

UCH-FC
Biotecnología
H967
C-1

UNIVERSIDAD DE CHILE- FACULTAD DE CIENCIAS-ESCUELA DE
PREGRADO



**CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LAS PROPIEDADES DE BTUBA/B Y
SU RELACIÓN CON LAS PROTEÍNAS HOMÓLOGAS ESTRUCTURALES
TUBULINA Y FTSZ**

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

Felipe Eduardo Hurtado Martínez

Director de Seminario de Título:
Dr. Octavio Monasterio Opazo.

Mayo 2013
Santiago. Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la escuela de pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el seminario de Título, presentado por el Sr. Felipe Eduardo Hurtado Martínez

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LAS PROPIEDADES DE BTUBA/B Y SU RELACIÓN CON LAS PROTEÍNAS HOMÓLOGAS ESTRUCTURALES TUBULINA Y FTSZ

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

Dr. Octavio Monasterio
Director Seminario de Título

Firma manuscrita en azul de Octavio Monasterio sobre una línea horizontal.

Dra. Rosalba Lagos
Co-directora Seminario de Título

Firma manuscrita en azul de Rosalba Lagos sobre una línea horizontal.

Comisión de Evaluación

Dr. Ricardo Cabrera
Presidente Comisión

Firma manuscrita en azul de Ricardo Cabrera sobre una línea horizontal.

Dr. Jorge Babul
Evaluador

Firma manuscrita en azul de Jorge Babul sobre una línea horizontal.

Santiago de Chile, Mayo de 2013

Biografía



Nací un 12 de diciembre de 1983 en el hospital Sótero del río en puente alto. Mis primeros años de vida los viví en Santa Rosa, aunque mis primeros recuerdos están en Independencia, donde viví alrededor de 2 años. Creo haber pasado una infancia feliz, a pesar de las carencias que como familia y como comunidad teníamos y en eso mucho influyeron mis padres que con su optimismo, esfuerzo, trabajo, perseverancia y alegría de vivir, fueron cambiando un destino que nos era adverso. A mis 6 años de edad llegamos a Maipú, lugar donde aún vivo y he vivido todos los procesos propios de una persona (niñez, adolescencia, adultez?). Tuve buena parte de la enseñanza básica en el colegio Republica de Guatemala, que quedaba solo a 3 cuadras de mi casa, por lo que siempre llegaba justo a tiempo. Al principio no me iba bien en el colegio, producto de mi mala base inicial y mi flojera, pero gracias a mi profesora jefe de primero a sexto básico, quien me llevaba a su casa después de clase y me hacía reforzamiento y caligrafía (que nunca depure mucho que digamos), empecé a enderezarme y a mejorar mis notas, que aunque no eran malas, siempre me dijo que yo podía dar mucho mas (y tenía razón). A partir de séptimo año básico, me cambie al colegio Salesianos de la calle cumming, frente al metro república, y fue en este lugar donde comenzó mi interés por las ciencias y las matemáticas. Si bien el colegio nunca destaco mucho con respecto al rendimiento académico de sus alumnos, definitivamente es un lugar donde siempre agradeceré haber estado, ya que los profesores siempre fueron muy preocupados y hasta confidentes de uno (como mi profesora de filosofía que era lo máximo) y su fuerte en formación estaba en valores y principios que hasta el día de hoy no tranzo (“no sirve de nada ser el mejor profesional si como ser humano no vales”), además por supuesto de encontrar a personas de las que te sientes orgullosa de estar al lado, y con quienes nunca hemos perdido el contacto.

Ya en tercero medio, tuve que decidir el curso electivo, y aunque elegí ser biólogo, la verdad es que siempre deambule entre las matemáticas y la biología, sin tener nunca hasta los días de hoy una clara preferencia entre uno y otro. Llegó el momento de dar la temida PAA (actual PSU) y yo simplemente no sabía qué hacer después (nunca fui muy decidido). Producto de eso entre al bachillerato de la Universidad de Chile, donde me convencí, previa consulta a otros estudiantes más antiguos, a entrar a la cerrera de Ingeniería en biotecnología molecular pues me

gustaba la idea de generar conocimiento. Si bien uno tiende a idealizar los proyectos profesionales, y las expectativas siempre son muy altas, la verdad es una carrera que te desafía todas tus habilidades cognitivas y hasta físicas (aquí me di cuenta cuanto aguantaba sin dormir) y me permitió obtener una base de conocimiento bastante amplia.

Ya ha pasado bastantes años desde que entre al bachillerato y luego a la carrera. He estudiado en el mismo campus y la he visto cambiar para bien y para mal. He conocido todo tipo de realidades y de personas. De hecho creo que este es uno de los lugares más diversos que existen en nuestro país, lo cual se agradece pues permite ampliar los puntos de vista y las opiniones. Felizmente he encontrado gente maravillosa que me ha ayudado a atravesar este camino y que comparten los mismos valores y principios que yo. En este lugar he conocido el éxito y también el fracaso, en todos los sentidos. En fin, me he terminado de moldear como persona consiente y crítica. Actualmente me encuentro realizando mi magister en ciencias biológicas en el laboratorio de Biología estructural y molecular, que es en definitiva es donde he realizado la mayor parte de mi aprendizaje de laboratorio. Aquí se aprende harto, aunque también se trabaja de manera inhumana a veces, resolviendo problemas de las formas más originales, propios de países donde el gasto en investigación es de las ultimas prioridades del país, pero en suma y resta, estoy convencido que la preparación de este y todos los laboratorios de la facultad de ciencias es sólida y me da confianza para enfrentar mis próximos desafíos.

Espero próximamente completar esta biografía con la otra parte de mi investigación. No daré fechas porque acá todo es relativo, pero espero que sea dentro de esta vida.

Agradecimientos

Sin duda es mucha gente la gente que quisiera agradecer y probablemente se me queden algunos en el tintero. Para partir quisiera partir agradeciendo a mis papas Víctor Hurtado y Teresa Martínez, quienes han sido el pilar de toda mi vida, y quienes me han apoyado en todos mis proyectos, confiando de manera irrestricta en mis decisiones, estando presente en mis mejores y peores momentos; me han dado la oportunidad de conocer las realidades de Chile y el extranjero, siendo testigo privilegiado de nuestro mundo, todo ello sin olvidar nunca las raíces de nuestra historia. En fin, ellos son mi inspiración y me hacen sentir un privilegiado de la vida. También quisiera agradecer a mi hermana Mabel, con quien siempre me he llevado muy bien, he sentido su cuidado de hermana mayor y fue una especie de guía académica ya que fue ella quien primero entró a la universidad, estudiando bachillerato y luego medicina, siendo además una de nuestros médicos de cabecera durante muchos años. También agradecer a Raúl, su eterno pololo y ahora parte de la familia quien, con su gran cabeza para los estudios, también ha sido nuestro médico familiar.

Siguiendo, ahora en orden cronológico, quisiera agradecer a todos los amigos que he conocido durante mi vida, partiendo por mis grandes amigos de básica y con quienes aún mantengo contacto, Paul Beltrán y Sebastián Castillo quienes me han aconsejado y han compartido sus experiencias de vida durante más de 20 años y quienes me han entendido en mi forma de ser a veces un tanto fría y más distante. A mis amigos de media Walter Aldana, Carlos Fierro y su hermana Marta y sus amigas quienes durante mucho tiempo formamos un gran "team" donde las salidas durante el año y durante las vacaciones sirvieron enormemente para la distracción de mi submundo y para entretención relativamente sana que siempre hemos tenido.

Ya en la universidad, quisiera partir mencionando a mis amigos del bachillerato en general, quienes a pesar de lo competitivo que puede llegar a ser por conseguir un cupo en las carreras que queríamos, nunca lo sentimos así, y siempre primo más el espíritu de cooperación que el de competencia. En particular quisiera agradecer a Dabid Fuentealba y Ociel Gutiérrez con quienes formamos un grupo de "estudio" algo jugoso y desordenado, pero siempre cumpliendo con nuestro deber. Como olvidar esas juntas donde Ociel en su antro de perdición.

Durante la carrera de "biotec", también conocí grandes personajes, con quienes aun compartimos, tanto en el plano laboral, como personal. Quisiera destacar a mis amigas Oriana Flores, Fernanda y Javiera Gutiérrez, a Claudia Huerta y también a mi amigo Nelson Caroca. Chiquillos, gracias por los innumerables momentos de compañía y jugos varios. Es difícil encontrar gente así y espero seguir junto a ustedes por muchísimo tiempo más.

Quisiera agradecer a este laboratorio, partiendo por mis jefes Octavio Monasterio y Rosalba Lagos por permitirme aprender esta media ciencia, medio arte que es el

trabajo con proteínas y por los consejos que recibí para mejorar la calidad de mi trabajo. También quiero mencionar a mis colegas, tanto tubulinos, como microcininos por las innumerables peladas de cable y conversaciones a veces sabias y a veces sin sentido así como las múltiples celebraciones que tuvimos. En este lote quiero destacar a Daniela Muñoz, Felipe Villanelo, Eduardo Bignon, Gisela Araya, Alexis Ordenes, Andrea Poch, Luis pouchucq, Daniel Maturana, Gonzalo Núñez, Sergio Gutiérrez, Pablo Lobos, Yerko Escalona, Erika Lang, Felipe Montecinos y más recientemente incorporados Andres Marcoleta, Paulina Aguilera y Yerko Argandoña. Mención especial para Cesar Díaz quien me enseñó a trabajar bajo el siempre riguroso y rudo método soviético de enseñanza que si bien, costo empezar, ahora siento que ningún protocolo es extenso y siempre se puede ir mas alla. Solo basta sudar sangre. Ah y por supuesto, también agradecer a Macarena Collao, a Don Pedro, a Roselyn Orellana, Mytzi y Sandra por su importante labor en el laboratorio. Créanme que me salvaron muchas veces.

Por último y no menos importante quisiera destacar y agradecer a mi compañera de vida en estos últimos 6 años, Susana Navarro por su infinito cariño y paciencia conmigo, por estar en las buenas y en las malas y por saber contenerme en mis ratos de locura y estres, propios de este tan poco transitado camino. Muchísimas Gracias. Te quiero Mucho.

**A mi querida Familia
Este trabajo también es suyo**

TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
RESUMEN.....	xiv
ABSTRACT.....	xvi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 DEL CITOESQUELETO EUCARIONTE AL BACTERIANO.....	1
1.2 HALLAZGO DE LA TUBULINA BACTERIANA.....	5
1.3 ASPECTOS CELULARES DEL FILUM <i>VERRUCOMICROBIA</i>	9
1.4 PROPIEDADES BIOQUÍMICAS Y ESTRUCTURALES DE BTUBA Y BTUBB.....	12
2. HIPÓTESIS.....	18
3. OBJETIVO GENERAL.....	18
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
5. Materiales y Métodos.....	19
5.1 MATERIALES.....	19
5.2 MÉTODOS.....	20
6. RESULTADOS.....	31
6.1 EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE BTUB A/B SILVESTRE.....	31
6.2 CINÉTICA DE POLIMERIZACIÓN DE BTUBA/B.....	33
6.3 DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DEL NÚCLEO.....	41
6.4 PROCESO DE ELONGACIÓN.....	44
6.5 DETERMINACIÓN DE LA CINÉTICA DE POLIMERIZACIÓN Y LA CONCENTRACIÓN CRÍTICA POR SEDIMENTACIÓN.....	48
6.5.1 Efecto de KCl y CaCl ₂ sobre la despolimerización de filamentos de <i>BtubA/B</i>	52
6.6 ACTIVIDAD GTPÁSICA.....	54

6.7 VISUALIZACIÓN DE FILAMENTOS DE BTUBA/B MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.	58
7. DISCUSIÓN.	60
7.1 PURIFICACIÓN DE BTUBA/B.	60
7.2 LAS PROPIEDADES BIOQUÍMICAS DE BTUBA/B SE ASEMEJAN MÁS A FTSZ QUE A TUBULINA EUCARIONTE.	61
7.2.1 Cinética de polimerización.	61
7.2.2 Actividad GTPásica.	65
7.2.3 Morfología de los filamentos.	68
7.3 SIGNIFICADO BIOLÓGICO DE LAS CONDICIONES DE POLIMERIZACIÓN ESTUDIADAS.	69
8. CONCLUSIONES.	73
BIBLIOGRAFÍA.	74
APÉNDICE.	79

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. MOTIVOS DE TUBULINA Y FTSZ IDENTIFICADOS EN BTUB A Y BTUB B DE <i>PROSTHECOBACTER DEJONGEII</i> . (JENKINS Y COL, 2002).....	7
TABLA 2. VALORES DE CONCENTRACIÓN CRÍTICA EN LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES ESTUDIADAS.....	38
TABLA 3. CONCENTRACIONES CRÍTICAS DE BTUBA/B OBTENIDAS DE DISPERSIÓN DE LUZ, SEDIMENTACIÓN Y ACTIVIDAD GTPÁSICA.....	57

ÍNDICE DE FIGURAS.

FIGURA 1 ESTRUCTURAS Y FUNCIONES DEL HETERODÍMERO DE α/β -TUBULINA Y DE FTSZ Y SUS FILAMENTOS.	2
FIGURA 2 ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS DE BTUBA/B Y SUS HOMÓLOGOS.	8
FIGURA 3. MICROGRAFÍAS ELECTRÓNICAS DE ESPECIES DEL FILUM <i>VERRUCOMICROBIA</i> . 10	
FIGURA 4. ESTRUCTURA 3D DE BTUBA/B.	13
FIGURA 5. ESTRUCTURA DE LOS FILAMENTOS Y PROPIEDADES BIOQUÍMICAS DE BTUBA/B. 15	
FIGURA 6. SDS-PAGE DE SOBREENPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE BTUBA/B.	32
FIGURA 7. POLIMERIZACIÓN DE BTUBA/B CON KCL, $CaCl_2$ Y GTP.	34
FIGURA 8. EFECTO DEL KCL 24 MM Y Ca^{+2} SOBRE LAS CURVAS DE POLIMERIZACIÓN DE BTUBA/B A DISTINTAS CONCENTRACIONES DE PROTEÍNA	36
FIGURA 9 EFECTO DEL KCL 95 MM Y Ca^{+2} SOBRE LAS CURVAS DE POLIMERIZACIÓN DE BTUBA/B A DISTINTAS CONCENTRACIONES DE PROTEÍNA.	39
FIGURA 10. CONCENTRACIÓN CRÍTICA DE BTUBA/B.	40
FIGURA 11. DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DEL NÚCLEO BTUBA/B.	43
FIGURA 12. CINÉTICA DE POLIMERIZACIÓN OBTENIDAS POR DISPERSIÓN DE LUZ A DISTINTAS CONDICIONES Y SU NORMALIZACIÓN.	46
FIGURA 13. SEDIMENTACIÓN A ALTA VELOCIDAD PARA DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN CRÍTICA.	51
FIGURA 14. SEDIMENTACIÓN A ALTA VELOCIDAD DE BTUBA/B EN CONCENTRACIONES CRECIENTES DE CALCIO.	53
FIGURA 15. CURVAS DE PROGRESO Y ACTIVIDAD GTPÁSICA.	55
FIGURA 16. VISUALIZACIÓN DE LOS FILAMENTOS DE BTUBA/B MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.	59

LISTA DE ABREVIATURAS

[P] : concentración de polímeros

[S] : concentración de subunidades

[S]_{ec}: concentración de subunidades en el equilibrio dinámico, equivalente al valor de la concentración crítica

[S*]: concentración de subunidades disponibles para polimerizar y equivale a la concentración inicial de subunidades menos la concentración crítica

I_{max} : intensidad máxima de la señal de dispersión de luz

V_{max} : velocidad máxima de polimerización

n: número de subunidades que forman el núcleo

Cc: concentración crítica

K_n : constante de equilibrio para la formación de un núcleo de subunidades

K_{ec} : constante de equilibrio de asociación de las subunidades con el polímero en el estado estacionario.

k^* : constante de velocidad de la nucleación de orden-n

k_{cat} : constante catalítica

C°: grados Celsius

Å: amstrong.

ADP: adenosin difosfato ("adenosine-5'-diphosphate")

ATP: adenosin trifosfato ("Adenosine-5'-triphosphate")

BtubA/B: tubulina bacteriana A, B ("bacterial tubulin A, B")

D.S.: desviación estándar

DTT: "dithiothreitol"

FtsZ: "filamentous temperature-sensitive Z"

GDP: guanosin difosfato ("guanosine-5'-diphosphate")

GFP: proteína fluorescente verde ("green fluorescent protein")

GMPCPP: "guanosine-5'-[(α,β)-methylene]triphosphate"

GTP: guanosin trifosfato ("guanosine-5'-triphosphate")

h: horas

kDa: kilodalton

klc: cadena liviana de quinesina ("kinesin light chain")

LB: medio Luria Bertani

m: metro

M: molar

MAPs: proteínas asociadas a microtúbulos ("microtubule associated proteins")

mg: milígramo

min: minutos

mL: mililitro

MTOC: centro organizador de microtúbulos (Microtubule organizing center)

NDP: nucleósidos difosfato

nm: nanómetro

NTP: nucleósidos trifosfato

OD: densidad óptica ("optical density")

P: Precipitado

Pi: fosfato inorgánico

S: Sobrenadante

s: segundos

SDS-PAGE: "sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis"

u.a: unidades arbitrarias

µm: micrómetro

RESUMEN

La tubulina, la proteína que forma el citoesqueleto de microtúbulos, está presente en todos los eucariontes conocidos, y nunca ha sido detectado en bacterias o arqueas. Por este motivo, se consideró a la tubulina como una proteína típica del citoesqueleto de los eucariontes. Sin embargo a lo largo de las 2 últimas décadas se ha detectado un citoesqueleto bacteriano bien desarrollado, con proteínas que eran homólogas a los 3 componentes del citoesqueleto eucarionte. Dentro de estos hallazgos, se encuentra el descubrimiento en el genoma de cuatro especies del género bacteriano *Prostheco bacter* del phylum verrucomicrobia, dos nuevas secuencias de tubulina, *btubA* y *btubB* (*bacterial tubulin A, B*), que compartían una mayor identidad de secuencia con el heterodímero de α/β -tubulina que con FtsZ, el cual es considerado el homólogo procarionte de la tubulina.

Las primeras caracterizaciones bioquímicas mostraron que BtubA/B forma un heterodímero que polimeriza en presencia de GTP, y lo hace en cantidades equimolares y alternadas de BtubA y BtubB formando filamentos helicoidales compuestos de dos protofilamentos similares a los de tubulina y FtsZ. Además, posee un plegamiento independiente de chaperonas como FtsZ. En base a estas características, se postuló que *Prostheco bacter* adquirió los genes *BtubA/B* por transferencia genética horizontal desde un eucarionte primitivo. Sin embargo la función aún es desconocida y solo se cree que tendría una función de mantención de la forma celular, que en el caso particular del género *Prostheco bacter* poseen una prosteca que sería una extensión de la célula para aumentar la superficie de absorción de nutrientes.

Por este motivo se caracterizó *in vitro*, la polimerización de BtubA/B en condiciones de potasio y calcio que para los casos de tubulina y FtsZ presentan comportamiento distintos entre si y con ellos poder determinar con cuál de las proteínas homologas se encontraban mayores semejanzas en términos bioquímicos. En base a los resultados de esta memoria, se determinó que el

aumento de la concentración de cloruro de potasio disminuye la concentración crítica de la polimerización, produce filamentos más estables y mantiene el tamaño del núcleo crítico de polimerización como un trímero en el rango de concentración estudiado. Por otro lado la actividad GTPásica aumenta levemente. La disminución de la concentración crítica produce un aumento del número de filamentos, y con KCl 95 mM se genera una interacción lateral entre los filamentos individuales que forma filamentos más largos y comienza la formación de manojos de filamentos.

Del mismo modo, se determinó que el calcio también ayuda a disminuir la concentración crítica, a generar manojos estables de filamentos y disminuye de manera considerable la actividad GTPásica, siendo este efecto aun mayor que en los casos de tubulina y FtsZ. Estos resultados dan cuenta que, a pesar del alto porcentaje de homología que presentan la tubulina eucarionte y BtubA/B, el comportamiento en términos bioquímicos se asemeja mucho mas a FtsZ en los aspectos estudiados y más aun, el comportamiento que posee BtubA/B en presencia de calcio es opuesto al de tubulina.

Finalmente, estos resultados apoyan la idea de que BtubA/B cumple un rol de soporte estructural en *Prostheco bacter* que estaría relacionado con la determinación de la forma celular alargada a través de la formación de los manojos.

Además proponemos que BtubA/B no realiza las mismas funciones que tienen tubulina y FtsZ , dado que en las condiciones fisiológicas más probables de la bacteria se mantendrían a los filamentos de BtubA/B como manojos estables.

ABSTRACT

Tubulin, the protein that forms the microtubule cytoskeleton, is present in all known eukaryotes, and has never been detected in bacteria and archaea. For this reason, it was considered as a cytoskeletal protein typical of eukaryotes. But over the past 2 decades have found a well-developed bacterial cytoskeleton, proteins that were homologous to the 3 components of the eukaryotic cytoskeleton. Within these findings is the hallmark discovery in the genome of four species of bacterial phylum Proteobacteria the Verrucomicrobia, two new sequences of tubulin btubA and btubB (bacterial tubulin A, B), which shared more sequence identity with the heterodimer of α/β -tubulin than FtsZ, which was considered the prokaryotic homolog of tubulin.

The first biochemical characterizations showed that BtubA/B forms a heterodimer that polymerizes in the presence of GTP, and does so in equimolar amounts and alternating BtubB BtubA and forming helical filaments composed of two protofilaments similar to those of tubulin and FtsZ. It also has an independent folding chaperones such as FtsZ. Based on these characteristics, it was postulated that genes acquired Proteobacteria BtubA/B by horizontal gene transfer from a primitive eukaryote. However, the function is still unknown and only think that would have a role in maintaining cell shape, which in the particular case of the genus have a prostheca Proteobacteria to be an extension of the cell to increase the absorption surface.

For this reason, characterized *in vitro*, polymerization of BtubA/B in terms of potassium and calcium in case of tubulin and FtsZ have different behavior between them and with them to determine which of the homologous proteins was greater similarity in biochemical terms. Based on the results of this report, we determined that increasing the concentration of potassium chloride lowers the critical concentration of polymerization, produces more stable filament and keeps the size of the nucleus of polymerization as a trimer in the concentration range studied. On

the other hand, the GTPase activity increases slightly. The decrease in critical concentration an increase in the number of filaments, and 95 mM KCl generates a lateral interaction between the individual filaments to form bundles of filaments.

Similarly, it was determined that calcium also helps to decrease the critical concentration to produce stable bundles of filaments and significantly reduced GTPase activity, and this effect was even greater than in the case of tubulin and FtsZ. These results show that, despite the high percentage of homology to eukaryotic tubulin and presented BtubA/B, the behavior in biochemical terms are much closer to FtsZ in the areas studied and furthermore, the behavior that has BtubA/B presence of calcium is opposite to that of tubulin.

Finally, these results support the idea that BtubA/B plays a structural support role in *Prostheco bacter* that might be related to the determination of the elongated cell shape through the bundling formation.

Also, we propose that BtubA/B don't do the same functions of tubulin and FtsZ, as in the physiological conditions of the bacteria most likely to be maintained filaments BtubA/B as stable bundles.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Del citoesqueleto eucarionte al bacteriano.

El citoesqueleto es una red compleja y dinámica de los filamentos de proteína altamente integrado, lo que lo hace un regulador clave y un organizador central de muchos procesos celulares eucariontes como la determinación de la forma celular (morfogénesis), la división celular, la segregación, la polaridad, fagocitosis, el movimiento y el tráfico de macromoléculas. Entre sus componentes están los filamentos de actina, los filamentos intermedios (FI) y los microtúbulos (MTs). (Figura 1 A) (Carballido-Lopez, 2006).

Los organismos del dominio Eucaria en algún momento de la evolución, que se estima entre 1000 y 1500 millones de años (Schopf, 1978) adquirieron una complejidad estructural mayor que la de otros dominios. Mas aún, existió la concepción generalizada durante mucho tiempo que el citoesqueleto era una de las características estructurales más importantes que separan al dominio Eucaria del de Bacterias y Archeas, pues se pensaba que sólo se encontraba presente en todos los eucariotas, incluso en el protozoo más primitivo que carece de mitocondrias (Keeling y Doolittle, 1996; Hartman y Fedorov 2002).

Los microtúbulos son polímeros no covalentes esenciales para la sobrevivencia de todos los eucariontes. Entre sus múltiples funciones se encuentran las de separar los cromosomas (Figura 1 B) orientando además el plano de corte de éstos, mediante la formación de una gran red de microtúbulos, organizar el citoplasma, posicionar el núcleo y los organelos y ser el principal elemento estructural de cilios y flagelos (Desai y Mitchison 1997).

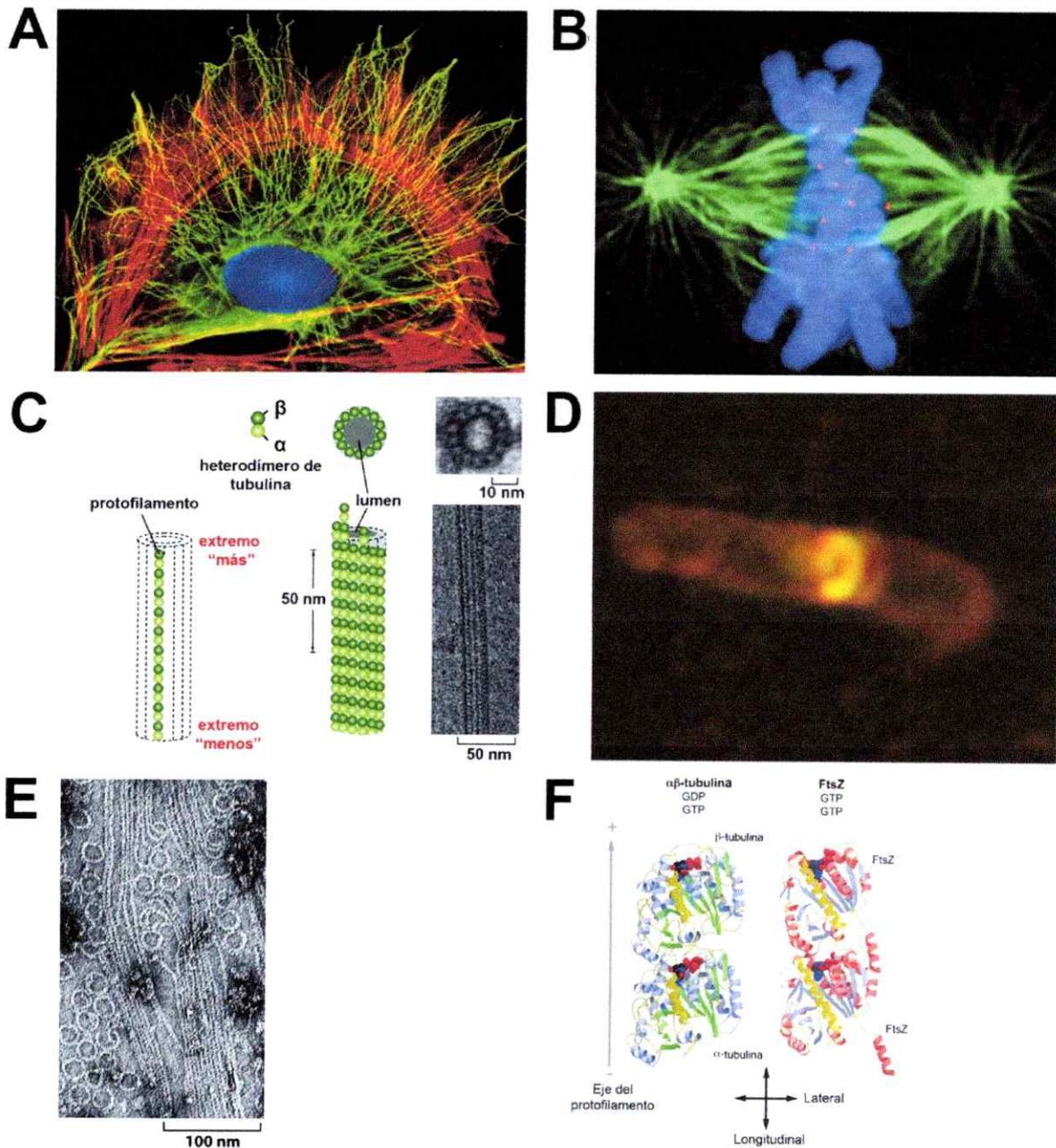


Figura 1 Estructuras y funciones del heterodímero de α/β -tubulina y de FtsZ y sus filamentos.

A. Microfotografía de fluorescencia de una célula con todos los elementos del citoesqueleto eucarionte. Los filamentos de actina se revelaron con un anticuerpo fluorescente rojo, los filamentos intermedios con un anticuerpo fluorescente amarillo y los microtúbulos con un anticuerpo fluorescente verde. **B.** Microfotografía de fluorescencia de una célula en mitosis. El huso de microtúbulos se reveló con un anticuerpo fluorescente verde, los centrómeros con un anticuerpo fluorescente rojo y el DNA de los cromosomas con la sonda fluorescente DAPI. **C.** Esquema de un microtúbulo. La disposición alternada de α/β -tubulina en los

protofilamentos confiere polaridad estructural a los microtúbulos. En la derecha se observa un corte transversal y de una vista completa de un microtúbulo con su estructura helicoidal. En el corte transversal se observan 13 protofilamentos por vuelta (Figuras adaptadas del libro *Molecular Biology of the Cell*, capítulo 16, quinta edición 2008)). D. Microscopía de fluorescencia que muestra una célula de *E. coli* que expresa bajos niveles de FtsZ-GFP y se observa la formación del anillo Z (Figura adaptada de Margolin y col, 1998). E. Microscopía electrónica de filamentos de FtsZ donde se observan filamentos rectos y curvos, además de anillos. F. Estructuras del heterodímero de α/β -tubulina de bovino (izquierda; código PDB 1JFF) (Löwe y col, 2001) y del homodímero de FtsZ de *Methanococcus jannaschii* (derecha; código PDB 1W5A) (Oliva y col, 2004) donde se destacan la posición de los nucleótidos en la parte superior y en la interfaz del dímero. Se muestra el eje longitudinal y lateral del protofilamento.

En éstos microtúbulos, el heterodímero es la subunidad del ensamblaje y está constituido por dos proteínas globulares llamadas α -tubulina y β -tubulina que están unidas por enlaces no covalentes. Los heterodímeros de tubulina interactúan longitudinalmente para formar protofilamentos lineales que lateralmente se asocian con un promedio de 13 protofilamentos paralelos para formar la pared del microtúbulo (Figura 1 C). El polímero resultante posee así una polaridad definida, con dos extremos que son estructural y funcionalmente distintos. Además, la unión e hidrólisis del nucleósido trifosfato GTP determina la dinámica de polimerización y despolimerización de microtúbulos.

La mencionada creencia de que las bacterias carecían de todos estos elementos del citoesqueleto ha cambiado, pues investigaciones realizadas durante las últimas dos décadas han puesto de manifiesto la existencia de un citoesqueleto bacteriano bien desarrollado (Michie y Lowe, 2006). Este hecho se sustenta en la presencia en bacterias de proteínas como FtsZ, que se le considera como un ancestro evolutivo de la tubulina, y MreB con ParM homólogos a actina (Carballido-Lopez, 2006) que se encuentran ampliamente distribuidos en Archeas y Bacterias. La primera proteína identificada fue FtsZ que es una GTPasa citosólica altamente conservada (de Boer y cols, 1992), presente en prácticamente todas las eubacterias y arqueas, que forma un anillo (el anillo Z) en el futuro sitio de citoquinesis y desempeña un papel esencial en la división celular (Figura 1 D) (Bi y Lutkenhaus, 1991). Al analizar esta proteína *in vitro*, se observa que puede formar protofilamentos simples, dobles o incluso manojos de muchos protofilamentos según sea la condición en la cual esté (Figura 1 E) (Bramhill y Thompson, 1994; de Boer y col, 1992; Mukherjee y col, 1993; Mukherjee y Lutkenhaus, 1994; RayChaudhuri y Park, 1992), siendo similares a los de tubulina pero que no se ensamblan en microtúbulos.

La resolución de las estructuras tridimensionales tanto del heterodímero de α - y β -tubulina, mediante cristalización de sábanas inducidas por zinc (Nogales y col, 1998), y posteriormente realizando una superposición estructural (Nogales y col, 1999) y la estructura cristalina de FtsZ (Löwe y Amos, 1998) (Figura 1 F) indica que presentan homología estructural y funcional entre sí. Así, ambas unen

GTP y comparten un mecanismo de activación de la actividad GTPásica dependiente de la polimerización (Nogales, 1999). Sin embargo muestran diferencias en su estructura terciaria que modifican las propiedades de los polímeros. Por ejemplo, los monómeros de α - y β -tubulina forman un heterodímero estable donde el GTP de α -tubulina no hidroliza ni intercambia su nucleótido y se encuentra ubicado en la superficie intradímero mientras que los monómeros individuales de FtsZ pueden tener GTP o GDP en el bolsillo del nucleótido tal como el monómero de β -tubulina. Otra de las diferencias se encuentra en el dominio carboxilo terminal de la proteína, pues la tubulina presenta un par de hélices α extra que terminan en una región de 12 amino ácidos negativamente cargados, que se orientan hacia el exterior de la superficie externa del microtúbulo y unen proteínas asociadas a microtúbulos (MAPS) y proteínas motoras (Nogales y col, 1999).

La tubulina es una proteína homóloga de FtsZ, y es importante destacar que estas proteínas tienen una baja identidad de secuencia (12%), pero las regiones de mayor conservación se encuentran principalmente ubicadas en los sitios de unión de GTP (de Boer y col, 1992). La baja identidad de secuencia entre la α/β -tubulina y la FtsZ no se condice con el hecho que estas proteínas están entre las que más poco han evolucionado del universo de proteínas conocidas (Doolittle, 1995). Además sus funciones celulares son distintas. Esto planteó la necesidad de un nexo entre ellas como otra proteína homóloga en bacterias o arqueas más relacionada con tubulina.

1.2 Hallazgo de la tubulina bacteriana.

A pesar que a lo largo de los años se han publicado numerosas estructuras que se asemejan a microtúbulos en un número superior a las 50 taxas tanto en bacterias como arqueas (Bermudes y col, 1994), todas estas observaciones sólo correspondían a observaciones morfológicas en micrografías y carecían de base genética o molecular. Sin embargo el reporte de una estructura semejante a microtúbulos en un ectosimbionte (epixenosomas) de ciliados del género *Euplotidium* presenta la evidencia estructural más convincente de la presencia de estructuras como microtúbulos en bacterias (Jenkins y col, 2002). Estos

organismos que pertenecen a una división taxonómica de bacterias recientemente descubierta llamada *Verrucomicrobia* han mostrado que poseen estructuras tubulares con un diámetro de 22 ± 3 nm, lo que resulta cercano al tamaño de los microtúbulos eucariontes (25 nm). Estas estructuras tubulares presentaron reacción cruzada con anticuerpos anti-tubulina de paramecios y sensibilidad a drogas que despolimerizan microtúbulos como el nocadozol, y temperaturas menores a 4 C° (Petroni y col, 2000).

En base a estas observaciones se buscó en el genoma parcialmente secuenciado de otra especie de vida libre del phylum *Verrucomicrobia* llamada *Prostheco bacter dejongeei* genes homólogos a los de tubulina. Así se encontraron los genes *btubA* ("bacterial tubulin A") y *btubB* ("bacterial tubulin B") (Jenkins y col, 2002), los cuales se postula habrían surgido a través de transferencia génica horizontal desde un eucarionte primitivo a *Prostheco bacter* (Schlieper y col, 2005). Llama la atención que a partir de una posible transferencia horizontal desde un eucarionte primitivo a *Prostheco bacter* se hayan conservado estos genes, lo que podría indicar que le han sido útiles a la bacteria. Interesantemente, se pensó en un principio que *Prostheco bacter* carecía de FtsZ (Jenkins y col, 2002; Staley y col, 2005). Sin embargo, se logró detectar una secuencia que codificaba para FtsZ en la mayoría de estos organismos usando partidores degenerados para amplificación por PCR. Estas proteínas exhiben la mayoría de las características típicas de FtsZ, por lo que estos hallazgos abren nuevos escenarios sobre la posible evolución del citoesqueleto y la división celular bacteriana (Pilhofer y col, 2007). Por otra parte, aun no se ha podido visualizar la proteína *in vivo* en *Prostheco bacter*, y solo se conoce la expresión del RNAm mediante RT-PCR.

Mediante un alineamiento múltiple entre tubulina de levadura, BtubA/B de *Prostheco bacter dejongeei* y FtsZ de *E. coli* y *Bacillus Subtilis* (Figura 2), se mostró un alto porcentaje de identidad con las proteínas eucarióticas α tubulina (31-35% de identidad con BtubA) y β tubulina (34-37% de identidad con BtubB). Además de esto, el análisis de los motivos conservados específicos de tubulina mostró que BtubA y BtubB poseen cada uno de los 9 motivos específicos de tubulina, frente a aproximadamente 2 a 3 de los 6 específicos de la proteína FtsZ (Tabla 1) (Jenkins

y col, 2002), lo que reafirma la relación más estrecha entre BtubA/B y tubulina que con FtsZ (8-11% de identidad de secuencia).

Tabla 1 Motivos de tubulina y FtsZ identificados en Btub A y Btub B de *Prostheco bacter dejongeei*. (Jenkins y col, 2002)

Subgrupo de tubulina	N° de motivos	Valor p
BtubA		
Tubulina	9 de 9	1.4×10^{-62}
α tubulina	7 de 13	5.9×10^{-17}
ϵ tubulina	4 de 10	1.2×10^{-15}
β tubulina	6 de 13	1.4×10^{-14}
δ tubulina	3 de 12	1.9×10^{-12}
γ tubulina	5 de 8	3.3×10^{-11}
FtsZ	2 de 6	8.3×10^{-6}
BtubB		
Tubulina	9 de 9	1.9×10^{-72}
β tubulina	8 de 13	4.2×10^{-26}
ϵ tubulina	6 de 10	3.3×10^{-19}
α tubulina	5 de 13	2.5×10^{-14}
γ tubulina	4 de 8	1.4×10^{-13}
FtsZ	3 de 6	1.7×10^{-10}
δ tubulina	2 de 12	5.6×10^{-9}

```

Tuba_YEAST      1  --MREVTSINVGQAGCGIGNACWELYSLEHGIRPDCHLEDGLSKPKGGEGFSTFHEHTG
TubB_YEAST     1  --MREIHHISTGCGGNQIGAAFETICGEGHLDENGTYHGHDDIQK---ERLNVYENEAS
bTubB          1  --MREILSIHVGCQGNQIADRFWRLLVLRHGLTEAGTPKEGTNVAAN--ANMEVFHKKVR
bTubA          1  MKVNNITLVVSIQAGGNQIAASFTKTVCLEHGLDPLTGQTAPGVPARGNWSFFSKLGESS
FtsZ_ECOLI     1  -----MFEEMELTN-DAVLRVIGVGGGGG-----NAVEHMRVRI
FtsZ_BACSU     1  -----MLEETNIDGLASLRVIGVGGGGN-----NAVNRMIENEV

Tuba_YEAST     59  YGKFFVPRAIYVDLEPNVIDEVRNCPYKDLEHEEQQLISGKEDAANNVARGHYTVGREIILGD
TubB_YEAST     56  SGKWVPRSINVDLEPGTIDAVRNSAIGNLREEDNYHFGQSSAGNVWARGHYTEGAEILVDS
bTubB          57  DGKYIPRAIYVDLEPGVIARIEGGDMAQLADESCIIRKIPGAANNWARGYNVEGERIIDQ
bTubA          61  SGSYVPRAIMVDLEPSVIDNVK-ATSGSLNLANLISRTEGAGGNFAVGYLGAGREVLPD
FtsZ_ECOLI     35  EG---VEFFAVNTDAQALRKTAVGQTIQIG--SGITKGLGAGAN-----PEVGRNADE
FtsZ_BACSU     36  QG---VEYFAVNTDAQALNLSKAEVRMIG--AKLTRGLGAGAN-----PEVGKKAAPD

Tuba_YEAST     119 VLDRIRKLADQCDGLQGGFLFTHSLGGGTGSGGLGSLLEELLSAEYCKKSKLEFAVYPAQVQV
TubB_YEAST     116  VMDVIRREAECCDSLQGFQITHSLGGGTGSGMGTLLISKIREEFFDRMMATFSVLPSPKT
bTubB          117  IMNVHDAVVEKTKSLOGELLTHSIGGGSGSGLGSLILLERLRQAPKKRIFTFVAPSPDI
bTubA          120  VMSRLDYELDKCDNVGGIIVLHAIAGGTGSGFGALLIESLKEKMGGEIPVLSCAVLRSPQV
FtsZ_ECOLI     84  DRDALRAALEGAD---MVFFIAGCGGTGTGAAPVVAEVAKDLG----ILTVAVVTKRFN
FtsZ_BACSU     85  SKEQHEALKCAD---MVFVTAGMGGGTGTGAAPVIAQIAKDLG----ALTGVVTRFET

Tuba_YEAST     179  STSVVEPYNTVLTHTTLEHADCTFMVDNEALYDMCRNNDIPRPSFANLNNLTAQVVS
TubB_YEAST     176  SOTVVEPYNATLSVHQVVEHSDFTFCIDNEALYDTCQRTMKNQPSYGDNNVSSVMSS
bTubB          177  SDSAVEPYNAIETLQRIIDNADAAVLLDNEALFRIAKSKLERS-PNYMDLNHTMALIMSS
bTubA          180  SVVVEPYNTVFAINTERRSDACLIFDNEALFDLAEKWNIESPTVDDLNLTTEALAG
FtsZ_ECOLI     137  FEGKRRMAFAEQGITE_SRFVDSLITIPNDRLLKVLGEGTISLL-DAFGAANDVLRGAVQ
FtsZ_BACSU     138  FEGRRKQLQAAGGISAMKFAVDTLIVIPNDRILEVDRNTPML-EAFREADVLRQGVQ

Tuba_YEAST     239  VTASLRFPG--SLNVDLNFQNLVVPYPRIFPLVSYSEVLSSKSKAFBESNSVSEITNAC
TubB_YEAST     236  VNTSLRYPG--QLNSDLRLAVNLVFPRLHFVFGYAPLTAIGSQSFRSLTVPEITQQM
bTubB          236  VTASLRFPG--KLNTDLGEYVNLVFPFGNHF LTASFAPMRAPGQGVVRFNFPDIARET
bTubA          240  ITASMRFSGFLTVEITRELLTNLVPQPSLHFLMCAFAPLTPPDRSKFELGTEEMIKSL
FtsZ_ECOLI     196  IAEILTRPG--LMNVDFADVRL-VMSEMGYAMGSGVASGEDRAEBAANMAISSPLEDI
FtsZ_BACSU     197  ISDLIATPG--LIRLDFADVRL-IMSNGSALMGIGIATGENRAEBAARKAISSPLEEA

Tuba_YEAST     297  FEPGNQMVKCDPRDGRYMATCLLYRGDVTRDVRQAVEQVKNKKTQVLVDWCPFTGFRICL
TubB_YEAST     294  EDANKMMAAADPRNCRVLTVAFFFRGKVSVEVEDEMHHKQSKNSDYFVWIPNNVQAV
bTubB          294  EAQDNFTAALIDFTNGVYLSACALFRGDVKAKEVENMAAIR--KSLNFASYVPTGVKLGV
bTubA          300  EDNGSVFAACSMEGRFSTAVLYRGIMEDKPLADALAAAMR-EKLPITYWVPTAFKIGY
FtsZ_ECOLI     253  DLSCARGVLVNIATG-----FDLRLDEFFETVGNTIRAFASDNATVVTGTSLDPDGM
FtsZ_BACSU     254  -IDGAQGVLMNINIG-----TNLSLYEVQEAADIIVASASDQDVNMIFGSVINENL

Tuba_YEAST     357  CYEPPATPNSQLATVDRAVCMASNTSIAEAWKRIDRFDLMLYAKRAEVHWVVGEGMZE
TubB_YEAST     354  CSVAPQG-----LDMAATFIANSISIQELFKRVGDQFSAMFKRKAFLHWYTSCEMDE
bTubB          352  AETAPEG-----FASSGLAVNHEGLAAVFERLNNEDIMFDNHAHTHWYENNVQVSR
bTubA          359  VEQPGIS-----HRKSMVLANNTEIARVLDRIHNEKDLWQRKAFANWYLNEMGSE
FtsZ_ECOLI     303  NDRLRVT-----VVATGIGMDKRFELTLVTKVQVQPVMDRYQQHGMAPLTPQCKPV
FtsZ_BACSU     303  KDEIVVT-----VIATGF-IEQEKDVTKPQPSLNQSIKTHNQSVPKREPKREPEPQQ

Tuba_YEAST     417  GEFTEREDIANLERDVIYEGADSYAESEEF-----
TubB_YEAST     406  LEFSEAESNMNDLVSEVQQQEQEATVEDDEEVDENGDFGAPQNQDEPITENFE-----
bTubB          404  DMMAHAEANTIVNLAQSRDAS-----
bTubA          411  EQINVLKASAQELVQSQVAEESGAKAKVQDSAGDTGMRAAAAGVSDDARGMSLRDLVD
FtsZ_ECOLI     355  AKYVNDNAPQTAKEPDYLDIPAFLRKQAD-----
FtsZ_BACSU     354  QNTVSRHTSQPAD--DILDIPFTFLRNRNKR-----

```

Figura 2 Alineamiento de secuencias de BtubA/B y sus homólogos.

Se tomaron las secuencias de α -tubulina y β -tubulina de levadura, BtubA y BtubB de la bacteria *Prospheobacter dejongei* y FtsZ de *Escherichia coli* y *Bacillus Subtilis* para realizar un alineamiento múltiple con el programa CLUSTALW. Las secuencias destacadas en negro corresponden a aminoácidos idénticos mientras que las secuencias coloreadas grises corresponden a aminoácidos que compartan una polaridad similar.

1.3 Aspectos celulares del filum *Verrucomicrobia*.

Verrucomicrobia, es un filum divergente de bacterias Gram-negativas que habitan los suelos y ambientes acuáticos. Hasta el presente se han reconocido dentro de este filum 6 subdivisiones monofiléticas basados en el estudio de librerías génicas del rRNA 16S (Lee y col, 2009), llegándose a estimar que *Verrucomicrobia* podría llegar a comprender hasta el 10 % de las bacterias totales en el suelo (Wagner y Horn. 2006), aunque muy pocas de éstas son actualmente cultivables. Entre las características de estas bacterias, tal como se mencionó anteriormente está la presencia de estructuras semejantes a los microtúbulos en los epixenosomas (Petroni y col, 2000), y de genes similares a la tubulina eucarionte en el género *Prostheco bacter* (Jenkins y col, 2002). De manera interesante, algunos miembros de *Verrucomicrobia* viven en asociación con eucariontes.

El género *Prostheco bacter*, es llamado así debido a la morfología de las especies que lo componen (*Prostheco bacter dejongei*, *Prostheco bacter vaneervenii*, *Prostheco bacter debontii* y *Prostheco bacter fusiformis*), las cuales producen prostecas. La prosteca es una extensión de la pared celular que contiene citoplasma (Staley, 1968) y que aumenta el área de la superficie de las células. Esto contribuye a un aumento de la respiración y captación de nutrientes, disminución de la sedimentación en ambientes acuáticos y posiblemente la adhesión a sustratos sólidos usando esta estructura (Merker y Smith. 1988). Además, al igual que el filum *Planctomicetes*, algunos miembros de *Verrucomicrobia* como *Prostheco bacter dejongei*, poseen células compartimentalizadas de forma diferente a la organización procarionte clásica (Lee y col, 2009) y que consiste en la separación del citoplasma celular en dos regiones: un gran compartimiento central llamado pirelulosoma que contiene al nucleoide condensado y ribosomas, los que están rodeados por una membrana intracitoplasmática y un segundo compartimiento más periférico que rodea al pirelulosoma, llamado parifoplasma que se ubica entre la membrana plasmática y la intracitoplasmática que carece de ribosomas (Figura 3).

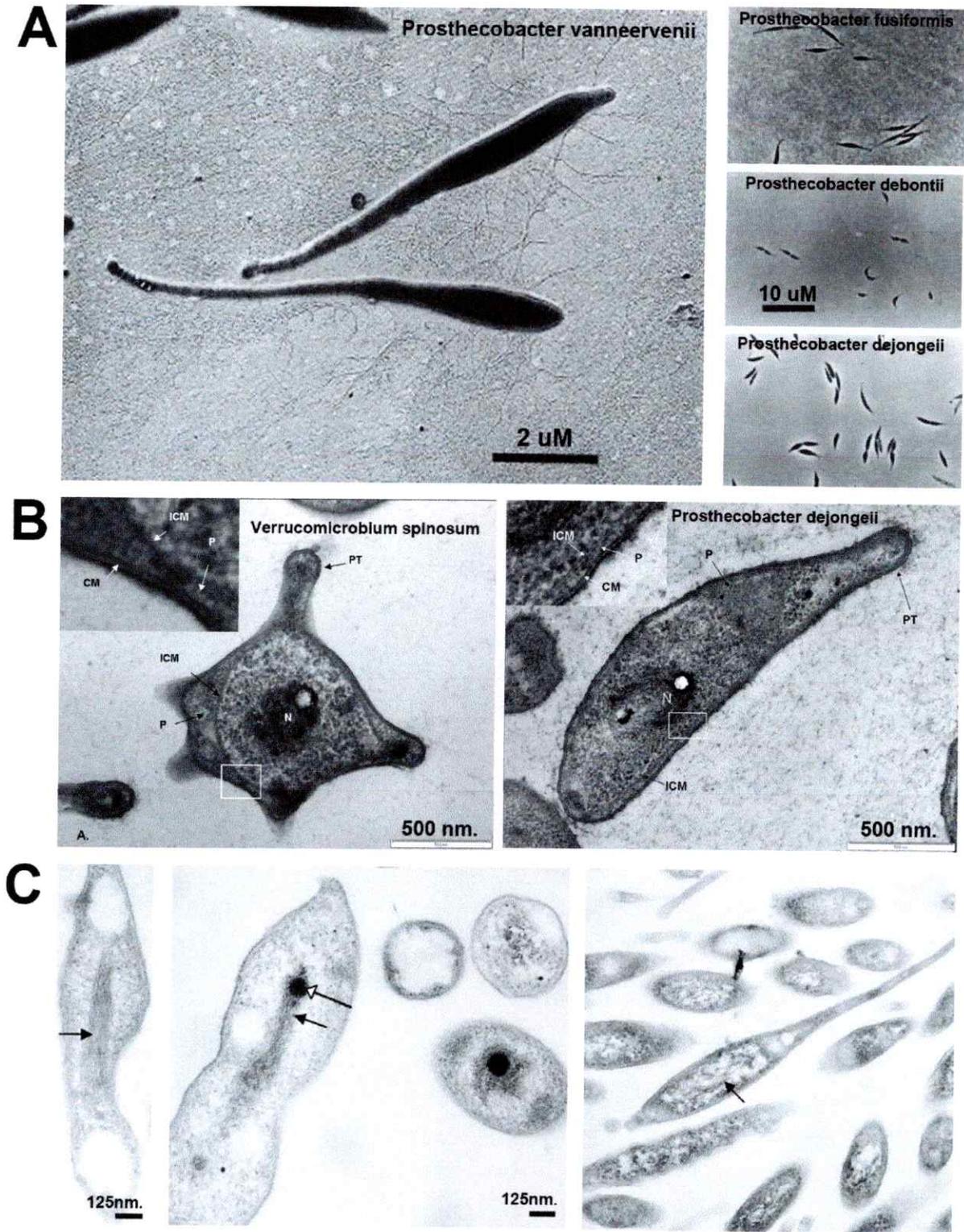


Figura 3. Micrografías electrónicas de especies del filum Verrucomicrobia.

A. Micrografías electrónicas oscurecidas de especies del género *Prostheco bacter*. (Figura adaptada de Hedlund y col, 1997) B. Micrografías electrónicas de transmisión de células del filum *Verrucomicrobia* congeladas a alta presión. Se muestran en estas figuras la prosteca (PT), el Parifoplasma (P), y la membrana intracitoplasmática (ICM), la cual encierra la región del pirelulosoma que contiene un núcleo de fibras condensadas. **Inserto.** Imagen ampliada de los recuadros blancos que muestra la membrana citoplasmática (CM), Parifoplasma (P) y la membrana intracitoplasmática (ICM).(Figura adaptada de Lee y col, 2009) C. Micrografías electrónica de transmisión de *P. debontii*. Las células se fijaron con glutaraldehído/OsO₄⁻ y se tiñeron con acetato de uranilo. Se observan estructuras de protofilamentos, las cuales se ubican como manojos en el centro de la célula (flechas negras) y algunas veces debajo de la membrana. También se observan estructuras electrónicamente muy densas (flecha blanca) que podrían corresponder a acumulaciones de metales (figura adaptada de Pilhofer, 2008)

Aún no se sabe la función que cumpliría la tubulina bacteriana BtubA/B en *Prostheco bacter dejongeeii*, pero se cree que participaría en la mantención de la forma alargada de la célula y no participaría en la división celular, pues *Prostheco bacter* posee la proteína FtsZ (Pilhofer y col, 2008). Sin embargo llama la atención de que el género *Prostheco bacter* haya conservado la tubulina bacteriana a lo largo de su evolución, lo que indicaría que tendría alguna función útil.

1.4 Propiedades bioquímicas y estructurales de BtubA y BtubB.

Debido a la dificultad para cultivar las bacterias de la división *Verrucomicrobia* (sólo unas pocas especies de las mas de 500 que se han encontrado sean cultivables), la función *in vivo* de BtubA/B en *Prostheco bacter dejongeeii* ha permanecido prácticamente desconocida. Por este motivo se clonaron estos genes en cepas de *E. coli* para su expresión, se purificó las proteínas y con esto se obtuvo la estructura cristalográfica de BtubA/B (Schlieper y col, 2005). Sin embargo, la polimerización *in vitro* y su plegamiento sólo han sido parcialmente caracterizados (Sontag y col, 2005).

La estructura cristalina del dímero de BtubA/B obtenida a 3,2 Å de resolución (Figura 4 A) muestra esencialmente un plegamiento similar a la del heterodímero de tubulina, donde aparece el monómero de BtubA (unido a GDP) en una posición análoga de β -tubulina y BtubB (sin nucleótidos) en una posición análoga a la de α -tubulina. Cada monómero muestra los 3 dominios característicos del plegamiento de Tubulina consistentes en un dominio amino terminal, con 6 hebras betas paralelas alternadas entre si por hélices α , un segundo dominio compuesto de 3 hélices α y una sabana beta mezclada y un dominio carboxilo terminal formado por dos hélices antiparalelas que cruzan a lo largo de los otros dominios (Schlieper y col, 2005). Otro aspecto que llama la atención en BtubA/B es que, al igual que FtsZ no requiere chaperonas para su plegamiento (Bertrand y col, 2005), a diferencia de tubulina, que requiere, hasta ahora, del mayor número de chaperonas y cofactores para plegar correctamente el heterodímero funcional (Lewis, 1997).

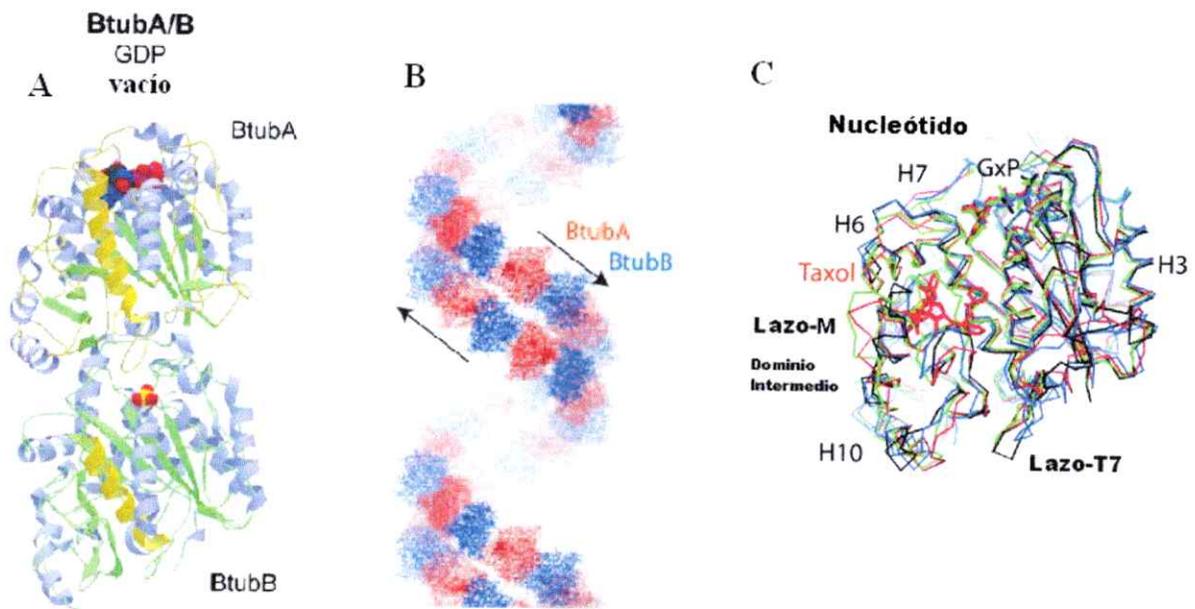


Figura 4. Estructura 3D de BtubA/B.

A. Estructura cristalográfica del heterodímero de BtubA/B a 3,2 Å de resolución. **B.** Empacamiento cristalino de un polímero de BtubA/B donde muestra un protofilamento doble helicoidal. **C.** Superposición estructural de BtubB (negro) con α -tubulina (verde), β -tubulina (rojo) y β -tubulina como complejo staminal-tubulina (azul). (Figura adaptada de Schlieper y col, 2005)

Estudios bioquímicos posteriores demostraron que, en presencia de GTP, BtubA y BtubB forman filamentos simples (Figura 5 A y B) y manojos de filamentos (Figura 5 C) que no corresponden a microtúbulos (Jenkins y col, 1997; Schlieper y col, 2005; Sontag y col, 2005). Sin embargo, los filamentos están formados por dos protofilamentos, similares a los de tubulina y FtsZ. No se sabe si los dos protofilamentos son paralelos o antiparalelos el uno con el otro (Schlieper y col, 2005). A través de ensayos de sedimentación, se determinó que ambas proteínas polimerizan en cantidades equimolares (Figura 5 D), lo que indica que BtubA y BtubB forman un heterodímero y además apoya la idea de que BtubA/B polimeriza de una manera alternada dentro del polímero, similar al heterodímero de α/β -tubulina (Schlieper y col, 2005; Sontag y col, 2005). Poco se sabe sobre la cinética de polimerización de BtubA/B, pero la existencia de una concentración mínima de proteína para polimerizar sugiere un mecanismo cooperativo de ensamblaje (Sontag y col, 2005), que es reversible (Schlieper y col, 2005), pues después de la despolimerización de los filamentos, debido al agotamiento del GTP, es posible iniciar un nuevo ciclo de polimerización adicionando más nucleótido trifosfato (Figura 5 E). Ensayos de inmunofluorescencia con anticuerpos anti-BtubB en la bacteria *Escherichia coli*, que se usó para la sobreexpresión de BtubA/B, mostró que la tubulina bacteriana se ensambla en largos manojos de filamentos que se extienden de polo a polo a lo largo de la bacteria (Sontag y col, 2005), lo que apoya la idea de que la tubulina bacteriana contribuiría de alguna manera a la forma alargada de *Prostheco bacter*.

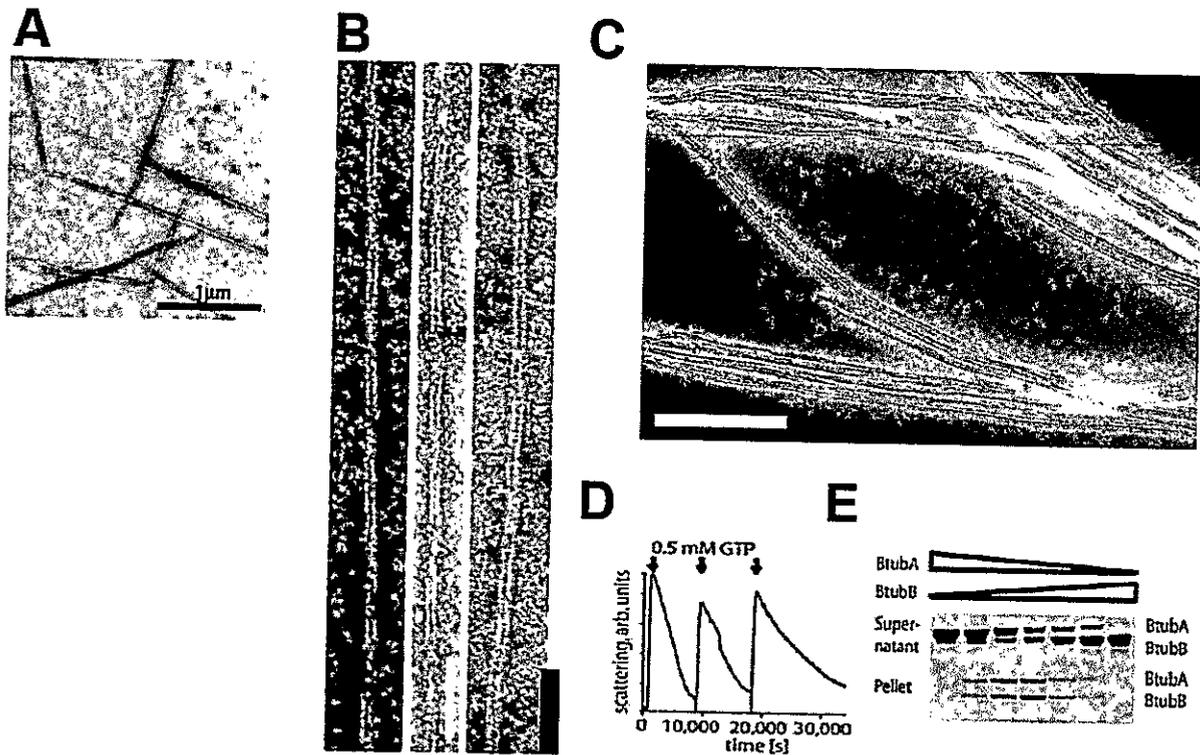


Figura 5. Estructura de los filamentos y propiedades bioquímicas de BtubA/B.

A. Microfotografía de baja magnificación que muestra BtubA/B después agregar GTP. **B.** Filamentos de BtubA/B. Estos son los filamentos más comunes, formados por dos protofilamentos de BtubA/B. La mayoría de los filamentos presentan un giro (izquierda), indicado por puntas de flechas. El filamento en el centro tiene un ancho promedio de 109 Å. Barra de escala: 100 nm. Figuras adaptadas de Schlieper y col, 2005. **C.** Manojos de 4-7 filamentos (Figura adaptada de Sontag y col, 2005) Barra de escala = 200 nm **D.** Ensayo de polimerización por dispersión de luz que muestra que la polimerización de BtubA/B es reversible. **E.** Ensayo de sedimentación con BtubA y BtubB en diferentes proporciones. La polimerización solo ocurre con ambas proteínas presentes y es mayor cuando están en relación 1:1. Figuras adaptadas de Schlieper y col, 2005.

Otros estudios, destinados a dilucidar más características bioquímicas, determinaron que BtubA/B, al igual que los microtúbulos, presentarían polaridad estructural, lo que produce que un extremo del filamento crezca más rápido que el otro. Sin embargo esta polaridad no se extendería a manojos de filamentos, sino que los filamentos se empacarían de una manera mixta. Más aun, también se observó que los filamentos individuales de BtubA/B exhibirían una dinámica denominada "treadmilling", que consiste en el crecimiento por un extremo del filamento y el acortamiento por el otro y también se observó en filamentos individuales el mecanismo de la inestabilidad dinámica, que es el principal mecanismo de ensamblaje de los microtúbulos, que consiste en cambios entre las fases de crecimiento y acortamiento de un extremo del microtúbulo (Díaz, 2010).

Sin embargo, a pesar de encontrar bastantes similitudes bioquímicas entre BtubA/B y tubulina, es posible encontrar algunas diferencias de carácter estructural, surgidas al momento de superponer las estructuras cristalinas (Figura 4 C), entre las cuales se encuentran diferencias en la hélice $\alpha 6$ (H6), en el lazo H1-S2 y en el lazo M, involucrado en las interacciones laterales de los dímeros en el microtúbulo. Este hecho puede ser relevante considerando que, si bien el dímero de BtubA/B polimeriza *in vitro*, como protofilamentos simples (semejantes tanto a tubulina como con FtsZ), estos finamente se empacan como filamentos dobles o bien manojos de filamentos dobles. Por su parte, los heterodímeros de tubulina forman estructuras de 13 protofilamentos, que conforman el microtúbulo.

Estos antecedentes muestran más bien aspectos estructurales de BtubA/B y aún se conocen pocas propiedades bioquímicas, que permitan determinar alguna funcionalidad a esta proteína dentro de la célula. Por este motivo, este seminario de título se enfocó en la caracterización de las propiedades bioquímicas de las proteínas BtubA/B *in vitro* para responder a las interrogantes que se tienen sobre la dinámica de polimerización de sus polímeros dada la gran similitud que tienen con tubulina y FtsZ.

Con este propósito se analizó la dinámica de polimerización de BtubA/B *in vitro* en diferentes condiciones experimentales, que producen efectos similares o

contrarios entre tubulina y FtsZ. Por ejemplo, se sabe que los cationes monovalentes K^+ y Na^+ tienen un efecto diferente sobre la concentración crítica de polimerización de tubulina (Octavio Monasterio, resultado no publicado) y que Ca^{+2} induce su despolimerización (Soto y col, 1993). Para FtsZ, los cationes monovalentes K^+ y Na^+ producen un efecto similar que en tubulina, pero en presencia de Ca^{+2} se induce la formación de manojos de filamentos. También se analizará la actividad GTPásica que presenta comportamientos característicos en las condiciones experimentales antes mencionadas. Los polímeros de BtubA/B se visualizaron mediante microscopía electrónica para analizar la morfología de los filamentos y así establecer similitudes y diferencias entre BtubA/B y sus homólogos.

2. HIPÓTESIS

La proteína BtubA/B, a pesar de poseer mayor similitud estructural con tubulina, presentaría una dinámica de polimerización y actividad GTPásica similar a FtsZ, debido a sus semejanzas funcionales en términos de formación de filamentos y sensibilidad a cationes.

3. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar las propiedades bioquímicas *in vitro* de la proteína BtubA/B y compararlas con sus homólogas tubulina y FtsZ

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Purificar BtubA/B silvestre.
- Determinar el efecto de los iones, potasio y calcio sobre la dinámica de polimerización y actividad GTPásica.
- Determinar el efecto de estos cationes sobre la estructura de los polímeros de BtubA/B silvestre mediante microscopía electrónica.

5. MATERIALES Y MÉTODOS.

5.1 Materiales.

Reactivos: Acrilamida, bis-acrilamida, glicerol, agarosa, Acido deoxicólico y Triton X-100 de Winkler (santiago, Chile). Ampicilina, IPTG, Tris y HEPES de USBiological (Swamscott, Massachusett, EEUU). Cloruro de Potasio, Cloruro de Magnesio hexahidratado, Cloruro de calcio, EGTA SDS y Urea de Merck (Darmstadt, Alemania).Cocktail de inhibidores de proteasas de Sigma-Aldrich (Estados Unidos). PMSF, DTT, Azul brillante de coomasie G-250, lisozima, desosiribonucleasa y beta mercaptoetanol de Sigma (St. Louis, Missouri, EEUU). SDS de appliChem (Darmstadt, Alemania). Acido Acético, etanol y metanol de TLC (Santiago, Chile).Agar, triptona y extracto de levaduras de Difco Laboratories (Detroit, Michigan, EEUU).

Medios de Cultivo.

Medio Luria-Bertrani. Para 1 litro de medio LB se agregó 10 g de bactotripton, 5 g de extracto de levadura, 10 g de cloruro de sodio y se ajusto el pH a 7,5 con hidroxido de sodio 10 N. El medio de cultivo fue esterilizado mediante autoclave. Se agrego ampicilina a una concentración final de 100 ug/mL cuando fue necesario.

Placas de agar-LB al medio líquido LB se agrego agar al 1%. Se agregó ampicilina a una concentración final de 100 ug/mL cuando fue necesario.

Cepas y plasmidios. Se utilizaron las cepas XL10-Gold suministradas por el Kit de mutagénesis sitio-dirigida para almacenar el plasmidio que codifica para la BtubA/B silvestre. También se utilizó la cepa DH5 α para los mismos propósitos de almacenaje. Se utilizó la cepa de *E .coli* BL21(Δ DE3) PLYS para sobreexpresar las proteínas silvestre y recombinantes. El plasmidio que codifica BtubA/B esta bajo el promotor T7 de tipo pET y fue donado por Daniel Schlieper (Universidad de Cambrigde) y posee resistencia para ampicilina.

5.2 Métodos.

5.2.1 Preparación de células electrocompetentes

Las células aptas para la transformación en electroporación (electrocompetentes), se prepararon a partir de un cultivo bacteriano en fase exponencial de crecimiento. Para ello, se tomó con un asa estéril la cepa de *Escherichia coli* BL21PLysS (λ DE3) guardada a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, y se sembró en una placa de LB agarosa. Después de incubar la placa por 24 h a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, se seleccionó una única colonia individual y se inoculó en 5 mL de medio LB por 24 hr a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ y agitación constante. Al siguiente día, se tomó 2 mL de cultivo y se inoculó en 200 ml de medio LB fresco y se incubó con agitación constante a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta alcanzar una DO_{600} entre 0,6-0,7 (fase exponencial de crecimiento). Las células se cosecharon mediante centrifugación a 7000 rpm por 10 min en tubos "Falcon" de 50 mL fríos. Se descartó el sobrenadante y el precipitado bacteriano obtenido se suspendió en glicerol 10 % usando un "vortex". La resuspensión se centrifugó a 7000 rpm por 10 min. La cosecha y centrifugación se realizó tres veces.

Terminados los lavados, las células se resuspendieron con parte del sobrenadante que quedo en el tubo después del último lavado en la centrífuga y se alicuotaron en tubos eppendorf en volúmenes de 25 μl para ser guardados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su posterior uso.

5.2.2 Transformación de cepas BL21 PLysS (λ DE3) con el plasmidio que contiene el gen de BtubA/B silvestre.

Para la transformación, se utilizó el método de electroporación. Para ello se utilizó un equipo Gene Pulser (Biorad) acoplado a un controlador de pulso. El equipo se preparó configurando el voltaje a 2500 V, la resistencia a 200 Ohms y con 25 μF de capacitancia. Las células electrocompetentes BL21 PLysS (25 μl) se descongelaron en hielo y se mezclaron con 1 μl de DNA plasmidial que contiene BtubA/B silvestre en una cubeta de electroporación de 0,2 cm de separación entre electrodos. Este plasmidio fue previamente extraído con el "kit" comercial de purificación *Plasmid Miniprep Kit 1* (Omega Biotek) desde células XL10. Inmediatamente realizada la electroporación, se le agregó a la cubeta 1 mL de

medio LB para suspender las células y se incubaron a 37 °C por 1 h con agitación constante. Las células transformadas se crecieron en placas LB suplementadas con ampicilina (100 µg/ml). Las placas se incubaron durante 24 h a 37 °C.

5.2.3 Sobreexpresión de las proteínas α BtubA/B silvestre mediante amplificación de cepas BL21 λ DE3 transformadas.

Para la sobre-expresión de estas proteínas se tomó una colonia de la placa de selección de la electroporación con BL21 PLysS y se incubó en 50 mL de medio LB suplementado con ampicilina (100 µg/ml) durante toda la noche con agitación constante a 37 °C. Al día siguiente, con este cultivo se inoculó 1 L de medio LB suplementado con ampicilina a una misma concentración y se dejó creciendo con agitación constante a 37 °C. Una vez alcanzada una DO_{600} aprox. de 0,7 se adicionó IPTG (isopropil- β -D-tio-galactósido), a una concentración final de 0,3 mM para inducir la sobre-expresión de la proteína y se mantuvo creciendo por 4 h con agitación constante a 37 °C. El cultivo se centrifugó a 5000 rpm por 40 min y el precipitado se resuspendió en 30 mL de buffer de polimerización (HEPES 50 mM, $MgCl_2$ 5mM, KCl 0,5M) por cada litro de cultivo. La suspensión celular, proveniente de 2 L de inducción, se colocó en 1 tubo Falcon de 50 ml, y se centrifugó a 8000 rpm por 10 min. Este procedimiento fue repetido 3 veces a modo de lavado y posteriormente se guardaron a -80 °C para su próximo uso.

5.2.4 Purificación de proteínas BtubA/B silvestre.

El precipitado final (después del lavado) es resuspendido con 15 mL de buffer de polimerización sin KCl (HEPES 50mM, $MgCl_2$ 5 mM) y es traspasado a un vaso de precipitado de vidrio al que se agrega una pastilla de coctel de inhibidores de proteasa (Sigma-Aldrich) que se agita hasta su completa disolución. Luego de esto se procede a la ruptura celular y del DNA mediante la sonicación del cultivo con 6 pulsos de 30 segundos y pausas de 1 minuto con una potencia (output) de 7 (misonix Sonicator) en hielo para evitar el sobrecalentamiento.

Posteriormente el lisado es traspasado a tubos de 10 mL los que son equilibrados en peso entre si y llevados a ultracentrifugar a 100.000 x g durante 1

hora a 4C°. Terminado este tiempo se rescató el sobrenadante, se midió su volumen y se descartó el pellet. A éste sobrenadante se le agregó KCl a una concentración final de 0,5M. Esta solución se dejó en temperatura ambiente por 15 minutos y luego se agregó GTP a una concentración final de 1 mM para inducir la polimerización de BtubA/B y se ultracentrifugó nuevamente a 100.000 x g por 15 minutos a 25 C°. Se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en hielo con 2-4 volúmenes de buffer de polimerización sin KCl y se dejó en hielo durante 15 minutos con el fin de favorecer la despolimerización de la proteína. Luego de esto se centrifuga la solución a 35.000 x g durante 15 minutos donde se traspara el sobrenadante a un tubo limpio y se descarta el pellet que consiste en agregados de proteína no funcionales. Se le midió el volumen a este sobrenadante y se completó la solución con KCl a una concentración final de 0,5M. Con este proceso se completo 1 ciclo de polimerización/despolimerización de la proteína. Estos ciclos de polimerización inducidos por GTP y despolimerización inducidos por frío, eliminación de KCl, y eliminación de cuerpos de inclusión se repitió 3 veces.

Al final del tercer ciclo, en el momento de resuspender el pellet con 2-4 volúmenes de buffer de polimerización sin KCl en hielo, se dializó el sobrenadante contra 1 Litro del mismo buffer de polimerización sin KCl durante toda la noche con el fin de ir eliminando el exceso de GTP de la solución. Las muestras se guardaron en alicuotas de 20 uL a -80C° para su posterior uso.

5.2.5 Cuantificación de BtubA/B silvestre obtenida en la purificación.

Para conocer la concentración de BtubA/B obtenida durante su purificación se uso la espectroscopía de absorbancia. Esta absorbancia es una función lineal de la concentración molar c tal como lo menciona la relación de Lambert-Beer:

$$A = \epsilon \times l \times c$$

Donde ϵ es el coeficiente de extinción molar que indica cuanta luz absorbe una proteína a una determinada longitud de onda y l es la longitud de la celda.

Es importante destacar que el coeficiente de extinción molar de cualquier proteína varía no sólo dependiendo de la composición sino además del estado de plegamiento de ésta y de la contribución de ligandos que pueda presentar la proteína como el GTP o GDP en este caso. Por este motivo, al momento de obtener el coeficiente de extinción molar de la proteína se debe tener en cuenta que hay una contribución de los nucleótidos que contenga el heterodímero de BtubA/B que puede ser 2 moléculas de GDP, dos de GTP o 1 de cada una, lo que complica el cálculo. Para solucionar este problema, se descongeló la proteína que se uso para los ensayos y se incubo con GTP 1 mM durante 1 hora y luego se paso por una columna de cromatografía de exclusión molecular para eliminar el GTP libre. Teniendo esta proteína, se sumaron las contribuciones de BtubA ($47.900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), BtuBB ($39.880 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), calculados a partir de sus secuencias de aminoácidos (Pace y col, 1995) además de las dos moléculas de GTP que tiene un coeficiente de $7987 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 280 nm cada una, lo que dio un coeficiente de extinción molar de $103.754,2 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ que se ocupó para obtener la concentración de proteína que se descongela para realizar los experimentos usando la ley de Lambert-Beer.

5.2.6 Ensayos de cinética de polimerización mediante dispersión de luz.

La polimerización de BtubA/B fue medida mediante dispersión de luz a 90° en un espectrofluorímetro Perkin-Elmer LS-50B usando una longitud de onda de excitación y emisión de 350 nm, anchos de banda de excitación y emisión de 5 nm y un filtro de transmisión de 4%. A partir de una solución de BtubA/B proveniente de la purificación (400 μM aprox.) en amortiguador de polimerización sin KCl (HEPES 50 mM pH7.0; MgCl_2 5 mM), se preparó una solución de BtubA/B a una concentración final de 20 μM en amortiguador de polimerización con KCl 25 o 100 mM según sea el caso. La preparación de esta solución 20 μM produjo una dilución del KCl de un 5%, lo que produce una concentración final de KCl de 24 y 95 mM, respectivamente, tanto para las medidas de dispersión de luz como para los demás ensayos. Para las demás concentraciones usadas se tomó la muestra de BtubA/B a 20 μM y se diluyó en serie al 75 % de su valor inicial, obteniendo concentraciones de 15; 11,25; 8,44; 6,33; 4,74; 3,56; 2,66; 2,0 y 1,5 μM según corresponda. Para el caso de las muestras que además de tener KCl (ya sea 24 o 95 mM), contengan calcio, se tomó una solución stock de CaCl_2 1 M preparada con el amortiguador HEPES 50 mM MgCl_2 5 mM y se adicionó a las soluciones con proteína en sus respectivas concentraciones para obtener una solución con 5 mM de CaCl_2 . Para las soluciones a menor concentración de calcio, se realizó diluciones seriadas al 50 % del valor inicial a la solución stock 1M, para obtener concentraciones de CaCl_2 de 0,5; 0,25; 0,125; 0,063 y 0,032 M y con éstas preparar las muestras con menor concentración de CaCl_2 . Estas muestras fueron previamente puestas durante 5 minutos a temperatura ambiente y luego se pasó a una cubeta de cuarzo de 500 μL y 1 cm de paso óptico que se introdujo a la cámara de la cubeta del espectrofluorímetro donde se dejó por otros 5 minutos a 25°C mediante un baño con circulación de agua. Transcurrido este tiempo se inició la medición de dispersión durante 5 minutos para establecer la línea base e inmediatamente después se sacó la cubeta y se agregó GTP a una concentración final de 1mM. Se invirtió suavemente 3 veces antes de devolver a la cámara. El tiempo transcurrido entre la adición del nucleótido y la medición era de 15 segundos aproximadamente. Transcurrido este tiempo, el cambio neto en la dispersión de

luz una vez adicionado el GTP fue graficado en función del tiempo y los datos fueron colectados cada 1 segundo.

5.2.7 Obtención del tamaño del núcleo.

Teniendo en cuenta que BtubA/B es un homólogo de tubulina eucarionte y FtsZ y que estas son proteínas que polimerizan en largos filamentos para múltiples funciones celulares, es lógico pensar que BtubA/B presente las siguientes fases de polimerización en relación al tiempo.

Fase "lag" o latencia que corresponde a la fase inicial del proceso donde los primeros heterodímeros pueden ensamblarse espontáneamente, aunque éstos son inestables y se desensamblan rápidamente debido a que cada heterodímero está unido a muy pocos otros heterodímeros (Alberts, 2008). Para que un filamento se forme es necesario que las subunidades se ensamblen en un agregado inicial, llamado núcleo, el cual es estabilizado por los contactos de suficientes subunidades. Así, el proceso inicial de formación de este núcleo se denomina nucleación, y dada la dificultad de formación de este, el tiempo de formación del núcleo puede tomar algún tiempo dependiendo del número necesario de heterodímeros que conformen el núcleo.

La fase de elongación ocurre cuando el núcleo se ha formado y por lo tanto ocurre una rápida adición de las subunidades en uno o ambos extremos del filamento y que produce la extensión de éste.

La fase de equilibrio o fase estacionaria se refiere al momento en que el sistema alcanza un estado donde se establece un balance entre la adición de subunidades por parte de los extremos del filamento y la salida de subunidades por parte del mismo o el otro extremo del filamento.

Para analizar el proceso de nucleación, se puede recurrir a ciertos parámetros. Por ejemplo la determinación de la décima parte del tiempo de polimerización ($t_{1/10}$) (tiempo necesario para producir el 10% de la cantidad total de polímero) es un tiempo usado para estimar el tiempo de latencia. Más aún, de acuerdo a modelos teóricos se pueden encontrar algunos parámetros para caracterizar el tamaño del núcleo. Uno de los parámetros llamado "q" se origina

desde la teoría de agregación helicoidal de macromoléculas desarrollada por Oosawa. Para el caso de la polimerización de actina, se demostró que el tiempo medio de polimerización ($t_{1/2}$) era proporcional a $[Mo]q$, siendo $[Mo]$ la concentración inicial de Monómeros (Oosawa y Kasai, 1962) y q una constante de proporcionalidad que da una estimación del número de subunidades en el núcleo crítico. Este parámetro "q" puede ser obtenido a través del gráfico del doble logaritmo entre el décimo tiempo de polimerización (t_{10} en lugar de $t_{1/2}$) versus la cantidad total de proteína en el polímero. Existe discrepancia acerca del valor que se obtiene a partir de este gráfico ya que por un lado algunos autores establecen que se obtiene la mitad del valor del tamaño del núcleo crítico ($n/2$) (Tobacman y Korn, 1983) mientras que otros (Voter y Erickson, 1984) establecen que se obtiene un valor de $([n+1]/2)$. Esta diferencia es más bien una interpretación de la definición de núcleo, entendida ya sea como el primer polímero que es por sí mismo más estable que el precursor (Tobacman y Korn, 1983) o bien, como el intermediario estable más pequeño (Voter y Erickson, 1984).

Otra forma de aproximación al tamaño del núcleo es el desarrollado por Nishida quien estudio la cinética de polimerización de polimerización de actina separando las fases de nucleación y elongación. Mediante su estudio determinó que durante el proceso de nucleación, el número de núcleos que se establecen se mantiene constante cuando se pasa a la fase de elongación. Con esta suposición se estima el tamaño del núcleo relacionando la concentración de actina, la constante de polimerización, la velocidad máxima de polimerización y el tiempo medio de polimerización (Nishida y Sakai, 1983). El tamaño del núcleo por este método se obtiene a partir del gráfico de doble logaritmo entre la concentración de proteína en el polímero versus la velocidad máxima de polimerización normalizada por la intensidad máxima de polimerización. (Derivación de la formula en apéndice 1).

5.2.8 Análisis del mecanismo de elongación.

Del mismo modo que podemos determinar el tamaño del núcleo crítico enfocándonos en el proceso de nucleación, es posible enfocarse en el proceso de

elongación para determinar como ésta es afectada en las distintas condiciones. Para esto debemos seleccionar aquellas curvas que tengan cantidades equivalente de proteína disponible para generar polímeros. Esto se determinó de acuerdo con la diferencia entre la concentración inicial de proteína y la concentración crítica ($C_0 - C_c$). Los datos de dispersión de luz se normalizaron a partir de sus propias intensidades máximas de tal modo que todas éstas curvas estén en el mismo rango de dispersión entre 0 y 1. Con estas curvas se pudo comparar la cinética de elongación hasta alcanzar el estado estacionario.

5.2.9 Ensayos de sedimentación a alta velocidad.

Para los ensayos de obtención de concentración crítica a partir de sedimentación, la preparación de muestra se realizó exactamente como se describe en la sección 5.2.6 en relación con la presencia de diferentes concentraciones de KCl, BtubA/B y CaCl_2 . Una vez preparadas las muestras se agregó GTP a una concentración final de 1 mM y se traspasó 50 μL a tubos Beckmann de 200 μL para ultracentrifugar a $100.000 \times g$. Con el fin de obtener los máximos estados de polimerización, se tomaron los valores de máxima dispersión de luz obtenidos previamente (Figura 8 y 9) y con esto se colectaron muestras durante 1,5 minutos después de agregar el GTP para KCl 24 mM sin calcio, 10 minutos después de agregar el GTP para KCl 95 mM sin calcio y 20 minutos después de agregar el GTP para 25 y 95 mM de KCl con CaCl_2 1,25 mM, que corresponden a sus máximos estados de polimerización.

Para los ensayos de sedimentación a distintas concentraciones de calcio se preparó, a partir de una solución de BtubA/B 200 μM (HEPES 50 mM pH 7.0; MgCl_2 5 mM) la proteína a una concentración final de 10 μM en amortiguador de polimerización a concentraciones de 25 o 95 mM de KCl. La preparación de esta solución 10 μM también produjo una dilución del KCl de un 5% con respecto al valor que se indica. Para los ensayos con calcio se tomó la solución "stock" de CaCl_2 1M y se completó el volumen de las soluciones de proteína para aquellos ensayos a 5mM de calcio. Para los ensayos de concentraciones más diluidas de calcio se realizó diluciones seriadas al 50 % de su valor inicial a la solución stock

de CaCl_2 , con el fin de mantener el mismo volumen adicionado que el caso de 5 mM, tal como los ensayos de sedimentación para obtener la concentración crítica. Una vez que se prepararon todas las soluciones con proteína con las distintas condiciones de KCl (24 y 95 mM) y calcio (0,625 - 5mM), se agregó GTP a concentración final de 1 mM y se fueron sacando alícuotas de 50 μL a 0, 20, 40, 80, 160 y 320 minutos luego de agregar el GTP. Estas alícuotas se pasaron a tubos Beckmann de 200 μL y se ultracentrifugaron a $100.000 \times g$ durante 15 minutos y temperatura ambiente.

Terminado ese tiempo se traspasó el sobrenadante a tubos nuevos y el precipitado se resuspendió en 50 μL de buffer de polimerización (HEPES 50 mM pH 7.0, MgCl_2 5 mM) sin KCl mediante "vortex" y pipeteo. Finalmente se tomaron 10 μL de cada una de las muestras de sobrenadante y pellet y se corrieron en SDS-PAGE junto a las muestras totales de proteínas que resultaban de la preparación inicial. Una vez corridos los geles, se tiñeron con Azul brillante de Coomassie G250 y se cuantificó la cantidad de proteína en el sobrenadante y en el precipitado a partir de las muestras totales de proteína de concentración conocida.

Para cuantificar la masa del precipitado para los ensayos de concentración crítica y de sedimentación a distintas cantidades de calcio, se escaneó los geles y las imágenes se analizaron mediante el programa ImageJ. La imagen fue transformada a escala de grises de 8 bit, se le sustrajo el "background", y se invirtió los colores. Con esta imagen el programa puede dar un valor de intensidad a cada una de las bandas que se encuentran en el gel y que es proporcional a la cantidad de proteína cargada. En todos los geles se dejan algunos carriles con cantidades conocidas de proteína cargada, con el propósito de construir una curva de calibración graficando la intensidad de la banda vs la masa de proteína.

5.2.10 Actividad GTPásica.

Se determinó la actividad GTPásica de BtubA/B mediante el ensayo de verde de malaquita catalizada con molibdato de amonio que mide la liberación de fosfato inorgánico liberado (Gedalopoulos y col, 1991). Su determinación se

realizó en amortiguador HEPES 50mM pH 7.0, $MgCl_2$ 5 mM y 24 o 95 mM de KCl según corresponda y todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente. La preparación de las muestras en ausencia y en presencia de calcio se realizó del mismo modo que con los ensayos de dispersión de luz. Antes de iniciar las reacciones, las soluciones se dejaron en temperatura ambiente durante 5 minutos y luego se inició la reacción agregando GTP a una concentración final de 1 mM. La reacción se incubó a tiempos de 0, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60 y 90 minutos. Para detener la reacción de hidrólisis de GTP en los tiempos deseados, se tomaron alícuotas de 10 μ L de solución y se depositaron en tubos eppendorf que contenían 150 μ L de ácido perclórico 0,309 M. Estas reacciones así detenidas eran dejadas en hielo hasta que todas las muestras fueran colectadas. Inmediatamente después se traspasaban todas las muestras a placas de 96 pocillos y a cada muestra se le agregó 40 μ L de solución colorante de verde de malaquita con molibdato de amonio mientras la placa se mantuvo en hielo. Esta solución colorante corresponde a una mezcla de 10 mL de la solución de verde de malaquita; 2,5 mL de la solución de molibdato de amonio al 15% en H_2O nanopura y 0,5 mL de solución de Tween 20 al 11%. Una vez agregado la solución de verde de malaquita se dejó la placa a temperatura ambiente durante 25 minutos. La medición de fosfato inorgánico (Pi) liberado es determinado mediante la medición de la absorbancia de las muestras a 630nm. La curva de calibración se construyó con fosfato inorgánico monobásico disuelto en agua nanopura y tuvo un rango lineal entre 0,5 y 3 nmoles de fosfato inorgánico. Se determinó la velocidad de hidrólisis de GTP de las distintas condiciones a partir de las pendientes de las curvas de progreso mientras se mantuvieran en el rango lineal. Para determinar la constante catalítica k_{cat} , se graficó las velocidades de hidrólisis de GTP en función de la concentración de BtubA/B. Para realizar los gráficos de Dixon, se usó los recíprocos de k_{cat} , y se graficó vs la concentración de $CaCl_2$

1. Solución "stock" de verde de malaquita 1,32 mM en H_2SO_4 3,1 M: agregar 8,3 mL de H_2SO_4 al 95% a 41,7 mL de agua nanopura. Esperar que se enfríe y agregar 61 mg de verde malaquita.

5.2.11 Visualización de polímeros mediante microscopía electrónica

Con el fin de asegurar la presencia de polímeros de BtubA/B en todas las condiciones estudiadas, se prepararon concentraciones de proteína que estuvieran sobre su concentración crítica. Por esta razón se preparó 100 μ L BtubA/B 8,44 μ M para todas las condiciones de KCl (25 y 100 mM) y calcio (0 y 1,25 mM), mediante diluciones seriadas y se polimerizó la proteína con GTP 1 mM a temperatura ambiente. Para observar los polímeros en su máximo estado de polimerización, se tomaron como referencia las curvas de dispersión de luz y después de 1,5 minutos, para KCl 24 mM sin calcio; 20 minutos para KCl 24 mM y calcio 1,25 mM ; 10 minutos para KCl 95 mM y 15 minutos para KCl 95 mM calcio 1,25 mM se adicionó 10 μ L de la mezcla de la reacción a una grilla de cobre cubierta con carbón. Después que las grillas se lavaron tres veces en el amortiguador de polimerización respectivo, se tiñeron negativamente con acetato de uranilo al 2%. Las imágenes de las muestras se obtuvieron a 25°C en un microscopio electrónico y con una magnificación de 46.000X.

Una vez obtenidas las imágenes, se midió el ancho promedio de los filamentos obtenidos de todas las condiciones. Para ello se escanearon las fotografías y se uso el programa ImageJ para la determinación. Para todos los casos se tomaron 8 filamentos para establecer el promedio.

6. RESULTADOS

6.1 Expresión y purificación de Btub A/B silvestre.

Los plasmidios que codifican para la proteína silvestre, se transformaron en la cepa de *Escherichia coli* BL21 PLysS (ADE3) para sobreexpresar y purificar las proteínas correspondientes, como se indica en Materiales y Métodos. Se escogió una colonia de cepa transformada con la proteína y se verificó mediante SDS-PAGE la sobreexpresión de las éstas (Figura 6 A).

La purificación de BtubA/B, se hizo con el protocolo de purificación descrito en Materiales y Métodos, y para comprobar la pureza de BtubA/B en cada una de las etapas de purificación de la proteína se analizaron éstas en un gel SDS-PAGE. La figura 6 B muestra un enriquecimiento de la proteína BtubA/B silvestre al eliminar los contaminantes.

En el carril 8 de la figura se observa que después de tres ciclos de polimerización/despolimerización se obtienen ambas proteínas prácticamente puras.

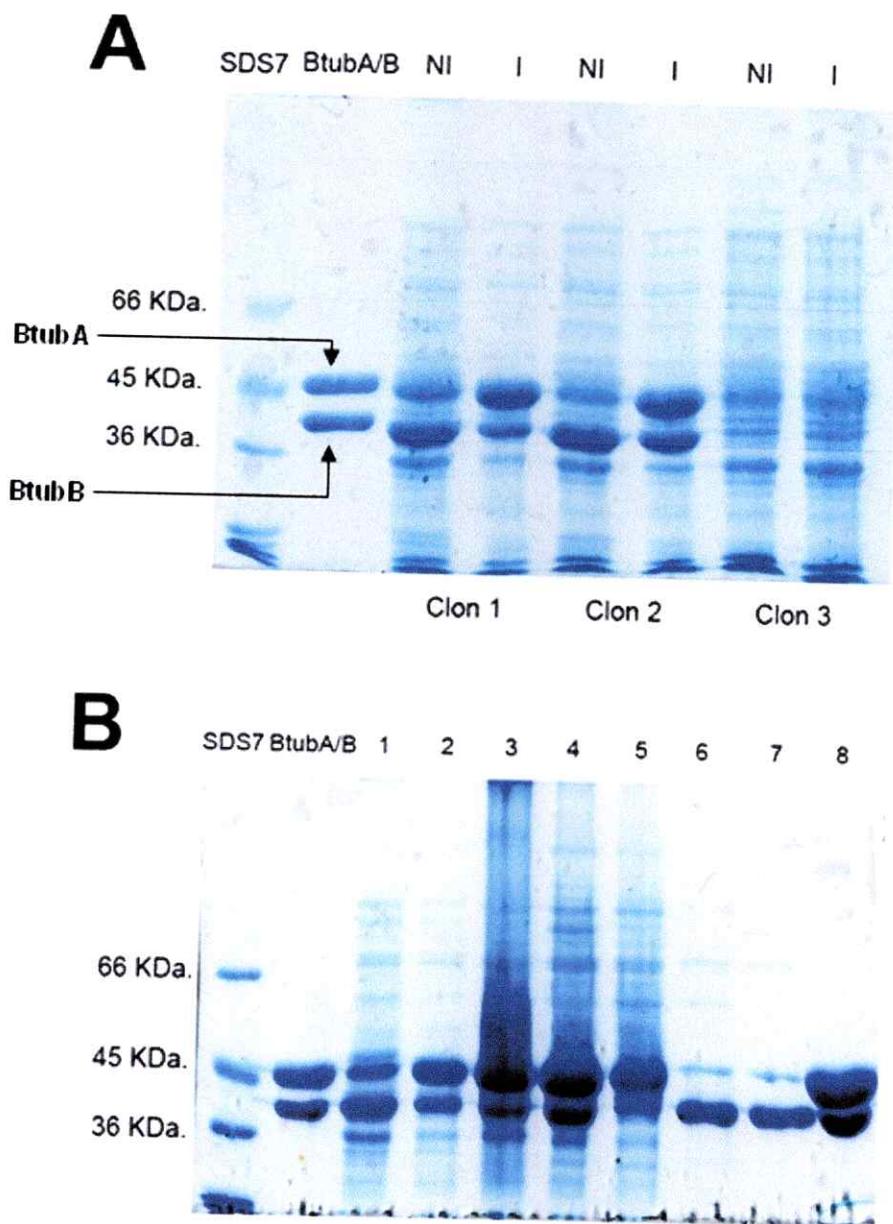


Figura 6. SDS-PAGE de sobreexpresión y purificación de BtubA/B.
A. Ensayo de sobreexpresión de 3 clones de células de *E. coli* BL21(λ DE3)PLysS. Los clones 1 y 2 presentan el plásmido con los genes de BtubA/B mientras que el clon 3 no lo tiene. NI; células no inducidas con IPTG. I; Células inducidas con IPTG a una concentración final de 0,3 mM. **B.** Alícuotas de los pasos de purificación de BtubA/B. **Carril 1:** células del ensayo de sobreexpresión no inducidas. **Carril 2:** Células del ensayo de sobreexpresión inducidas con IPTG. **Carril 3:** Extracto celular total del cultivo sonicado. **Carril 4.** Sobrenadante de la ultracentrifugación de las células sonicadas. **Carril 5.** Sobrenadante del primer ciclo de polimerización/despolimerización. **Carril 6.** Sobrenadante del segundo ciclo de polimerización/despolimerización. **Carril 7.** Sobrenadante del tercer ciclo de polimerización/despolimerización. **Carril 8.** Precipitado de proteína resultante del tercer ciclo de polimerización/despolimerización.

6.2 Cinética de polimerización de BtubA/B.

Se ha descrito anteriormente que la proteína BtubA/B polimeriza de manera dependiente de GTP para formar filamentos dobles y manojos de filamentos dobles que miden hasta algunos micrones de largo, dependiendo de las condiciones de pH y KCl del medio. Estos otorgan turbidez a la solución, que se puede seguir por dispersión de luz, que es un método conveniente para observar la cinética de polimerización en tiempo real y así caracterizarla (Mukherjee y Lutkenhaus, 1998).

Con este ensayo se observó que BtubA/B polimeriza al agregar GTP y que la turbidez muestra un rápido aumento hasta alcanzar un máximo cuyo valor depende en forma directa de la concentración del nucleótido. Después se observa el proceso de despolimerización, cuya velocidad disminuye al aumentar la concentración de GTP (Fig. 7A). En esta misma figura se observa que a las mismas concentraciones de GTP utilizadas a KCl 95 mM hay un aumento (de aproximadamente 4 veces del máximo de polimerización con respecto a KCl 24 mM, confirmando los resultados de Mukherjee y col, (1993).

Recientemente se ha publicado un trabajo del laboratorio del Dr. José Manuel Andreu (Martin-Galeano y col, 2011) donde prueba diferentes condiciones para la polimerización de BtubA/B. Entre ellas cabe destacar la acción de calcio, que se comporta como un activador de la polimerización. Sin embargo no da mayores detalles de su comportamiento. Este catión es muy interesante, pues su efecto ha sido estudiado en dos de las proteínas de la familia de las tubulinas, FtsZ y el heterodímero de alfa y beta tubulina en eucariontes: en el primer caso induce la formación de manojos de filamentos y en el segundo inhibe la polimerización de microtúbulos. Nuestros resultados en la figura 7B muestran que para BtubA/B, el calcio aumenta la dispersión de luz y modifica algunas fases como nucleación y despolimerización después de inducir por GTP su polimerización. Este resultado también fue observado en el trabajo del Dr. Andreu. Para confirmar el efecto de calcio se hizo un control con EGTA (Fig. 7C) para eliminar cualquier traza de calcio proveniente de la muestra proteica. Se concluye que calcio estimula la polimerización al igual que lo hace con FtsZ.

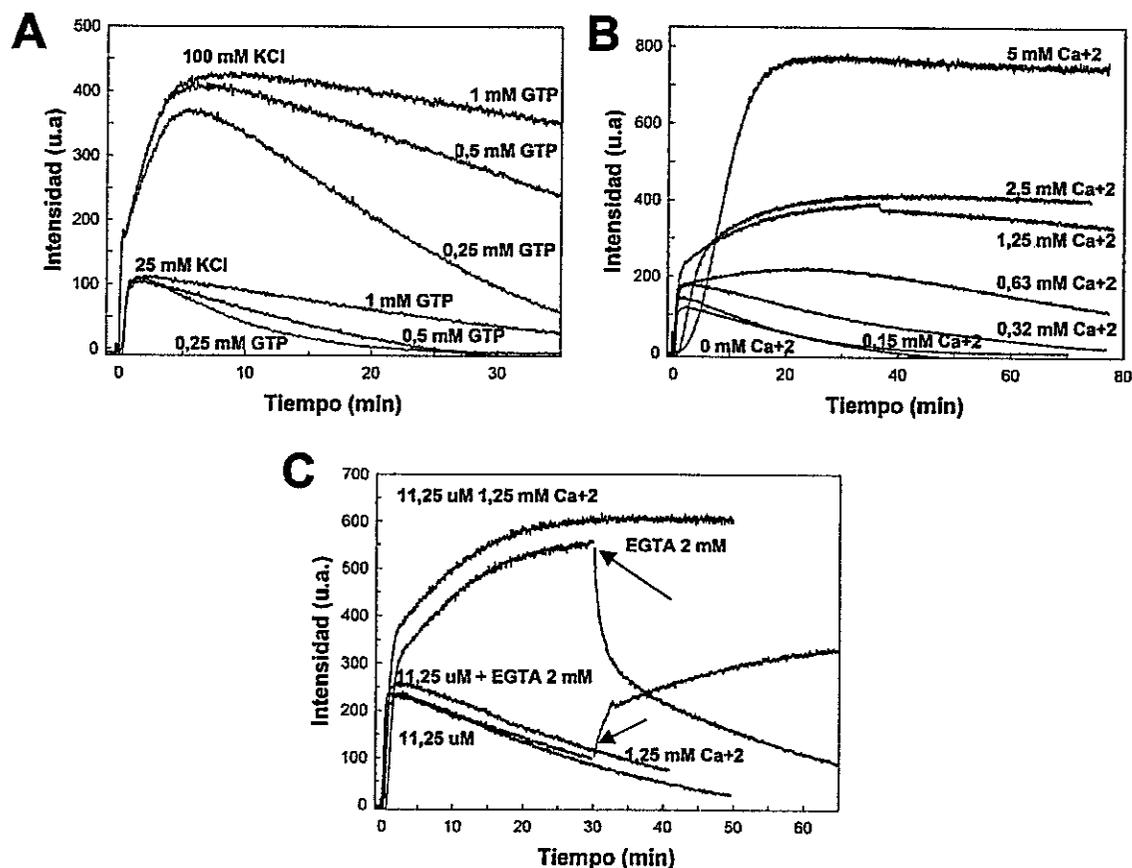


Figura 7. Polimerización de BtubA/B en presencia de KCl, CaCl₂ y GTP.
A. Ensayos de dispersión de luz a distintas concentraciones de KCl y GTP con BtubA/B 10 μM, para determinar los máximos de dispersión y la cinética de polimerización. **B.** Efecto de calcio sobre BtubA/B 10 μM para comparar sus dinámicas de polimerización. **C.** Polimerización de BtubA/B 10 μM en presencia de EGTA (Flecha inferior). Como control se agregó EGTA a una concentración final de 2 mM, durante la polimerización en presencia de calcio (Flecha superior) se agregó calcio a la polimerización en ausencia de este para observar la reversibilidad del efecto de calcio.

Con el objeto de determinar la concentración crítica y el efecto del calcio sobre ésta, a una concentración fija de 24 mM KCl (Fig. 8A), se ensayó la polimerización entre 4,74 y 20 μ M de BtubA/B. Los resultados muestran un aumento progresivo de la dispersión de luz con la concentración de proteína. Se observa que al aumentar la concentración de proteína también aumenta la velocidad de despolimerización probablemente debido a un aumento de la velocidad de hidrólisis de GTP que se hace limitante. Cabe mencionar que el aumento de la dispersión de luz por sobre 11,25 μ M de proteína se hace muy rápido e impide distinguir el efecto del GTP, pero por bajo esta concentración es notoria la dependencia de este aumento respecto a la concentración de proteína. Al agregar 1,25 mM de CaCl₂ (Fig. 8B) se observan claramente dos fases en el aumento inicial de la dispersión de luz. Una rápida, probablemente debida a la polimerización de los filamentos, y una más lenta, debida a la potencial formación de los manojos (como se mostrará mas adelante). Es probable que la formación de manojos estabilice los polímeros haciendo despreciable la despolimerización. Para hacer notar el aumento de la dispersión de luz debida a los probables manojos, se comparan las cinéticas de polimerización en presencia y ausencia de calcio en la Figura 8C. Se observa un aumento de la dispersión en presencia de calcio, propio de manojos de filamentos, como ocurre en el caso de FtsZ (Jae Yen, 2007).

Como se mostró en la Figura 7A al aumentar la concentración de KCl a 100 mM se produce un aumento de la dispersión de luz. Para determinar si este aumento se debe a una disminución de la concentración crítica o a la formación de manojos, que producen mayor dispersión de luz, se determinó la concentración crítica en presencia y ausencia de calcio de manera similar a lo que se hizo a 24 mM KCl.

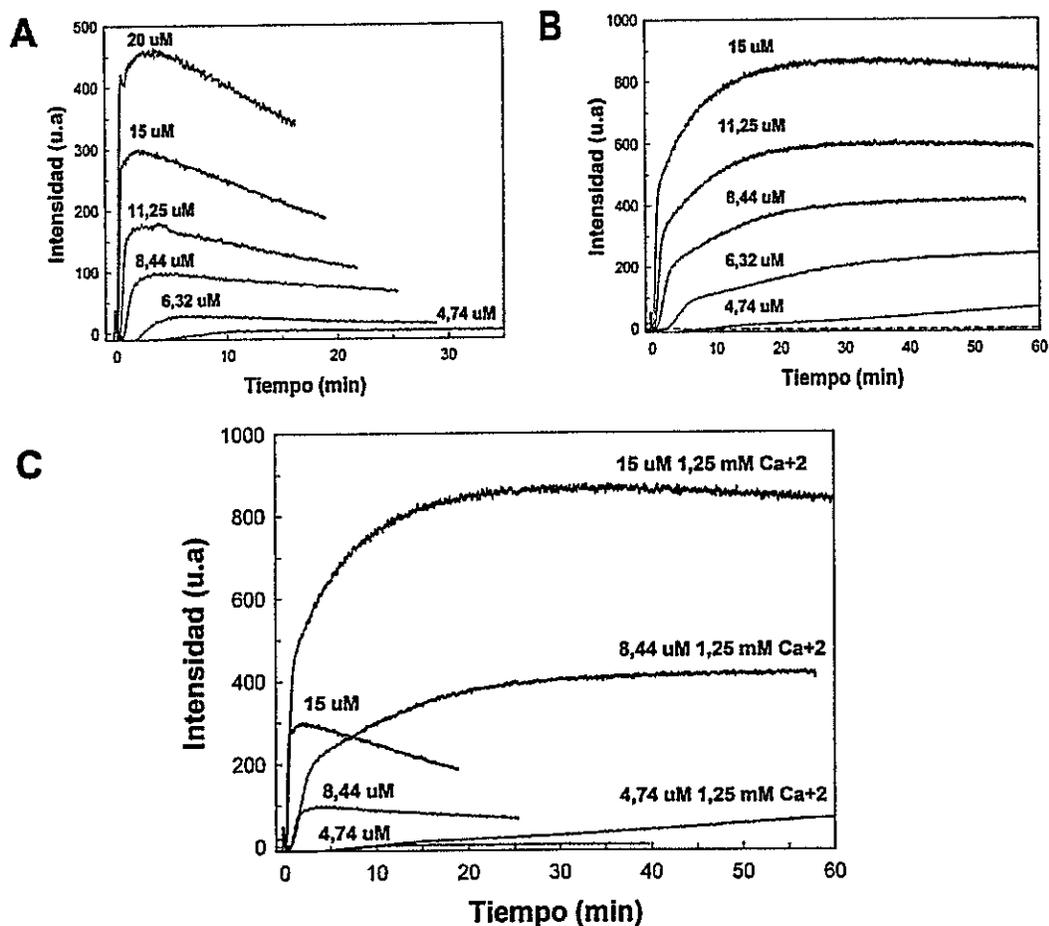


Figura 8. Efecto del KCl 24 mM y Ca²⁺ sobre las curvas de polimerización de BtubA/B a distintas concentraciones de proteína

A. Cinética de polimerización de BtubA/B a 24 mM de KCl sin calcio y con distintas concentraciones de proteína. **B.** Cinética de polimerización de BtubA/B a 24 mM de KCl y 1,25 mM de calcio a distintas concentraciones de proteína. **C.** Superposición de las curvas de la polimerización en presencia y ausencia de calcio. El tiempo 0 se consideró a los 15 segundos luego de agregar el GTP a una concentración final de 1 mM.

En la Figura 9A se observa la ocurrencia de dos fases en el aumento inicial de la dispersión de luz. Hay una clara dependencia del máximo de polimerización respecto a la concentración de proteína como también una leve disminución de la velocidad de despolimerización. Este resultado indica que el aumento en la concentración de KCl estabiliza los polímeros probablemente al disminuir la velocidad de hidrólisis de GTP. Al agregar calcio (Figura 9B) hay una clara estabilización de los polímeros al igual que a 24 mM KCl (Figura 8B). Sin embargo, el aumento inicial de la dispersión vuelve a ser de una sola fase aparente desde la elongación hasta el máximo de dispersión. Esto resulta un efecto contrario al de KCl 24 mM donde se aprecia sola una fase aparente desde la elongación hasta el máximo de dispersión y dos fases de elongación hasta llegar lentamente al máximo de polimerización. En la figura 9C se observa que calcio aumenta la dispersión de luz a una misma concentración de proteína como se observó con KCl 24 mM, aunque la diferencia entre presencia y ausencia de Ca^{+2} es menor.

La concentración crítica se determinó con los valores experimentales de las figuras 8 y 9. Con ese propósito se graficó el aumento de dispersión de luz en el máximo de la curva de polimerización versus la concentración de proteína en presencia y ausencia de calcio a las dos concentraciones de KCl utilizadas. En la figura 10 se observa que al aumentar la concentración de KCl y calcio hay una disminución de la concentración crítica. Se observa también un aumento significativo del valor de la pendiente respecto a KCl 24 mM. Un cambio en el valor de la pendiente refleja un cambio en la estructura de los polímeros, lo que hace probable la presencia de manojos en estas condiciones. Si bien en las otras condiciones se observan diferencias en las pendientes, su diferencia no permite determinar si tenemos distintos tipos de polímeros. Los valores de concentración crítica se resumen en la tabla 2.

Tabla N°2. Valores de concentración crítica en las condiciones experimentales estudiadas

	24 mM KCl	95 mM KCl
0 mM Ca ⁺²	4,17 ± 0,0649	2,29 ± 0,2303
1,25 mM Ca ⁺²	3,45 ± 0,0849	1,54 ± 0,1308

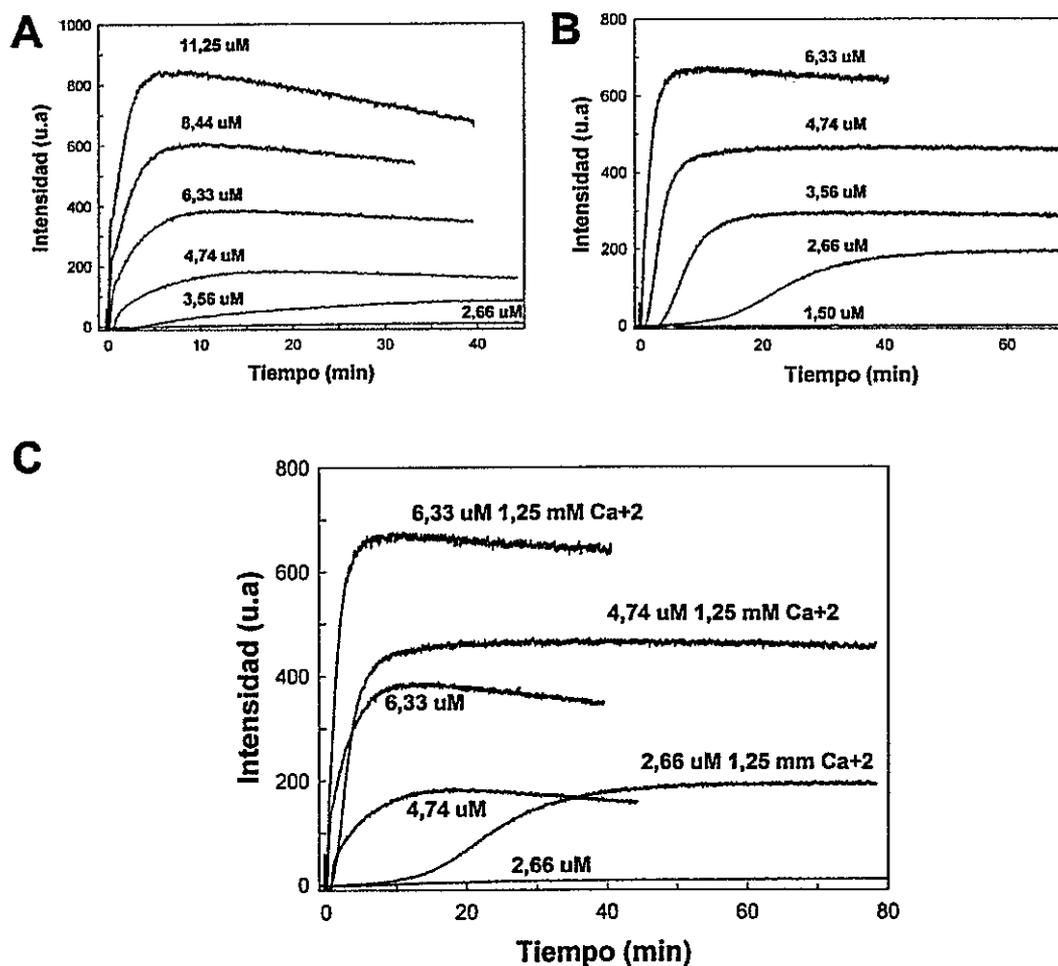


Figura 9 Efecto del KCl 95 mM y Ca²⁺ sobre las curvas de polimerización de BtubA/B a distintas concentraciones de proteína.

A. Cinética de polimerización de BtubA/B a 95 mM de KCl, sin calcio y con distintas concentraciones de proteína. B. Cinética de polimerización de BtubA/B con 95 mM de KCl y 1,25 mM de calcio a distintas concentraciones de proteína. C. Superposición de las curvas de polimerización en presencia y ausencia de calcio. El tiempo 0 se consideró a los 15 segundos luego de agregar el GTP a una concentración final de 1 mM.

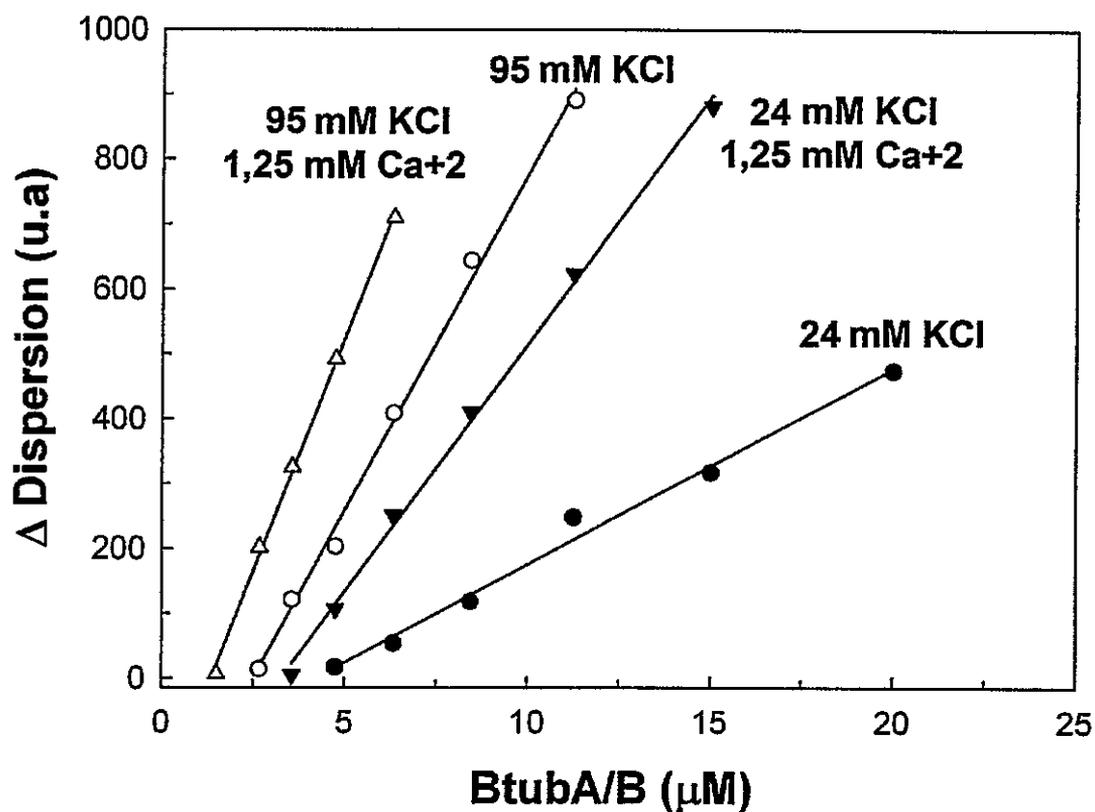


Figura 10. Concentración crítica de BtubA/B.

Determinación de concentración crítica de BtubA/B en las 4 condiciones analizadas en figura 8 y 9. La determinación de la concentración crítica se hizo por la extrapolación de línea sobre el eje X para las condiciones experimentales señaladas en el gráfico. Δ Dispersion corresponde a la diferencia de intensidad de luz entre el máximo de dispersión y la línea base.

6.3 Determinación del tamaño del núcleo.

Tal como se mencionó en materiales y métodos (5.2.7), se han desarrollado distintas teorías para de estimar un valor para el tamaño del núcleo de polimerización, dependiendo de los distintos parámetros que se puedan tomar. El primero en desarrollar una teoría fue Oosawa y Kasai (1962), el cual se basa en la agregación helicoidal de macromoléculas y toma como principal parámetro el tiempo para generar distintos porcentajes de la polimerización total en alguna condición particular. Según el modelo de Oosawa y Kasai, si se grafica el doble logaritmo entre la concentración a la que se encuentra el polímero versus el décimo de tiempo de polimerización ($t_{1/10}$) se obtiene una recta cuyo pendiente es el valor absoluto de la mitad del tamaño del núcleo ($n/2$),

Por otro lado, se encuentra la teoría de Nishida y Sakai (1983) que se basa en sus estudios con actina y cuya estimación del tamaño del núcleo depende de la relación en la máxima velocidad de polimerización y la máxima polimerización que se alcanza en alguna condición.

Siguiendo el modelo de Nishida y Sakai (1983), si se grafica el doble del logaritmo entre la velocidad máxima de polimerización dividida por la máxima intensidad de polimerización versus la concentración de proteína en el polímero, obtenemos una pendiente cuyo valor corresponde al de la mitad del tamaño del núcleo ($n/2$) (Figura 11B). Este gráfico muestra una linealidad para dicha dependencia entre los datos e ilustra 2 puntos importantes: a) por un lado muestra que las pendientes en ausencia y en presencia de calcio a las 2 concentraciones de KCl son similares, lo que da cuenta que según este modelo, a pesar de la notable diferencia entre las curvas de dispersión de luz, esta diferencia no incide en el tamaño del núcleo. b) es posible observar que si bien las pendientes no sufren cambios significativos, si se observa una disminución de los valores del eje de la ordenadas de alrededor de 0,8 en el modelo de Nishida. Teniendo en cuenta que, según ésta derivación, el valor del eje de las ordenadas corresponde al producto entre la constante de polimerización y la de nucleación ($\log \sqrt{k \cdot k_2}$), se puede mencionar que si bien, no se puede obtener un valor para estas constantes en forma independiente, si se observa una reducción del producto de ellas en mas

de 6 veces en presencia de calcio, lo que hace razonable pensar que la presencia de calcio no modifica el tamaño del núcleo, pero sí disminuye la constante para la formación de éste. Se realizó además los cálculos según el modelo de Oosawa, resultando valores similares a los del modelo de Nishida y Sakai (datos no mostrados). Esto sugiere que la aplicación de estos modelos a actina (Nishida y Sakai, 1983; Oosawa y Kasai, 1962) se puede generalizar para otros polímeros como los de BtubA/B. Estos valores obtenidos desde los gráficos de Nishida y Sakai nos permiten sugerir que BtubA/B necesita de al menos un trímero para comenzar la fase de elongación en este rango de concentración de KCl y calcio.

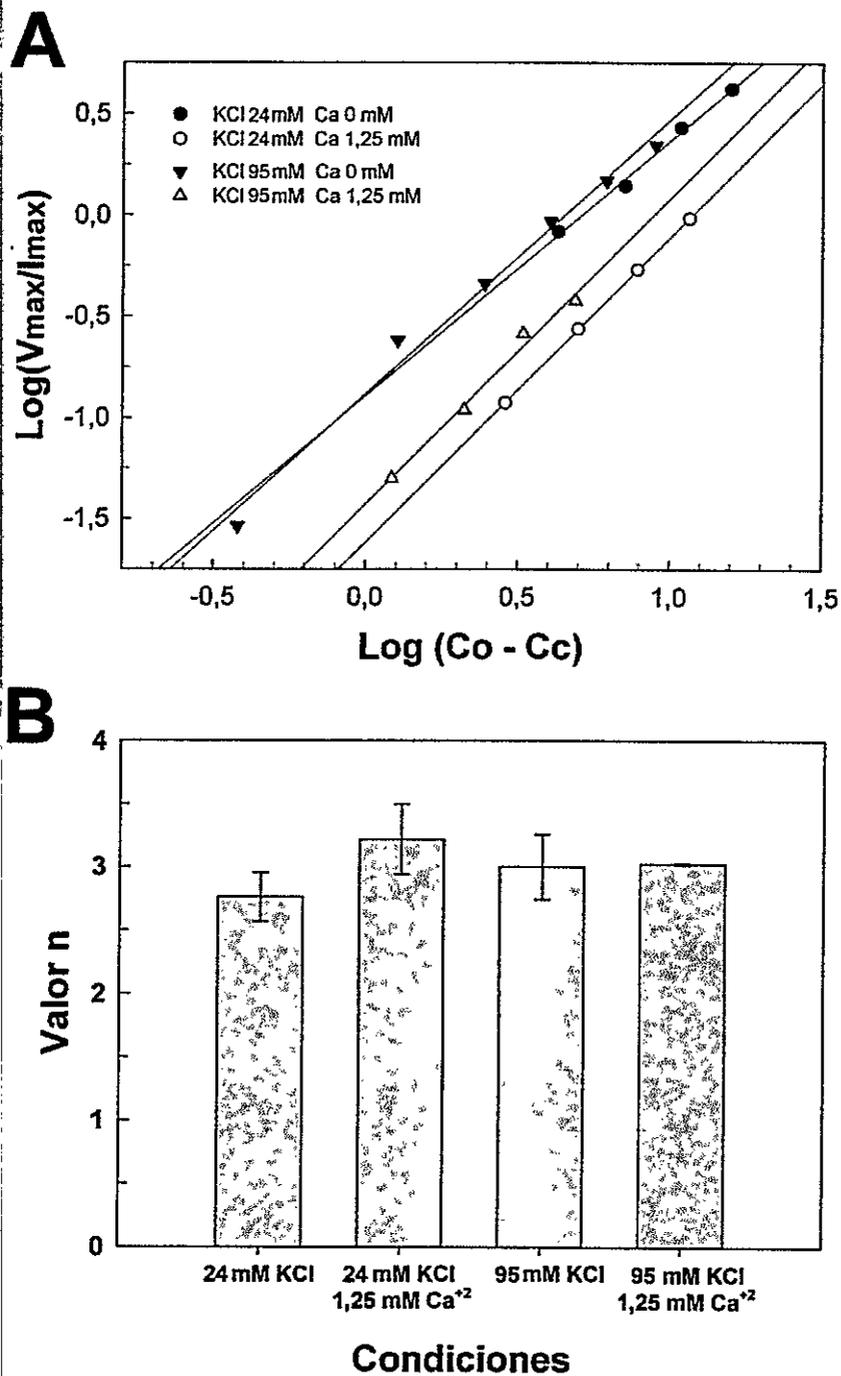


Figura 11. Determinación del tamaño del núcleo de BtubA/B

A. Determinación del tamaño del núcleo según el método de Nishida Y Sakai. El valor que se obtuvo a partir de la pendiente del logaritmo del coeficiente entre la velocidad máxima y la intensidad máxima ($\text{Log } V_{\text{max}}/I_{\text{max}}$) versus el logaritmo de la concentración de BtubA/B en el polímero ($\text{Log } C_o - C_c$) para las distintas condiciones corresponde a la mitad del valor del núcleo ($n/2$). **B.** Valores de n (tamaño del núcleo) obtenidos a partir de ambos métodos, para todas las condiciones estudiadas. $n = 3$.

6.4 Proceso de elongación.

De acuerdo al estudio de Nishida y Sakai (1983), es posible analizar también la etapa de elongación de un polímero. Con este propósito se normalizaron los datos de la polimerización de BtubA/B obtenidos por dispersión de luz (Fig. 12) y se consideraron sólo las curvas que presentaban una cantidad similar de proteína disponible para polimerizar ($C_0 - C_c$; ver sección 5.2.8 materiales y métodos) (Fig. 12 A). La comparación de las curvas normalizadas (Fig. 12B y C) muestra claras diferencias en todo el proceso de polimerización, pues en todos los casos se observan diferencias, tanto en los periodos de latencia, como en los puntos de inflexión donde hay una disminución en la velocidad de elongación hasta llegar al estado estacionario.

La diferencia en el periodo de latencia para el caso de 24 mM de KCl es particularmente notoria, pues este tiempo pasó de ser un proceso sumamente rápido y difícil de medir con el fluorímetro a más de 1 minuto, cuando la proteína se encuentra con calcio (Fig. 12B). Se observó este mismo efecto para el caso de 95 mM de KCl (Fig 12 C). Esto sugiere que durante la fase de latencia, el producto de las constantes de polimerización (k_2) y de nucleación (k^*) disminuyeron para los casos con calcio.

Con respecto al proceso de inflexión que ocurre durante la elongación si se observan importantes diferencias. Para el caso de 24 mM de KCl (Fig 12B) no se observó ningún punto de inflexión en el proceso de elongación, lo que produce que el proceso de elongación sea de una sola fase hasta llegar rápidamente a su máxima polimerización. Por otro lado, para 24 mM de KCl en presencia de Calcio 1,25 mM si se observa un punto de inflexión (flecha negra) alrededor de los 5 minutos que produce una constante disminución en la velocidad de elongación y como consecuencia tengamos un proceso de elongación de dos fases. En cambio, para 95 mM KCl si se observa un punto de inflexión (flecha negra) que produce un proceso de elongación de 2 fases y una constante disminución de la velocidad de ésta, aunque mucho mas leve que el caso de 24 mM KCl 1,25mM Calcio. Este punto de inflexión desaparece cuando tenemos 95 mM KCl con 1,25 mM de calcio lo que produce una elongación de una sola fase. Estos resultados muestran que

existe un efecto opuesto del calcio entre 25 y 95 mM KCl cuando observamos el número de fases durante la elongación.

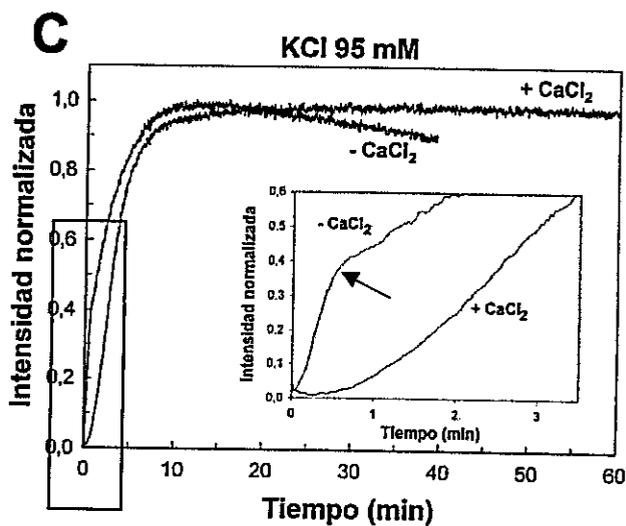
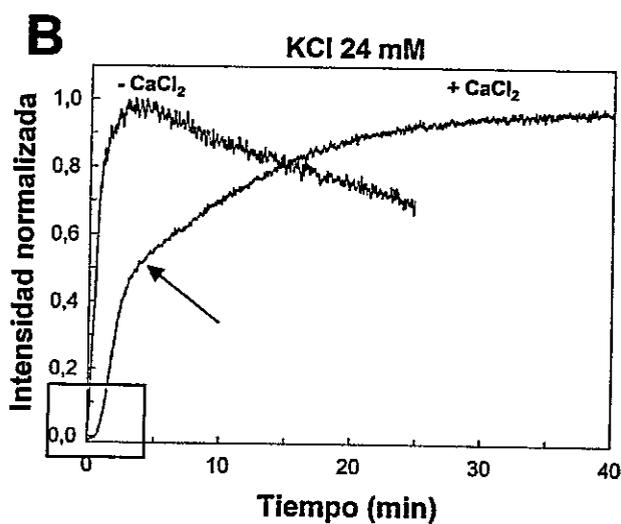
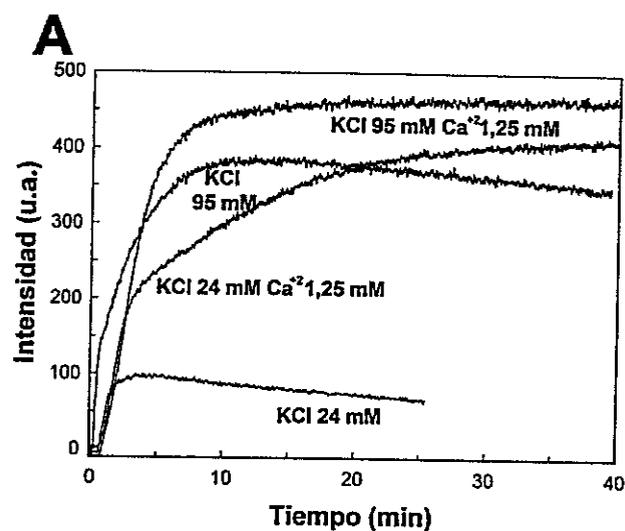


Figura 12. Cinética de polimerización obtenidas por dispersión de luz a distintas condiciones y su normalización.

A. Cinética de polimerización de las muestras cuya cantidad de precipitado fue similar entre todas las condiciones estudiadas. **B.** Dispersión de luz normalizada con KCl 24 mM en ausencia y presencia de calcio. En el sector marcado con un cuadrado y en la flecha se observan claramente las diferencias en los procesos de nucleación y elongación respectivamente. **C.** Dispersión de luz normalizada con KCl 95 mM en ausencia y presencia de calcio. En el inserto se realiza un zoom de la zona rectangular donde se observan las diferencias en los procesos de nucleación y elongación (flecha negra).

6.5 Determinación de la cinética de polimerización y la concentración crítica por sedimentación.

Los experimentos de dispersión de luz permitieron observar la cinética de polimerización de la proteína en ausencia y en presencia de KCl y CaCl₂. Sin embargo, las medidas de dispersión de luz no permiten medir la masa de polímeros en el tiempo. Para obtener la masa de proteína polimerizada y no polimerizada, se sedimentaron los polímeros mediante centrifugación a alta velocidad a diferentes tiempos de polimerización.

Una vez alcanzado el máximo de polimerización en presencia de KCl 24 y 95 mM, en ausencia y presencia de CaCl₂ 1,25 mM, la masa de proteína se determinó en el precipitado y en el sobrenadante directamente desde la tinción de los geles SDS-PAGE con azul de Coomasie (Fig. 13). En las figuras 13A y B se observa que BtubA y BtubB aparecen en el sobrenadante (S) y que al aumentar su concentración sobre la concentración crítica empiezan a aparecer ambas proteínas en el precipitado (P). La figura 13 A muestra que al aumentar la concentración de KCl de 24 a 95 mM hay un aumento de la proteína en el precipitado. La figura 13 B muestra que en presencia de CaCl₂ 1,25 mM la cantidad de proteína en el precipitado aumenta cuando se incrementa la concentración de KCl.

Mediante la cuantificación de la cantidad de proteína en el sobrenadante y en el precipitado (Fig. 13C y D), se obtuvo un valor de la concentración crítica de 4,9 μ M y 3,2 μ M para KCl 25 y 100 mM, respectivamente y de 3,2 μ M y 1,4 μ M para KCl 25 y 100 mM en presencia de 1,25 mM de calcio. Estos valores son similares a los obtenidos mediante dispersión de luz.

Cabe hacer un comentario sobre los resultados obtenidos al comparar el método de dispersión de luz y el de sedimentación, en las diferentes condiciones de polimerización utilizadas. Como ejemplo analizaremos la polimerización con 24 mM KCl. Se observa que al determinar la masa de proteína precipitada por sedimentación en presencia de calcio hay un aumento (Fig. 13C). Si se compara en términos porcentuales este aumento respecto al obtenido por dispersión de luz, en las mismas condiciones experimentales (Fig 8C), se observa que este es

mayor al medirlo por dispersión de luz en presencia de calcio. Se observa también un cambio de la pendiente en el gráfico de la figura 10A en presencia de calcio. Estos resultados en su conjunto indican la aparición de polímeros que dispersan más luz y confirman la dependencia de la dispersión de luz respecto a la forma de los polímeros (Gaskin y cols, 1971). La polimerización con 95 mM KCl hace mas parecidos los resultados antes analizados y en este caso no permite discriminar si el aumento en presencia de calcio se debe a un mayor número de filamentos o a un cambio en la forma de los polímeros. Este punto se analizará con más profundidad con los resultados de microscopía electrónica de los polímeros.

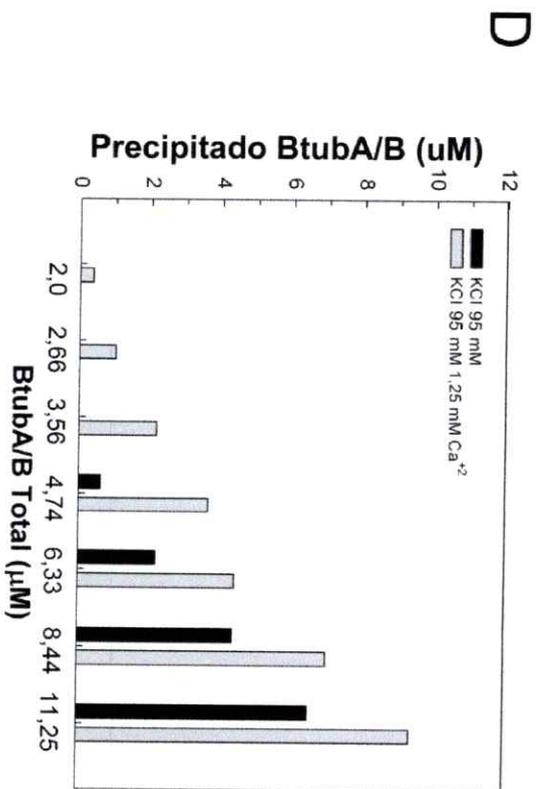
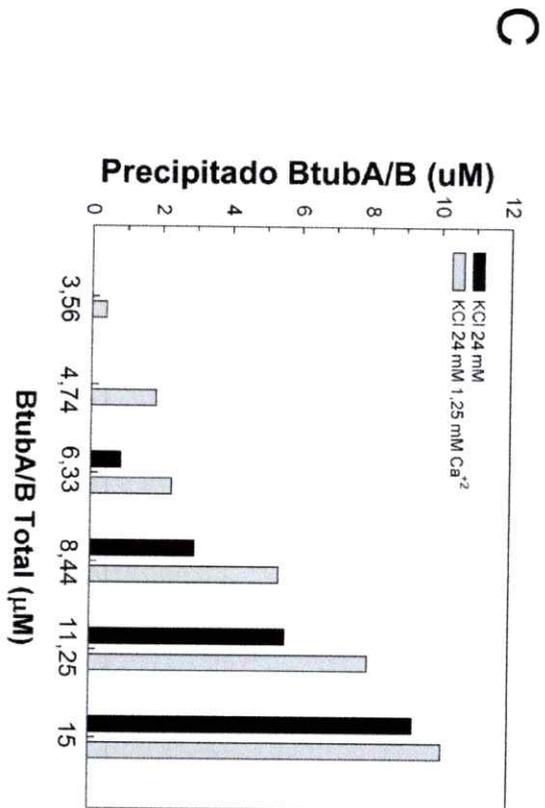
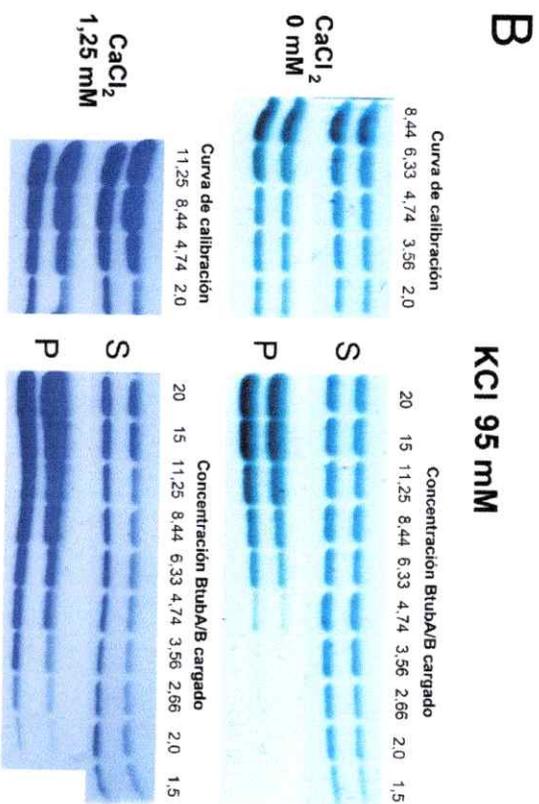
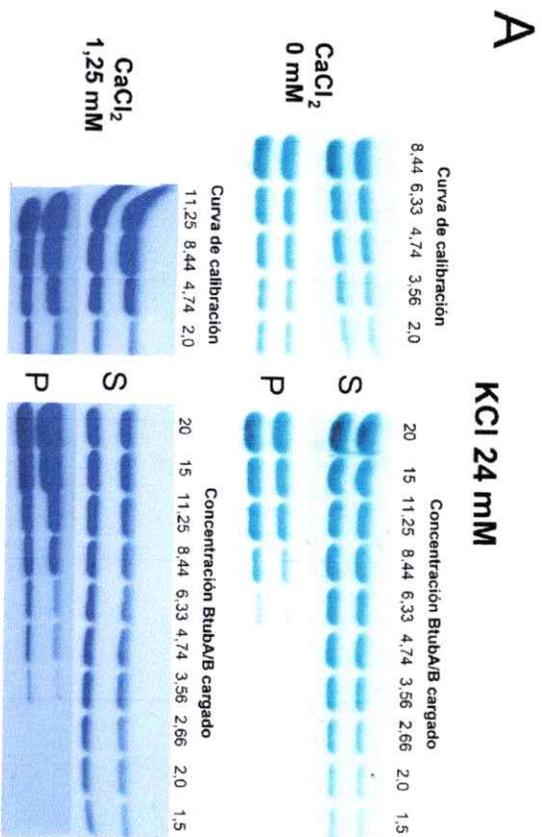


Figura 13. Sedimentación a alta velocidad para determinación de la concentración crítica.

A. Geles SDS-PAGE teñidos con azul de coomassie usados para determinar la cantidad de proteína en el sobrenadante (S) y precipitado (P) en ensayos de polimerización con KCl 24 y 95 mM. Se cargaron en el mismo gel cantidades conocidas de BtubA/B (5 primeros carriles) para relacionar la intensidad de la banda con la cantidad de proteína. **B** Geles SDS-PAGE teñidos con azul de Coomassie usados para determinar la cantidad de proteína en el sobrenadante y precipitado relacionar la intensidad de la banda con la cantidad de proteína con KCl 24 y 95 mM y calcio 1,25 mM. Se cargaron en el mismo gel cantidades conocidas de BtubA/B (4 primeros carriles) para construir la recta de calibración para cuantificar la proteína. Ésta se hizo con el programa ImageJ según se describe en Materiales y Métodos. **C.** Cuantificación del precipitado de BtubA/B con KCl 24 mM en ausencia y presencia de calcio (1,25 mM) para las distintas concentraciones de proteína que se indican en la parte superior del gel. **D.** Cuantificación del precipitado de BtubA/B con KCl 95 mM en ausencia y presencia de calcio (1,25 mM) para las distintas concentraciones de proteína que se indican en la parte superior del gel. La cuantificación de los precipitados de BtubA/B se hizo con el programa ImageJ usando el protocolo descrito en Materiales y Métodos.

6.5.1 Efecto de KCl y CaCl₂ sobre la despolimerización de filamentos de BtubA/B.

El proceso de despolimerización se analizó por sedimentación. Para iniciar la polimerización se agregó GTP 1 mM sobre BtubA/B 10 uM de acuerdo a las condiciones experimentales descritas en la sección 5.2.9. Se tomaron muestras para SDS-PAGE a diferentes tiempos hasta 320 min. Para acentuar el efecto de calcio se utilizaron concentraciones mayores a 1,25 mM. En la figura 14A se observan las bandas de proteína tanto en el sobrenadante como en el precipitado. Se observó un aumento en la cantidad de masa con KCl 95 mM, y estos aumentos continuaban con la presencia de calcio. El análisis de la intensidad de las bandas en términos porcentuales se muestra en la figuras 14B y C para 25 y 95 mM KCl, respectivamente a las diferentes concentraciones de calcio. Se observa un claro efecto de la concentración de KCl sobre la masa del polímero, donde esta se forma más rápidamente y alcanza una mayor cantidad de precipitado. Se observa también que con ambas concentraciones de KCl, el calcio disminuye la velocidad de despolimerización y esta disminución va en directa proporción a su concentración. Se observa además que el efecto de calcio sobre la despolimerización presenta una buena correspondencia con su conducta cinética determinada por dispersión de luz. Este fenómeno podría estar asociado a una disminución de la velocidad de hidrólisis de GTP, lo cual que mantendría por más tiempo los polímeros en solución.

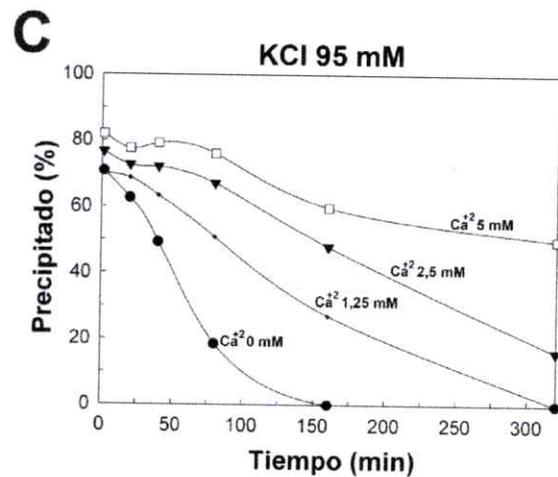
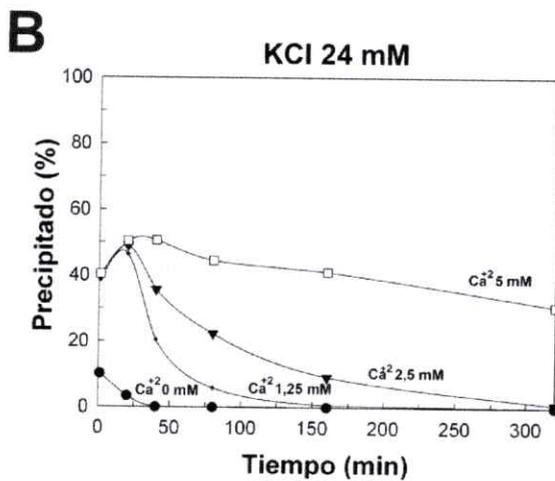
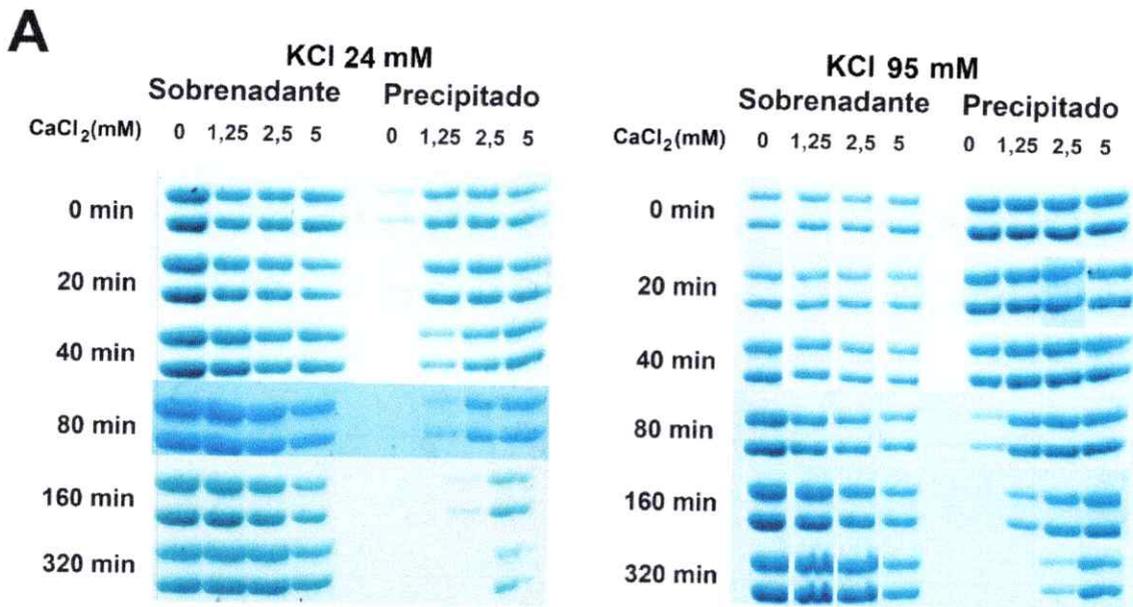


Figura 14. Sedimentación a alta velocidad de BtubA/B en concentraciones crecientes de calcio.

A. Geles SDS-PAGE teñidos con azul de coomassie de muestras de BtubA/B 10 μ M con KCl de 24 y 95 mM a concentraciones crecientes de calcio (0-5 mM) obtenidas en distintos tiempos (0-320 min) luego de la adición de GTP 1 mM. **B.** Porcentaje de precipitado determinado a partir de los geles SDS-PAGE con KCl 24 mM. **C.** Porcentaje de precipitado determinado a partir de los geles SDS-PAGE con KCl 95 mM. La cuantificación de los precipitados de BtubA/B se hizo con el programa ImageJ usando el protocolo descrito en Materiales y Métodos.

6.6 Actividad GTPásica.

Para determinar la velocidad inicial de la hidrólisis de GTP y el tiempo en que se debe seguir el progreso de la reacción, se midió inicialmente el producto de la reacción hasta los 90 minutos (Fig. 15 A y B). Se observa que en ausencia de calcio la velocidad inicial es levemente mayor en 95 mM KCl para la mayoría de los casos. En presencia de calcio se observa una disminución de la producción de Pi a medida que aumenta la concentración del ión, lo que confirma los resultados anteriores. Para resaltar el efecto de calcio se aumentó su concentración hasta 5 mM. Las figuras 15 C y D muestran que hay un incremento en la inhibición de la actividad GTPasa que es debida a una disminución de la constante catalítica de la reacción (k_{cat}). Las figuras 15 E y F muestran una conducta de saturación sobre la disminución del valor de la k_{cat} al aumentar la concentración de Ca^{+2} . A partir de los gráficos de Dixon respectivos (insertos en la figuras E y F) se calcularon las constantes de inhibición aparente por calcio (K_{iapp}) cuyos valores fueron de 0,77 y 0,69 mM con 25 y 95 mM KCl, respectivamente. Estos valores muestran que el potasio prácticamente no tiene efecto sobre la inhibición de calcio. Los valores límites de k_{cat} en ausencia de calcio determinados a partir de la intersección vertical en el gráfico de Dixon fueron 1,43 y 1,69 min^{-1} en presencia de KCl 24 y 95 mM, respectivamente. El conjunto de resultados indica que el efecto inhibitor de calcio sobre la velocidad de hidrólisis de GTP es inverso al efecto levemente activador de KCl sobre la constante catalítica. Así, podemos explicar que la estabilidad de los polímeros formados en altas concentraciones de calcio se debe más bien a un cambio de forma de los polímeros que los hace más estables en el tiempo.

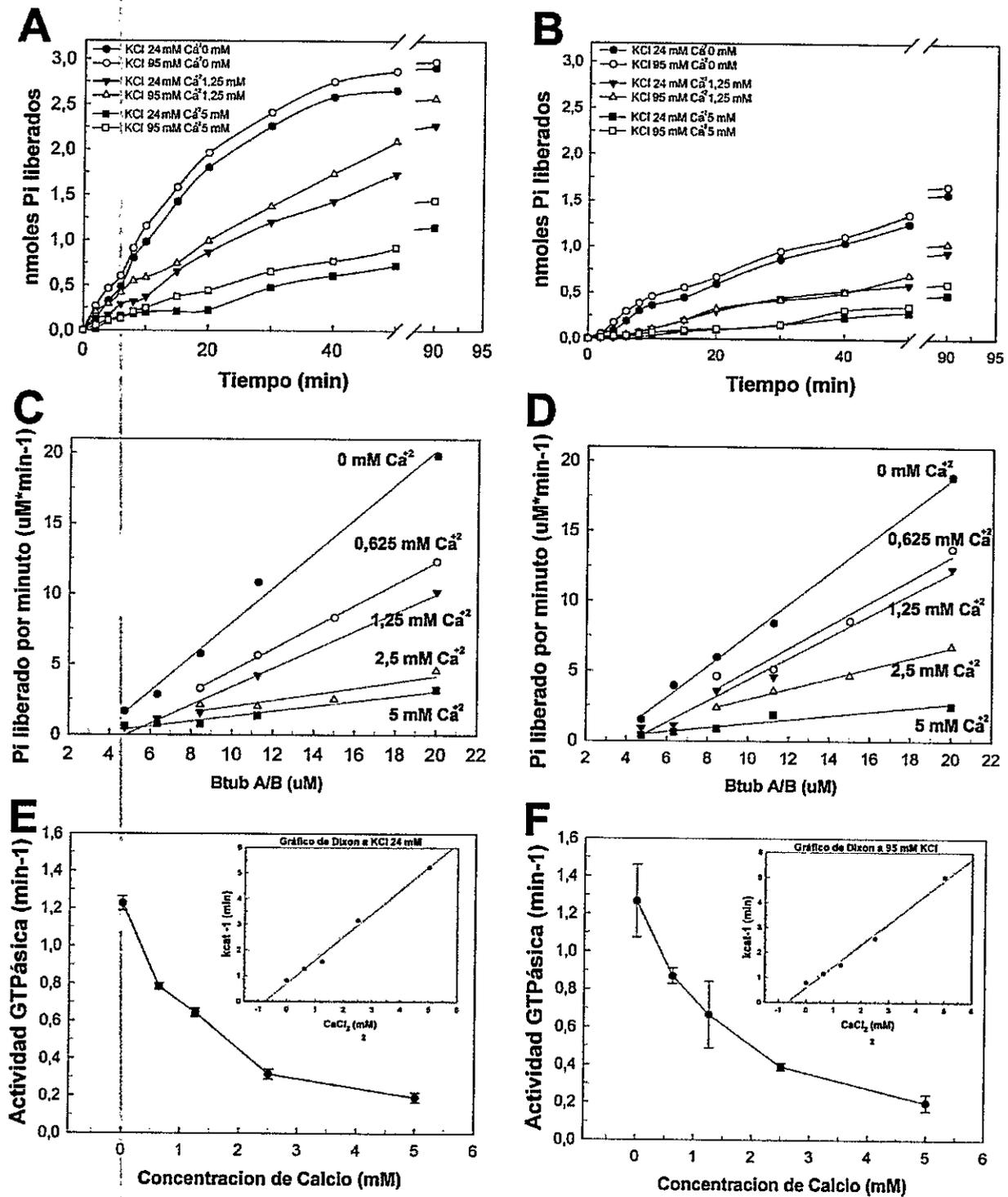


Figura 15. Curvas de progreso y actividad GTPásica.

A. Curva de progreso de la actividad GTPasa BtubA/B 11,25 uM en 6 condiciones distintas. **B.** Curva de progreso de BtubA/B 6,33 uM y las mismas condiciones que en A. **C.** Curva de liberación de fosfato inorgánico a distintas concentraciones de calcio con KCl 24 mM. **D.** Curva de liberación de fosfato inorgánico a distintas concentraciones de calcio y KCl 95 mM. **E.** Constante catalítica en función de la

concentración de calcio a KCl 24 mM. **Inserto.** Gráfica de Dixon que se obtiene a partir del recíproco de la *k_{cat}* vs la concentración de CaCl₂. F. Constante catalítica en función de la concentración de calcio a KCl 95 mM. **Inserto.** Gráfica de Dixon que se obtiene a partir del recíproco de la *k_{cat}* vs la concentración de CaCl₂. n = 3

Al variar la concentración de BtubA/B y determinar su efecto sobre la velocidad de hidrólisis de GTP se puede determinar la concentración crítica. Los valores obtenidos a partir de la actividad GTPasa, dispersión de luz y sedimentación se comparan en la Tabla 3.

Se observa en la tabla que todos los valores determinados a distintas concentraciones de KCl y calcio por los tres métodos son parecidos.

Esta tabla muestra la gran influencia que ejerce el calcio sobre la concentración crítica de BtubA/B ya que se aprecia una disminución de más de 4 veces (independiente de la concentración de KCl) cuando pasamos de 0 a 5 mM. En cambio, el aumento de KCl 24 mM a 95 mM produce una disminución menor al del efecto de calcio al producir un cambio de la concentración crítica de alrededor de 2 veces.

Tabla 3 Concentraciones críticas de BtubA/B obtenidas de dispersión de luz, sedimentación y actividad GTPásica.

Condición	Técnica utilizada			
	Dispersión de luz (μM)	Sedimentación (μM)	Actividad GTPásica (μM)	
KCl 24 mM	Ca ⁺² 0 mM	4,17 ± 0,0649	5,10	4,30 ± 0,1556
	Ca ⁺² 0,63 mM	N.D	N.D.	4,11 ± 0,0707
	Ca ⁺² 1,25 mM	3,45 ± 0,0849	3,60	3,17 ± 0,2404
	Ca ⁺² 2,5 mM	N.D	N.D.	1,98 ± 0,2121
	Ca ⁺² 5 mM	N.D	N.D.	1,00 ± 0,1556
KCl 95 mM	Ca ⁺² 0 mM	2,29 ± 0,2303	3,16	3,34 ± 0,2121
	Ca ⁺² 0,63 mM	N.D	N.D.	3,38 ± 0,1697
	Ca ⁺² 1,25 mM	1,54 ± 0,1308	1,45	2,35 ± 0,0990
	Ca ⁺² 2,5 mM	N.D	N.D.	1,32 ± 0,0424
	Ca ⁺² 5 mM	N.D	N.D.	0,78 ± 0,1414

6.7 Visualización de filamentos de BtubA/B mediante microscopía electrónica.

Para determinar la influencia de KCl y calcio sobre la forma de los polímeros de BtubA/B se tomaron muestras de polímeros en su máximo estado de polimerización, (máximo observado en las curvas de dispersión de luz) (Figs 8 y 9). Las muestras se prepararon de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos. En la figura 16A, para polímeros obtenidos con KCl 24 mM sin calcio, se observa que son mayormente cortos y con un ancho de 10 nm que corresponden a dobles filamentos. La adición de calcio (Fig. 16B) aumentó el largo de los polímeros y mantuvo su grosor. Al aumentar la concentración de KCl a 100 mM también se observaron filamentos dobles y largos, que en la mayoría de los casos resultaban ser de varios micrómetros. En este caso también se observa la presencia de algunos manojos de filamentos cortos (Fig. 16C inserto). La adición de calcio indujo la formación de manojos largos y algunos cortos (Fig. 16D). Al analizar el ancho de estos manojos, se observó que existían distintas poblaciones, con valores de alrededor de 16 nm y algunos manojos aún más anchos.

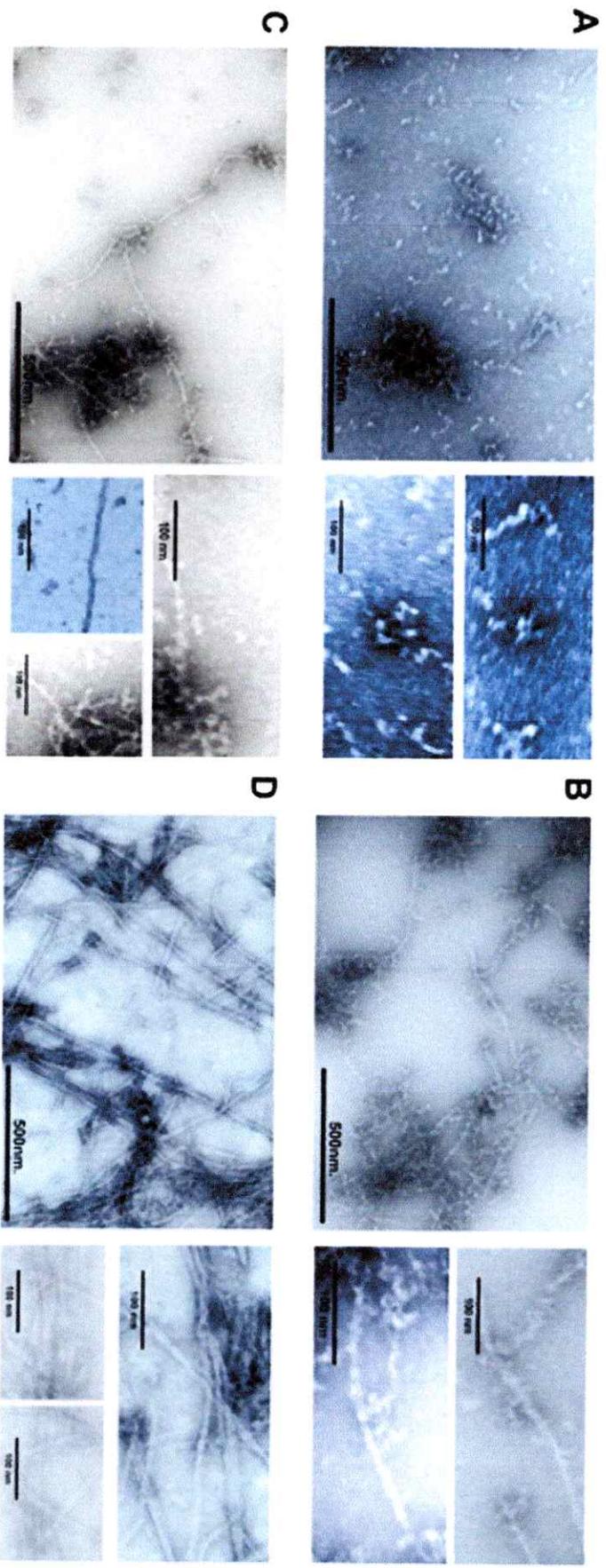


Figura 16. Visualización de los filamentos de BtubA/B mediante microscopía electrónica.

BtubA/B 8,44 μM se polimerizó en amortiguador de polimerización a temperatura ambiente con GTP 1 mM en presencia de KCl 24 mM (A) y 100 mM (C) en ausencia de calcio y KCl 24 mM Ca^{+2} 1,25 mM (B) y KCl 95 mM Ca^{+2} 1,25 mM (D) y se tiñó con acetato de uranilo al 2%. Se visualizó por microscopía electrónica de transmisión. Los insertos a la derecha de las figuras son ampliificaciones de ciertas zonas la misma microfotografía o bien otra microfotografía de la misma condición.

7. DISCUSIÓN.

7.1 Purificación de BtubA/B.

Una de las principales complicaciones de la purificación de proteínas es la presencia de otras moléculas que puedan modificar las propiedades de la proteína de interés tal como ocurrió con tubulina en la década de los 80, donde además de tubulina se co-purificaban muchas MAPS. Por esta razón se necesita de un método adecuado para obtener BtubA/B de forma pura y funcional.

El método empleado en este trabajo para es el de ciclos de polimerización y despolimerización mediante GTP inducidos por alta y baja temperatura, respectivamente. Algunas de las ventajas del método desarrollado, en comparación al de otros métodos descritos en la bibliografía son:

Buen rendimiento en la purificación. En el primer método descrito para purificar BtubA/B (Schlieper y col, 2005) se usaron columnas de exclusión y de afinidad para proteínas que tenían cola de histidina y generalmente se obtenían alrededor de 34 mg de proteínas por cada 12 litros de cultivos de *E. coli* C41 (λ DE3). En nuestro caso, no se requiere ninguna modificación de la proteína como las colas de histidina y sólo ocupa la propiedad de polimerizar y despolimerizar, por lo que no necesita columnas de afinidad ni exclusión. A partir de la expresión de la proteína en cepas de *E. coli* BL21 pLysS cultivadas en 12 L se obtuvieron alrededor de 150 mg, lo cual representa una mejora de 3 veces en el rendimiento respecto a lo reportado inicialmente por Schlieper.

Obtención de BtubA y BtubB en cantidades equimolares y funcionales. Mediante sedimentación se determinó que la polimerización ocurre cuando ambas proteínas están presentes y es mayor cuando su relación es 1:1 (Figura 5E). Sin embargo la sobreexpresión de BtubA/B en cepas *E. coli* BL21 pLysS mostró cantidades diferentes de BtubA y BtubB (Fig. 6A). Por esta razón, los ciclos de polimerización y despolimerización resultaron útiles para obtener estas proteínas en cantidades equimolares. Además, dado que solo la proteína completamente

funcional es capaz de polimerizar y despolimerizar se va descartando aquella proteína que se agrega o no polimeriza.

7.2 Las propiedades bioquímicas de BtubA/B se asemejan más a FtsZ que a tubulina eucarionte.

Las publicaciones previas al trabajo de esta memoria daban cuenta que BtubA/B posee características que hacían recordar mucho más a la tubulina eucarionte que a FtsZ. 1. Se encontraron ambas proteínas en los ectosimbiontes de *Euplotidium* y ellas mostraron reacción cruzada a drogas que afectaban a la tubulina eucarionte (Jenkins y col, 2002). 2. La identificación de los genes BtubA y BtubB de *Prostheco bacter degongeei* mostró entre un 31 y 34% de identidad de secuencia con α y β -tubulina (Fig. 2). 3. La resolución de la estructura cristalográfica mostró tres dominios característicos del heterodímero de α/β -tubulina (Fig. 1F) (Schlieper y col, 2005). Sin embargo, los ensayos realizados en esta memoria dan cuenta de propiedades bioquímicas que se asemejan mucho más a FtsZ que a tubulina y más aún, bajo algunas condiciones, particularmente el efecto de calcio sobre la polimerización se condice mejor con el comportamiento de FtsZ y es contrario al de tubulina. Las propiedades que marcaron similitud con FtsZ fueron la cinética de polimerización, la actividad GTPásica y la morfología de los filamentos. A continuación se discutirán estos puntos.

7.2.1 Cinética de polimerización.

Tal como se mencionó, las proteínas homólogas tubulina y FtsZ poseen una polimerización de tipo cooperativo que puede ser ajustada al modelo de polimerización de nucleación-condensación, descrito primero para los polímeros de actina. Por esta razón era lógico pensar que BtubA/B mantuviera este mismo mecanismo. Esto se corroboró con los ensayos de dispersión de luz en presencia de KCl 24 y 95 mM en ausencia y presencia de calcio (1,25 mM), donde se observaron claramente las etapas de nucleación, elongación y fase estacionaria. (Figs. 7-9).

La polimerización de tipo cooperativa consiste de *i*) nucleación que corresponde a la unión de las primeras subunidades de proteínas, que resulta ser desfavorable dada la falta de mas sitios de unión entre subunidades que ayuden a estabilizarla y *ii*) elongación que es la unión de subunidades de proteína al polímero de proteína, que resulta favorable dado el mayor numero de sitios de interacción que tiene esta subunidad con otras subunidades del polímero.

En esta memoria, se determinó que el aumento de 24 a 95 mM KCl, si bien estimula la polimerización, el número de subunidades de BtubA/B que forman el núcleo de polimerización no se afecta. Al contrario, el calcio si tiene efecto sobre la cinética de nucleación (en ambas concentraciones de KCl), pues esta se hace más lenta. Pese a lo anterior es importante destacar que el tamaño del núcleo permanece inalterado. Tampoco observamos un efecto del aumento de la concentración a 95 mM de KCl. Sin embargo, a concentraciones mayores (500 mM de KCl) se produce un aumento de este que es directamente proporcional a la concentración de potasio. (Díaz, 2010).

Es importante destacar que, si bien el método de Nishida que considera tanto la velocidad máxima de polimerización como la máxima formación de polímeros que se alcanza bajo cierta condición fueron inicialmente desarrollados para los estudios de polimerización de actina, este también resulto ser útil para BtubA/B. El método de Oosawa que considera el tiempo para alcanzar cierto porcentaje del máximo de polimerización también fue realizado obteniendo resultados similares a los de Nishida (datos no mostrados). Así, el núcleo sería un trímero al que se une el resto de las moléculas de BtubA/B durante el proceso de elongación en este rango de concentración de KCl. Este núcleo coincide con lo reportado para actina, que muestra la presencia de trímero o un tetrámero, dependiendo los parámetros de velocidad de elongación, constante de polimerización o tiempos para alcanzar cierto porcentaje de la polimerización (Nishida y Sakai, 1983). Más aún, en el, caso de actina también se han descrito mecanismos de nucleación que incluyen el efecto de cationes como potasio, magnesio y calcio. Por ejemplo, se ha señalado que la actina necesita de magnesio para activar los monómeros de G-actina mediante algún cambio

conformacional y posteriormente dos de estos monómeros activados pueden unirse y formar un dímero, luego un trímero o tetrámero y posteriormente elongar para formar el polímero (Frieden, 1985). En el caso de actina en presencia de potasio también se ha mostrado evidencia de cambios conformacionales de G-actina, aunque no hay certeza de que sean los mismos cambios que podrían producirse con magnesio. En este sistema la polimerización en presencia de magnesio y potasio es mucho más rápida que la suma de las velocidades separadas de estos cationes. Es notable que el efecto de calcio en la polimerización de actina presente las mismas características al alargar la fase de latencia, y que tampoco se registran cambios en el tamaño del núcleo (Nishida y Sakai, 1983). Sin embargo, comparado con nuestro sistema este cambio en la velocidad de nucleación, medido bajo condiciones iónicas similares a las descritas en este trabajo, mostró que para actina la fuerza iónica del medio afectó en varios órdenes de magnitud las constantes y la velocidad de nucleación, sin afectar el tamaño del núcleo. (Tobacman y Korn, 1983).

En el proceso de elongación se observaron diferencias en todas las condiciones experimentales analizadas. Al comparar la cinética de polimerización en presencia de KCl 24 y 95 mM se observa que en un principio ambos casos es de rápido crecimiento. Sin embargo, para el caso de 95 mM de KCl aparece un punto de inflexión que genera una segunda fase de elongación más lenta (Fig. 12). Este comportamiento se debe a que KCl estimularía el proceso de "annealing" que consiste en la interacción de filamentos simples entre sí para formar manojos de filamentos dobles que se producen por el aumento de KCl.

Por otro lado el calcio afectó de manera diferente la elongación. Así, con KCl 24 mM, se observa la aparición de un punto de inflexión que genera una segunda fase que tiene una elongación que se va haciendo mucho más lenta. Con KCl 95 mM, en cambio, no se observa ningún tipo de inflexión y el proceso de elongación es de una fase, dando cuenta que se produce un proceso inverso en la éste proceso al agregar calcio. Estos resultados dan cuenta que tanto KCl como calcio estimularían el proceso de "annealing", siendo ésta mayor en el segundo caso. Lo más probable es que los manojos inducidos por KCl sean potenciados

por calcio y por esta razón haya una elongación de una sola fase para la condición KCl 95 mM con calcio 1,25 mM, lo cual indicaría que la nucleación y la elongación ocurran en manojos de filamentos.

Otra de las propiedades que caracterizan la polimerización de proteínas que exhiben mecanismos de cooperatividad, como BtubA/B, es la concentración crítica (C_c), que se define como la concentración de proteína mínima que permite su polimerización y corresponde al recíproco de la constante de equilibrio de elongación (K_e) del polímero. Por lo tanto se analizó la dependencia de la concentración crítica respecto a la concentración de KCl y $CaCl_2$, manteniendo las mismas condiciones experimentales utilizadas para el análisis de la nucleación y elongación (Fig. 10). Se observó que tanto potasio como calcio producen una disminución de la C_c . El aumento de KCl de 24 a 95 mM, disminuyó la C_c desde 4,17 μM a 2,29 μM respectivamente y confirma los resultados obtenidos previamente, donde se abarcaba un mayor rango de concentración del catión (Díaz, 2010). Por su parte, el incremento 24 y 95 mM de potasio, en presencia de calcio 1,25 mM a mostró valores de C_c de 3,45 μM y 1,54 μM , respectivamente. Esta disminución de la C_c indica, básicamente que existe una mayor tendencia de las subunidades a formar el polímero, Así, los valores de K_e , calculados a partir de C_c fueron $2,35 \times 10^6 M^{-1}$ con KCl 24 mM y $4,44 \times 10^6 M^{-1}$ con KCl 95 mM y al agregar calcio 1,25 mM, $2,90 \times 10^6 M^{-1}$ y $6,90 \times 10^6 M^{-1}$, respectivamente. Por lo tanto, KCl y $CaCl_2$ favorecen la asociación de subunidades durante la polimerización, siendo mayor para calcio. La misma tendencia fue observada por sedimentación (Fig. 13) y actividad GTPásica (Tabla 2). El efecto de calcio sobre el proceso de polimerización se interpretó como una disminución de la constante catalítica de la actividad GTPasa (K_{iapp} menor que 1 mM) que se contrapone al efecto activador de calcio. En tubulina En presencia de calcio 5 mM los valores de la C_c disminuyeron alrededor de 4 veces de forma independiente a la presencia de potasio. Al analizar los valores de la concentración crítica con la ecuación desarrollada por Nishida y Sakai (apéndice 1) se sugiere que esta disminución produce un aumento en el número de filamentos durante la etapa de nucleación. Este aumento en la densidad de población de filamentos de BtubA/B podría

afectar la ocurrencia de interacciones laterales y con ello, la formación de manojos. Este comportamiento se manifiesta en el cambio de pendiente de las rectas que generan los Δ dispersión vs concentración de BtubA/B y cuyo intercepto nos da la concentración crítica en las distintas condiciones estudiadas (Fig. 10), donde observamos una curva de menor pendiente para KCl 24 mM respecto a las otras condiciones analizadas. Este gráfico nos indica que en alguna concentración entre 24 y 95 mM de KCl (probablemente más cerca de ésta última), en ausencia de calcio se generan las condiciones iónicas que permiten la formación de manojos producto de interacciones laterales. Además este proceso ocurre por debajo de 24 mM de KCl en presencia de calcio 1,25 mM. Este comportamiento de BtubA/B resulta interesante, pues para tubulina, un rango similar de calcio produce cambios en la dinámica de polimerización, aunque en la dirección contraria, pues el catión induce despolimerización e incremento del valor de C_c (Berkowitz y Wolff, 1986). Otra diferencia con respecto al efecto del calcio es que el cambio en la concentración crítica no va acompañado de ningún cambio en el tipo de polímero que forma la tubulina puesto que las pendientes del gráfico de Δ dispersión vs concentración son idénticas.

Si bien no hay estudios acerca del efecto de Ca^{+2} sobre la concentración crítica para el caso de FtsZ, se puede observar que la cinética de polimerización de ésta es muy similar a lo visto en BtubA/B. Por lo tanto es razonable pensar que el efecto que ejerce el calcio sobre BtubA/B es al menos similar de FtsZ.

7.2.2 Actividad GTPásica.

Las dinámicas de polimerización de las proteínas del citoesqueleto de eucariontes y procariontes son energéticamente altas aunque evolutivamente conservadas, lo que indica su importancia para el desarrollo de las funciones biológicas. Para esto, la mayoría de las proteínas citoesqueléticas unen e hidrolizan nucleósidos trifosfato (NTP), lo que les permite transformar la energía química en energía mecánica que permite una dinámica de polimerización alejada del equilibrio químico. Si bien la tubulina y la FtsZ unen GTP, hay otras proteínas como actina que une ATP, así éstas polimerizan cuando están unidas al NTP.

Poco después de su unión al polímero las subunidades hidrolizan el NTP a nucleósidos difosfato (NDP), liberando el fosfato inorgánico (Pi) y reteniendo el NDP en las subunidades del polímero, el cual se vuelve más inestable que el polímero con NTP. La despolimerización libera las subunidades individuales que estarán disponibles para otro ciclo de polimerización. En la tubulina eucarionte, el GTP unido a β -tubulina es intercambiable e hidrolizable, a diferencia del GTP unido a α -tubulina que no es intercambiado ni hidrolizado. La base de esta diferencia se atribuye al lazo T7 ubicado en el extremo "menos" de las subunidades (Nogales y col, 1999). En la estructura cristalina de α/β -tubulina, el glutamato 254 de la α -tubulina que se encuentra conservado en todas las α -tubulinas, está en contacto con el fosfato- γ del GTP en el sitio de unión en β -tubulina, en la interface dímero-dímero. En la β -tubulina la posición homóloga 254 se encuentra una lisina que se localiza en la interface intradímero lo que impide la hidrólisis del GTP de la α -tubulina (Nogales y col, 1999). En FtsZ, la mutación del residuo en la posición estructuralmente conservada de la α -tubulina E254 (D212) inhibe la hidrólisis del GTP pero no la unión del GTP (Dai y col, 1994; Mukherjee y Lutkenhaus, 1994; Díaz, 2010).

Para el caso de BtubA/B, se observó previamente que la hidrólisis de GTP es estimulada por la formación de protofilamentos y su valor esta entre 0,117 y 1,37 min^{-1} (Sontag y col, 2009; Sontag y col, 2005). Un aspecto interesante con respecto a BtubA/B es que, BtubA, considerada la homóloga de β -tubulina, presenta en su aminoácido 254 un residuo de glutamato (al igual que BtubB). Mas aún, en mutantes de BtubA/B que sólo pueden formar el heterodímero, estos poseen una actividad GTPásica baja pero por encima de los monómeros por separado (Sontag y col, 2009). Todo esto sugiere que, a pesar de las diferencias estructurales del lazo T7 de BtubA tanto con BtubA como tubulina, la presencia de la carga negativa del glutamato 254 puede inducir una leve actividad GTPásica en BtubB cuando se forma el heterodímero, aunque no se puede determinar en este caso la contribución en la actividad GTPásica de cada monómero.

En esta memoria de título se estudió el efecto del KCl y calcio en la hidrólisis de GTP.

Con respecto al efecto del KCl sobre la actividad GTPasa, donde se estudió el rango de concentraciones entre 24 y 95 mM, tanto en ausencia como en presencia de distintas concentraciones de calcio (Fig. 15E y F), se observó que solo hubo diferencias de entre 5 y 19%. Este mismo efecto se observó en FtsZ de *E. coli* y *M. jannashii* donde también hubo aumento de la actividad GTPásica cuando se aumentó de 50 a 100 mM de KCl, aunque la diferencia porcentual fue mayor en ambos casos. Esto se debería, de acuerdo a experimentos de simulaciones de dinámica molecular, a que en presencia de ión K^+ se permite el posicionamiento de una molécula de agua en una posición compatible que permite la interacción del fosfato gamma del GTP. Esta molécula de agua estaría en coordinación con el ión K^+ (la distancia entre K^+ y el oxígeno del agua es de 3 Å). Este arreglo podría favorecer la estabilidad del dímero y la hidrólisis de GTP (Mendieta y col, 2009). Es posible que en BtubA/B ocurra un efecto similar, pues también hay un incremento de la hidrólisis de GTP en un rango similar de concentraciones de KCl. Sin embargo, dado que este incremento es bastante menor a lo reportado para FtsZ, también se podría deber a que la concentración crítica disminuyó y por lo tanto se forman más polímeros y por ende la hidrólisis de GTP aumenta.

Calcio mostró un marcado efecto inhibitor sobre la actividad GTPasa de manera casi independiente de la concentración de KCl. Así, la velocidad disminuyó 7,5 veces con el rango de concentración de calcio de 0 a 5 mM, valor cercano a la actividad GTPasa de las subunidades de BtubA y BtubB por separado. (Sontag y col, 2005). De manera similar, se observó una disminución de 6 veces en la actividad GTPásica para FtsZ con 50 mM de KCl y 40 mM de calcio. Esto indica que la actividad GTPasa de BtubA/B es mucho más sensible que FtsZ a la inhibición por calcio. Sin embargo el comportamiento de FtsZ con respecto calcio es más complejo pues entre 0 a 2,5 mM de Ca^{+2} se observó una activación de la actividad GTPásica y luego hubo una disminución de ésta a mayores concentraciones y cuyo grafico k_{cat} vs concentración de FtsZ es similar a lo observado con BtubA/B (Figs. 15E y F) (Xuan-Chuan y Margolin, 1997). En oposición con BtubA/B en la tubulina presenta una activación por Ca^{+2} en un rango

de concentración similar al de BtubA/B (1-6 mM). El aumento es mayor en el rango de 0 a 2 mM y luego esta estimulación se va haciendo menor hasta llegar a una saturación del efecto a una concentración de 6 mM aproximadamente (Soto y col, 1996). Vale la pena enfatizar que para tubulina se observa una curva de actividad GTPásica vs concentración de calcio completamente opuesta en el mismo rango de concentración que para BtubA/B. La disminución de la actividad GTPasa de BtubA/B en presencia de calcio se correlaciona con la formación de manojos de filamentos (Fig. 16D) y con la disminución de la velocidad de despolimerización en los ensayos de dispersión de luz (Fig. 7B y Figs. 8 y 9) lo que indicaría que los manojos de filamentos estabilizan a los filamentos individuales contra la despolimerización al disminuir su actividad GTPasa. Si los filamentos son estabilizados, las subunidades disponibles para intercambiar el GDP por el GTP e iniciar un nuevo ciclo de polimerización e hidrólisis disminuyen, pues se quedan atrapadas en los manojos, los cuales al ser mas largos disminuyen el número de extremos donde se produciría el intercambio de subunidades con GDP por GTP. Otra posibilidad es que el calcio afecte directamente la hidrólisis de GTP en el sitio activo. Uno de los estudios en FtsZ que apoya esta idea acerca de la disminución de la actividad GTPásica con la presencia de calcio y otros cationes divalentes señala que, además de existir una coordinación entre este tipo de iones y los oxígenos de los fosfatos del GTP, también existe una conformación alternativa donde hay una interacción entre el ión calcio y el nitrógeno 7 de la base púrica de la guanina que generaría una torsión que formaría una forma mas plegada del GTP (Sigel y col, 2001). Así, se produce una interacción entre la proteína y la forma alternativa de GTP que reduciría la coordinación de los fosfatos con el sitio activo de la FtsZ y con ello se impediría la hidrólisis de este GTP (Marrington y col, 2004).

7.2.3 Morfología de los filamentos.

Uno de los aspectos que presenta mas diferencias entre tubulina eucarionte y FtsZ es la morfología de los filamentos. La tubulina eucarionte presenta interacciones longitudinales para formar protofilamentos lineales y un promedio de

13 protofilamentos en paralelo que forma la pared del microtúbulo y esta estructura se mantiene bajo casi todas las condiciones en las que se ha estudiado. Por otro lado, la morfología de los polímeros de FtsZ presenta mayor variación y se han encontrado *in vitro* protofilamentos simples, dobles y manojos de protofilamentos de acuerdo a las condiciones en las que se encuentre. Dada la alta identidad de secuencia que presenta BtubA/B con tubulina, y la presencia de regiones características de ésta era posible esperar alguna similitud de la estructura de los filamentos. Sin embargo se encontraron desde los primeros estudios que los filamentos de BtubA/B consistían principalmente en protofilamentos simples y manojos de filamentos que en ningún caso eran microtúbulos. Los resultados de microscopía electrónica de filamentos polimerizados en las condiciones experimentales descritas muestran que se producen cambios en la morfología de los filamentos. Así, con KCl 24 mM solo se observaron filamentos pequeños y simples y al aumentar KCl a 95 mM se inducían filamentos simples muchos más largos y algunos filamentos dobles (Fig. 16C). Calcio induce la formación de manojos de filamentos muy largos y similares a los encontrados en KCl 95 mM (Fig. 16B) para el caso de KCl 24 mM. Con KCl 95 mM y calcio 1,25 mM se observaron mayoritariamente manojos de protofilamentos.

Los filamentos encontrados con KCl 24 mM explican la baja dispersión de luz, pues esta es proporcional al largo de los filamentos. KCl 95 mM induce filamentos más largos que dan cuenta del aumento de dispersión de luz y estos al estabilizarse con calcio como manojos producen todavía un mayor aumento.

7.3 Significado biológico de las condiciones de polimerización estudiadas.

El mecanismo de polimerización de los filamentos de BtubA/B descritos en esta memoria, si bien no es capaz de proveer una función específica, si puede sugerir el estado en que se encuentra estos filamentos de BtubA/B en *Prostheco bacter*. Hay por lo menos tres reacciones distintas observadas *in vitro* que podrían estar controladas por separado *in vivo*: nucleación, elongación y despolimerización. En este trabajo se analizó la polimerización de BtubA/B en

función de dos concentraciones de KCl y distintas concentraciones de calcio. Con respecto a la concentración de potasio intracelular en *E. coli*, esta se encuentra entre 100 y 500 mM. No existe un registro acerca de la concentración intracelular de potasio en *Prostheco bacter*, pero se espera sea similar, por lo que la polimerización de BtubA/B estaría favorecida principalmente por la condición iónica del medio. En los microtúbulos, FtsZ, actina y otras proteínas citoesqueléticas, la regulación de la polimerización, está controlada por otras proteínas que favorecen y desfavorecen alternativamente la nucleación, elongación, acortamiento y anclaje de sus polímeros. Por ejemplo en la polimerización de la tubulina los centríolos o cuerpos basales controlan espacialmente la formación de los microtúbulos, en FtsZ la correcta localización de anillo-Z depende del sistema MinD/C/E y en actina el complejo Arp2/3 regula la nucleación de los filamentos de actina, lo que indica la importancia de la regulación a nivel de nucleación. Con respecto al efecto del calcio sobre el tamaño del núcleo, vemos que este es prácticamente nulo, pues los valores n (núcleo crítico) no variaron con calcio. Considerando las posibles condiciones fisiológicas del *Prostheco bacter*, es muy probable que el tamaño del núcleo se mantenga en torno del trímero lo que es similar al núcleo de la actina.

Una forma de impedir la polimerización espontánea de BtubA/B en *Prostheco bacter* a nivel de nucleación es a partir del control de los niveles de expresión de BtubA/B, lo que resulta probable, pues se ha observado que la transcripción de los genes del operon-*btub* es mucho mayor en la fase estacionaria que en la fase exponencial de crecimiento (Pilhofer, comunicación personal). Otra posibilidad es la participación de *bklc*, ubicado río abajo del *btubB* para el control de la nucleación de BtubA/B, ya sea ubicando y favoreciendo los sitios de nucleación o por el contrario, impidiendo la nucleación en sitios no deseados, mediante la interacción directa con el heterodímero o con uno de los dos monómeros.

En *E. coli* se observó que los filamentos de BtubA/B estaban agrupados en manojos que recorrían toda la longitud de la célula y se ubicaban en el centro en algunas células o contiguos a las membranas en otras (Sontag y col, 2005) (Fig.

4E). Además, las células adoptan una morfología peculiar curva (Pilhofer, comunicación personal), lo que se podría deber a que los filamentos de BtubA/B están empujando en cada extremo de la célula. Los estudios *in vitro* de este trabajo confirman la tendencia de los filamentos de BtubA/B a interactuar entre sí y formar manojos en altas concentraciones de potasio y de calcio, y teniendo en cuenta que estos filamentos cruzan de polo a polo las bacterias, estos parecen estar mezclados en su polaridad individual, por lo que los dos extremos del manajo de filamentos crecerían a una misma velocidad. El filamento inhibe la división de la bacteria al impedir la estrangulación de las membranas en el centro de la célula.

En particular, para *Prostheco bacter dejongeei* se ha observado por microscopía de transmisión de electrones, estructuras de protofilamentos que forman manojos localizados en el centro de las células, y debajo de la membrana. Un resultado similar se observó con ensayos de inmunocitoquímica con anticuerpos anti-BtubA o anti-BtubB (Pilhofer, resultados no publicados). La formación de manojos estabiliza a los filamentos de BtubA/B contra la despolimerización (Fig. 8 y Fig. 9) y además le confiere elasticidad a las células (Heidemann y Wirtz, 2004), lo que apoya la idea de que los manojos de filamentos de BtubA/B tienen una función estructural que determinaría la forma alargada de *Prostheco bacter*. Esta función estructural, al formar manojos de filamentos y participar en la mantención de la forma celular es similar a lo encontrado para otras proteínas. Por ejemplo la Crescentina, que es requerida para mantener la forma vibrioide o helicoidal de *C. crescentus* y que se ubica como un filamento helicoidal que va de polo a polo a través de un lado de la célula (Ausmees y col, 2003) y MreB que estaría codificado en un cluster de genes involucrados en la mantención de la forma celular en un grupo diverso de bacterias (Michie y Löwe, 2006).

Finalmente, aunque no se puede descartar alguna otra función, dada la homología que presenta con tubulina y con FtsZ, parece poco probable que adopte las funciones de estas proteínas, dado que las condiciones fisiológicas que presenta la bacteria hacen más probable que los filamentos de BtubA/B se

encuentren como filamentos largos, e incluso manojos que permanecen estables y no presenten otras características, como por ejemplo la inestabilidad dinámica de los microtúbulos que le permite al filamento buscar su destino en el espacio tridimensional de la célula. Por ello, no parece factible que BtubA/B, tenga la función de segregar moléculas de ADN. Tampoco parece probable que BtubA/B tenga alguna función en la división celular como el caso de FtsZ, pues algunas bacterias del phylum *Verrucomicrobia* presentan los genes que codifican para FtsZ y se ha observado que existe un aumento transitorio de la cantidad de calcio intracelular durante los procesos de división celular, que contribuiría precisamente a mantener más estables a los filamentos de BtubA/B. Por ello las concentraciones de KCl y CaCl₂ analizadas en esta memoria apoyan la idea de que BtubA/B tendría una función netamente estructural *in vivo*, ayudando a mantener la forma celular, que incluye a la prosteca para aumentar la superficie de absorción de los nutrientes y adherirse de mejor forma a las superficies de su hábitat.

8. CONCLUSIONES.

1. El método de purificación de BtubA/B (tubulina bacteriana), por ciclos de polimerización y despolimerización, permitió obtener una proteína prácticamente pura, funcional y sobre todo, con cantidades prácticamente equimolares de BtubA y BtubB, independiente de la mayor expresión de alguna de las subunidades del heterodímero.
2. El aumento de la concentración de potasio reduce la concentración crítica de la polimerización de BtubA/B aunque no parece incrementar el tamaño del núcleo en este rango de concentración.
3. Este núcleo parece ser un trímero tal como los núcleos de actina. A una concentración de KCl 95 mM se forman comienzan a formar manojos por interacciones laterales entre filamentos de BtubA/B. Este efecto que ejerce el potasio es similar al efecto que se ejerce en FtsZ en un rango similar al estudiado en esta memoria.
4. El aumento de la concentración de calcio también reduce la concentración crítica de la polimerización de BtubA/B y no afecta el tamaño del núcleo. Sin embargo, el efecto que ejerce el calcio es mucho mayor que el de potasio y afecta toda la cinética de polimerización de BtubA/B, incluyendo la de facilitar la interacción lateral entre filamentos para formar manojos muy estables, a bajas concentraciones de KCl. Este efecto nuevamente es muy similar a lo que ocurre con FtsZ y por el contrario, se genera un efecto opuesto a lo que ocurre con tubulina.

BIBLIOGRAFÍA.

- Alberts B.(2008). En Garland Science (fifth edition), Molecular Biology of the Cell.
- Ausmees N, Kuhn J.R. and Jacobs-Wagner C. (2003). The bacterial cytoskeleton: An intermediate filament-like function in cell shape. Cell 115, 705-713.
- Berkowitz S.A. and Wolff J. (1986). Intrinsic Calcium Sensitivity of Tubulin Polymerization. The contributions of temperature, tubulin concentration, and associated proteins. The Journal of Biological Chemistry.256:11216-11223.
- Bermudes D. Hinkle G. And Margulis L. (1994). Do Prokaryotes Contain Microtubules?. Microbiological Reviews, p. 387-400.
- Bertrand S. Barthelemy I. Oliva M.A. Carrascosa J.L. Andreu J.M. and Valpuesta J.M. (2005). Folding, stability and polymerization properties of FtsZ chimeras with inserted tubulin loops involved in the interaction with the cytosolic chaperonin CCT and in microtubule formation J. Mol.Biol.346:319-330
- Bi, E.F. and Lutkenhaus J. (1991). FtsZ ring structure associated with division in Escherichia coli. Nature 354:161–164.
- Bramhill D. and Thomson C.M.(1994). GTP-dependent polymerization of Escherichia coli FtsZ protein to form tubules. Proc Natl Acad Sci USA 91, 5813-5817.
- Carballido-Lopez, R. (2006). The Bacterial Actin-Like Cytoskeleton. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 70, 888-909.
- de Boer P. Crossley R. and Rothfield L. (1992). The essential bacterial cell-division protein FtsZ is a GTPase. Nature 359:254–256.
- Desai A. y Mitchinson T. (1997). Microtubule polymerization dynamics. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 13:83–117
- Díaz C. (2010). Polaridad estructural y dinámica de polarización de tubulina bacteriana BtubA/B de *prostheco bacter de jonegii*. Tesis de Doctorado

- Doolittle R.F. (1995). The origins and evolution of eukaryotic proteins. *Philos. Trans. R. Soc. London* 349, 235–240.
- Flyvbjerg H. Jobs E. and Leibler S. (1996). Kinetics of self-assembling microtubules: an "inverse problem" in biochemistry. *Proc Natl Acad Sci USA*. 93(12): 5975–5979.
- Gaskin F. Cantor C.R and Shelansky M.L. (1971). Turbidimetric study of the in vitro assembly and disassembly of porcine neurotubules. *Journal Biol. Mol.* 1971 89.737:740
- Gedalopoulos, T.P. Sotiroudis, T.G. y Evangelopoulos, A.E. (1991). A malachite green colorimetric assay for protein phosphatase activity. *Anual Biochem* 192, 112-116.
- Hartman H. and Fedorov A. (2002). The origin of the eukaryotic cell: a genomic investigation *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 1420– 1425.
- Hedlund, B. Gosink J. y Staley J. (1996). *Verrucomicrobia* div.nov.a new division of the Bacteria containing three new species of *Prostheco bacter*. *Antonie van Leeuwenhoek* 72: 29–38
- Jae Yen, S. (2007). Papel del glutamato 83 y la arginina 85 de ecFtsZ en la formación y el anclaje del anillo Z en el sitio de la división celular. Tesis de doctorado..
- Jenkins Ch. Samudrala R. Anderson I. Heldlund B. Petroni G. and Pinel N. (2002). Genes for the cytoskeletal protein tubulin in the bacterial genus *Prostheco bacter*. *PNAS*.99:17049-17054.
- Keeling P.J. and Doolittle W.F. (1996). Alpha-tubulin from early-diverging eukaryotic lineages and the evolution of the tubulin family *Mol. Biol. Evol.* 13, 1297–1305.
- Lee K. Webb R. Janssen P. Sangwan P. Romeo T. Stanley J y Fuerst J. (2009). Phylum *Verrucomicrobia* representatives share a compartmentalized cell plan with members of bacterial phylum *Planctomycetes*. *BMC Microbiology* , 9:5 doi:10.1186/1471-2180-9-5
- Lewis A.A. Tian G. and Cowan N.J. (1997). The α - and β -tubulin folding pathways. *Trends Cell Biol.* 7, 479–484.

- Löwe, J. and Amos, L. A. (1998). Crystal structure of the bacterial cell-division protein FtsZ *Nature* 391, 203–206.
- Marrington R. Small E. Rodger A. Dafforn T.R. and Addinall S.G. (2004). FtsZ Fiber Bundling Is Triggered by a Conformational Change in Bound GTP. *The Journal of Biological Chemistry*. 279: 48821–48829.
- Mendieta J. Rico A. Lopez-Viñas, E. Vicente M. Mingorance J. and Gomez-Puertas P. (2009). Structural and Functional Model for Ionic (K⁺/Na⁺) and pH Dependence of GTPase Activity and Polymerization of FtsZ, the prokaryotic Ortholog of Tubulin. *J.Mol.Biol* 390:17-25
- Merker, R.I. and Smith, J. (1988). Characterization of the adhesive holdfast of marine and freshwater caulobacters. *Appl Environ Microbiol* 54, 2078-2085.
- Michie K. and Lowe J. (2006). Dynamics filaments of the bacterial Cytoskeleton. *Annu. Rev. Biochem.* 75:467-492
- Mukherjee A. Dai K. and Lutkenhaus J. (1993). E. coli cell division protein FtsZ is a guanine nucleotide binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:1053–1057.
- Mukherjee, A. and Lutkenhaus, J. (1994). Guanine nucleotide-dependent assembly of FtsZ into filaments. *J Bacteriol* 176, 2754-2758
- Mukherjee A. and Lutkenhaus J. (1998). Analysis of FtsZ Assembly by Light Scattering and Determination of the Role of Divalent Metal Cations. *Journal of Bacteriology*.181: 823-832.
- Nishida E. and Sakai H. (1983). Kinetic Analysis of Actin Polymerization. *J. Biochem.* 93, 1011-1020
- Nogales E. (1999). A structural view of microtubule Dynamics. *CMLS. Cell. Mol. Life.Sci.*56: 133-142.
- Nogales E. Wolf S. G. y Downing K.H. (1998). Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography *.Nature.* 391, 199–203.
- Nogales E. Whittaker M. Milligan R.A. and Kenneth H. (1999). High-Resolution Model of the Microtubule. *Cell*, Vol. 96, 79–88.

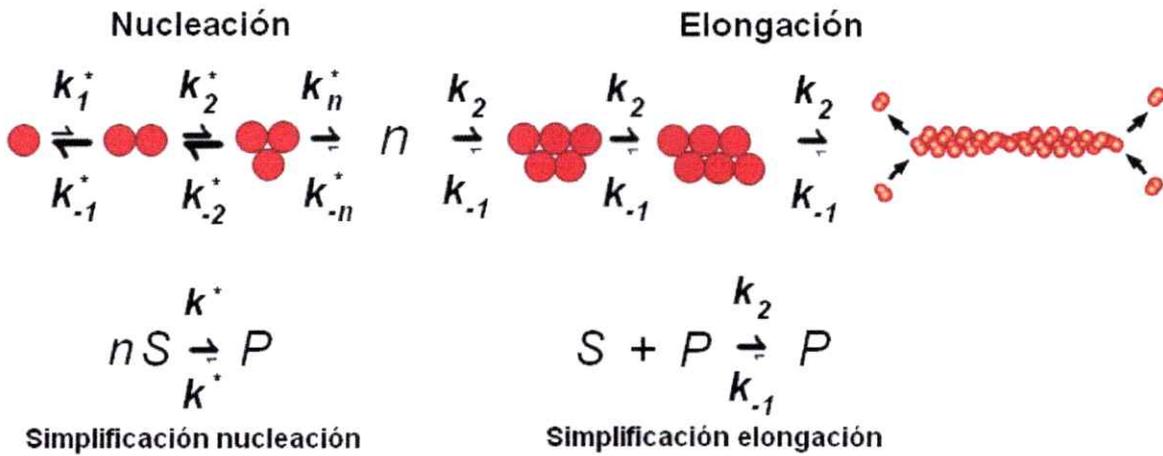
- Oosawa F. and Kasai M. (1962). A theory of linear and helical aggregations of macromolecules. *J.Biol.Mol* 4:10-21
- Pace C.N. Vajdos F. Fee L. Grimsley G. and Gray T. (1995). How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci* 4:2411-2423.
- Petroni G. Spring S. Schleifer K.H. Verni, F. and Rosati G. (2000) *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* 97, 1813–1817.
- Pilhofer M. Rosati G. Ludwig W. Schleifer K. and Petroni G. (2007). Coexistence of Tubulins and *ftsZ* in Different *Prostheco*bacter Species.
- Pilhofer M. (2008). Elucidation of the cell Division mechanism and characterization of tubulins in the bacterial Phylum *Verrucomicrobia*. Tesis Doctoral.
- RayChaudhuri D. and Park J.T. (1992). *Escherichia coli* cell-division gene *ftsZ* encodes a novel GTP-binding protein. *Nature* 359, 251-254.
- Schopf J.W.(1978). The evolution of the earliest cells. *Scientific American*, 239: 110-120.
- Schlieper D. Oliva M. Andreu J. and Lowe J. (2005). Structure of bacterial tubulin BtubA/B: Evidence for horizontal gene transfer. *PNAS*.102:9170-9175.
- Sigel H. Bianchi E.M. Corfù N.A. Kinjo Y. Tribolet R. and Martin R.B. (2001). Stabilities and isomeric equilibria in solutions of monomeric metal-ion complexes of guanosine 5'-triphosphate (GTP⁴⁻) and inosine 5'-triphosphate (ITP⁴⁻) in comparison with those of adenosine 5'-triphosphate (ATP⁴⁻). *Chem*.7:3729-3737
- Sontag C.A. Staley J.T. and Erickson H.P. (2005). In vitro assembly and GTP hydrolysis by bacterial tubulins BtubA and BtubB. *J. Cell Biol.* 169, 233–238.
- Soto C. Rodríguez P.H. and Monasterio O. (1996). Calcium and Gadolinium Ions Stimulate the GTPase Activity of Purified Chicken Brain Tubulin through a Conformational Change. *Biochemistry*. 35, 6337-6344

- Staley J.T.(1968). *Prosthecomicrobium* and *Ancalomicrobium*: new prosthecate freshwater bacteria. J. Bacteriol 95,1921-1942.
- Staley J.T. Bouzek H. and Jenkinns C. (2005). Eukariotic signature proteins of *prosthecobacter dejongeii* and Gemmata sp Wa-1 as revealed by in silico analysis. FEMS Microbiol. Lett.243:9-14.
- Tobacman L.S. and Korn E.D. (1983). The kinetics of actin nucleation and polymerization. *J Biol Chem.* Mar 10; 258(5):3207–3214.
- Voter W.A. and Erickson. H.P. (1984). The kinetics of microtubule assembly. Evidence for a two stage nucleation mechanism. J.Biol.Chem. 259:10430-10438.
- Yu X.C. and Margolin W. (1997). Ca²⁺-mediated GTP-dependent dynamic assembly of bacterial cell division protein FtsZ into asters and polymer networks *in vitro*. The EMBO Journal. 16: 5455 – 5463.

APÉNDICE.

A. Derivación de Nishida y Sakai del proceso de nucleación.

Dada la dificultad de modelar matemáticamente el proceso de nucleación, tanto en la determinación del tamaño de este y las constantes que la rigen (Esquema), los autores simplifican el proceso asumiendo que el proceso de nucleación se establece en un solo paso donde n es el número de subunidades de BtubA/B necesarias para formar el núcleo y k^* es la constante de nucleación.



Con esta simplificación y si despreciamos la pérdida de filamentos, una vez que estos se han formado, la tasa en que estos filamentos son formados esta dada por la ecuación (1).

$$\frac{dP}{dt} = k^* [S^*]^n \quad (1)$$

Donde P es la concentración de extremos de los filamentos y S es la concentración de subunidades de heterodímeros de BtubA/B. Similarmente, si despreciamos la despolimerización de los filamentos la tasa de polimerización (vista desde la pérdida de heterodímeros en la reacción) esta dada por la ecuación (2).

$$-\frac{dS}{dt} = k_2 [P][S^*] \quad (2)$$

Ahora bien, si nos fijamos en el momento particular de máxima tasa de polimerización ocurre un punto de inflexión en el gráfico de dispersión donde entre

otras cosas la aceleración de la tasa de polimerización que es a su vez la segunda derivada de la tasa de polimerización tiende a cero (3).

$$\frac{d^2 S}{dt^2} = 0 \quad (3)$$

Para encontrar este punto tomamos la derivada de la ecuación (2). Usando la regla de la cadena, obtenemos:

$$-\frac{d^2 S}{dt^2} = \frac{d}{dt} k_2 [P] [S^*]$$

$$-\frac{d^2 S}{dt^2} = k_2 [S^*] \frac{dP}{dt} + k_2 [P] \frac{dS^*}{dt} = 0$$

$$k_2 [S^*] \frac{dP}{dt} = -k_2 [P] \frac{dS^*}{dt} \quad (4)$$

Ahora, sustituyendo las ecuaciones (1) y (2) dentro de la ecuación (4) obtenemos.

$$k_2 [S^*] (k^* [S^*]^n) = k_2 [P] (k_2 [P] [S^*])$$

$$k^* [S^*]^n = k_2 [P]^2$$

$$[P] = \sqrt{\frac{k^* [S^*]^n}{k_2}} = \sqrt{\frac{k^*}{k_2}} [S^*]^{\frac{n}{2}} \quad (5)$$

La ecuación (5) nos muestra la concentración de filamentos de acuerdo a la concentración de heterodímero inicial y las constantes de nucleación y polimerización. Ahora si nos volvemos a centrar en el punto de máxima velocidad

de polimerización (V_{max}) y sustituimos lo obtenido de la ecuación (5) en la ecuación (2) obtenemos.

$$V_{m\acute{a}x} = k_2[P][S^*] = k_2[S^*] \sqrt{\frac{k^*}{k_2}} [S^*]^{\frac{n}{2}} = \sqrt{k_2 k^*} [S^*]^{\frac{n}{2}+1}$$

En este punto, se asume que la concentración de subunidades o heterodímeros como en nuestro caso se mantiene mas o menos constante a la concentración inicial de las subunidades G_0 . Otra forma de graficar esto es asumiendo que el máximo número de filamentos son formados antes que la concentración de subunidades libres sean significativamente menores a la concentración inicial.

$$V_{m\acute{a}x} = \sqrt{k_2 k^*} [S^*]^{\frac{n}{2}+1}$$

Ahora normalizando la máxima tasa de cambio en nuestras señales de dispersión de luz por la máxima señal de dispersión de luz (I_{max}) es equivalente a dividir por la concentración inicial de las subunidades obtenemos.

$$\frac{V_{m\acute{a}x}}{I_{m\acute{a}x}} = \sqrt{k_2 k^*} [S^*]^{\frac{n}{2}}$$

Y finalmente, tomando el logaritmo en ambas partes, se obtiene.

$$\log\left(\frac{V_{m\acute{a}x}}{I_{m\acute{a}x}}\right) = \log(\sqrt{k_2 k^*}) + \frac{n}{2} \log([S^*])$$

Esta ecuación es equivalente a una ecuación del tipo $Y = mx + a$, por lo que al hacer un grafico de doble logaritmo, obtendremos una recta cuya pendiente es equivalente $n/2$ donde n es el tamaño del núcleo critico, entendido como el polímero estable más pequeño.