquél del plasmidio termo-sensible pLAR9 (ver materiales y métodos).

Los porcentajes de complementación *in vivo* de las mutantes se muestra en la figura 10.



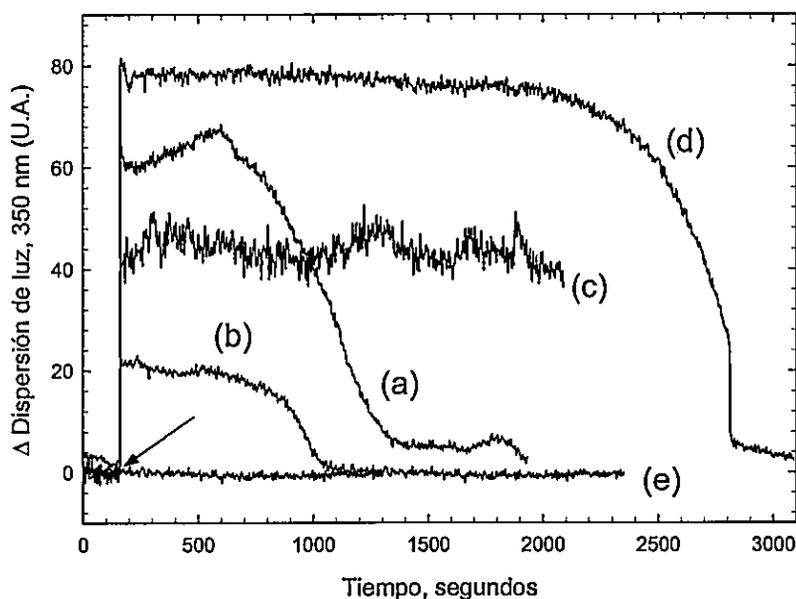
**Figura 10. Gráfico de la sobrevivencia de EcFtsZ silvestre (C+) y sus mutantes F40W, F135W, F145W, Y222W, F275W e I294W.** La barra azul y la barra roja corresponden al número de unidades formadoras de colonias (U.F.C.) por unidad de volumen (ml) que crecen a 30 (color lila) y 42 °C (color rojo), respectivamente. El control negativo del experimento (C-) corresponde al valor de U.F.C./ml obtenido con la cepa VIP2- $\lambda$ DE3 sin transformar, que se origina por la reversión de la mutación *ftsZ84* (ver materiales y métodos). La línea punteada marca la diferencia entre la sobrevivencia a 30 y 42 °C. Esta diferencia es la que se utiliza para comparar las sobrevivencias de mutantes y EcFtsZ silvestre.

Las mutantes Y222W e I294W presentaron una baja complementación al comparar con EcFtsZ silvestre (Fig. 10). El mutante F135W mostró una sobrevivencia a 42°C menor que la observada para EcFtsZ silvestre, aunque mayor que la de los mutantes Y222W e I294W. Los demás mutantes fueron capaces de complementar en mayor medida que EcFtsZ silvestre. Los sobrevivientes del control negativo son la milésima parte de los sobrevivientes del control positivo (FtsZ silvestre), lo que permitió detectar adecuadamente las diferencias de complementación entre mutantes.

**Polimerización.** La formación de polímeros produce un notorio aumento de la dispersión de luz de la solución que las contiene, debido a que el dipolo inducido por la luz de excitación en el polímero oscila y emite luz, de la misma longitud de onda, en todas direcciones. EcFtsZ es capaz de formar filamentos en presencia de GTP (Mukherjee y Lutkenhaus 1994; Mukherjee y Lutkenhaus 1999). La reacción se caracteriza por un rápido aumento de la dispersión de luz, hasta alcanzar un periodo estacionario, en general corto, que es seguido por una etapa de despolimerización que se observa como una caída de la señal hasta volver al nivel inicial (Mukherjee y Lutkenhaus 1998).

La polimerización *in vitro* de EcFtsZ silvestre y las mutantes se siguió por dispersión de luz. Los resultados mostraron que todos los mutantes, a excepción de I294W, polimerizaron. En la figura 11 se ilustra este fenómeno para las mutantes que

mostraron las diferencias más pronunciadas respecto a EcFtsZ silvestre.

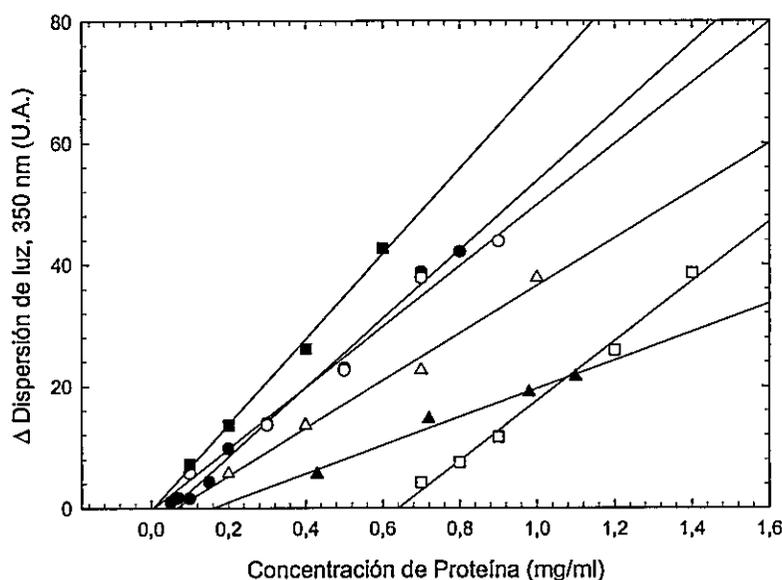


**Figura 11. Polimerización y despolimerización de EcFtsZ silvestre y las mutantes.** Se muestra la variación de la dispersión de luz a 350 nm con el tiempo de incubación en una solución que contenía proteína (25  $\mu$ M), Mes 50 mM pH 6,5 y  $MgCl_2$  a 30  $^{\circ}C$ . (a) EcFtsZ silvestre; (b) F135W; (c) F145W; (d) Y222W; (e) I294W. La flecha indica el momento en que se agregó GTP 1 mM final a la solución.

La figura 11 muestra que la capacidad de polimerización de estas proteínas fue  $Y222W > F145W > EcFtsZ \text{ SILVESTRE} > F135W \gg I294W$ , que no polimerizó. La estabilidad de los polímeros fue  $Y222W \approx F145W > EcFtsZ \text{ SILVESTRE} \approx F135W$  y sus velocidades de despolimerización fueron aproximadamente iguales. Para inducir la polimerización de la mutante I294W, se hizo el experimento a diferentes concentraciones de proteína, desde 2,5 hasta 50  $\mu$ M, y no se observó polimerización. El mismo resultado se obtuvo al aumentar la concentración de GTP a 2 mM. Posteriormente, se determinó el efecto de agentes inductores de la polimerización,

como glutamato de sodio 1 M y cloruro de calcio 20 mM, y tampoco se observó cambios. La mutante F145W mostró una curva ruidosa y no se observó despolimerización (la señal fue seguida varios min adicionales a los mostrados en el gráfico sin obtener resultados diferentes). Sin embargo, al disminuir la concentración de GTP hasta 100  $\mu$ M se observó una caída típica asociada a la despolimerización, lo que sugiere que la velocidad de hidrólisis de GTP es más lenta.

La concentración crítica de polimerización es la concentración de proteína sobre la cual se produce la polimerización y se obtiene de la extrapolación de la recta sobre el valor del eje de la abscisa en un gráfico del máximo de dispersión versus la concentración de proteína. La pendiente de la recta está relacionada con la forma y tamaño de los polímeros.



**Figura 12. Concentración crítica de la polimerización.** Se muestra la diferencia de dispersión de luz al agregar GTP 1 mM a la solución, en función de la concentración de proteína de EcFtsZ silvestre (●), F40W (○), F135W (▲), F145W (Δ), Y222W (■) y F275W (□). La intersección en el eje X corresponde a la concentración mínima o crítica para la polimerización.

La figura 12 muestra que hay una relación lineal entre la concentración de proteína y la dispersión máxima de luz para la polimerización de EcFtsZ silvestre y sus mutantes. De la figura se deduce que las concentraciones críticas de EcFtsZ silvestre y las mutantes Y222W, F40W y F145W son del mismo orden de magnitud, mientras F135W es dos a tres veces mayor y F275W es casi un orden de magnitud mayor (Tabla 5). Se observa una similitud  $\geq 80\%$  en el valor de las pendientes de las mutantes F40W, F275W y Y222W con el valor de EcFtsZ silvestre, que indica similitud de forma de los polímeros.

**Tabla 5.** Concentración crítica y valores de pendientes para la relación entre la dispersión de luz máxima y la concentración de proteína, de EcFtsZ silvestre y las mutantes que se muestra en la figura 15.

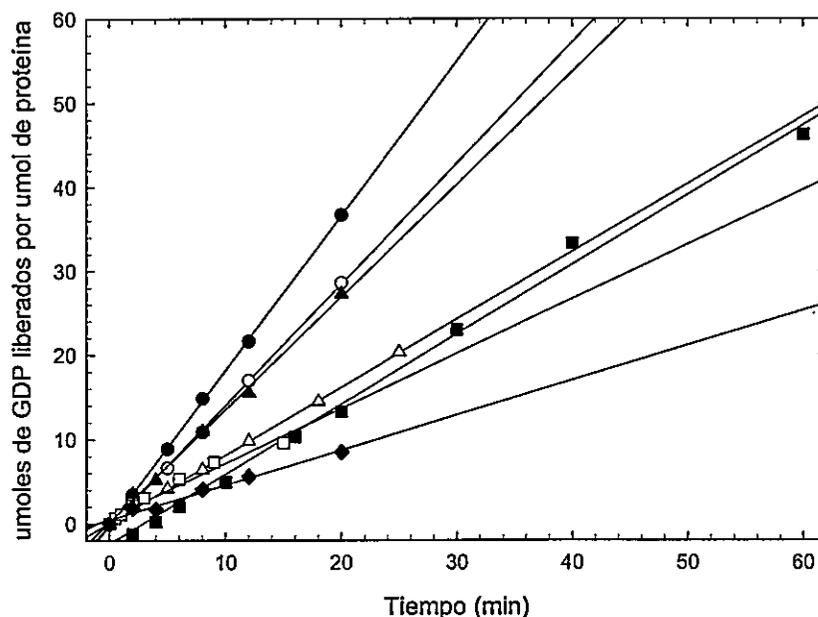
Mutante	Concentración crítica	Pendiente de la recta
EcFtsZ	0,052± 0,008	56,67± 1,9
F40W	0,008± 0,02	50,17± 3,8
F135W	0,160± 0,09	23,31± 2,3
F145W	0,065± 0,009	39,06± 3,1
Y222W	0,006± 1,6	70,22± 3,6
F275W	0,642± 0,026	49,11± 2,5
I294W	np <sup>a</sup>	np <sup>a</sup>

<sup>a</sup> No polimeriza

**Actividad GTPásica.** FtsZ une GTP y lo hidroliza a GDP + Pi, a pH 6,5 y en presencia de magnesio ( $Mg^{+2}$ ). Se postuló que este catión es capaz de coordinar el fosfato gama del nucleótido de manera de facilitar la hidrólisis. El magnesio a su vez sería estabilizado durante este proceso por residuos de aspartato, particularmente el aspartato 212, que se ubica en el monómero adyacente al sitio de unión, dando origen a un sitio activo formado por dos monómeros, aquél que une GTP y el otro que expone

los residuos negativos para coordinar al magnesio unido al fosfato gama del nucleótido (Lowe y Amos 1999).

Se analizó el efecto de cada una de las mutaciones sobre la velocidad inicial de hidrólisis de GTP, respecto a la de EcFtsZ silvestre (Fig. 13).



**Figura 13. Actividad GTPásica.** La actividad GTPásica se midió en una solución que contenía proteína (25  $\mu$ M), Mes 50 mM pH 6,5 y  $MgCl_2$  a 30  $^{\circ}C$ . Se grafica los  $\mu$ moles de GDP liberados por  $\mu$ mol de proteína a diferentes tiempos. Las líneas de regresión se trazó entre los puntos experimentales, que corresponden a: F40W (○), F135W (▲), F145W (Δ), Y222W (■), F275W (□) e I294W (◆), y EcFtsZ silvestre (●).

**Tabla 6.** Actividad específica y porcentaje de la actividad de EcFtsZ silvestre y mutantes.

	Actividad Específica <sup>a</sup> ( $\mu\text{M GDP} * \mu\text{M de Proteína}^{-1} * \text{min}^{-1}$ )	Porcentaje de Actividad (%)
EcFtsZ silvestre	1,84 $\pm$ 0,14	100 $\pm$ 7,6
F40W	1,44 $\pm$ 0,13	79 $\pm$ 7
F135W	1,33 $\pm$ 0,03	72 $\pm$ 1,6
F145W	0,81 $\pm$ 0,071	44 $\pm$ 4
Y222W	0,83 $\pm$ 0,04	45 $\pm$ 2,2
F275W	0,88 $\pm$ 0,05	48 $\pm$ 2,3
I294W	0,22 $\pm$ 0,028	12 $\pm$ 1,3

<sup>a</sup> La actividad específica corresponde a la pendiente calculada a partir de la regresión lineal de los puntos experimentales (Fig. 13). Para el porcentaje de actividad se utilizó como 100% el valor de actividad obtenido para EcFtsZ silvestre.

Los resultados de la Tabla 6 muestran una alta variabilidad de la actividad específica entre los mutantes. Los valores obtenidos con la mutante F40W presentaron mayor similitud con los valores obtenidos para EcFtsz silvestre, seguido por la mutante F135W. El menor valor de porcentaje de actividad específica fue para la mutación I294W, como se esperaba a partir de los resultados obtenidos en los ensayos de polimerización.

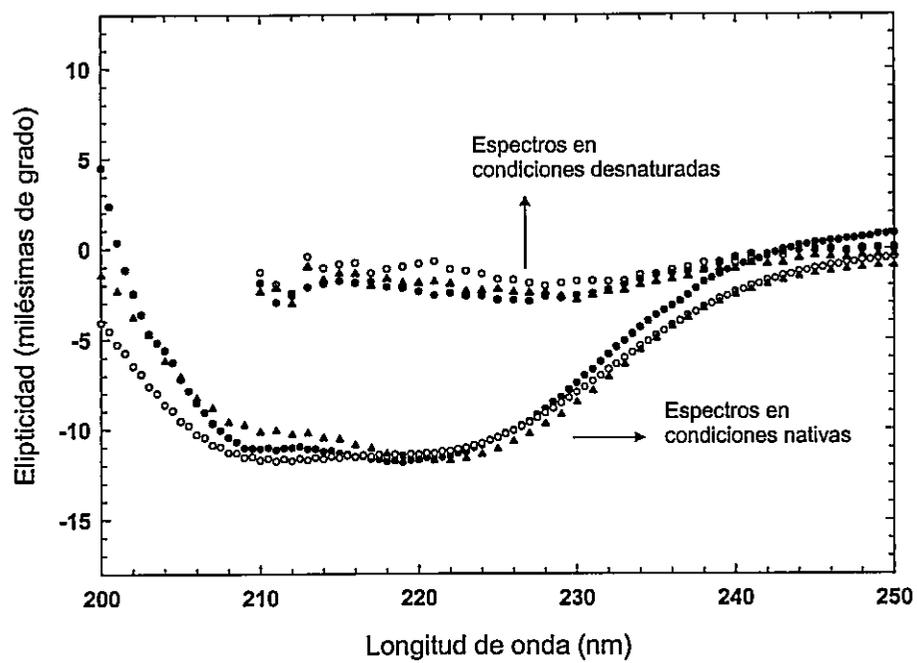
El plegamiento y la estabilidad de las mutantes que se afectaron mayormente en su funcionalidad, se analizó por Dicroísmo Circular, DC. Se escogió una mutación por dominio para realizar los experimentos y se utilizó como referencia EcFtsZ silvestre. Para el dominio carboxilo, se escogió I294W que fue la mutante que presentó las mayores alteraciones, en su actividad GTPásica, en la complementación *in vivo*, y en la incapacidad de polimerizar bajo las condiciones estudiadas. Para el dominio amino se escogió la mutante F135W que si bien no presentó cambios tan radicales como la

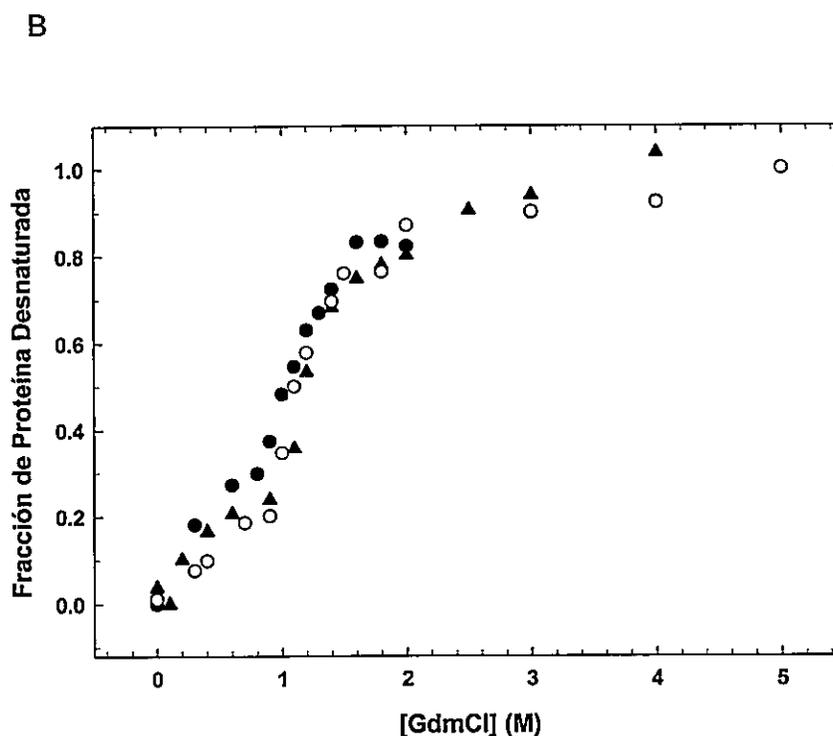
mutación I294W, se afectó en un 50% la capacidad de complementar *in vivo*, y presentó diferencias en la polimerización, particularmente en la concentración crítica.

La figura 14 A, muestra que los perfiles de los espectros de DC de EcFtsZ silvestre y de ambas mutantes en su forma nativa, prácticamente se puede superponer, lo que sugiere que la estructura secundaria de ambas mutantes no se alteró de manera significativa al introducir un triptófano. En cada curva se observa un mínimo alrededor de 210 y 222 nm, característico de la absorción de hélices alfa de una proteína cuya estructura secundaria es de tipo alfa-beta.

En la figura 14 B se muestra los resultados de la desnaturación química con GdmCl de EcFtsZ silvestre y las mutantes F135W e I294W. Las mutaciones no tuvieron efecto sobre las curvas de desnaturación de las tres proteínas, pues presentaron una conducta prácticamente idéntica. Estas curvas muestran al menos dos etapas, una entre 0 y 0,8 M de GdmCl, donde se pierde el nucleótido unido, con una  $[GdmCl]_{50\%}$  (concentración de GdmCl donde se alcanza un 50% de desnaturación) de 0,6 M. y una segunda etapa de desnaturación de la apoproteína entre 0,9 y 1,6 M de GdmCl, con una  $[GdmCl]_{50\%}$  de 1,1 M. Por sobre 1,6 M no se registró cambios importantes en la elipticidad a 222 nm.

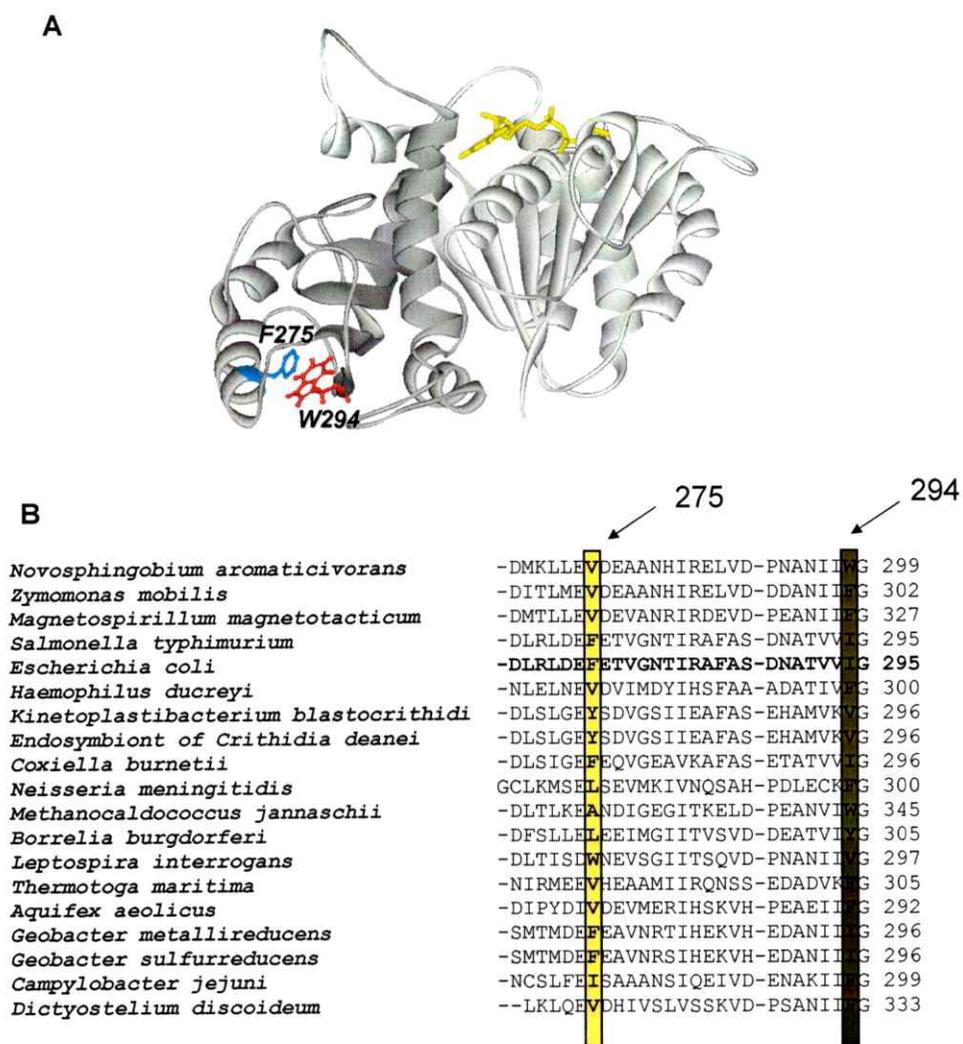
A





**Figura 14. Dicroísmo Circular (DC).** **A.** Espectro de DC en condiciones nativas y desnaturaladas de EcFtsZ silvestre (●), mutante F135W (○) e I294 W (▲), a una concentración de proteína de  $7,4 \mu\text{M}$  en buffer Tris-HCl 50 mM pH 8,0. Cada curva corresponde al promedio de cuatro barridos desde 200 hasta 250 nm. **B.** Desnaturalación con GdmCl, desde 0 hasta 5 M, de EcFtsZ silvestre (●) y las mutantes F135W (○) e I294 W (▲), a una concentración de proteína de  $7,4 \mu\text{M}$  en amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 8,0. La fracción de proteína desnaturalada se calculó a partir de la elipticidad a 222 nm (absorción del enlace peptídico de las hélices alfa) a distintas concentraciones de agente desnaturalante (GdmCl), normalizando cada punto por la máxima elipticidad experimental.

**Mutante I294W.** Los resultados relativos a la funcionalidad del mutante I294W demostraron que esta mutación afectó seriamente la capacidad de polimerizar *in vitro*, la capacidad de complementar *in vivo* y la actividad GTPásica, en comparación con las demás mutaciones. Al analizar estructuralmente la proteína mutante, se determinó que su estabilidad y estructura no presentaron diferencias significativas respecto de EcFtsZ silvestre. Por lo tanto el efecto de esta mutación parece ser más local (cercano a la región misma de la mutación). Con el fin de analizar detalladamente el entorno del triptofano se construyó un modelo de la estructura tridimensional de la mutante I294W.



**Figura 15. Análisis de la mutación I294W.** **A.** Modelo tridimensional de la estructura del mutante I294W (ver materiales y métodos). En gris claro se muestra el dominio amino (GDP marcado de color amarillo) y en gris oscuro se muestra el dominio carboxilo. El triptófano 294 se marca en rojo formando posiblemente una interacción aromática con al fenilalanina 275 (marcada azul). **B.** Alineación múltiple de secuencias de FtsZ con un porcentaje de identidad mayor al 40%. Se muestra la zona que va desde la posición 269 hasta la 295 de la alineación, tomando como referencia la secuencia de EcFtsZ silvestre. En amarillo se marca la posición 275 y la 294, que indican la ausencia de residuos aromáticos presentes simultáneamente en una misma secuencia. Se expone 19 secuencias representativas de las 474 totales. El fenómeno descrito se observó para las otras 455 secuencias.

Al analizar el modelo de la mutante I294W (Fig. 15 A), se observó que la fenilalanina 275 está a alrededor de 4 Å del triptófano 294, al tomar como referencia el centro de masa del anillo bencénico y el anillo indol de ambos residuos, respectivamente. Esta distancia está dentro del rango descrito de interacción entre anillos aromáticos (Burley y Petsko 1985), de manera que un posible puente o *stacking* aromático se formaría entre ambos residuos. Se hizo un análisis evolutivo a través de la alineación múltiple de secuencias de FtsZ expuesto anteriormente (ver resultados parte 1), para determinar la frecuencia y el tipo de aminoácidos presentes en las posiciones correspondientes a ambos residuos (Fig. 15 B), y se observó que en ambas posiciones, sobretodo la 294, existe una alta tendencia de aparición de residuos aromáticos, sin embargo, en ninguna de las 474 secuencias analizadas se detectó dos residuos aromáticos situados simultáneamente en ambas posiciones (275 y 294) en la misma secuencia. Esto apoya desde un punto de vista evolutivo, la idea de que dos residuos aromáticos estructuralmente ubicados en esas posiciones es energéticamente desfavorable, debido posiblemente a la formación de una interacción aromática entre ambos.

Con el fin de abordar experimentalmente esta idea, se diseñó la doble mutante F275A/I294W, que reemplaza la fenilalanina 275 por una alanina, que está presente en esa posición en varias otras secuencias de FtsZ (8% del total), como la MjFtsZ que posee un triptófano situado estructuralmente en la misma posición que la isoleucina 294 y una alanina en la posición 275. Para determinar el efecto de esta doble mutación, se analizó las funciones afectadas en la mutante I294W que se resumen en la Tabla 7. El proceso de construcción y purificación se hizo de la misma forma que para las otras proteínas mutantes. Los resultados obtenidos con la doble mutante muestran una total reversión de la baja complementación presentada por el mutante I294W, sumado a un

pequeño aumento de la actividad GTPásica. Sin embargo, la doble mutación no revertió *in vitro* la ausencia de polimerización de la mutante I294W, a pesar de que produjo una disminución sustancial de la dispersión luz previa a la adición de GTP, que se observó con la mutante.

**Tabla 7.** Estudios funcionales de la mutante F275A/I294W <sup>a</sup>.

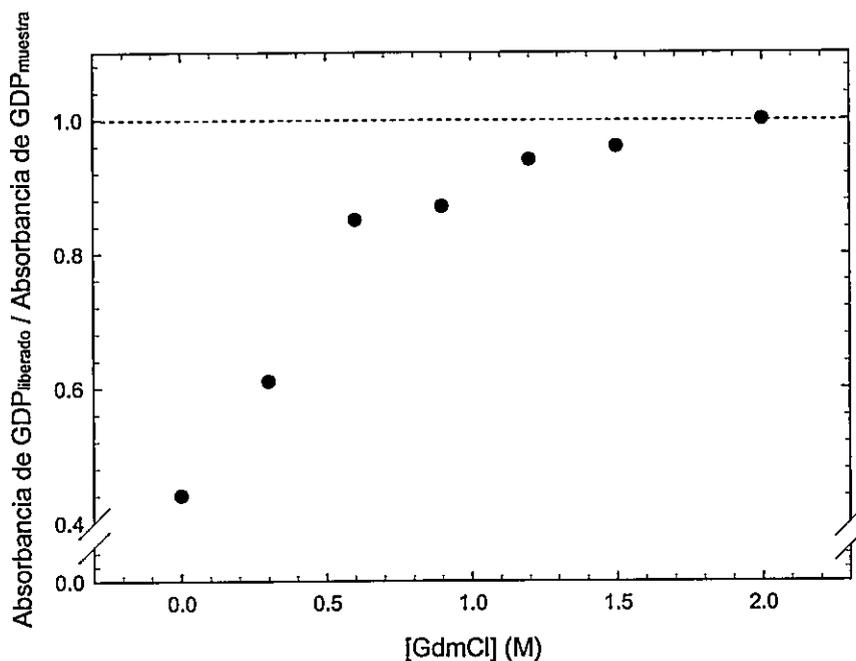
	<b>Complementación <i>in vivo</i></b>	<b>Polimerización (dispersión de luz)</b>	<b>Actividad GTPásica</b>
EcFtsZ silvestre	100 %	+	100%
I294W	5 %	-	12%
F275A/I294W	99 %	-	20%

<sup>a</sup> La complementación y la actividad GTPásica se expresa como porcentaje relativo a lo obtenido con EcFtsZ silvestre. La polimerización observada a través de experimentos de dispersión de luz, se representa como capacidad (+) o incapacidad (-) de polimerizar.

**Liberación del nucleótido durante la desnaturación.** La estructura cristalina de MjFtsZ posee una molécula de GDP unida al dominio amino (característica del motivo de plegamiento Rossmann presente en este dominio). La homología entre la estructura de EcFtsZ y MjFtsZ, muestra que las características de este sitio en EcFtsZ debieran ser similares, con una estequiometría GDP/EcFtsZ cercana a uno (Andreu y col., 2002). De hecho, en los experimentos de actividad GTPásica se detectó una cantidad basal considerable de GDP en el tiempo cero (alrededor de un 14%) que más bien correspondía al contenido de nucleótido de la proteína y no al contenido basal de GDP del reactivo comercial de GTP (alrededor de un 0,1%).

Para determinar la cantidad de GDP que se libera a medida que la proteína se despliega, se midió el nucleótido libre a diferentes concentraciones de GdmCl para EcFtsZ silvestre. Se observa en la figura 16 que el nucleótido comienza a ser liberado

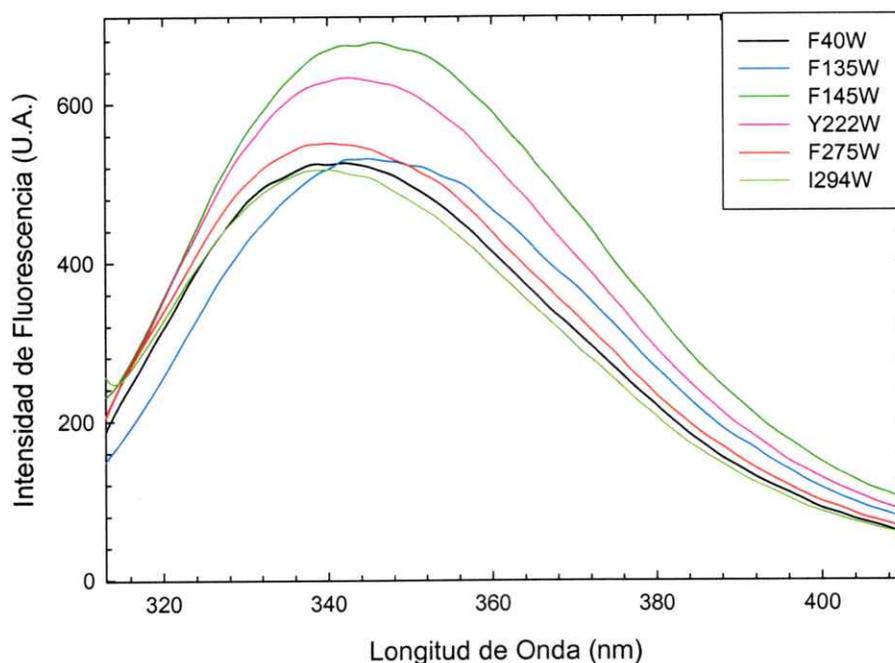
de la estructura de EcFtsZ a las concentraciones iniciales de agente desnaturante. La mayor diferencia en absorbancia ocurre entre 0 y 0,6 M de GdmCl, y luego tiende a estabilizarse partir de 1,2 M de GdmCl.



**Figura 16. Liberación de GDP.** La liberación de GDP desde EcFtsZ silvestre (7,4  $\mu$ M) a diferentes concentraciones de GdmCl se determinó por filtración, midiendo la absorbancia del filtrado a 254 nm (ver Materiales y Métodos). Se expresó los resultados como una fracción entre el GDP liberado (GDP<sub>liberado</sub>) y el GDP total de la muestra (GDP<sub>muestra</sub>) estimado a partir de la absorbancia en el punto de máxima desnaturación (2 M de GdmCl). La línea punteada indica la liberación completa de GDP.

**Fluorescencia de triptófanos.** Las propiedades espectrales del triptófano en la proteína son altamente sensibles a las características del ambiente que lo rodea. Aspectos como la intensidad de fluorescencia y la longitud de emisión máxima que presenta dependen de las propiedades fisicoquímicas de los residuos que están

vecinos, de la cercanía de éstos con el triptófano, y del grado de accesibilidad al solvente del medio (Lakowicz 1999). Para determinar las características espectrales en condiciones nativas de los triptófanos introducidos en las mutantes de EcFtsZ, se obtuvo los espectros de emisión de cada uno de ellos. Adicionalmente, este ensayo se utilizó para cerciorarse de la presencia de FtsZ en la etapa final de purificación.



**Figura 17. Fluorescencia de los triptófanos.** Se muestra los espectros de emisión en condiciones nativas de las mutantes F40W, F135W, F145W, Y222W, F275W e I294W, a una concentración de proteína de 12  $\mu$ M, en una solución que contenía Tris-HCl 50 mM pH 7,5. Cada muestra corresponde al promedio de 3 barridos. La longitud de onda de excitación fue 295 nm.

**Tabla 8.** Propiedades espectrales de la emisión del triptófano en condiciones nativas, obtenidas a partir de los espectros de cada mutante <sup>a</sup>.

	<b>Máximo de Emisión (nm)</b>	<b>Intensidad en el Máximo (U.A.)</b>	<b>Área del espectro (U.A.*nm)</b>	<b>% ASA teórico</b>
F40W	340,0 ± 0.10	524	14500 ± 500	8,2
F135W	343,1 ± 0.50	512	16800 ± 345	30
F145W	344,0 ± 0.30	674	26100 ± 478	6,7
Y222W	342,4 ± 0.13	632	25000 ± 440	29,6
F275W	340,2 ± 0.14	550	24400 ± 442	5,8
I294W	339,8 ± 0.20	516,6	13600 ± 512	9,6

<sup>a</sup>Las propiedades espectrales y las incertidumbres de las mediciones fueron calculadas con el programa GRAMS. El porcentaje del área accesible al solvente (% ASA) fue calculado a partir de los modelos tridimensionales de cada mutante.

Los espectros de emisión de cada mutante muestran en general triptófanos ocultos del solvente, caracterizados por intensidades de fluorescencia elevadas y un corrimiento del máximo de emisión hacia zonas más energéticas como muestran los máximos de emisión en la Tabla 8, al compararlos con el máximo de emisión e intensidad del triptófano expuesto totalmente al solvente (~350 nm y ~200 U.A.). El área de los espectros aumenta en proporción al aumento de la intensidad en el máximo de emisión. Se observa que las mutantes F135W e Y222W, que presentan máximos de emisión menores que otros mutantes, poseen los mayores porcentajes de ASA, lo que sugiere que las moléculas de agua tienen mayor acceso a estos residuos y causan una disminución en la energía de los fotones emitidos (Lakowicz 1999). Por otra parte, las mutantes F275W e I294W poseen un máximo de emisión muy similar, debido probablemente a que al estar ubicados estructuralmente en la misma zona (ver Figura 5) poseen un grado semejante de accesibilidad al solvente, sin embargo la intensidad de la emisión es mayor para el mutante F275W que se encuentra cerca de la posición 294. Esto último puede estar asociado a la cercanía de la fenilalanina 275 con el

triptófano 294 en el mutante I294W, lo que generaría un apagamiento de la fluorescencia debido a la absorción de fotones por parte del anillo bencénico, lo que no ocurriría en el mutante F275W, apoyando la idea de la interacción aromática entre ambos residuos.

Al observar el ambiente que rodea cada triptófano en los modelos tridimensionales de cada mutante, se puede relacionar el grado de cercanía de residuos vecinos con el triptófano y la intensidad de fluorescencia en el máximo de emisión (residuos muy cercanos al triptófano tienden a apagar la fluorescencia). Los triptófanos W145 e W222 poseen un ambiente con una densidad menor de residuos vecinos que los demás triptófanos, lo que disminuye el apagamiento natural de su fluorescencia debido a la cercanía de cadenas laterales de otros residuos circundantes. Esto explicaría la mayor intensidad observada en los espectros de emisión de estos mutantes al compararla con los demás espectros. Los demás mutantes presentan intensidades menores y en general similares, debido probablemente a la ubicación del triptófano en zonas más compactas de la proteína con mayor densidad de residuos circundantes. Esto último se aprecia de manera más pronunciada para el mutante F40W, cuyo triptófano se encuentra en el núcleo o *core* del dominio aminó, y el mutante I294W que posee residuos vecinos bastante cercanos al triptófano 294. El triptófano W145 presentó además el máximo de emisión menos energético de todos los mutantes. Al observar el ambiente que rodea a este triptófano, se observa la presencia de un residuo cargado positivamente a una distancia de 3,5 Å, la lisina 141, que puede afectar la energía de los fotones emitidos desde el triptófano a través de interacciones entre los momentos dipolares de ambos residuos. En general se observa que los mutantes que se encuentran en zonas con cargas eléctricas cercanas, como se aprecia en la figura 5 mediante la representación de la superficie de potencial

electrostático que rodea cada triptófano, presentan una máximo de emisión mayor (mutantes F35W Y F145W) en comparación con aquellos situados en ambientes más hidrófobos.

## PLEGAMIENTO

Debido a que el plegamiento de una proteína es un proceso favorecido termodinámicamente, su estudio requiere la alteración de las condiciones del sistema de manera de inducir el desplegamiento de manera artificial. Esto se hace generalmente desviando el equilibrio natural desde la forma nativa a la desnaturalada al modificar las propiedades químicas (uso de agentes desnaturalantes como GdmCl) o físicas (temperatura, presión, etc.) del sistema basal en que se encuentra la proteína. De esta forma es posible detectar los cambios que surgen de estas alteraciones a través de distintas técnicas (fluorescencia, microcalorimetría diferencial de barrido, dicroísmo circular, etc.).

FtsZ es una proteína de un peso molecular relativamente alto comparado con la mayoría de las proteínas utilizadas como modelos de estudio de plegamiento. Por esto es importante abordar el estudio de su plegamiento por medio de más de una técnica, de manera de obtener una visión más completa y definida del proceso y eventualmente confirmar y evaluar los resultados obtenidos a través de distintas estrategias experimentales. Mediante el uso de mutantes de triptófanos se analizará el desplegamiento y replegamiento al equilibrio de EcFtsZ por espectroscopía de fluorescencia, y por experimentos de microcalorimetría diferencial se estudiará el efecto de la temperatura en la desnaturalación. Estos estudios serán complementados además por los experimentos de desnaturalación al equilibrio seguidos por DC realizados previamente.

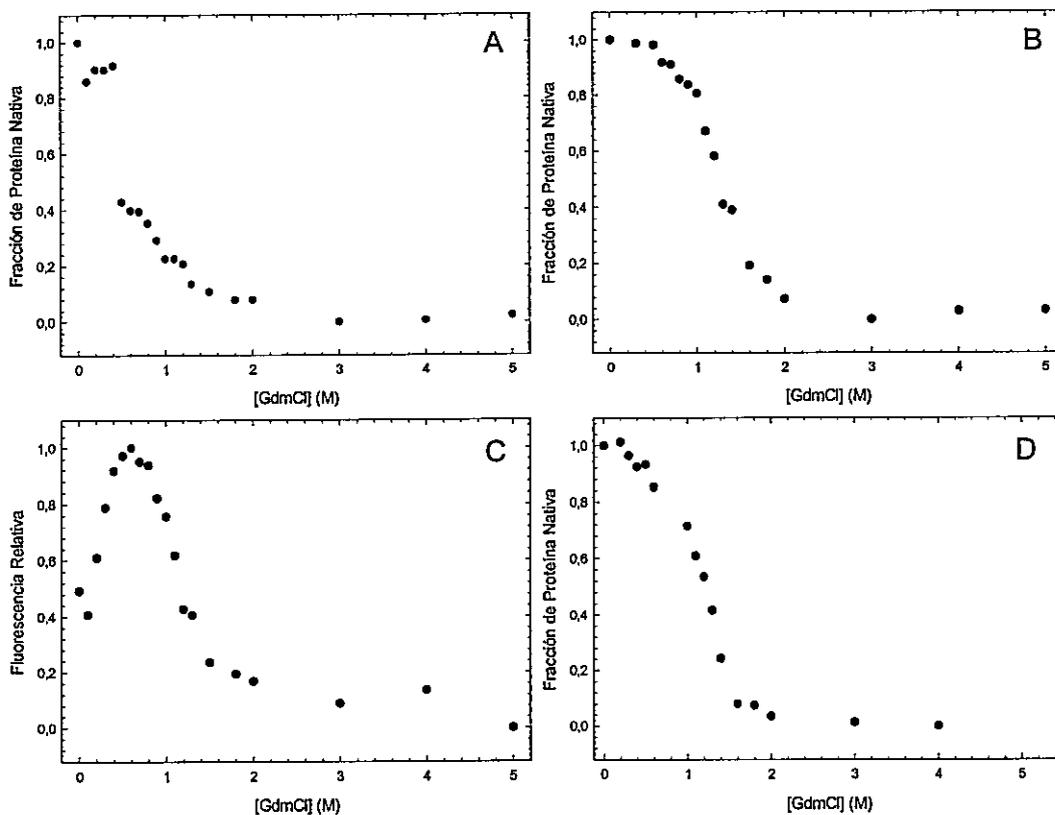
**Fluorescencia.** El desplegamiento de una proteína se caracteriza por la pérdida de la conformación altamente estructurada que posee el estado nativo. Este proceso global está compuesto de múltiples modificaciones estructurales a nivel local que se originan en puntos determinados de la estructura terciaria o cuaternaria de la proteína y que se transmiten de manera secuencial a otras regiones. El uso de fluorescencia en estudios de plegamiento permite detectar estos cambios locales a través de las alteraciones que experimentan las propiedades espectrales de sondas fluorescentes ubicadas en regiones determinadas de la proteína, como por ejemplo sondas extrínsecas que interactúan con zonas específicas, y también sondas intrínsecas que forman parte del esqueleto covalente de la proteína (Taniuchi y Anfinsen 1969). Dentro de estas últimas, la fluorescencia de triptófanos posee ventajas respecto de las sondas extrínsecas, ya que omite las modificaciones adicionales de la estructura producidas por la interacción de la sonda con la proteína. Las propiedades espectrales de este residuo aromático son sensibles a las variaciones fisicoquímicas que experimenta el ambiente que lo rodea y que surgen a su vez de los cambios estructurales asociados al desplegamiento. Estos cambios pueden ser detectados en el tiempo (fluorescencia en el tiempo en experimentos de *stopped flow*) o al equilibrio (fluorescencia de estado estacionario).

Los experimentos de desnaturación y renaturación seguidos a través de fluorescencia se hizo al equilibrio a distintas concentraciones de agente desnaturante (GdmCl) de acuerdo a lo descrito por Santoro y Bolen (Santoro y Bolen 1988). Este reactivo ha sido utilizado clásicamente en estudios de desplegamiento debido a su conformación molecular, que incluye un grupo cargado (Cl<sup>-</sup>) que interactúa con las zonas cargadas y polares de la superficie de la proteína y con el solvente para iniciar la desestabilización del estado nativo y permitir el ingreso del componente más hidrófobo (guanidimio) hacia las regiones más apolares para interactuar con el enlace peptídico.

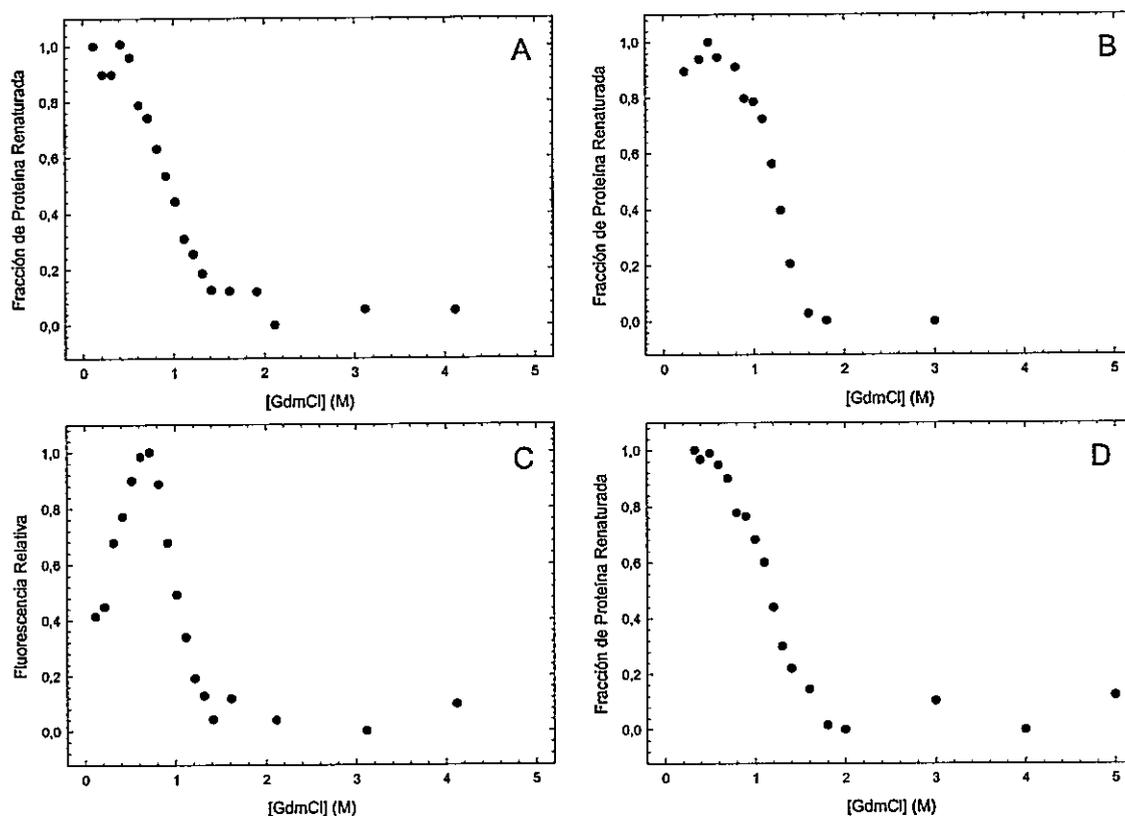
De esta forma se favorece el desplegamiento debido a la estabilización natural que provoca el GdmCl de las conformaciones intermedias y totalmente desnaturaladas de la proteína (el agente desnaturalante es por definición una molécula que posee más afinidad por estados desnaturalados de la proteína).

EcFtsZ no posee triptófanos en su secuencia, de modo que para caracterizar el plegamiento de cada dominio se seleccionó de entre las mutantes construidas sólo aquellas que conservaron en mejor forma su estructura y/o su funcionalidad respecto de EcFtsZ silvestre. Así, se escogió dos mutantes puntuales por dominio para realizar los experimentos de desplegamiento y replegamiento, con la idea de explorar este proceso en varias regiones, estas fueron las mutantes F40W y F135W del dominio amino y F275W e I294W del dominio carboxilo. Se seleccionó las mutantes F135W e I294W debido a que sus perfiles de estructura secundaria fueron similares a los de EcFtsZ silvestre en estado nativo (Fig. 14) y las mutantes F40W y F275W, debido a que su funcionalidad fue semejante a la de EcFtsZ silvestre, aunque en menor grado para F275W. Las características de la emisión de fluorescencia de los triptófanos de estas mutantes, como se dijo, muestran que este residuo de aminoácido se encuentra más bien oculto. Las curvas de desnaturalación, seguidas por el cambio en la intensidad de fluorescencia intrínseca, que se muestran en las figuras 18 A, B y D presentan un comportamiento normal, es decir al aumentar la concentración del agente desnaturalante GdmCl, hay una disminución de la intensidad de fluorescencia con una conducta cooperativa. Se observa que los mayores cambios en intensidad se producen entre 0,1 y 1,8 M de GdmCl similar a lo observado por DC. Es interesante destacar el comportamiento de la mutante F275W que inicialmente muestra un aumento de la intensidad de fluorescencia hasta 0,6 M GdmCl y luego decae con una conducta similar a las anteriores (Fig. 18 C). Las curvas de renaturación que se muestra en la figura 19

presentan un patrón similar al de desnaturación, lo que sugiere que el proceso es reversible.



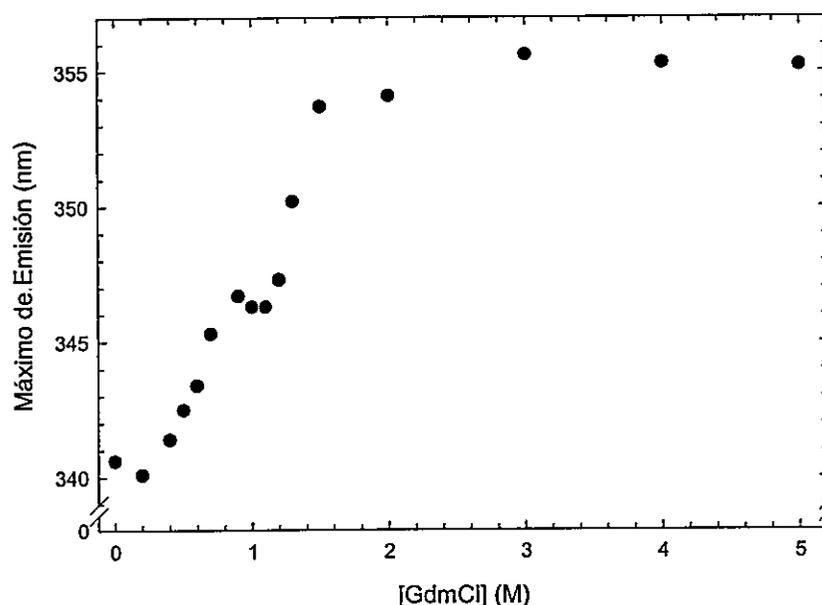
**Figura 18. Desnaturación al equilibrio.** La desnaturación de las mutantes del dominio amino F40W (A) y F135W (B), y las del dominio carboxilo F275W (C) e I294W (D), a una concentración de proteína de 12  $\mu$ M, se hizo por dilución rápida en una solución que contenía Tris-HCl 50 mM pH 7,5, con las concentraciones de GdmCl que se indica en la figura. Se grafica la fracción de proteína nativa para las mutantes F40W, F35W e I294W, estimada a partir de la normalización de los datos en función de la intensidad máxima obtenida en la muestra nativa. Para la mutante F275W, se grafica la fluorescencia de emisión relativa, pues se produjo un aumento de la fluorescencia hasta alrededor de GdmCl 0,6 M. En cada punto se determinó la intensidad de fluorescencia a 340 (F40W), 343,1 (F135W), 340,2 (F275W) y 339,8 (I294W) nm, que corresponden a los máximos de emisión de cada proteína en estado nativo (0 M de GdmCl).



**Figura 19. Renaturación al equilibrio.** La renaturación de las mutantes F40W (A), F135W (B) y F275W (C) e I294W (D), a una concentración de 12  $\mu$ M, se hizo por dilución rápida de las proteínas en estado desnaturalado (GdmCl 3,0 M) en una solución que contenía Tris-HCl 50 mM pH 7,5. La obtención y el tratamiento de los datos de intensidad de fluorescencia se hizo de la misma manera como se indica en la figura 18.

Los triptófanos situados en el dominio amino (W40 y W135) se encuentran estructuralmente alejadas entre sí (ver figura 5), y los experimentos de desnaturalación muestran una transición levemente diferente, que comienza en ambos casos alrededor de 0,4 M de GdmCl, pero que transcurre de forma menos cooperativa para el caso del mutante F40W, con la formación probable de un intermediario alrededor de 1 M que no se detecta con el mutante F135W. Este último muestra una transición más cooperativa, asociada a un típico proceso de dos estados. Debido a que el triptófanos W40 se

encuentra más oculto al solvente comparado con el triptófano W135 (ver Fig. 17 y Tabla 8) que se caracteriza por una emisión menos energética, es posible que el primero sea más sensible al proceso de desplegamiento, y se detecte una estructura intermedia relativamente estable que en el otro mutante no se observó. Para explorar más esta idea, se analizó el cambio del máximo de emisión del W40 en función del agente desnaturante.

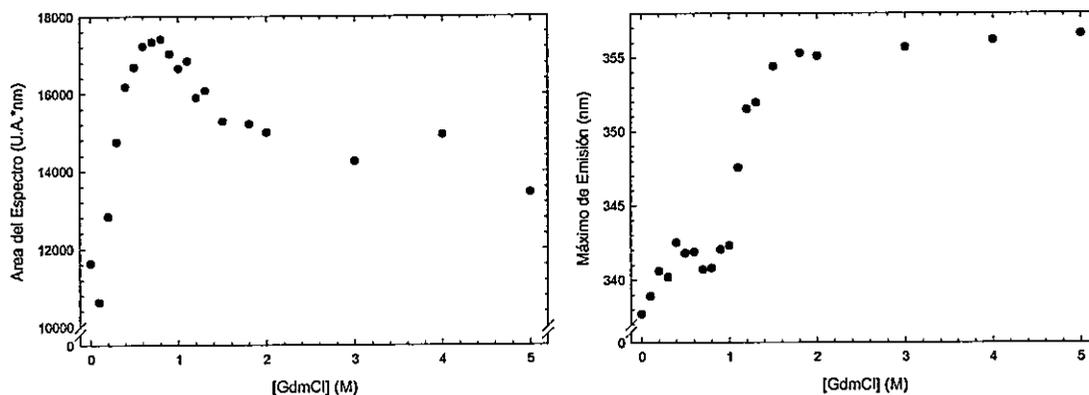


**Figura 20. Máximos de emisión del mutante F40W.** Cada punto corresponde al máximo de emisión determinado a partir de los espectros de fluorescencia obtenidos a distintas concentraciones de agente desnaturante (GdmCl) en el experimento de desnaturación al equilibrio.

La energía de emisión del W40 comienza a disminuir conforme empieza el proceso de desnaturación (Fig. 20), a partir de 0,2 M de GdmCl, y alcanza finalmente a una emisión promedio de 354,7 nm a partir de 1,6 M de GdmCl. Se observa claramente

la formación de una región intermedia de emisión constante alrededor de 1 M de GdmCl, que separa dos transiciones centradas aproximadamente en 0,6 y 1,3 M de GdmCl respectivamente. Esto sugiere la formación de un intermediario relativamente estable de plegamiento en esa zona, que se caracteriza por una energía de emisión e intensidad de fluorescencia relativamente constantes en ese intervalo de agente desnaturalante.

En el dominio carboxilo, las mutantes muestran transiciones diferentes. Con la mutante F275W se observó un aumento considerable y pronunciado de la intensidad de fluorescencia a medida que se incrementa la concentración de agente desnaturalante (la intensidad alcanzó un 140% la intensidad de la proteína nativa). Este aumento en la intensidad de fluorescencia, fenómeno denominado en la literatura como *Hiperfluorescencia* (Missiakas y col., 1990), se detectó en la desnaturalación y renaturalación al equilibrio de la proteína, y comienza alrededor de 0,1 M, alcanzando un pico a 0,6 M de GdmCl en ambos casos. La transición total finaliza a 1,8 M de GdmCl, al igual que en los demás mutantes. Por otro lado, la mutación I294W presentó una transición típicamente cooperativa asociada más a un proceso de dos estados, muy similar a la observada con el mutante F135W, que se inicia a 0,4 M y finaliza en 1,8 M de GdmCl. Con el fin de determinar si el aumento evidente de la intensidad de fluorescencia observado con el mutante F275W está además asociado a cambios en la longitud de onda de la emisión, se analizó los máximos de emisión de cada espectro.



**Figura 21. Area y máximos de emisión del mutante F275W.** A. El área de cada espectro de emisión de fluorescencia se determinó a distintas concentraciones de GdmCl en la desnaturalación al equilibrio, a través de la integración de la curva bajo el pico de emisión máxima. B. El máximo de emisión de cada espectro fue estimado a partir de los espectros a distintas concentraciones de agente desnaturalante.

En la figura 21 A se aprecia que el área contenida bajo cada uno de los espectros aumenta de manera proporcional y correlacionada con el aumento de intensidad de fluorescencia observado en los experimentos de desnaturalación y renaturalación, en el intervalo de concentraciones de agente desnaturalante que va desde 0,1 hasta 1,8 M de GdmCl, con un pico similar alcanzado a 0,6 M de GdmCl. La energía de la emisión disminuye pronunciadamente a medida que comienza la desnaturalación de la proteína, reflejado en el aumento en la longitud de onda de emisión (Fig. 21 B), alcanzando una estabilización e incluso una disminución del máximo de emisión entre 0,4 y 1 M de GdmCl, que corresponde a la zona de la transición donde comienza a caer la intensidad de fluorescencia luego del pico alcanzado. A partir de 1 M la energía vuelve nuevamente a disminuir hasta cerca de

1,6 M de GdmCl, donde comienza la estabilización de la emisión, promediando 355,6 nm.

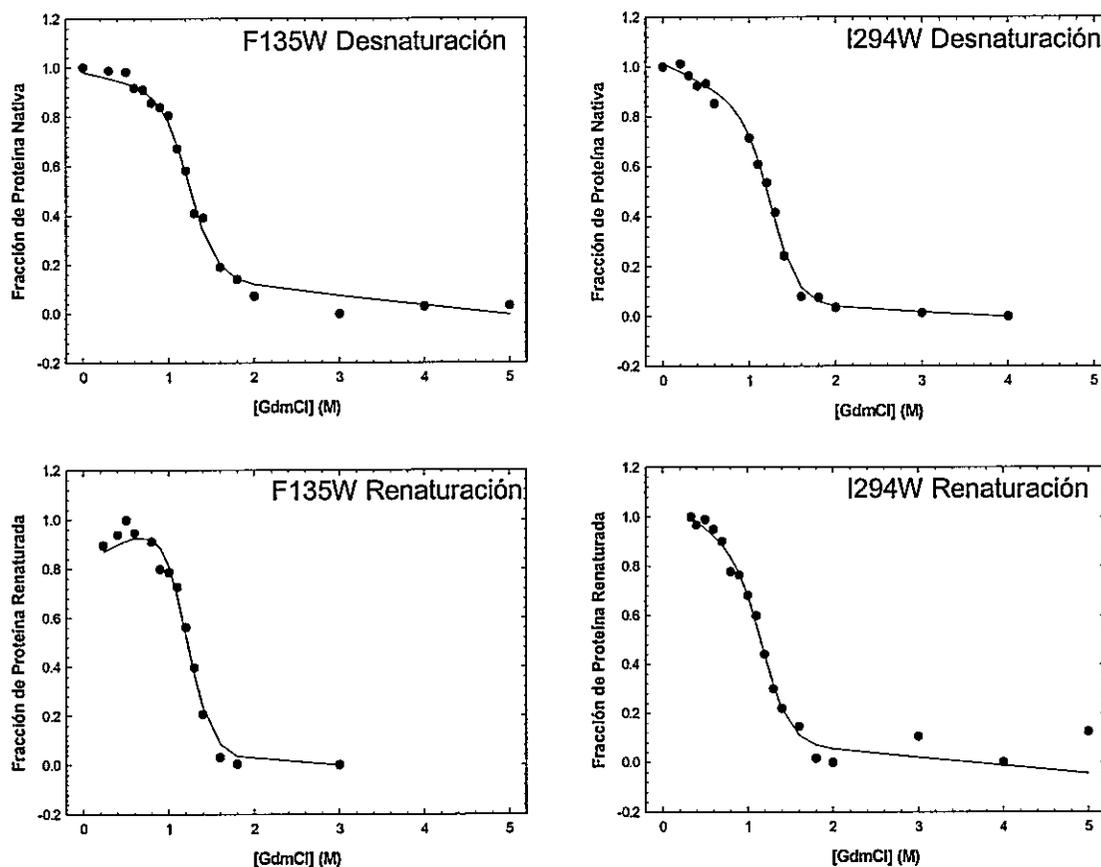
### Cálculo de energía libre

A partir de las curvas de desnaturación es posible estimar la diferencia de energía libre asociada al equilibrio que se establece en cada punto de la curva. Cuando la transición es de dos estados o al menos no presenta regiones intermedias, se produce una dependencia lineal entre ese valor de energía y la concentración de agente desnaturante en la zona de transición, de manera que al extrapolar a cero [GdmCl] es posible determinar la diferencia de energía libre del desplegamiento ( $\Delta G^{\circ}_{0[M], D-N}$ ) de la proteína en la solución sin GdmCl (Ver Apéndice I)(Santoro y Bolen 1988).

Para estimar  $\Delta G^{\circ}_{0[M], D-N}$  de desplegamiento de EcFtsZ se hizo un ajuste de las curvas de desplegamiento y replegamiento de los mutantes F135W e I294W, ya que presentaron transiciones mucho más cooperativas que los otros mutantes. A partir de este ajuste se determinó el valor de  $\Delta G^{\circ}_{0[M], D-N}$  para cada proceso. Además, se calculó el parámetro  $[GdmCl]_{50\%}$ , que corresponde a la concentración de agente desnaturante necesaria para alcanzar el punto medio de la transición, donde la constante de equilibrio alcanza la unidad ( $K_{eq, unf} = 1$ ). Este índice es generalmente utilizado para comparar las estabildades de proteínas (Ver Apéndice I).

Los valores de  $\Delta G^{\circ}(x)_{D-N}$  y  $[GdmCl]_{50\%}$  fueron similares entre ambos mutantes, dentro del intervalo de error experimental (Tabla 9, Figs. 22 y 23), lo que indica que las regiones estructurales en las cuales se ubica cada triptófano presentan características termodinámicas similares, y el mismo proceso de desplegamiento y replegamiento al equilibrio se observa a partir de esas zonas. La transición en ambos casos pasa por el

mismo punto de  $K_{eq} = 1$  (alrededor de 1,2 M de [GdmCl]), lo que sugiere que estas zonas poseen la misma estabilidad. La similitud entre los valores obtenidos para ambos parámetros estimados a partir de la desnaturación y renaturación para cada mutante, comprueba la reversibilidad del proceso de desplegamiento al equilibrio.

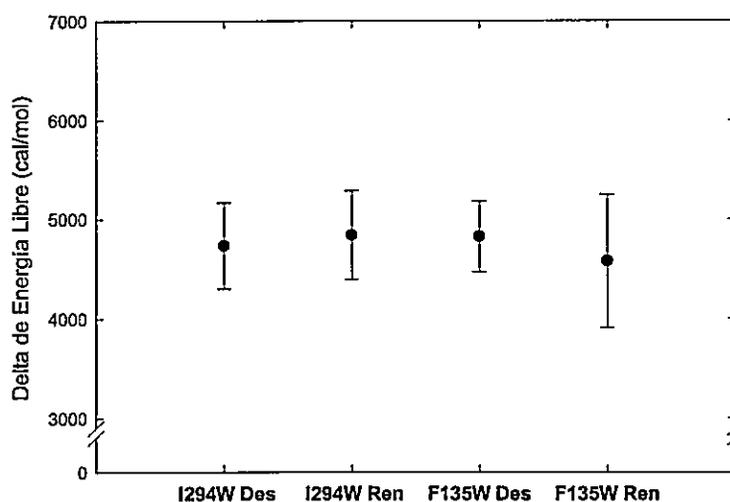


**Figura 22. Ajuste de curvas de desnaturación y renaturación de mutantes F135W e I294W.** El ajuste se hizo mediante el método de extrapolación lineal (ver Apéndice I). Los círculos negros (●) corresponden a los puntos experimentales y las líneas continuas corresponde al ajuste.

**Tabla 9.** Ajuste de las curvas de desnaturalación y renaturación de mutantes F135W e I294W <sup>a</sup>.

	F135W	I294W
$\Delta G^{\circ}$ desnaturalación (cal/mol)	$4700 \pm 4,3 \cdot 10^2$	$4800 \pm 3,5 \cdot 10^2$
$[GdmCl]_{50\%}$ (M) (desnaturalación)	$1,25 \pm 0,06$	$1,27 \pm 0,09$
$\Delta G^{\circ}$ renaturación (cal/mol)	$4800 \pm 4,4 \cdot 10^2$	$4500 \pm 6,7 \cdot 10^2$
$[GdmCl]_{50\%}$ (M) (renaturación)	$1,2 \pm 0,05$	$1,2 \pm 0,08$

<sup>a</sup> El cálculo de la diferencia de energía libre de cada proceso fue determinado a partir del método de extrapolación lineal (ver Apéndice I).



**Figura 23.** Energía libre de desnaturalación y renaturación. Valores de  $\Delta G^{\circ}$  para las mutantes F135W e I294W para los experimentos de desnaturalación (Des) y renaturación (Ren).

### **Microcalorimetría Diferencial de Barrido (DSC)**

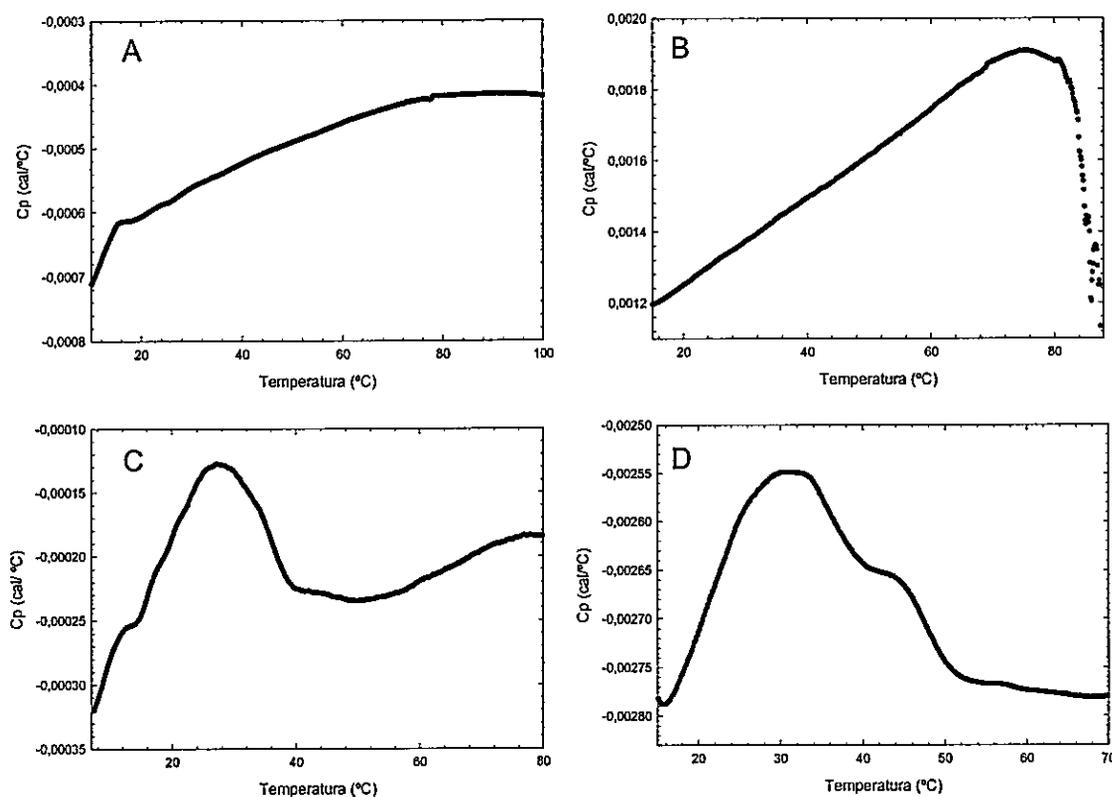
Esta técnica consiste esencialmente en medir los cambios en la capacidad calórica ( $C_p$ ) del sistema en estudio, en función de la temperatura. Al utilizar la temperatura como variable física, se consigue una perturbación directa de las propiedades estructurales del sistema, de manera que es posible estimar parámetros termodinámicos de manera directa. Se observó que la estructura de las proteínas es capaz de absorber calor de manera diferencial de acuerdo al estado conformacional en que se encuentra. Debido a que durante el desplegamiento se suscitan diversas conformaciones, es posible estudiar este proceso en función de los cambios de  $C_p$  del sistema al aumentar la temperatura gradualmente e inducir el desplegamiento de la proteína (Privalov y Potekhin 1986).

Se analizó el desplegamiento de EcFtsZ silvestre por el aumento de la temperatura a través de DSC. Además, se utilizó adicionalmente esta técnica para estudiar el desplegamiento de MjFtsZ, con el fin de establecer comparaciones estructurales entre ambas proteínas.

**EcFtsZ silvestre.** En una primera etapa, para los experimentos de desnaturación térmica se varió la temperatura entre 5° y 100° C. En las condiciones experimentales utilizadas, esto es proteína más amortiguador Tris-HCl pH 8,0, 50 mM, los resultados mostraron absorciones continuas de calor dentro del intervalo térmico utilizado, en la forma de transiciones incompletas, sin la presencia del pico característico de una transición de estado asociado a un desplegamiento de la proteína. Estos resultados fueron reproducibles aún con muestras de EcFtsZ provenientes de diferentes preparaciones.

El siguiente paso fue desnaturar completamente la EcFtsZ con GdmCl como agente desnaturalante, y luego iniciar el proceso de renaturación por dilución rápida en

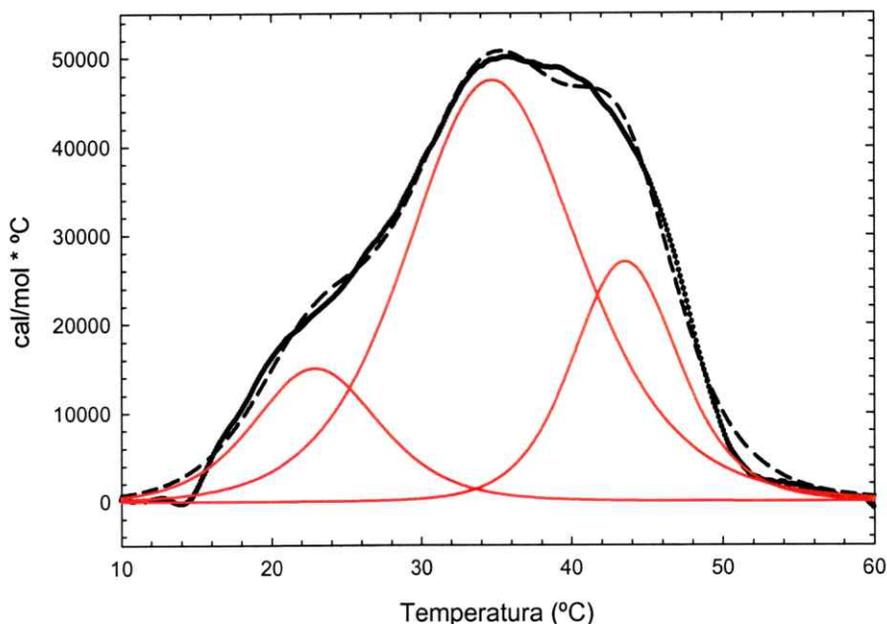
Tris-HCl 50 mM pH 8,0 (logrando una concentración final de GdmCl de 0,1 M), durante 50 min en hielo. Al utilizar esta muestra renaturada de EcFtsZ, se observó una absorción de calor más pronunciada que en los termogramas anteriores, pero la transición siguió siendo incompleta (Fig. 24 A). Para analizar el efecto del pH, se utilizó Glicina (pH 4,0) como amortiguador, sin embargo no se observó diferencia respecto de los resultados obtenidos anteriormente.



**Figura 24. Microcalorimetría diferencial de barrido (DSC).** La solución experimental contenía la EcFtsZ en amortiguador TrisHCl 50 mM, pH 8. Se muestra los perfiles de absorción de calor en función de la temperatura (termogramas) de EcFtsZ renaturada en 0,1 M de GdmCl (A), MjFtsZ silvestre (B), EcFtsZ renaturada en GdmCl 0,7 M (C) y MjFtsZ renaturada en GdmCl 2 M (D).

Se demostró que el uso de agentes desnaturantes en bajas concentraciones durante el desplegamiento por temperatura permite estabilizar estados intermedios durante el proceso de desnaturación y evitar además eventos de agregación e interacciones inespecíficas que dependen del cambio en la temperatura del sistema (Blaber y col., 1999). Debido a la absorción continua de calor observada en los experimentos previos, se procedió a usar GdmCl en bajas concentraciones. Así en el intervalo de 0,1 a 0,3 M GdmCl, no hubo cambios respecto a los resultados anteriores, sin embargo, al utilizar GdmCl 0,7 M, se observó un pico de absorción de calor característico de una transición (Fig. 24 C). Sin embargo debido a que el proceso no fue reversible, no se pudo obtener datos termodinámicos reproducibles, pues se observó una evidente agregación y posterior precipitación de la muestra luego de alcanzar los 60 °C.

Para analizar la curva mostrada en la figura 24 C asociada a una transición, se realizó una deconvolución de los puntos experimentales para determinar el número de transiciones de dos estados que existen en la curva envolvente de modo de analizar la presencia de intermediarios y el grado de cooperatividad o unidades cooperativas (ver Apéndice 2). La deconvolución de los datos experimentales indica la presencia de 3 transiciones durante el desplegamiento por temperatura de EcFtsZ (Fig. 25), lo que sugiere una baja cooperatividad en el proceso de desplegamiento asociado probablemente a la presencia de uno o más intermediarios.

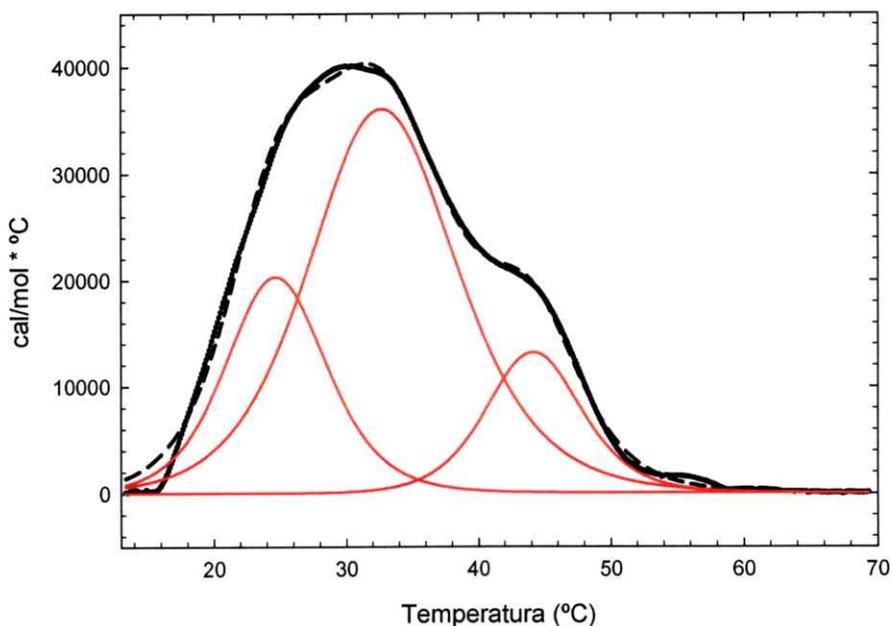


**Figura 25. Termograma de desplegamiento de EcFtsZ.** La muestra en amortiguador TrisHCl 50 mM, pH 8,0 se desgaseó y se adquirió el termograma con una velocidad de muestreo de 1 °C/min. Se muestra la capacidad calorífica normalizada por la concentración de proteína (25  $\mu$ M) y por la temperatura. Los datos experimentales se ajustaron para obtener la mejor curva experimental, y se obtuvo una deconvolución de la curva experimental. Los puntos negros continuos corresponden a la sustracción de la curva experimental y la línea base. La línea negra discontinua corresponde al ajuste de los datos experimentales. Las líneas rojas corresponden a la deconvolución de los datos en transiciones de dos estados.

**MjFtsZ.** Para analizar el efecto de la temperatura sobre el desplegamiento de MjFtsZ proveniente del microorganismo hipertermófilo (*M. jannashii*) se varió la temperatura entre 5° y 110° C. De manera similar a lo ocurrido con EcFtsZ, los termogramas obtenidos con MjFtsZ en amortiguador Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 mostraron un proceso de absorción de calor continuo (transición incompleta), con eventos de agregación y precipitación desde los 80 °C (Fig. 24 B).

Con el fin de evitar la agregación se utilizó GdmCl que eventualmente puede estabilizar estados intermediarios de transición. Se usó una concentración de GdmCl 2 M que está por debajo de la concentración que desnatura la proteína (2,8 M) (Andreu y col., 2002). Bajo estas condiciones, se observó un pico de absorción de calor asociado a una transición, similar a lo observado para EcFtsZ. Se observa en la figura 24 D, que la transición comienza a una temperatura menor que para EcFtsZ, lo que es razonable considerando la alta concentración de GdmCl utilizada. No se detectó agregación de la muestra, sin embargo, al repetir el experimento con la misma muestra no se observó reversibilidad, pues se produjo agregación y precipitación en la muestra a partir de los 75 °C. Por esto la deconvolución se hizo con los datos del primer experimento de la misma forma que en EcFtsZ y se muestra en la figura 26. La deconvolución mostró la presencia de más de una transición durante la absorción de calor, de manera similar a lo observado con EcFtsZ.

Las curvas de desnaturalación por temperatura muestran en general una transición similar para EcFtsZ y MjFtsZ, caracterizadas por un bajo grado de cooperatividad, que se comprueba por la diferencia observada entre los valores de entalpía experimental y teórica calculados para el desplegamiento de ambas proteínas (Tabla 10, Apéndice II), y la presencia de intermediarios de plegamiento bajo las condiciones experimentales utilizadas.



**Figura 26. Termograma de desplegamiento de MjFtsZ.** La muestra en una solución de Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 se desgaseó por 45 min antes de cargar en el microcalorímetro. La velocidad de muestreo fue de 1 °C/min. Se muestra la capacidad calorífica normalizada por la concentración de proteína (25  $\mu$ M) y por la temperatura. Los datos experimentales se ajustaron para obtener la mejor curva experimental, y se obtuvo una deconvolución de la curva experimental. Los puntos negros continuos corresponden a la sustracción de la curva experimental y la línea base. La línea negra discontinua corresponde al ajuste de los datos experimentales. Las líneas rojas corresponden a la deconvolución de los datos en transiciones de dos estados

**Tabla 10.** Entalpía del desplegamiento por temperatura de MjFtsZ y EcFtsZ <sup>a</sup>.

	$\Delta H_{\text{cal}}$ (kcal/mol)	$\Delta H_{\text{van't Off}}$ (kcal/mol)
EcFtsZ	1140	197
MjFtsZ	867	203

<sup>a</sup> Las entalpías calorimétricas ( $\Delta H_{\text{cal}}$ ) y teóricas ( $\Delta H_{\text{van't Off}}$ ) fueron calculadas a partir de las curvas experimentales y sus ajustes respectivamente, mostrados en las figuras 25 y 26 (Ver Apéndice II).

## DISCUSION

**Diseño de Mutantes.** El diseño de mutantes puntuales de triptófano consideró aspectos estructurales y evolutivos. El criterio principal fue el diseño de mutaciones que no afectaran en lo posible las propiedades estructurales y funcionales de la EcFtsZ. Se reportó en la literatura, numerosos trabajos en los cuales se diseñó y construyó mutantes puntuales con la idea de no perturbar las características de las proteínas silvestres. La mayoría de estas mutaciones son conservadas, es decir implican un cambio en el cual se mantiene las propiedades fisicoquímicas del residuo a cambiar, esto incluye su hidrofobicidad, el volumen hidrodinámico y radio de Van der Waals, y las propiedades electrostáticas, entre otras. Este fue el criterio basal que se utilizó en este trabajo en la mayoría de las mutaciones por triptófano. Además, se realizó consideraciones a través de análisis de secuencias para determinar el grado de conservación evolutivo de los residuos candidatos a ser mutados. Como resultado se construyó 6 mutantes de triptófano, 3 en el dominio amino y 3 en el dominio carboxilo.

EcFtsZ es considerada una proteína altamente conservada que se encuentra presente en la gran mayoría de los microorganismos, e incluso en eucariontes en algunos sistemas de origen bacteriano como cloroplastos y mitocondrias (Gilson y col., 2003; Kiefel y col., 2004). Esto fue confirmado al encontrar un alto número de secuencias con un porcentaje de identidad mayor o igual al 40% en la alineación múltiple de secuencias de FtsZ. Este porcentaje es suficiente para clasificar a estas proteínas como estructuralmente homólogas entre sí. La mayoría de los residuos posicionados en zonas cercanas al núcleo de la EcFtsZ o en él mismo mostraron alta

conservación, al igual que aquellos situados en zonas asociadas a la unión e hidrólisis del nucleótido.

Los modelos construidos en este trabajo de EcFtsZ silvestre y de cada una de las mutantes mostraron un alto grado de confiabilidad, pues fueron muy similares a la estructura cristalina de MjFtsZ, utilizada como molde, en cuanto a las características de la estructura secundaria y al tipo de plegamiento presente en cada dominio.

La mayoría de los residuos de fenilalanina, esto es alrededor de un 75%, poseían porcentajes de ASA bastante bajos (menores al 40 %), probablemente debido a su carácter hidrófobo. La ausencia de impedimentos estéricos asociados a la introducción de triptófanos en los modelos generados se debe al volumen similar que ocupa la cadena aromática de ambos residuos. Estos dos parámetros, sumado al grado de conservación evolutiva de cada posición fueron los factores principales para escoger el sitio de la mutación. De las mutaciones escogidas, F40W fue la que mostró mejores cualidades debido a que evolutivamente existe en esa posición un alto número de triptófanos, considerando la baja abundancia de este residuo, además de estar situada en una zona de muy baja accesibilidad al solvente.

**Construcción y purificación de EcFtsZ silvestre y las mutantes.** Los ensayos de mutagénesis realizados en este trabajo, tuvieron una buena eficiencia debido al uso de un "kit" comercial que utiliza una DNA polimerasa de alta procesividad y fidelidad, además de una alta eficiencia de transformación. Prácticamente todos los clones seleccionados para secuenciar poseían la mutación deseada y no presentaron ningún cambio en el resto de la secuencia. Los mayores inconvenientes surgieron en el paso de optimización, pues en esa etapa las características de los partidores (tamaño y porcentaje de bases CG) influyen considerablemente. En algunos casos fue necesario

aumentar la estrictez del sistema en la reacción de PCR, ya sea incrementando la temperatura de hibridación con el molde o variando la concentración de los partidores, ambas estrategias con la idea de evitar la reacción complementaria entre partidores. La optimización de estos dos factores resolvió el problema de la ausencia de productos de PCR en ciertos casos (mutación F275W e I294W).

En los experimentos de sobre-expresión, las proteínas mutantes que presentan problemas de agregación o alteraciones importantes en la estructura generalmente conllevan niveles de sobre-expresión menores que su contraparte silvestre o en un caso más extremo llegan a ser expresadas como cuerpos de inclusión. Todas las mutantes se expresaron de manera soluble, lo que indica la ausencia de problemas serios en su estructura y plegamiento. Las diferencias se notaron en los niveles de expresión. Los menores niveles se obtuvieron con la mutante I294W y F275A/I294W, mientras que las otras mutaciones presentaron niveles similares a EcFtsZ silvestre. La presencia de niveles comparativamente bajos de sobre-expresión sugieren alguna deficiencia asociada a su funcionalidad y no a su estructura, debido a su expresión en forma soluble, ya que además este efecto fue similar en todos los clones seleccionados para esas mutantes. En algunos casos se observó filamentos a simple vista en los medios de cultivo sobre-expresados, un indicativo de alteraciones en la división celular, lo que puede estar asociado al exceso de moléculas de FtsZ silvestre o mutantes, ya que aquellos cultivos presentaron en general altas cantidades de proteína durante las purificaciones.

La purificación de EcFtsZ silvestre se caracterizó por poseer alto rendimiento en general, asociado al alto nivel de sobre-expresión. Todos los mutantes a excepción de I294W y F257A/I294W presentaron niveles similares a los de EcFtsZ silvestre, lo que se correlaciona también con los niveles de sobre-expresión obtenidos. La

polimerización de EcFtsZ inducida por glutamato es reversible (los filamentos formados se despolimerizan fácilmente cambiando por ejemplo la temperatura) y en gran parte los precipitados solubilizan fácilmente. Este paso de purificación permitió aumentar la actividad específica de las muestras luego de la etapa de cromatografía de intercambio iónico. Se concentraron las muestras finales lo más posible (entre 0,3 y 0,4 mM) sin presentar agregación producto de la concentración, lo que demuestra la alta solubilidad de la EcFtsZ.

## CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL Y ESTRUCTURAL

**Funcionalidad.** Se utilizó el mismo método de purificación para EcFtsZ silvestre y para las mutantes y se analizó la polimerización y la actividad GTPásica de cada una de ellas en las mismas condiciones experimentales. EcFtsZ silvestre presentó un comportamiento similar al de la proteína purificada por el método tradicional de precipitación por calcio (Beuria y col., 2003), por lo que constituye un buen control para las mutantes.

En la evaluación de la viabilidad de las células que no expresan FtsZ silvestre en condiciones restrictivas, el hecho de complementar esta carencia con las proteínas mutantes permitió establecer el efecto *in vivo* de ésta sobre la estructura nativa o función de FtsZ. Así, niveles muy bajos de complementación indicarían de manera indirecta una alteración importante de la estructura de FtsZ, sin embargo, resultados intermedios no permiten una evaluación directa, razón por la cual fue necesario evaluar la funcionalidad *in vitro*. Las mutaciones Y222W e I294W mostraron niveles de sobrevivencia muy bajos respecto de EcFtsZ silvestre, a diferencia de las demás mutantes. Este resultado indica que el residuo tirosina 222 y la isoleucina 294 y

probablemente el ambiente que rodea a cada uno son esenciales para mantener una estructura funcional de la proteína.

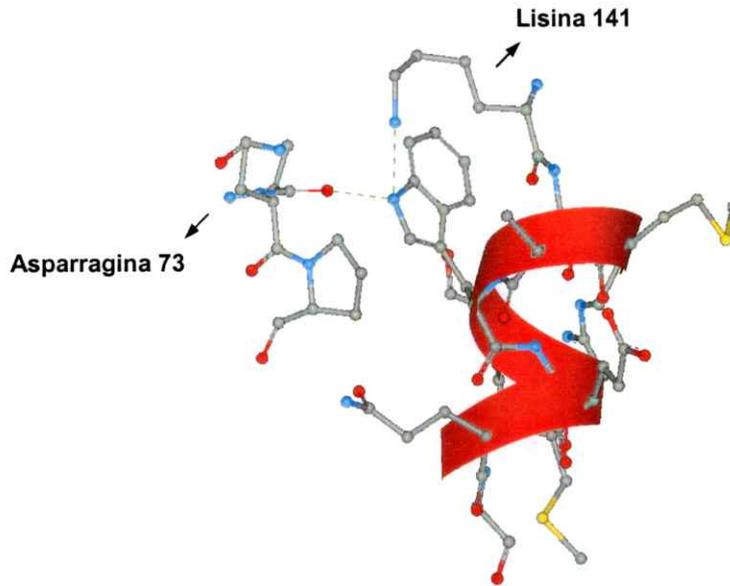
En la caracterización funcional *in vitro* se observó una correlación entre la polimerización y la actividad GTPásica. Aquellos mutantes que polimerizaron y presentaron tiempos más largos en la condición de estado estacionario, mostraron también una disminución en la actividad GTPásica.

La mutación F40W del dominio amino mostró una funcionalidad muy parecida a la de EcFtsZ silvestre en cuanto a la complementación *in vivo*, la polimerización y la actividad GTPásica. Esto refleja que la mutación de una fenilalanina por un triptofano (el cual aparece en el mismo lugar en varias otras secuencias de FtsZ) no altera significativamente la función, hecho que debiera ser considerado cuando se escoge un lugar para una mutación. Da fuerza a esta proposición el hecho que, el residuo de fenilalanina ubicado inmediatamente al lado no muestra una substitución por triptófano en las secuencias analizadas. El cambio de un residuo hidrófobo por otro, como fenilalanina por triptofano, no debiera afectar la zona donde estos aminoácidos se encuentran, cuando el ambiente que los rodea es altamente hidrófobo y los problemas estéricos asociados a la substitución son menores. Todo lo anterior sustenta lo observado experimentalmente en cuanto a la funcionalidad de la mutante.

La actividad GTPásica de la mutante F135W *in vitro* fue casi normal, sin embargo, la polimerización fue distinta a la de EcFtsZ silvestre y la complementación *in vivo* alcanzó solo a un 50%. Estas diferencias pueden ser explicadas por la cercanía de la zona de la mutación con el bolsillo de unión del nucleótido, pues el anillo indólico del triptófano se encuentra a alrededor de 10 Å de la base nitrogenada del nucleótido. De esta forma, la unión de GTP puede estar afectada y por eso se observa diferencias a nivel de polimerización, mientras que la actividad GTPásica a concentraciones

saturantes no fue muy diferente a la EcFtsZ silvestre porque la mutación se encuentra lejos del fosfato gama del GTP. El análisis de secuencia mostró que había una alta conservación de fenilalanina en esa posición, y se encontró solo un triptófano en las secuencias analizadas, de manera que a pesar del cambio conservado (triptófano por fenilalanina) esa zona puede ser especialmente sensible a cualquier mutación.

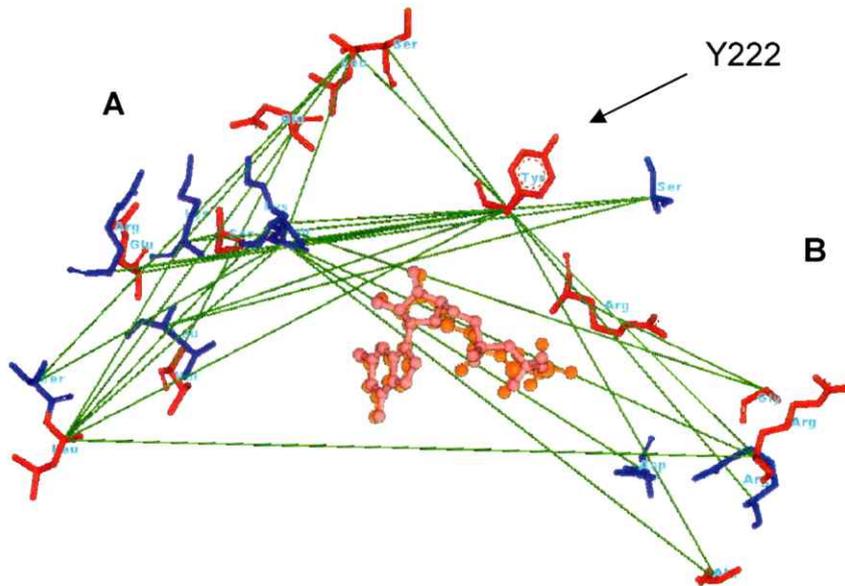
La mutante F145W polimerizó y la velocidad de despolimerización fue mucho más lenta que la EcFtsZ silvestre, lo que se correlaciona muy bien con la disminución observada en la actividad GTPásica. El análisis de secuencia mostró una alta variabilidad de residuos para esa posición y en ninguna de ellas se encontró un triptófano. En el modelo 3D se observó que la posición 145 se encuentra cerca del sitio de unión de GTP, alrededor de 5 Å entre el anillo indólico del triptófano y el fosfato beta del nucleótido. Esto puede explicar el hecho de que se altere en mayor medida la actividad GTPásica que la polimerización. Además, al determinar la presencia de interacciones cercanas a la posición 145, se observa la formación de dos puentes de hidrógeno entre el nitrógeno del anillo indólico de W145, el oxígeno de la asparragina 73 (situada en el lazo opuesto a la hélice alfa) y el nitrógeno de la lisina 141 (ubicada en la misma hélice alfa donde se ubica el triptófano) (ver figura 27). Estas interacciones podrían alterar la dinámica propia del sitio del nucleótido en la zona más cercana a la hidrólisis del fosfato gama por un aumento en la rigidez de la región, sobretodo debido a que uno de los puentes de hidrógeno se produce entre dos regiones lejanas en la secuencia, particularmente el caso de N73, que se ubica en el lazo T3 (Fig. 27), el cual ha sido definido como un elemento estructural clave del dominio amino en cuanto a los cambios conformacionales producidos por la hidrólisis de GTP (Diaz y col., 2001).



**Figura 27. Zona aledaña al triptófano 145.** Se muestra los residuos ubicados a 6 Å del centro de masa del anillo indol del triptófano 145 en el modelo 3D de la mutante F145W. Se muestra los residuos coloreados de acuerdo a su carga (color rojo para cargas negativas, azul para cargas positivas y gris para átomos sin carga). En cinta roja se muestra la hélice alfa que contiene al W145. La línea verde punteada indica los puentes de hidrógeno que se forman entre los átomos conectados.

La mutante Y222W del dominio carboxilo mostró un bajo nivel de sobrevivencia *in vivo*. La polimerización presentó un aumento en la dispersión de luz respecto a EcFtsZ silvestre a la misma concentración y en las mismas condiciones experimentales con una despolimerización muy lenta, lo que se correlaciona bien con su baja actividad GTPásica. Esto sugiere que los polímeros que se forman permanecen por tiempos más largos debido a que el estado estacionario se hace más estable como consecuencia de la disminución de la actividad GTPásica. Esta estabilidad podría estar asociada a la formación de manojos de filamentos más gruesos al favorecer la mutación las interacciones laterales entre polímeros. Este fenómeno se describió con inductores de la polimerización de FtsZ como calcio (Yu y

Margolin 1997; Lowe y Amos 1999) o glutamato (Beuria y col., 2003), donde se observa redes de filamentos mucho más densas y que afectan la actividad GTPásica. Una disminución de la actividad GTPásica puede explicarse por una alteración del sitio de unión del nucleótido que afecta la catálisis o por un impedimento de la correcta interacción del aspártico 212 del bucle T7 del monómero vecino. Otra posibilidad es que el cambio conformacional inducido por la hidrólisis del fosfato gama de GTP se encuentre impedido. La posición de la Y222 está lejos del sitio de GTP y de la interfase entre los monómeros de FtsZ del protofilamento, por lo tanto es probable que el cambio conformacional se encuentre alterado favoreciendo en este caso las interacciones laterales entre filamentos (tomando como referencia que las interacciones longitudinales entre monómeros de EcFtsZ siguen aproximadamente la dirección longitudinal de la hélice que conecta los dos dominios y que se indica en la Fig. 4). Para estudiar esta posibilidad, en el laboratorio Andrea Garcés hizo un análisis de *mutaciones correlacionadas*, donde analizó la relación evolutiva que existe entre los residuos de superficie y mediante una alineación de secuencias localizó otras posiciones de aminoácidos donde se produjo un cambio en forma simultánea al de la mutación analizada. Se determinó que existe una correlación entre dos zonas laterales opuestas del monómero de EcFtsZ, que estarían implicadas en interacciones laterales entre polímeros. Se observa en la figura 28 que la tirosina 222 forma parte de un eje central de correlación que conecta una zona lateral con la otra.



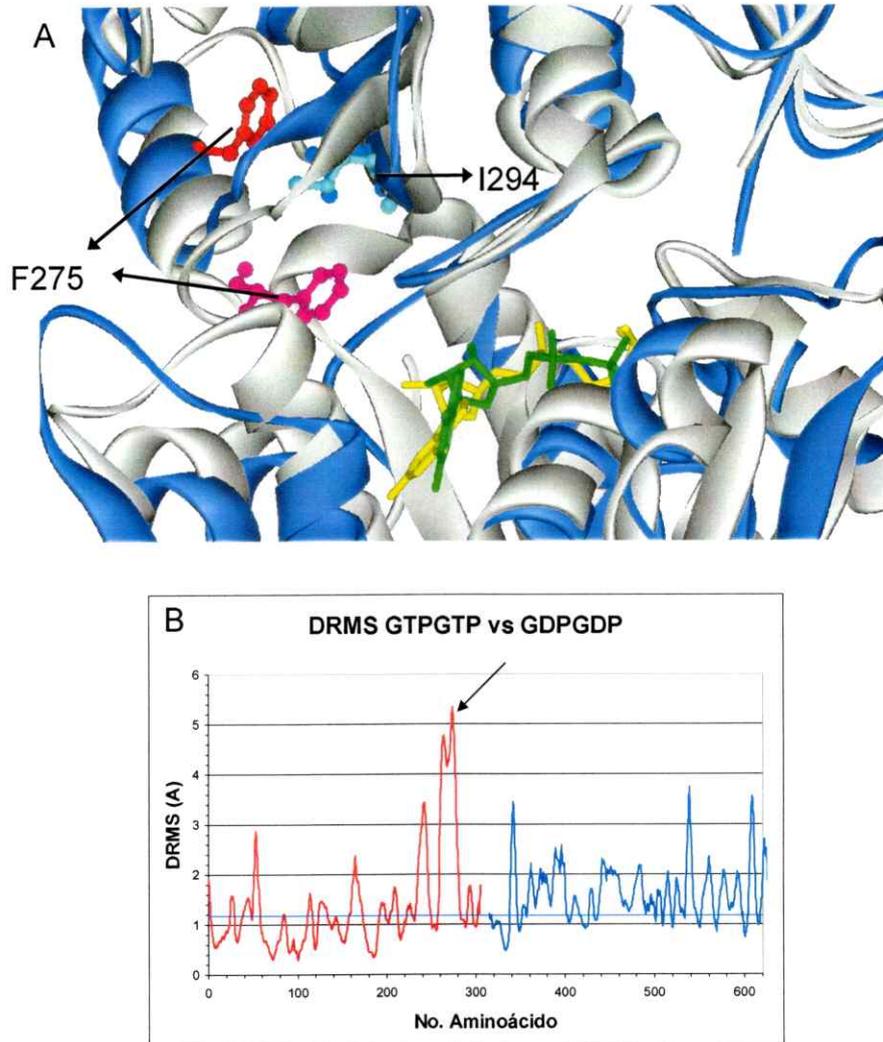
**Figura 28. Análisis de las mutaciones correlacionadas en EcFtsZ.** Desde una perspectiva transversal se muestra los residuos de superficie situados en las dos caras laterales de un monómero de EcFtsZ indicadas por A y B. Los residuos que tienen correlación evolutiva se muestra en rojo y los que presentan una conservación de un 50% en las secuencias en violeta, la correlación se indica con líneas verdes. Se muestra en rojo las estructuras sobrepuestas de GDP y GTP. La flecha indica la ubicación de la tirosina 222 que aparece como eje central en la red de correlaciones (Fuente: Tesis en curso de Andrea Garcés).

La red de correlaciones evolutivas de la figura 28 muestra que la tirosina 222 sería el eje central entre los dos grupos de residuos, de ambas caras del monómero, que estarían participando en las interacciones laterales de EcFtsZ. Al analizar la frecuencia de los residuos en la posición 222 se observa una alta variabilidad, que estaría asociada a los cambios correlacionados ya mencionados (ver Tabla 4). Sin embargo, en esta zona existe un bajo número de fenilalaninas y ningún triptófano en comparación con la frecuencia de tirosinas y de otros residuos, probablemente debido

a la hidrofobicidad de sus anillos aromáticos. De hecho, el mayor porcentaje de aminoácidos corresponde a residuos cargados positivamente (alrededor de un 49%). Los resultados en su conjunto sugieren que la posición 222 estaría participando en la conexión funcional entre las caras laterales de la EcFtsZ (interacciones laterales entre el dominio amino y carboxilo de monómeros difentes). Por esto, una mutación en esta posición debiera alterar las interacciones laterales entre filamentos de EcFtsZ.

La mutación que presentó mayores alteraciones en la funcionalidad respecto de EcFtsZ silvestre fue I294W. La isoleucina 294 se encuentra prácticamente en el mismo lugar que la fenilalanina 275, sin embargo la mutante F275W fue capaz de polimerizar, presentó actividad GTPásica y complementó *in vivo* en un 100%. Para explicar el efecto de la mutante I294W analizaremos el grado de conservación de este residuo. De hecho ambos presentan diferencias en hidrofobicidad y en su volumen hidrodinámico. Los análisis de secuencia indicaron que no pueden existir simultáneamente dos residuos aromáticos en las posiciones 275 y 294, lo que ayuda a explicar el efecto de la mutante I294W. El sitio de la mutación en MjFtsZ W319Y, se encuentra ubicado en la misma región estructural que la posición 294, y esta mutante mostró una inactivación de la actividad GTPásica comparada con MjFtsZ silvestre (Oliva y col., 2003), lo que sugiere que esta zona está relacionada con la función de FtsZ.

Se analizó desde un punto de vista estructural el efecto de la mutación I294W. Con este propósito se utilizó dos modelos 3D de EcFtsZ construidos en el laboratorio, que corresponden a dos estados diméricos que tienen unido GTP y GDP. A partir de estos modelos, se analizó el efecto de la mutación sobre el cambio conformacional entre los estados GDP y GTP (proteína EcFtsZ silvestre en estado dimérico unida a GDP o GTP respectivamente) (Fig. 29).



**Figura 29. Cambios conformacionales asociados a la hidrólisis del GTP. A.** EcFtsZ en estado dimérico. Se realizó una alineación estructural entre el modelo dimérico de EcFtsZ silvestre unido a GTP (estado GTP-GTP, color azul) y el modelo dimérico de EcFtsZ unido a GDP (estado GDP-GDP, color gris). En la figura se muestra la interfase longitudinal entre los monómeros que conforman ambos dímeros. Las flechas indican la posición de los residuos F275 en el dímero GDP-GDP (rojo) y en el dímero GTP-GTP (rosa) y la posición del residuo I294 en el dímero GDP-GDP (azul) y en el dímero GTP-GTP (calipso). **B.** Gráfico de DRMS por aminoácido construido a partir de la alineación estructural mencionada en A. La flecha indica la región ubicada en la interfase del dímero que posee un mayor valor de DRMS (Fuente: Tesis en curso de Andrea Garcés).

En la figura 29 se observa que la región que va desde la posición 260 hasta la 290 es la que sufre los mayores cambios conformacionales en función del tipo de nucleótido unido (GTP o GDP), y alcanza un valor máximo de DRMS de 5,3 Å (Fig. 29 B). Se observa en la figura 29 A que la posición de la fenilalanina 275 depende del estado de fosforilación del nucleótido y que este residuo se encuentra en una región de máxima variación, muy cercano al pico máximo que aparece en la figura 29 B. Por lo tanto a partir de este análisis propusimos que si el cambio de la isoleucina 294 por un triptofano lleva a una interacción aromática de este residuo con el de la fenilalanina 275 debiera producirse una restricción del movimiento de este residuo y afectar la actividad GTPásica. Para dilucidar esta proposición se diseñó y construyó la doble mutante F275A/I294W, que revirtió parcialmente el efecto de la mutación I294W sobre la viabilidad y la actividad GTPásica pero no tuvo efecto sobre la polimerización. Este resultado confirma la hipótesis respecto a la actividad GTPásica pero no da cuenta del efecto sobre la polimerización.

La normalidad observada para la mutante F275W puede entenderse por la ubicación y libertad de movimiento del residuo F275 en la región antes mencionada. Así, aunque esta mutación se encuentra situada a sólo 4 Å de la I294, fue capaz de polimerizar y presentó una actividad GTPásica prácticamente normal y complementó en un 100%. Esto se debe probablemente a la similitud de las propiedades fisicoquímicas entre la fenilalanina y el triptófano y al espacio adecuado para el movimiento de la fenilalanina que permite el movimiento del triptofano. No tenemos una explicación clara para el efecto de esta mutación sobre la polimerización, en especial sobre la concentración crítica.

**Estructura secundaria.** La caracterización de la estructura secundaria de las mutantes F135W e I294W respecto de EcFtsZ demostró que las propiedades estructurales y de estabilidad observadas con EcFtsZ silvestre no se afectaron por la mutación. El desplegamiento al equilibrio fue similar para ambas mutantes respecto de la EcFtsZ silvestre. Esto sugiere que las alteraciones de la función están asociadas a modificaciones locales ya sea de la estructura o de la dinámica de la proteína. La posición 135 se encuentra lejos del núcleo hidrófobo de la proteína (posee un ASA relativamente alto, Tabla 3) y no sería importante para la estabilidad, como se demostró parcialmente con los resultados obtenidos con la mutante F135W. La conservación de la secuencia podría estar más bien relacionada con aspectos funcionales.

**Liberación del nucleótido durante la desnaturación.** La liberación del nucleótido (GDP) desde EcFtsZ ocurre entre 0 y 1 M de GdmCl durante la desnaturación, etapa que coincide con la primera fase de pérdida de la estructura secundaria seguida por dicroísmo circular (Fig. 14 B). Estos resultados sugieren que la liberación del nucleótido durante la desnaturación podría estar asociada a un cambio en la estructura secundaria del dominio amino en una zona cercana al sitio de unión o responsable del cambio conformacional. Los cambios de estructura secundaria reflejan la importancia estructural de GDP, sin embargo no se puede establecer si su liberación de EcFtsZ se debe principalmente a las propiedades salinas de GdmCl que afectarían la constante de unión, y que trae como consecuencia las modificaciones estructurales, o son estas modificaciones propias de la acción desnaturante de GdmCl las que originan la salida. En cualquier caso, los resultados demuestran la fuerza de la unión de GDP a FtsZ. Es posible que el nucleótido estabilice adicionalmente el dominio amino de plegamiento Rossmann a través de la unión a EcFtsZ. Los resultados de desnaturación seguida por

CD y la liberación de GDP coinciden con lo reportado previamente (Andreu y col., 2002).

**Fluorescencia.** Las propiedades de los espectros de emisión de las mutantes, particularmente las intensidades máximas y los valores de energía asociados al máximo de emisión, mostraron una buena relación general con las propiedades fisicoquímicas determinadas para el triptófano y su ambiente en los modelos 3D de cada mutante. Se observó que en general aquellos residuos ocultos al solvente ( $\leq 10\%$  de ASA) poseían máximos de emisión mayores que aquellos con un ocultamiento parcial (10%-50%). En el caso de las intensidades máximas, hubo una mayor variación, pues esta propiedad depende no sólo del tipo de residuos cercanos (cargados, polares o apolares) sino también de su cercanía con el triptófano. Debido a que la mayoría de los triptófanos se ubicaban de acuerdo a los modelos en zonas de alta hidrofobicidad (residuos ocultos), las intensidades dependen más bien de las propiedades fisicoquímicas de los residuos vecinos y de su cercanía.

## PLEGAMIENTO

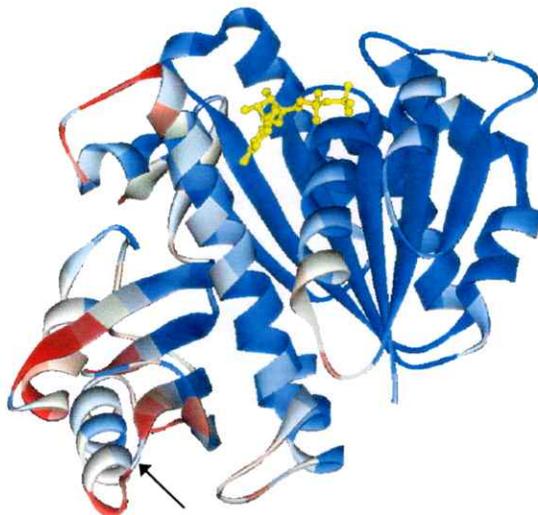
**Fluorescencia.** Los experimentos de desnaturación y renaturación mostraron transiciones diferentes con cada sonda utilizada (W40, W135, W275, W294). Mientras con los mutantes F135W e I294W se obtuvo transiciones más semejantes a un proceso de dos estados, con los otros mutantes se observó menos cooperatividad durante las transiciones. Los mutantes F135W e I294W fueron caracterizados por dicroísmo circular, con lo cual se demostró que las propiedades estructurales y de estabilidad seguidas a partir de los cambios de la estructura secundaria no se vieron afectadas. Por otro lado, los mutantes F40W y F275W fueron los que presentaron

mayor similitud funcional para cada mutante de cada dominio de EcFtsZ, lo que sugiere también que su estructura no se vió alterada de manera importante. Esto conduce a la idea de que las diferencias observadas en las transiciones asociadas al desplegamiento y replegamiento se deben principalmente a la ubicación estructural de las sondas en la EcFtsZ y a la sensibilidad de sus propiedades espectrales.

En el dominio amino, el triptófano W40 se ubica distante de W135, en una zona mucho más densa de residuos y mucho más oculta. Estas características generan una mayor sensibilidad del W40 en cuanto a las alteraciones de las propiedades espectrales durante el desplegamiento. Si bien la transición total ocurre en un intervalo muy similar al intervalo observado con el W135, las curvas fueron mucho menos cooperativas. De hecho, se detectó claramente un intermediario de plegamiento que se forma alrededor de 1 M de GdmCl, caracterizado por intensidades y sobre todo energías de emisión definidas. Debido a que el ambiente de W40 es principalmente apolar, la formación de esta zona intermedia no se debe a residuos cargados o polares que se posicionan cerca de la sonda durante el desplegamiento, sino más bien posee características de intermediario estable. El hecho de que el corrimiento del máximo (energía de emisión) de la mutante W40 se mantenga más estable que la intensidad durante la región intermedia, indica que la penetración del solvente no varía significativamente en ese tramo, y la intensidad se ve mayormente afectada debido al distanciamiento de un residuo apagador que se aleja al iniciarse la desnaturación de la EcFtsZ cuando se aumenta la concentración del agente desnaturante, o debido a un cambio en la flexibilidad del entorno.

En el dominio carboxilo, la cadena lateral de los triptófanos (W275 y W294) se ubica en la misma región estructural, aunque provienen de elementos de estructura secundaria distintos, hélice alfa y hebra beta, respectivamente. La transición observada

con el mutante I294W es de tipo cooperativa, muy similar a la obtenida con la mutante F135W. De manera similar a lo ocurrido con las sondas del dominio amino, la conducta de desplegamiento y replegamiento fue similar entre ambas mutantes, sin embargo se observó la formación de un intermediario hiperfluorescente con la mutante W275. Este tipo de transiciones ha sido clásicamente asociada con intermediarios estables de plegamiento (Missiakas y col., 1990) o al alejamiento de un grupo apagador. Sin embargo, un trabajo publicado recientemente (Osvath y col., 2005) demostró que la hiperfluorescencia se debe a variaciones significativas de la flexibilidad estructural local en la región en que se encuentra la sonda, y en ciertos casos no estaría asociada a intermediarios sino a incrementos de la flexibilidad conformacional de esa región en estados de pre-transición (antes de la desnaturación). En ambos casos, se requiere que la región posea la flexibilidad necesaria para que se produzca el fenómeno. Al analizar la posición 275 (Fig. 29), se observó que el intercambio del nucleótido, GDP por GTP o viceversa en EcFtsZ está asociado a cambios conformacionales que producen la mayor variación estructural, lo que indica que esa región es flexible. Para profundizar más este punto, se analizó el cristal de MjFtsZ desde el punto de vista de la flexibilidad.



**Figura 30. Análisis de la flexibilidad de la estructura de MjFtsZ.** La flexibilidad de MjFtsZ se midió en función de los valores de *B-factor* normalizados obtenidos a partir de la estructura cristalina 1FSZ. Se muestra las zonas flexibles en color rojo, y las zonas rígidas en color azul. La flecha indica la región equivalente a la posición 275 en EcFtsZ (Fuente: Tesis en curso de Andrea Garcés).

La figura 30 muestra la flexibilidad relativa (flexibilidad de zonas más rígidas/ flexibilidad de zonas menos rígidas) de MjFtsZ en función de los valores de B-factor, que se relacionan con el grado de movimiento de regiones específicas en función de la temperatura (obtenidos a partir de los datos de la determinación de estructura por Rayos X). Se observa que el dominio amino es más rígido que el dominio carboxilo. La zona en MjFtsZ equivalente a la posición 275 en EcFtsZ no es rígida en comparación con el resto de la proteína, aunque no presenta una flexibilidad mayor al promedio general, quizás debido a que esa posición se encuentra en una hélice alfa, cuya estructuración particular se estabiliza y rigidiza por puentes de hidrógeno. Sin embargo, al observar la figura 29 A se observa que esta región pierde su estructura y adquiere forma de lazo al pasar del estado GDP a GTP en el dímero, lo que indica que la posición terminal de esa hélice es propensa a perder estructura (pasar de hélice alfa a

lazo) cuando experimenta cambios conformacionales significativos, como los que ocurren al unir GTP e hidrolizarlo (Fig. 29 A), o durante el proceso de desnaturación.

El hecho que la hiperfluorescencia detectada con la mutante F275W no se observe con el mutante I294W a pesar de estar situados muy cerca el uno del otro, sugiere que ese fenómeno corresponde más bien a un incremento de la flexibilidad pre-transicional que a la presencia de un intermediario estable de plegamiento.

Los valores de energía libre de desplegamiento calculados a partir de las curvas de desnaturación y renaturación obtenidas con los mutantes F135W e I294W se encuentran dentro de los intervalos reportados para proteínas de tamaño similar (Santoro y Bolen 1988). La similitud de los valores obtenidos con ambas mutantes indica que un proceso termodinámico único se observa con ambas sondas a pesar de estar situadas en diferentes dominios. Por otra parte, el valor determinado para el energía libre de desplegamiento al equilibrio de MjFtsZ (Andreu y col., 2002) a partir de CD es aproximadamente el doble que el estimado para EcFtsZ (valor estimado a través fluorescencia en esta tesis), lo cual está de acuerdo con las diferencias de estabilidad (en función de la energía libre o  $[GdmCl]_{50\%}$ ) que se esperaría entre proteínas mesófilas y termófilas.

**Microcalorimetría.** Los procesos de absorción continua de calor observados inicialmente en los experimentos de desplegamiento por temperatura, sugieren la presencia de fenómenos de agregación de FtsZ dependientes de la temperatura. La agregación suele ocurrir sobretodo en proteínas de tamaño medio o mayores (>20kDa), como es el caso de FtsZ (40 kDa). Se suele vincular la aparición de eventos de agregación con la formación de intermediarios estables, que exponen parcialmente zonas hidrofóbicas que interactúan con las mismas zonas hidrofóbicas de otras moléculas (Blaber y col., 1999). La formación de estos intermediarios de

desplegamiento puede surgir como consecuencia de la cinética del proceso (intermediarios cinéticos) o por la presencia de mínimos locales termodinámicos (intermediarios en el equilibrio).

Como agente desnaturante, GdmCl se considera generalmente como un estabilizador del estado desnaturado de proteínas, sin embargo, este concepto debe ser más ampliamente aplicado, pues el intervalo de acción de GdmCl incluye la estabilización de zonas hidrofóbicas de la proteína expuestas total (estado desnaturado) o parcialmente (intermediarios o la desnaturación parcial de la proteína). Esto implica que a bajas concentraciones, GdmCl puede estabilizar estados intermediarios en el proceso de desplegamiento de una proteína. Así, en los experimentos de desnaturación térmica de EcFtsZ y MjFtsZ se observó transiciones de estado al utilizar concentraciones más bajas que las requeridas para iniciar el desplegamiento de la estructura secundaria de la proteína. En ambos casos se observó la presencia de transiciones muy poco cooperativas, caracterizadas por una gran absorción de calor con elevados valores de entalpía. Esto sugiere la presencia de estados intermedios durante el proceso, que son capaces de ser estabilizados por GdmCl y adicionalmente evitar la interacción entre intermediarios (protegería de la interacción con las mismas zonas de otras moléculas). Sin embargo, a altas temperaturas también se ve afectados los procesos de estabilización, y la agregación aparece entonces a partir de los 60 °C para EcFtsZ en presencia de 0,7 M de GdmCl. La transición de MjFtsZ comenzó a una temperatura menor que para EcFtsZ, pues se usó una concentración mayor de GdmCl (2,0 M), lo que aumenta la probabilidad de desnaturación de la proteína, y que además permitió evitar la agregación de MjFtsZ en la zona de los 60 °C, justo después de la transición. Al enfriar y hacer un segundo barrido de la misma muestra aumentando la temperatura igual que en el primer barrido no se observó la transición y hubo alguna

agregación a altas temperaturas. Esto sugiere directamente que el proceso de desplegamiento por temperatura de MjFtsZ es irreversible, pues la proteína es incapaz de volver al estado inicial (el estado nativo) al enfriar el sistema hacia la temperatura de partida, aún a una concentración de GdmCl de 2,0 M, que impide fuertemente la interacción entre moléculas en estados intermedios o desplegados de MjFtsZ. La irreversibilidad observada en ambos casos (MjFtsZ y EcFtsZ) puede estar asociada al tamaño de las proteínas (40 kDa) y a la presencia de dos dominios en su estructura. El caso reportado anteriormente (Blaber y col., 1999) correspondía a una proteína más pequeña que FtsZ (19 kDa), lo que disminuye la probabilidad de interacciones inespecíficas que conducen a la agregación.

### **Modelo de plegamiento**

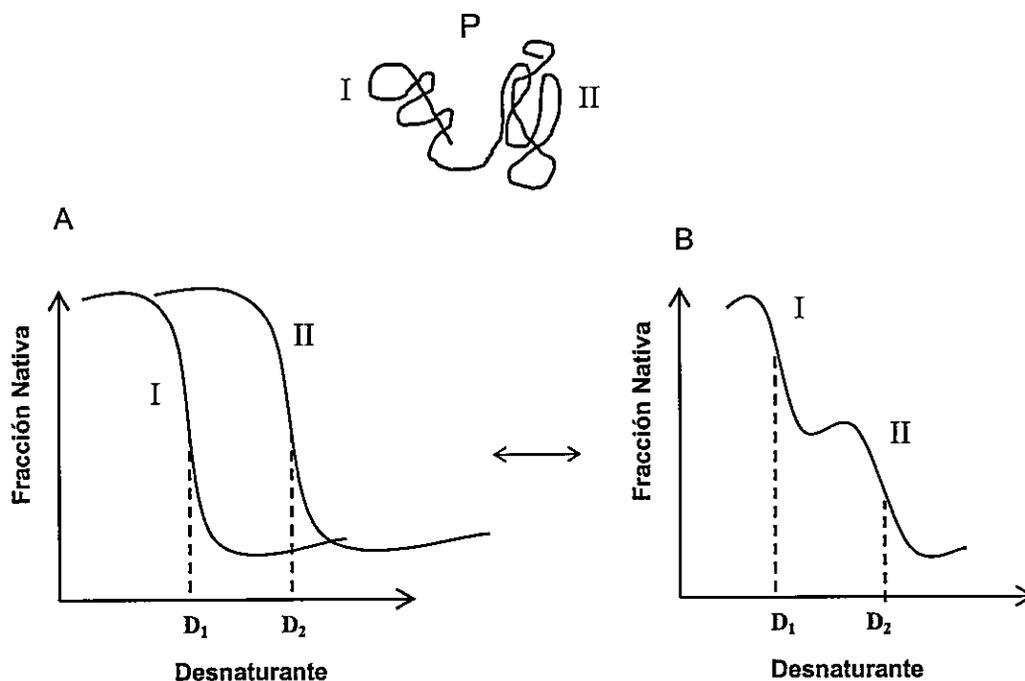
El proceso de plegamiento de una proteína está determinado esencialmente por su secuencia. Las proteínas de tamaño pequeño (menor a 20 kDa) generalmente presentan un plegamiento cooperativo, caracterizado por una sola transición que ocurre de manera pronunciada y separa dos estados termodinámicamente estables, el estado nativo y el estado desnaturado. Estas proteínas poseen en la mayoría de los casos solo un dominio o unidad cooperativa. Aquellas proteínas de dos o más dominios presentan procesos de plegamiento más complejos (con más de una transición), con la formación a menudo de intermediarios. Una de las proteínas de dos dominios más estudiadas es la *fosfoglicerato kinasa* (PGK) (Missiakas y col., 1990; Zaiss y Jaenicke 1999; Bentahir y col., 2000). Esta proteína posee un dominio amino y un dominio carboxilo, este último de plegamiento de tipo Rossmann es capaz de unir el nucleótido. Se reportó en varios trabajos la presencia de intermediarios de plegamiento asociado a este dominio. De hecho, se postuló recientemente que el replegamiento del dominio

amino está dirigido por el dominio carboxilo, y que las interacciones inter-dominio juegan un rol fundamental durante el plegamiento de la proteína (Osvath y col., 2005).

El caso de EcFtsZ es similar, pues esta proteína es de dos dominios, uno de los cuales posee dos motivos de plegamiento Rossmann unidos. Sin embargo, la interfase entre ambos dominios es mucho más extensa e hidrofóbica que en el caso de PGK. Esto causa que la separación espacial de ambos dominios no sea completa. De hecho existe una hélice alfa que va de un dominio a otro generando una conexión estructural aún más evidente (Fig. 4).

El desplegamiento y replegamiento de EcFtsZ y las mutantes analizado en este trabajo por dicroísmo circular, fluorescencia y microcalorimetría diferencial, indican que el proceso general de plegamiento se aleja de la cooperatividad, y existiría más de una transición. Los resultados de microcalorimetría indican la presencia de intermediarios de plegamiento, al igual que por la fluorescencia intrínseca de un triptofano localizado en el dominio amino (que posee motivos estructurales de tipo Rossmann). Además, por dicroísmo circular se observó la presencia de dos transiciones durante el proceso (Fig. 14). Sin embargo, dos de las mutantes (F135W e I294W) presentaron curvas de desplegamiento seguidas por fluorescencia mucho más cooperativas que los curvas obtenidas con los demás mutantes, con características termodinámicas similares, a pesar que por dicroísmo circular se observó dos transiciones similares a EcFtsZ silvestre. Los resultados con estas mutantes indican que el plegamiento al equilibrio de EcFtsZ es similar para ambos dominios, y el mismo proceso se observa cuando se analiza la fluorescencia intrínseca de un triptofano ubicado en el dominio amino o en el dominio carboxilo. Sin embargo, ambos dominios son estructuralmente diferentes al analizar los modelos de EcFtsZ y la estructura cristalina de MjFtsZ, de manera que se podría sospechar que el plegamiento de un dominio debiera ser distinto al otro. Una

posible explicación para este fenómeno es que el proceso de plegamiento de un dominio sea dependiente del otro y por lo tanto sus propiedades termodinámicas de plegamiento sean las mismas al determinarlas desde uno u otro dominio. Como se mencionó anteriormente, el plegamiento y la estructura nativa de una proteína están definidos por la secuencia, ésta es responsable de las interacciones fisicoquímicas que estabilizan la estructura terciaria de la proteína, y son estas interacciones las que a su vez determinan las propiedades termodinámicas globales. En otras palabras, la termodinámica y la estabilidad de la proteína están definidas por el conjunto de interacciones propias de la estructura y de la disposición topológica que adquiere cada interacción. De esta forma, la posibilidad de que el plegamiento de dos dominios, estructuralmente diferentes (diferentes topologías) como son el dominio amino y carboxilo de EcFtsZ sean termodinámicamente similares por simple coincidencia es remota. De allí que la idea de que el plegamiento de cada dominio esta determinado en gran medida por la conexión estructural que existe entre ellos sea la hipótesis más plausible. Así, la interfase que se establece entre ambos dominios debiera ser estructuralmente significativa, y lo suficientemente fuerte como para estabilizar ambos dominios, de manera adicional a la estabilidad propia de cada uno. De esta forma, el patrón de desplegamiento y replegamiento similar observado desde cada dominio estaría determinado por las interacciones inter-dominio estabilizarían globalmente la proteína y conducirían al plegamiento de la proteína en su forma nativa.



**Figura 31.** Desplegamiento hipotético de una proteína (P) de dos dominios separados topológicamente (I y II respectivamente). En A se simula el desplegamiento de la proteína seguido desde el dominio I (curva I) o el dominio II (curva II). En B se muestra el desplegamiento de la proteína seguido por una técnica que detecta el cambio en la estructura de ambos dominios en forma simultánea (DC, intercambio de hidrógeno, etc.). La concentración de agente desnaturalante para obtener un 50% de forma nativa se representa como  $D_1$  y  $D_2$  para cada dominio, respectivamente.

En la figura 31 se muestra el desplegamiento hipotético de una proteína de dos dominios que están separados estructural y topológicamente. Ambos dominios presentan tipos de plegamiento distintos, de manera que sus estabildades debieran ser diferentes, lo que se representa a través de los valores medios de transición ( $[D_n]_{50\%}$ )  $D_1$  y  $D_2$ . El dominio I es menos estable que el dominio II (requiere una menor

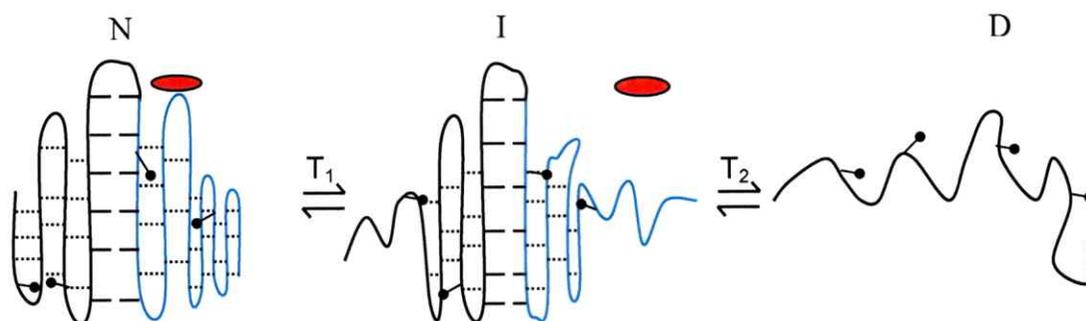
concentración de agente desnaturalante para iniciar el desplegamiento), y por lo tanto presenta un  $D_1$  menor. La curva de desplegamiento de la proteína nativa medida con un método que evalúa en forma simultánea la pérdida de estructura de ambos dominios muestra dos transiciones, una asociada a la desnaturalación del dominio I y la otra a la desnaturalación del dominio II. Esta separación de estabilidades se establece en primer lugar por la diferencia en estructura de ambos dominios, y segundo por que no existe una conexión estructural fuerte entre ellos, que influya sobre sus estabilidades particulares.

El plegamiento en solución de cada dominio de FtsZ de *Thermotoga maritima* expresado por separado y la interacción entre ellos ha sido demostrada experimentalmente (Oliva y col., 2004). Se observó que los dos dominios de FtsZ expresados y purificados en forma separada no mostraron actividad GTPásica, sin embargo al mezclarlos en solución la actividad aumentó considerablemente. La interacción de los dominios de FtsZ explicaría porqué las curvas de desnaturalación de EcFtsZ, seguidas por la fluorescencia de triptófano, se superponen. Los resultados apoyan esta hipótesis, pues en ambos casos, el inicio de la pérdida de estructura secundaria comienza entre 0,6 y 0,7 M de GdmCl. Estos valores coinciden con el máximo del aumento de fluorescencia observado con la mutante F275W, donde se iniciaría la separación de los dominios en la interfase y la pérdida de su estructura.

El modelo propuesto en este trabajo sugiere un proceso de desplegamiento determinado por las interacciones que estabilizan la interfase de ambos dominios, que estabilizarían adicionalmente la estructura propia de cada dominio. Apoyan este modelo los resultados obtenidos con las cuatro sondas de triptófano utilizadas, donde dos mostraron curvas con una cooperatividad similar. La sonda W135 es la más

cercana a la interfase (Fig. 5), y por ende es capaz de sensar el desplegamiento cercano a la interacción de los dominios. La sonda W294, a pesar de estar situada lejos de la interfase, y muy lejos además de W135, presenta un patrón similar de plegamiento, lo que indicaría que la pérdida de estructura del dominio amino es simultánea al cambio cercano a la interfase, el que se propagaría a través de la proteína en forma cooperativa. Sin embargo, las zonas alejadas de la interfase y en la superficie de la proteína serían más vulnerables a la acción del GdmCl, probablemente debido a la acción del cloruro sobre el solvente que rodea a la proteína. Por eso estas regiones comenzarían a desplegarse a concentraciones más bajas de agente desnaturante, hasta que parte de la cadena peptídica quedara expuesta al solvente y se produjera la interacción con el ion guanidinio y la desestabilización de la interfase. La figura 5 muestra que las sondas W40 y W275 se encuentran situadas lejos de la interfase donde el triptófano 40 dispone su anillo aromático hacia el solvente en una orientación perpendicular respecto de la interfase, mientras que el triptofano 275 se encuentra en la hélice alfa más expuesta del dominio carboxilo.

La primera transición seguida por dicroísmo circular coincide perfectamente con la liberación GDP, de manera que ambos procesos estarían asociados. Los resultados de microcalorimetría mostraron una muy baja cooperatividad, pues se observó más de una transición. Todo esto sugiere que existe un intermediario de plegamiento que se generaría por el desplegamiento parcial de las zonas más expuestas al solvente y alejadas de la interfase, sobretudo el dominio amino cuya estabilidad y desplegamiento estaría ligada a la unión del nucleótido.



**Figura 32. Modelo del desplegamiento de EcFtsZ.** La línea negra continua corresponde al dominio carboxilo, la línea continua azul al dominio amino, la línea negra punteada corresponde a las interacciones en los dominios, y la línea negra discontinua a las interacciones de la interfase. En rojo se muestra el nucleótido GDP. **N** corresponde al estado nativo, **I** al estado intermediario y **D** al estado desnaturado. Se muestra la localización de los triptófanos de las mutantes utilizados como sondas de fluorescencia intrínseca (¶).

El modelo propuesto en la figura 32 muestra dos transiciones ( $T_1$  y  $T_2$ ). La primera involucra la desnaturación de las zonas más expuestas a la acción del agente desnaturante, situadas lejos de la interfase entre los dominios. La salida de GDP de la proteína genera un cambio en la estructura secundaria en el dominio amino. La segunda transición implica la desestabilización de la interfase, que finalmente conlleva al desplegamiento total de la proteína.

Los modelos de plegamiento actualmente propuestos incluyen tres mecanismos: “difusión-colisión”, “colapso hidrófobo” y “propagación” (Fersht 1998). Los dos primeros incluyen la presencia de intermediarios de plegamiento, pero el mecanismo de difusión-colisión se ajusta más al modelo propuesto en este trabajo, pues considera la formación de elementos de estructura secundaria de manera independiente de la estructura terciaria (se demostró en el trabajo que al inicio de la desnaturación ocurren cambios en la estructura secundaria que no se detectó a nivel de estructura terciaria

con algunas mutantes) (Fig. 14 B y Fig. 18 A, B, D). Así, durante el desplegamiento es posible observar cambios estructurales locales que preceden el desplegamiento total de la proteína. Sin embargo, los mecanismos propuestos han sido establecidos generalmente a partir del estudio de proteínas pequeñas (< 20 kDa), y es posible que en proteínas de mayor tamaño (como FtsZ) se presente más de un mecanismo durante el plegamiento, en zonas distantes de la estructura. Una posibilidad es que el mecanismo de difusión-colisión domine el plegamiento de los dominios de FtsZ, mientras que la interfase de la proteína, principalmente hidrófoba, se pliegue mediante el mecanismo de "colapso hidrófobo". Experimentos futuros, como son la desnaturación y renaturación de EcFtsZ seguidas por el cambio en algún observable experimental (como fluorescencia o DC) en función del tiempo, y la caracterización estructural de cada uno de sus dominios expresados por separado, permitirán confirmar cuál es el mecanismo que domina el plegamiento de FtsZ.

## CONCLUSIONES

El plegamiento de EcFtsZ es un proceso complejo que depende de las estabildades propias de cada uno de sus dominios, y también de la estabilidad de la interfase que existe entre ambos. Los procesos de desplegamiento y plegamiento son reversibles, cooperativos y no son de dos estados, pues existe más de una transición. La conexión estructural entre los dos dominios es importante para la función, pues EcFtsZen estado GDP presenta una conformación diferente a la del estado GTP que induce la polimerización. Estas funciones, la actividad GTPásica y la capacidad de polimerizar, se ven alteradas cuando mutaciones puntuales alejadas del sitio activo afectan la dinámica de EcFtsZ asociada a ambos dominios y su interfase de interacción.

## Apéndice I: Método de extrapolación lineal para el cálculo de la energía libre (MEL).

MEL se utiliza para determinar la diferencia de energía libre de desplegamiento de una proteína en solución cuando la transición observada es de dos estados y los datos experimentales son obtenidos mediante el uso de una técnica experimental que permita diferenciar adecuadamente el estado nativo del estado desnaturalado (generalmente fluorescencia, dicroísmo circular, calorimetría, etc.).

El plegamiento de una proteína está favorecido termodinámicamente. Esta generalización se puede extender a todas las proteínas, si se considera una única molécula en solución (para evitar por ejemplo eventos de agregación). Por esto, la desnaturalación de una proteína implica alterar el equilibrio (a) en el cual se encuentra:

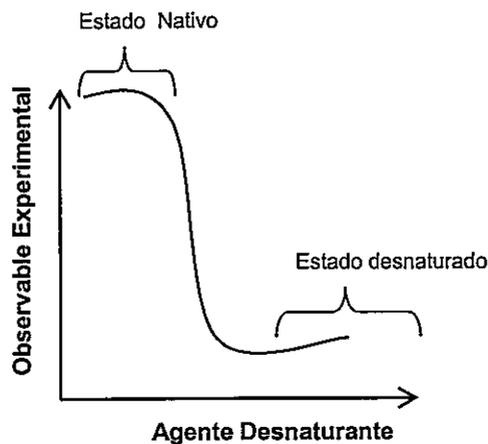


El equilibrio se puede alterar variando las condiciones físicas del sistema, tales como la temperatura o la presión, o las condiciones químicas, al agregar agentes inductores del desplegamiento, comúnmente llamados "agentes caotrópicos o desnaturalantes". Los agentes desnaturalantes más utilizados son Urea y Cloruro de Guanidinio (GdmCl). El método MEL fue desarrollado y aplicado en los experimentos de desnaturalación de proteínas utilizando agentes desnaturalantes (desnaturalación química).

Se define el equilibrio en (a) como:

$$K_{eq} = [D] / [N] \quad (b)$$

MEL se basa en la estimación de la diferencia de energía libre a diferentes concentraciones de agente desnaturalante, para una transición típica como la mostrada a continuación:



**Figura 1. Apéndice I. Simulación de un desplegamiento de dos estados.** Se muestra el efecto de un agente desnaturalante en la conformación de una proteína, seguido por algún observable experimental.

La curva sigmoidea (Figura 1. Apéndice I) muestra un cambio dramático en el "observable experimental" (señal que proviene de la proteína que es detectada por una técnica particular) y por ende en la pendiente de la curva, a una determinada concentración de agente desnaturalante. Este cambio se denomina transición. Antes de la transición, el observable tiende a mantenerse constante o lineal, al igual que después de la transición. Estas regiones están asociadas a los estados nativo y desnaturalado respectivamente. Se habla de cooperatividad en el desplegamiento de una proteína cuando la transición observada desde el estado nativo hacia el desnaturalado es abrupta y lineal en gran parte del cambio. Este tipo de transiciones se observa generalmente en proteínas o dominios que presentan un plegamiento de dos estados. La aplicación del método MEL sobre la curva de desplegamiento implica el

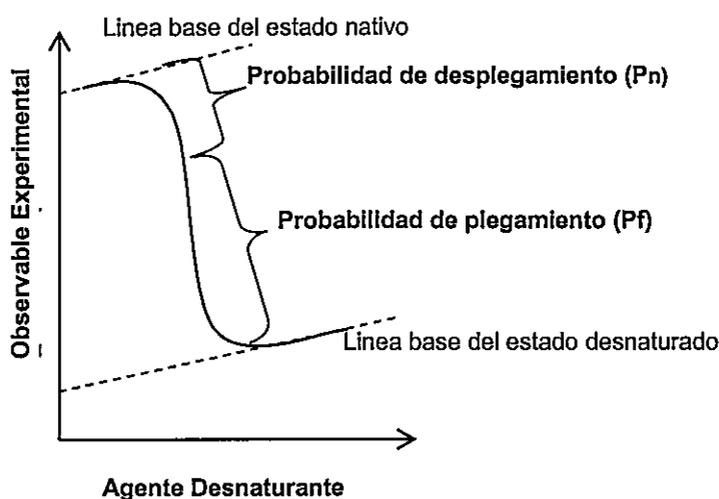
uso de ecuaciones lineales para describir el estado pre-transición y post-transición de la siguiente forma:

$$\text{Pre-Transición: } Y_N(X) = m_N[X] + n_N \quad (c)$$

$$\text{Post-Transición: } Y_D(X) = m_D[X] + n_D \quad (d)$$

( $m_N$  y  $m_D$  pendientes,  $n_N$  y  $n_D$  interceptos,  $[X]$  concentración de agente desnaturalante)

Estas ecuaciones ((c) y (d)) se denominan "líneas base". La relación de cada línea base con el observable experimental se obtienen a partir del gráfico anterior (Figura 1 Apéndice I) de la siguiente forma:



**Figura 2. Apéndice I. Análisis de la curva de desplegamiento de dos estados.**

La probabilidad del estado nativo o desnaturalado es proporcional a la población de moléculas en ése estado conformacional, que depende de la concentración de agente desnaturalante (Fig. 2, Apéndice I). De esta forma:

$$K_{eq} = [D] / [N] \approx P_f / P_u \quad (e)$$

La probabilidad de un estado particular aumenta a medida que aumenta la diferencia absoluta entre el observable experimental "Obs" (dependiente de la concentración de agente desnaturante "X") y la línea base del otro estado:

$$P_f(X) / P_n(X) = (Y_n(X) - Obs(X)) / (Obs(X) - Y_d(X)) \quad (f)$$

Reemplazando en (e):

$$K_{eq} = (Y_n - Obs(X)) / (Obs(X) - Y_d) \quad (g)$$

Para el cálculo de la energía libre, se utiliza la expresión que relaciona esta cantidad con la constante de equilibrio:

$$\Delta G(X) = -RT \ln (K_{eq}) = -RT \ln [(Y_n(X) - Obs(X)) / (Obs(X) - Y_d(X))] \quad (h)$$

Despejando "Obs":

$$Obs(X) = [Y_n(X) + Y_d(X)e^{(\Delta G(X)/RT)}] / [1 + e^{(\Delta G(X)/RT)}] \quad (i)$$

"Y<sub>n</sub>" y "Y<sub>d</sub>" dependen de "X" como se mostró en (b) y (c). Por otra parte, como el equilibrio mostrado en (b) es alterado al agregar agente desnaturante al sistema, el

cambio en energía libre en cada punto de la curva también es una función de "X". El método MEL considera que el cambio en la energía libre en la transición es una función lineal de la forma:

$$\Delta G(X) = \Delta G_{[X=0]} + m [X] \quad (j)$$

Reemplazando (j) en (i):

$$Obs(X) = [Y_n(X) + Y_d(X) e^{((\Delta G_{[X=0]} + m[X])/RT)}] / [1 + e^{((\Delta G_{[X=0]} + m[X])/RT)}] \quad (k)$$

Esta ecuación se puede utilizar directamente para ajustar los puntos experimentales que se obtienen en una desnaturación al equilibrio. Sin embargo, involucra muchos parámetros (solo se conoce "Obs", "R", "T" y [X]), de manera que la única forma de que el ajuste converja es dando valores de partida al ajuste para los parámetros desconocidos. Otra forma más indirecta, es simplemente calcular la diferencia de energía libre en cada punto de la transición utilizando para ello la ecuación (h). En este caso se conoce todos los parámetros. Luego, debido a que en la transición la diferencia de energía libre varía linealmente con la concentración de agente desnaturante, se realiza un ajuste de regresión lineal aplicando la ecuación (j). De esta forma, es posible obtener el parámetro

$$\Delta G_{[X=0]}$$

Este parámetro equivale a la diferencia de energía libre en ausencia de agente desnaturante, o sea la **diferencia de energía libre de desplegamiento** de una proteína en agua (o amortiguador).

El punto medio de la transición o  $[X]_{50\%}$  es la concentración de agente desnaturante requerida para desnaturar el 50% de las moléculas, de manera que la constante de equilibrio a esta concentración alcanza la unidad:

$$K_{eq} = P_u / P_f = 0,5 / 0,5 = 1$$

Luego, reemplazando en (h) y después en (j):

$$\Delta G(X) = 0$$

$$\Delta G_{[X=0]} = m [X]_{50\%}$$

$$[X]_{50\%} = \Delta G_{[X=0]} / m$$

(Referencia: Santoro y Bolen, 1988)

## Apéndice II: Cálculo de la entalpía del desplegamiento de una proteína a partir de Microcalorimetría Diferencial de Barrido (DSC).

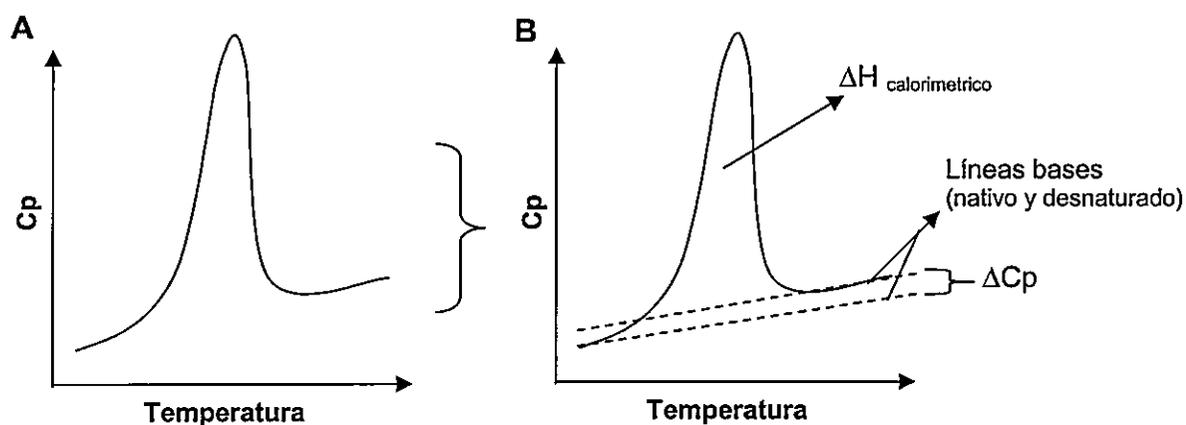
El microcalorímetro es un aparato que es capaz de detectar sutiles variaciones de temperatura. La muestra problema es puesta en un compartimiento adiabático, de manera que el equipo transforma las diferencias de temperatura producidas en la muestra, que surgen como consecuencia de incrementos de temperatura proporcionados por el equipo, en diferencias de voltajes que pueden ser amplificadas y observadas en un computador. Los incrementos de temperatura en general son discretos y completamente regulables.

En los experimentos de desnaturación por temperatura, la proteína en solución es puesta en una celda a una concentración adecuada para observar cambios, y en otra celda se pone la misma solución pero sin proteína. De esta forma, el equipo detecta las diferencias de temperatura asociadas a la presencia de la proteína, y eventualmente los cambios conformacionales que experimenta debido al incremento en temperatura del sistema.

Durante el desplegamiento de una proteína se produce cambios en el  $C_p$  (capacidad calórica) del sistema en función de la temperatura ( $T$ ), de acuerdo a la ecuación:

$$dH = C_p dT \quad (a)$$

Esto genera un pico de absorción de calor (Fig. 1 A, Apéndice II).



**Figura 1. Apéndice II. DSC.** (A). Ejemplo de desnaturalación por temperatura de una proteína, seguido por DSC. (B). Parámetros directamente extraídos de este tipo de experimentos.

A partir de este gráfico, es posible determinar la entalpía directa o "calorimétrica" del desplegamiento calculando el área bajo la curva (Fig. 1 B Apéndice II). De manera alternativa, es posible calcular la entalpía del desplegamiento, asumiendo que la transición corresponde a un proceso de dos estados. Para ello se utiliza una modificación de la ecuación de van't Hoff adaptada para microcalorimetría diferencial:

$$\Delta H_{vH} = -R \partial \ln K_{eq} / \partial (1/T) \quad (b)$$

$$\Delta H_{N-D,vH}(T_m) = 4RT_m^2 \Delta C_p(T_m) / Q \quad (c)$$

( $T_m$  : temperatura a la cual se desnaturala el 50% de las moléculas,  $Q$ : área bajo la curva)

La ecuación (b) corresponde a la ecuación de van't Hoff clásica, que relaciona la constante de equilibrio con la temperatura. La ecuación (c) es una variación de (b), que permite calcular el cambio en la entalpía de van't Hoff para un pico de absorción calórico como el observado en una desnaturalización por temperatura. Este valor corresponde al cambio en entalpía de un proceso de dos estados, o de forma más general, corresponde a la desnaturalización de una "unidad cooperativa" (la región mínima de la proteína que se desnatura cooperativamente).

De esta forma, es posible comparar los valores de  $\Delta H_{\text{calorimétrico}}$  y  $\Delta H_{\text{N-D,vH}}(T_G)$ . Si estos valores son similares, significa que la proteína se desnatura de manera cooperativa, sin la presencia de intermediarios estable al equilibrio:

$\Delta H_{\text{calorimétrico}} / \Delta H_{\text{N-D,vH}}(T_G) = 1 \rightarrow$  Desplegamiento cooperativo

$\Delta H_{\text{calorimétrico}} / \Delta H_{\text{N-D,vH}}(T_G) < 1 \rightarrow$  Presencia de intermediarios de plegamiento

$\Delta H_{\text{calorimétrico}} / \Delta H_{\text{N-D,vH}}(T_G) > 1 \rightarrow$  Presencia de una o más unidades cooperativas

(Referencias: Privalov y Potekhin 1986, Plotnikov y col., 1997)

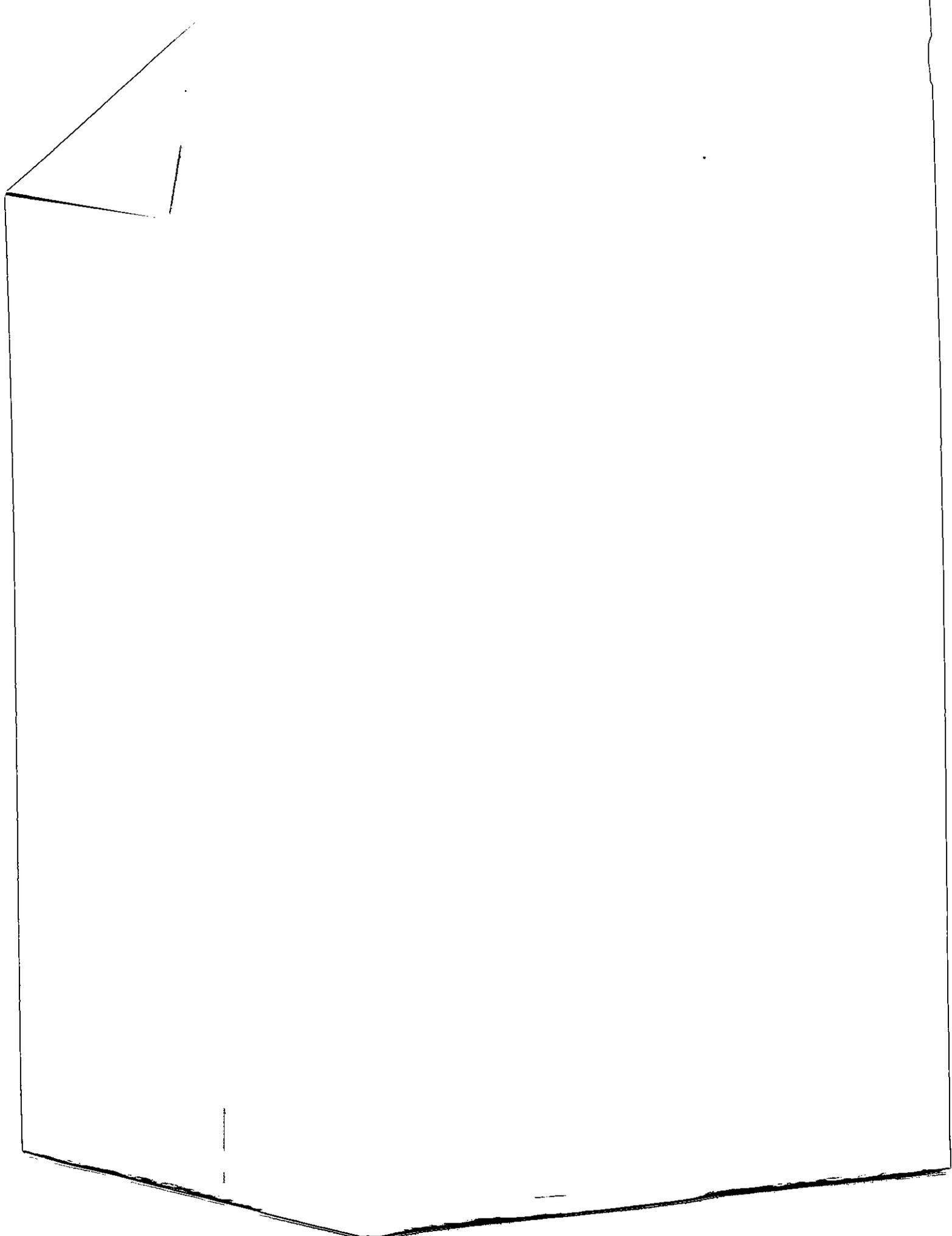
**BIBLIOGRAFIA**

- Andreu, J. M., Oliva, M. A. y Monasterio, O. (2002). "Reversible unfolding of FtsZ cell division proteins from archaea and bacteria. Comparison with eukaryotic tubulin folding and assembly." *J Biol Chem* **277**(45): 43262-70.
- Bentahir, M., Feller, G., Aittaleb, M., Lamotte-Brasseur, J., Himri, T., Chessa, J. P. y Gerday, C. (2000). "Structural, kinetic, and calorimetric characterization of the cold-active phosphoglycerate kinase from the antarctic *Pseudomonas* sp. TACII18." *J Biol Chem* **275**(15): 11147-53.
- Beuria, T. K., Krishnakumar, S. S., Sahar, S., Singh, N., Gupta, K., Meshram, M. and Panda, D. (2003). "Glutamate-induced assembly of bacterial cell division protein FtsZ." *J Biol Chem* **278**(6): 3735-41.
- Bi, E. F. y Lutkenhaus, J. (1991). "FtsZ ring structure associated with division in *Escherichia coli*." *Nature* **354**(6349): 161-4.
- Blaber, S. I., Culajay, J. F., Khurana, A. y Blaber, M. (1999). "Reversible thermal denaturation of human FGF-1 induced by low concentrations of guanidine hydrochloride." *Biophys J* **77**(1): 470-7.
- Burley, S. K. y Petsko, G. A. (1985). "Aromatic-aromatic interaction: a mechanism of protein structure stabilization." *Science* **229**(4708): 23-8.

- Creighton, T. E. (1993). Chemical properties of polypeptides. Proteins. T. E. Creighton. New York, W. H. Freeman and Company: 1-47.
- de Boer, P., Crossley, R. y Rothfield, L. (1992). "The essential bacterial cell-division protein FtsZ is a GTPase." *Nature* **359**(6392): 254-6.
- Diaz, J. F., Kralicek, A., Mingorance, J., Palacios, J. M., Vicente, M. y Andreu, J. M. (2001). "Activation of cell division protein FtsZ. Control of switch loop T3 conformation by the nucleotide gamma-phosphate." *J Biol Chem* **276**(20): 17307-15.
- Fersht, A. (1998). Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding. A. Fersht. New York, W. H. Freeman and Company: 576.
- Gilson, P. R., Yu, X. C., Hereld, D., Barth, C., Savage, A., Kiefel, B. R., Lay, S., Fisher, P. R., Margolin, W. y Beech, P. L. (2003). "Two Dictyostelium orthologs of the prokaryotic cell division protein FtsZ localize to mitochondria and are required for the maintenance of normal mitochondrial morphology." *Eukaryot Cell* **2**(6): 1315-26.
- Huecas, S. y Andreu, J. M. (2004). "Polymerization of nucleotide-free, GDP- and GTP-bound cell division protein FtsZ: GDP makes the difference." *FEBS Lett* **569**(1-3): 43-8.

- Kiefel, B. R., Gilson, P. R. y Beech, P. L. (2004). "Diverse eukaryotes have retained mitochondrial homologues of the bacterial division protein FtsZ." *Protist* **155**(1): 105-15.
- Lakowicz, J. R. (1999). *Introduction to Fluorescence. Principles of Fluorescence Spectroscopy*. J. R. Lakowicz. New York, Kluwer Academics/Plenum Publishers: 1-24.
- Lowe, J. y Amos, L. A. (1998). "Crystal structure of the bacterial cell-division protein FtsZ." *Nature* **391**(6663): 203-6.
- Lowe, J. y Amos, L. A. (1999). "Tubulin-like protofilaments in Ca<sup>2+</sup>-induced FtsZ sheets." *Embo J* **18**(9): 2364-71.
- Lowe, J., Li, H., Downing, K. H. y Nogales, E. (2001). "Refined structure of alpha beta-tubulin at 3.5 A resolution." *J Mol Biol* **313**(5): 1045-57.
- Lu, C. y Erickson, H. P. (1998). "Purification and assembly of FtsZ." *Methods Enzymol* **298**: 305-13.
- Lu, C. y Erickson, H. P. (1999). "The straight and curved conformation of FtsZ protofilaments-evidence for rapid exchange of GTP into the curved protofilament." *Cell Struct Funct* **24**(5): 285-90.

- Lu, C., Reedy, M. y Erickson, H. P. (2000). "Straight and curved conformations of FtsZ are regulated by GTP hydrolysis." *J Bacteriol* **182**(1): 164-70.
- Missiakas, D., Betton, J. M., Minard, P. y Yon, J. M. (1990). "Unfolding-refolding of the domains in yeast phosphoglycerate kinase: comparison with the isolated engineered domains." *Biochemistry* **29**(37): 8683-9.
- Mukherjee, A. y Lutkenhaus, J. (1994). "Guanine nucleotide-dependent assembly of FtsZ into filaments." *J Bacteriol* **176**(9): 2754-8.
- Mukherjee, A. y Lutkenhaus, J. (1998). "Dynamic assembly of FtsZ regulated by GTP hydrolysis." *Embo J* **17**(2): 462-9.
- 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**(3): 823-32.
- Nogales, E., Downing, K. H., Amos, L. A. y Lowe, J. (1998). "Tubulin and FtsZ form a distinct family of GTPases." *Nat Struct Biol* **5**(6): 451-8.
- Ogino, H., Wachi, M., Ishii, A., Iwai, N., Nishida, T., Yamada, S., Nagai, K. y Sugai, M. (2004). "FtsZ-dependent localization of GroEL protein at possible division sites." *Genes Cells* **9**(9): 765-71.



- Lu, C., Reedy, M. y Erickson, H. P. (2000). "Straight and curved conformations of FtsZ are regulated by GTP hydrolysis." *J Bacteriol* **182**(1): 164-70.
- Missiakas, D., Betton, J. M., Minard, P. y Yon, J. M. (1990). "Unfolding-refolding of the domains in yeast phosphoglycerate kinase: comparison with the isolated engineered domains." *Biochemistry* **29**(37): 8683-9.
- Mukherjee, A. y Lutkenhaus, J. (1994). "Guanine nucleotide-dependent assembly of FtsZ into filaments." *J Bacteriol* **176**(9): 2754-8.
- Mukherjee, A. y Lutkenhaus, J. (1998). "Dynamic assembly of FtsZ regulated by GTP hydrolysis." *Embo J* **17**(2): 462-9.
- 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**(3): 823-32.
- Nogales, E., Downing, K. H., Amos, L. A. y Lowe, J. (1998). "Tubulin and FtsZ form a distinct family of GTPases." *Nat Struct Biol* **5**(6): 451-8.
- Ogino, H., Wachi, M., Ishii, A., Iwai, N., Nishida, T., Yamada, S., Nagai, K. y Sugai, M. (2004). "FtsZ-dependent localization of GroEL protein at possible division sites." *Genes Cells* **9**(9): 765-71.

- Santra, M. K. y Panda, D. (2003). "Detection of an intermediate during unfolding of bacterial cell division protein FtsZ: loss of functional properties precedes the global unfolding of FtsZ." *J Biol Chem* **278**(24): 21336-43.
- Taniuchi, H. y Anfinsen, C. B. (1969). "An experimental approach to the study of the folding of staphylococcal nuclease." *J Biol Chem* **244**(14): 3864-75.
- van den Ent, F. y Lowe, J. (2000). "Crystal structure of the cell division protein FtsA from *Thermotoga maritima*." *Embo J* **19**(20): 5300-7.
- Ward, J. E., Jr. y Lutkenhaus, J. (1985). "Overproduction of FtsZ induces minicell formation in *E. coli*." *Cell* **42**(3): 941-9.
- Yu, X. C. y Margolin, W. (1997). "Ca<sup>2+</sup>-mediated GTP-dependent dynamic assembly of bacterial cell division protein FtsZ into asters and polymer networks in vitro." *Embo J* **16**(17): 5455-63.
- Zaiss, K. y Jaenicke, R. (1999). "Thermodynamic study of phosphoglycerate kinase from *Thermotoga maritima* and its isolated domains: reversible thermal unfolding monitored by differential scanning calorimetry and circular dichroism spectroscopy." *Biochemistry* **38**(14): 4633-9.

- Oliva, M. A., Cordell, S. C. y Lowe, J. (2004). "Structural insights into FtsZ protofilament formation." *Nat Struct Mol Biol* **11**(12): 1243-50.
- Oliva, M. A., Huecas, S., Palacios, J. M., Martin-Benito, J., Valpuesta, J. M. y Andreu, J. M. (2003). "Assembly of archaeal cell division protein FtsZ and a GTPase-inactive mutant into double-stranded filaments." *J Biol Chem* **278**(35): 33562-70.
- Osvath, S., Kohler, G., Zavodszky, P. y Fidy, J. (2005). "Asymmetric effect of domain interactions on the kinetics of folding in yeast phosphoglycerate kinase." *Protein Sci* **14**(6): 1609-16.
- Plotnikov, V. V., Brandts, J. M., Lin, L. N. y Brandts, J. F. (1997). "A new ultrasensitive scanning calorimeter." *Anal Biochem* **250**(2): 237-44.
- Privalov, P. L. y Potekhin, S. A. (1986). "Scanning microcalorimetry in studying temperature-induced changes in proteins." *Methods Enzymol* **131**: 4-51.
- Sali, A., Potterton, L., Yuan, F., van Vlijmen, H. y Karplus, M. (1995). "Evaluation of comparative protein modeling by MODELLER." *Proteins* **23**(3): 318-26.
- Santoro, M. M. y Bolen, D. W. (1988). "Unfolding free energy changes determined by the linear extrapolation method. 1. Unfolding of phenylmethanesulfonyl alpha-chymotrypsin using different denaturants." *Biochemistry* **27**(21): 8063-8.