

UCH-FC,
Biotecnología
W467
C.1

ESCUELA DE PREGRADO – FACULTAD DE CIENCIAS – UNIVERSIDAD DE CHILE



“Determinación de la interacción de FtsA con FtsZ y su influencia sobre la actividad ATPásica de una preparación de FtsA”

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

DAVID WEINSTEIN BARRIGA



Director de Seminario de Título:
Dr. Octavio Monasterio

Co-Directora de Seminario de Título:
Dra. Rosalba Lagos

Julio, 2009
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.:

DAVID WEINSTEIN BARRIGA

“Determinación de la interacción de FtsA con FtsZ y su influencia sobre la actividad ATPásica de una preparación de FtsA”

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

Dr. Octavio Monasterio
Director de Seminario de Título

Dra. Rosalba Lagos
Co-Directora de Seminario de Título

Comisión de Evaluación

Dr. Juan Carlos Letelier
Presidente de Comisión

Dr. Ricardo Cabrera
Evaluador

Santiago de Chile, 21 de Julio del 2009.

사군이충 事君以忠
사친이효 事親以孝
교우이신 交友以信
임전무퇴 臨戰無退
임전무퇴 臨戰無退



*Dedido a mi familia,
CA
especialmente a mi madre,
este también es un logro de ella.*



BIOGRAFÍA



Nací en enero de 1984, en la ciudad de La Serena, Chile. Descubrí tempranamente mi gusto por la ciencia con *Jurassic Park*, película que no solo me mostró el fascinante mundo de los dinosaurios, si no también la intrigante molécula de la vida, el DNA. Realice mis estudios primarios y secundarios en el *Colegio Inglés Católico de La Serena*. Mi profesor de Biología fue el Sr. Guerra, considerado el más estricto, exigente y lunático del Colegio, con quien comencé a interesarme en las células y las biomoléculas. Decidí formalmente tomar el camino de la ciencia en tercero medio, cuando escuche hablar sobre la carrera *Ingeniería en Biotecnología Molecular*, no tenía idea de que se trataba, pero como sonaba parecido a ingeniería genética, además era impartida en la mejor Universidad del país, me dije a mi mismo: "esto es lo mío". Y así el año 2002 me fui a vivir a Santiago, con mis tías abuelas, para estudiar en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile.

Durante estos 7 años en la Universidad he aprendido muchísimo sobre la ciencia y la vida, es más, me considero hoy en día un científico (con todo el peso que tiene la palabra), y voy a continuar con mis estudios de Doctorado fuera del país. En retrospectiva, quiero decir que valoro enormemente la formación crítica y rigurosa que recibí en la Facultad de Ciencias, y especialmente los conocimientos que me entregaron los profesores Osvaldo Álvarez, Boris Weiss, Juan Carlos Letelier, Jorge Babul, además de mis tutores Octavio Monasterio y Rosalba Lagos.



AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer en primer lugar al *Dr. Octavio Monasterio*, quien me recibió en su laboratorio cuando solo tenía 18 años y fue mi mentor durante estos largos años de trabajo, y a la *Dra. Rosalba Lagos*, quien fue siempre un apoyo fundamental. Pronto partiré a doctorarme en Biofísica en una de las Universidades más prestigiosas de USA, y me siento completamente preparado para este enorme desafío, gracias a la excelente formación que recibí de ambos.

A toda la gente del BEM: al *Dr. José Jaime Arbildúa* por todos los conocimientos que me entregó, y su valiosa ayuda bioinformática; a *Maribel López*, por enseñarme a trabajar en el laboratorio con rigurosidad, que he tratado de mantener siempre; a *Juan Carlos Mobarec*, quien fue mi primer tutor en el laboratorio; a *Jae Yen Shin* por su amistad; a *Esteban Nova*, por enseñarme a utilizar los equipos y su ayuda en la planificación de experimentos; a *Mario Tello*, por sus buenos consejos y guía en los experimentos; a *Cesar Díaz*, por ayudar a mantener un ambiente exigente en el laboratorio (se notó su ausencia); a *Rodrigo Gallardo*, por heredarme su trabajo (no se hasta que punto fue bueno eso); a *María José Gallardo*, por enseñarme su método distinto de trabajar (*cōtē stylē*), que si bien es opuesto al mío, con el tiempo asímilē que era mas bien complementario, y trate de aprender de ella; a *Felipe Montecinos*, por esforzarse en entender bien cómo funcionan los equipos, que creó que es uno de los sellos distintivos de nuestro laboratorio; a *Claudio Zuñiga*, por sus estimulantes conversaciones; a *Marisol Espinosa*, por alegrarme el día con sus locuras, que con el tiempo logre, algunas veces, logre asimilarlas de buena manera; a *David Gonzáles* por su ayuda con los experimentos y sus divertidas anécdotas; a *Andrea Garcés* por su apoyo y guía en los procesos de postulación al doctorado; a *Leonardo Sepúlveda*, por toda su buena onda y sus inolvidables e hilarantes "performance navideñas". Y al resto de mis compañeros de laboratorio: *Alexis Ordenes*, *Macarena Marín*, *María Jesús Mascayano*, *Sergio Gutiérrez*, *Verónica García*, *Gabriela Mercado*, *Luis Pouchucq*, *Cristian Escobar*, *Gíssela Araya*, *Mario Felipe Hernán Leiva*, *Paula Maldonado*, *Jorge Flores*, *Beatriz González*, *Felipe Hurtado*, *Daniela Muñoz*, *Jonathan Arias* e *Ignacio Cabrera*, por toda su ayuda en el trabajo día a día, y por el buen ambiente de

compañerismo. También agradezco a Gino Corsini y Erwin Strahsburger, aprendí mucho de ellos durante mis primeros años en el laboratorio.

Al personal del laboratorio: a Don Pedro, que siempre tuvo buena disposición para ayudarnos en las vicisitudes propias del trabajo de laboratorio; a Roselyn Orellana, por su esencial labor en el funcionamiento del laboratorio, incluyendo preocuparse por todos nosotros; y a Macarena Collao, por su ejemplar labor en el orden del laboratorio, las conversaciones y todos los favores que me hizo (incluyendo des-estresarme continuamente).

A los Drs. *Miguel Vicente* y *Paolo Natale* (Centro Nacional de Biotecnología, España) por enviarme gentilmente sus plásmidos, por compartir sus resultados antes de publicarlos, sus valiosas discusiones y ayudarme a mejorar los experimentos.

A Los integrantes de mi comisión: al Dr. Ricardo Cabrera, por su buena disposición para analizar mis resultados y sus valiosas discusiones, pero sobre todo por el curso de Bioinformática que dictó el año 2006, que fue uno de los que más me gusto en la carrera, y que me sirvió muchísimo en mi trabajo. Al Dr. Juan Carlos Letelier, por su ayuda clave en mis postulaciones al doctorado, por tratar de traspasarme sus conocimientos y experiencia (para que me vaya bien en la vida), por hacerme participe de sus nobles metas, y por enseñarme la clave del éxito (ser ultra eficiente).

A mis compañeros de carrera: Felipe Vargas, Carolina Rosas, Francisca Toledo, Andrés Lagos, Catalina Zuñiga, Mauricio Latorre, Jorge Vera, Lorena Pizarro y Luis Matsuda. Por su valiosa amistad a través de los años, los buenos momentos vividos y su apoyo. Les deseo el mejor de los éxitos a todos.

Y finalmente al Kuksanim Hector Contreras y a todos mis compañeros de Escuela, especialmente a Miguel Ramírez, Elizabeth Ocampo, Felipe Hormazabal, Guillermo González, Romina Reyes, Sebastián Baeza, Cristian Álvarez, José Miguel Lagos, Alejandro López y Marcelo Guerra. Con quienes compartí mis momentos más entrañables y de mayor crecimiento personal. Los recordaré por siempre.



INDICE DE CONTENIDOS



	Pág.
Dedicatoria	ii
Biografía	iv
Agradecimientos	v
Índice de contenidos	vii
Lista de tablas	viii
Lista de figuras	ix
Lista de abreviaturas	xi
RESUMEN	xiv
SUMMARY	xvi
INTRODUCCIÓN	1
MATERIALES Y METODOS	9
Reactivos	9
Cepas y Plasmidios	10
Medios de cultivo	12
Aislamiento de DNA plasmidial (Miniprep)	13
Cuantificación de DNA	14
Electroforesis de DNA plasmidial en geles de agarosa	14
Preparación de células de <i>E. coli</i> electrocompetentes	14
Electrotransformación de <i>E. coli</i>	15
Electroforesis de proteínas en condiciones denaturantes (SDS-PAGE)	15
Electrotransferencia	17

Desarrollo inmunológico de la membrana de nitrocelulosa	17
Prueba de sobreexpresión de proteína recombinante	18
Purificación de FtsA y FtsA Δ 27	18
Purificación de FtsZ	20
Polimerización	21
Determinación de la actividad ATPásica de una preparación de FtsA	22
Unión FtsA-FtsZ	23
Entrecruzamiento químico de FtsA y FtsA Δ 27	25
Apagamiento dinámico de la fluorescencia intrínseca de FtsA	26
Unión de DAPI a FtsA	27
RESULTADOS	28
Purificación de FtsA y de FtsA Δ 27	28
Expresión de mutantes en los dominios de FtsA	30
Purificación y polimerización de FtsZ	31
Polimerización de FtsA	35
Determinación de la actividad ATPásica de una preparación FtsA	43
Determinación de la unión de FtsZ a FtsA	48
Entrecruzamiento químico de FtsA y FtsA Δ 27	50
Apagamiento dinámico de la fluorescencia intrínseca de FtsA	53
Unión de DAPI a FtsA	55
DISCUSION	54
Polimerización de FtsA y FtsZ	54
Actividad ATPásica de FtsA	57



Unión de FtsZ a FtsA	57
Apagamiento de la fluorescencia intrínseca de FtsA y unión de DAPI	58
CONCLUSIONES	64
REFERENCIAS	65

INDICE DE TABLAS



		Pág.
Tabla I	Plásmidos utilizados en este trabajo	11
Tabla II	Parámetros cinéticos de la actividad ATPásica de FtsA, y de FtsA en presencia de FtsZ	47
Tabla III	Constantes de disociación para los tres sitios observados en la curva de titulación de FtsA 1 μ M con FtsZ	50
Tabla IV	Constantes de Stern-Volmer calculadas para del apagamiento dinámico de la fluorescencia de los triptófanos de la hélice C-terminal de FtsA y su grado de exposición al solvente	55

INDICE DE FIGURAS



	Pág.
Figura 1 Organización genética del cluster <i>dcw</i>	2
Figura 2 Inmunolocalización de FtsA, FtsA y ZipA en <i>E. coli</i>	6
Figura 3 Modelo del divisoma en <i>E. coli</i>	7
Figura 4 Esquema del vector pMFV12	11
Figura 5 Gel SDS-page de las distintas etapas de purificación de FtsA	29
Figura 6 Gel SDS-page de las distintas etapas de purificación de FtsA Δ 27	29
Figura 7 Sobreexpresión de mutantes de FtsA	30
Figura 8 Purificación de FtsZ	32
Figura 9 Polimerización de FtsZ a pH 6,5 seguida por dispersión de luz	34
Figura 10 Efecto del pH en la polimerización de FtsZ	35
Figura 11 Inhibición de la polimerización de FtsA por sacarosa	37
Figura 12 Efecto del pH sobre la polimerización de FtsA	38
Figura 13 Efecto de NaCl y KCl sobre la polimerización de FtsA	39
Figura 14 Efecto de la concentración de FtsA y el ATP en su cinética de polimerización	41
Figura 15 Efecto de la concentración de FtsA y el ATP en el delta de polimerización	42
Figura 16 Curva de calibración para la cuantificación de fosfato inorgánico usando el método de verde de malaquita	44
Figura 17 Curva de saturación de la actividad ATPásica de una preparación de FtsA	46
Figura 18 Curva de saturación de la actividad ATPásica de una preparación de FtsA, y FtsA más FtsZ	47
Figura 19 Curva de titulación de FtsA con FtsZ, siguiendo la anisotropía de la fluorescencia intrínseca de FtsA	49

Figura 20	Gel de SDS-PAGE de la cinética de entrecruzamiento químico con glutaraldehído de FtsA y FtsA Δ 27	51
Figura 21	Análisis del gel SDS-PAGE de entrecruzamiento de FtsA Δ 27	52
Figura 22	Diagrama de rueda para la supuesta α -hélice C-terminal de FtsA de <i>E. coli</i>	53
Figura 23	Gráfico de Stern-Volmer del apagamiento dinámico de la fluorescencia de los triptofanos de la hélice C-terminal de FtsA	54
Figura 24	Estructura química de la sonda fluorescente DAPI	55
Figura 25	Titulación de FtsA con DAPI seguida por FRET	56



LISTA DE ABREVIATURAS

ATP	: Nucleótido trifosfato de adenosina
C_r	: Concentración crítica
DAPI	: 4'-6-diamino-2-fenilindol
DTT	: <u>D</u> itio <u>t</u> reitol
EDTA	: Ácido etilendiaminotetraacético
ϵ_{λ}	: Coeficiente de extinción molar a la longitud de onda λ
FRET	: “ <u>F</u> örster <u>r</u> esonance <u>e</u> nergy <u>t</u> ransfer”
GTP	: Nucleótido trifosfato de guanosina
Hepes	: Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etanosulfónico
IPTG	: Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
K_M	: Constante de Michaelis-Menten
Mes	: Ácido 2-morfolino-etanosulfónico
MTS	: “ <u>M</u> embrane <u>t</u> argeting <u>s</u> equence”
OD_{λ}	: Densidad óptica a la longitud de onda λ
PAGE	: “ <u>P</u> oly <u>a</u> crylamide <u>g</u> el <u>e</u> lectrophoresis”
PI	: Fosfato inorgánico
Pipes	: Piperazina-1,4-bis(ácido 2-etanosulfónico)
R_F	: Migración relativa
SDS	: “ <u>S</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfate”
Tris	: 2-amino-2-(hidroximetil)propano-1,3-diol
u.a.	: <u>U</u> nidades <u>a</u> rbitrarias
UFC	: <u>U</u> nidades <u>f</u> ormadoras de <u>c</u> olonias

Otras abreviaciones se definen en el texto.

RESUMEN

El denominado divisoma bacteriano es un complejo multiprotéico compuesto por al menos 15 proteínas en *E. coli*, que se localizan en el punto división celular. Este complejo permite la separación de las células hijas y la segregación del cromosoma bacteriano, mediante los procesos de septación y partición, respectivamente.

El primer componente del divisoma en reclutarse al sitio de división celular, es la FtsZ, una GTPasa citosólica considerada el homólogo procarionte de la tubulina. Esta proteína polimeriza para formar el llamado anillo Z, una estructura dinámica que se contrae durante el proceso de septación, y se desensambla una vez que se han separado las células hijas. Las primeras proteínas que se unen al anillo Z son FtsA y ZipA, para formar el protoanillo, el cual recluta el resto de las proteínas del divisoma, que participan en la síntesis del peptidoglicano septal. Dado que FtsA es una ATPasa, cabe preguntarse: ¿Cuál es el papel que cumple la actividad ATPásica de FtsA en la septación? Se postula en este trabajo que la actividad ATPásica de FtsA participa en forma activa en la constricción del anillo Z.

Se estudió la polimerización de FtsA siguiendo la dispersión de luz a 350 nm, la proteína exhibió una importante tendencia a agregarse, la cual se favoreció a una alta concentración de proteína y a un pH ácido; y se inhibió con sacarosa (cosolvente estabilizador), fuerza iónica, y pH alcalino. Se estudió el efecto del ATP sobre la cinética de polimerización de FtsA, a pH 7,4 se observó un estímulo en la polimerización, el que se hizo menor a una mayor concentración de proteína, esto indica que el ATP solo tiene efecto sobre el estado de agregación de la proteína

cuando está como monómero u oligómeros, no así cuando esta agregada formando polímeros. El ATP no tuvo efecto en la polimerización de FtsA a pH ácido. Resultados de microscopia electrónica indican que a pH 8,0 FtsA forma manojos de polímeros en presencia de ATP (Gallardo, 2006), y que en cambio, a pH entre 5 y 6 solo forma agregados amorfos (Marcin Krupka y Dr. Miguel Vicente, CNB, Madrid, España). Por experimentos de entrecruzamiento químico se determinó que la hélice C-terminal de FtsA es importante para la polimerización de la proteína, pero no esencial. Se observó un dímero en el caso de FtsA Δ 27, que ha sido propuesto como la unidad funcional de la proteína por experimentos genéticos de complementación.

Por anisotropía de la fluorescencia intrínseca de FtsA se determinó que FtsZ se une a FtsA, con constantes del orden micromolar, y que esta interacción es más favorable a mayor concentración de FtsA, lo que sugiere que la afinidad del polímero de FtsA por FtsZ es mayor que la del monómero u oligómero. Lo que se ha corroborado por experimentos *in vivo* de complementación genética (Shiomi y Margolin, 2007). Se determinó además que la unión de FtsZ a FtsA inhibió su actividad ATPásica, pues disminuyó la V_{MAX} , la unión no afectó la K_M .

En conjunto estos resultados indican que la polimerización de FtsA, que es dependiente de su concentración y de ATP, favorece la interacción con FtsZ. Esto sumado a la reciente determinación de que la polimerización de FtsA favorece su unión a la membrana (Shiomi y Margolin, 2008), permite establecer que la polimerización de FtsA favorecería la unión de la FtsZ a la membrana, permitiendo así la formación de un anillo Z funcional.

SUMMARY

The so-called bacterial divisome is a multiprotein complex composed of at least 15 different proteins in *E. coli*, that are located in the middle of the longitudinal axis of the cell, during the process of cell division. This complex allows the separation of daughter cells and the segregation of the bacterial chromosome, through the processes of septation and partition, respectively.

The first component of the divisome to be recruited at the site of cell division, is FtsZ, a GTPase cytosolic located protein, that is considered the prokaryotic homologue of eukaryotic tubulin. This protein polymerizes to form the so-called Z ring, a dynamic structure that constricts during the process of septation, and disassembles once the daughter cells are formed. The first proteins that binds to the Z ring are FtsA and ZipA, forming the proto-ring, which function as a scaffold and recruits the late divisome components that are responsible of the septal peptidoglycan synthesis. As FtsA is an ATPasic protein, a question arises: Which is the role of the ATPase activity of FtsA in the septation process? We postulate that the ATPase activity of FtsA participates actively in the constriction of the ring Z.

FtsA's polymerization activity was studied following the light scattering at 350 nm, where the protein showed a high tendency to form high molecular weight clusters, these were enhanced at a high protein concentration and with an acidic pH; and were inhibited with sucrose (stabilizing cosolvent), ionic strength and a alkaline pH. ATP enhanced the polimerization of FtsA at pH 7,4 the polimerization was enhanced, and this efect was reduced at higher FtsA concentration. The results indicate that ATP has

an effect only upon the aggregation of FtsA's monomers or oligomers, and not on the polymers. These effects were abolished at acid pH. Electron microscopy results indicates that bunches of FtsA's polymers are formed at pH 8,0 with ATP (Gallardo, 2006), but in contrast, at pH 5-6 only amorphous protein clusters are formed (Marcin Krupka, Ph.D. Miguel Vicente, CNB, Madrid, Spain). It was determined by chemical cross-linking experiments, that the C-terminal helix of FtsA is important, but not essential, for its polymerization. Moreover, a dimer of FtsA Δ 27 was found, which has been indicated by genetic complementation experiments, as the functional unit of FtsA.

Measuring the anisotropy of the intrinsic fluorescence of FtsA, was found that FtsZ binds to FtsA with constant values in the micromolar range. This interaction was enhanced at a higher concentration of FtsA, suggesting that the affinity of FtsA polymers for FtsZ is stronger than the affinity of monomers or oligomers, which was confirmed recently by genetic complementation assays (Shiomi and Margolin, 2007). The ATP hydrolysis assays indicate that the binding of FtsZ inhibited FtsA's ATPase activity.

According to this findings, and our results, we propose a model for FtsA-FtsZ interaction in *E. coli*. At high concentration of FtsA, and in presence of ATP, FtsA polymers are formed, which have higher affinity for FtsZ than the monomers. FtsA polymers have higher affinity for the membrane than the monomers (Shiomi and Margolin, 2008), indicating that the polymerization of FtsA increases the binding of the FtsZ polymers to the membrane, forming a functional Z-ring.

INTRODUCCIÓN

En las primeras etapas de la división celular en *E. coli*, se origina el septo, una invaginación de la membrana citoplasmática y de la pared celular, que se forma en la mitad del eje longitudinal de la célula. En él se localiza el denominado divisoma bacteriano, un complejo multiprotéico que constituye la maquinaria para la síntesis del peptidoglicano, que permite la separación de las células hijas y la segregación del cromosoma bacteriano (Vicente y col., 2006).

Se han identificado en *E. coli*, varias mutantes termosensibles para genes, que bloquean la división celular en alguna etapa. A una temperatura restrictiva, las células crecen, pero se interrumpe la septación, originando largos filamentos celulares, que finalmente se lisan, por esta razón solo se han obtenido mutantes condicionales para estos genes. De ahí que muchos de estos genes se denominen *fts* "filamentous temperature-sensitive" (Donachie, 1993).

Varios de estos genes se encuentran agrupados en el genoma de *E. coli*. El "cluster" más numeroso denominado *dcw* "division and cell wall" (Vicente y col., 1998), contiene genes como *ftsI*, *ftsL*, *ftsW*, *ftsQ*, *ftsA* y *ftsZ* (**figura 1**). También contiene genes que codifican para proteínas que participan en la síntesis de precursores del peptidoglicano en el citoplasma, y que los translocan al periplasma.

La primera proteína que se localiza en el septo es la FtsZ (**figura 2**), que polimeriza para formar un anillo en el citoplasma, alrededor de la membrana interna, llamado anillo Z (Bi y Lutkenhaus, 1991), una estructura dinámica que se contrae durante el proceso de septación, y se desensambla una vez que la célula se separa (Addinall y Lutkenhaus, 1996; Stricker y col., 2002; Li y col., 2007; Osawa y col., 2008).

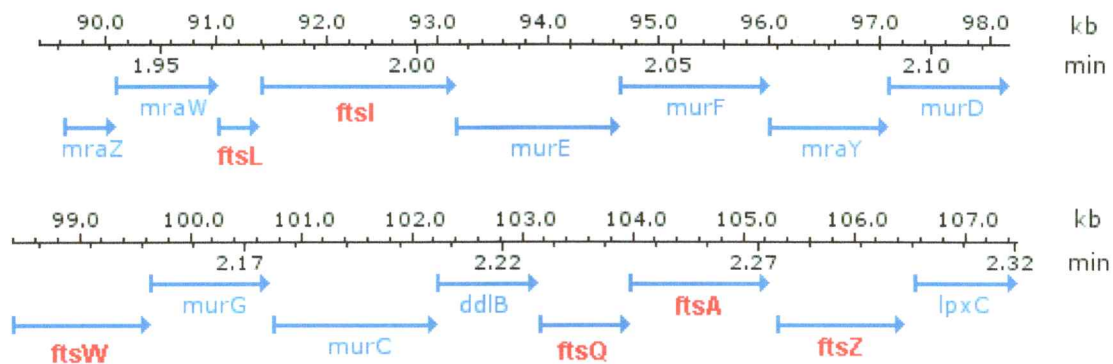


Figura 1. Organización genética del cluster *dcw*, ubicado en el minuto 2 del genoma de *E. coli* K12. Se observan 16 genes: *ftsL*, *ftsQ*, *ftsA* y *ftsZ* son parte de la maquinaria de división celular; *ftsI* y *ftsW* participan en la síntesis de peptidoglicano en el septo; *murE*, *murF*, *mraY*, *murD*, *murG*, *murC* y *ddlB* participan en la síntesis de los precursores del peptidoglicano; a *mraZ*, *mraW* y *lpxC* (*envA*) no se les conoce su función. Imagen tomada de la base de datos Eco Gene (Rudd, 2000).

La FtsZ es considerada el homólogo procarionte de la tubulina (Ericsson, 1997; van den Ent y col., 2001). Si bien FtsZ y tubulina, comparten una baja identidad de secuencia (~17%), poseen una alta similitud estructural (Löwe y Amos, 1998; Nogales y col., 1998), además ambas proteínas son capaces de unir e hidrolizar GTP (RayChaudhuri y Park 1992; de Boer y col., 1992) y de formar polímeros, que luego se desensamblan al hidrolizar el nucleótido (Bramhill y Thompson, 1994; Romberg y col., 2001).

FtsZ es considerada una de las proteínas más conservadas en los procariontes (Vaughan y col., 2004), se han identificado homólogos en la mayoría de los genomas secuenciados de bacterias, a excepción de bacterias parásitos como *Ureaplasma urealyticum* y miembros de la familia Chlamydiaceae; y de archaeas (solo en el phylum Euryarchaeota) (Erickson, 2000). Se ha identificado también FtsZ en mitocondrias de alga (Beech y col., 2000) y en cloroplastos de plantas como *Arabidopsis thaliana*

(Osteryoung y col., 1998; Osteryoung y McAndrew, 2001; Vitha y col.s, 2001), donde forman anillos. Se piensa que en las mitocondrias de organismos superiores, la función de la FtsZ ha sido reemplazada por proteínas semejantes a dinamina (Ericsson, 2000). Hasta la fecha no se han encontrado homólogos de FtsZ en hongos ni en animales. Se han identificado recientemente tubulinas bacterianas, nombradas BtubA y BtubB, en la bacteria *Prostheco bacter dejongeei* (Jenkins y col., 2002), estas proteínas poseen una mayor identidad de secuencia (~35%) y similitud estructural con las tubulinas eucariontes que con FtsZ. (BtubA/B y FtsZ solo comparten un 8 a 11% de identidad de secuencia). Se ha planteado que *Prostheco bacter* adquirió BtubA/B por transferencia horizontal de genes (Pilhofer y col., 2007). Si bien en *P. dejongeei* no se ha encontrado un homólogo de FtsZ, dentro de este género, si se han encontrado especies que poseen homólogos de FtsZ, BtuA/B y FtsA.

Se ha determinado que en el divisoma de *E. coli* participan 15 proteínas, que son reclutadas en forma secuencial (Buddelmeijer y Beckwith, 2002; Chen y Beckwith, 2001), cuyo orden se muestra a continuación:

FtsZ > (FtsA, ZapA, ZipA) > [FtsEX] > FtsK > FtsQ > [FtsBL] > FtsW > FtsI > FtsN > AmiC > EnvC

Donde las proteínas entre paréntesis se ensamblan en forma independiente entre si, pero dependiente de FtsZ; y las proteínas entre corchetes, se ensamblan aparentemente en forma simultanea (Vicente y col., 2006).

La formación del anillo Z es necesaria para reclutar al resto de las proteínas del divisoma (**figura 3**), éstas, de acuerdo a su tiempo de ensamblaje y a su orden de dependencia, se han dividido en dos grupos (Aarsman y col., 2005; Vicente y col.,

2006): de ensamblaje temprano (FtsA, ZipA) y de ensamblaje tardío (FtsE, FtsX, FtsK, FtsQ, FtsB, FtsL, FtsW, FtsI, FtsN, AmiC y EnvC).

Las primeras proteínas que se unen al anillo Z son FtsA y ZipA, para formar el denominado protoanillo (figura 3 A). ZipA es una proteína periférica de membrana, posee una hélice N-terminal que la une a la membrana, y un dominio C-terminal que interactúa con FtsZ (Hale y de Boer, 1997; RayChaudhuri, 1999; Hale y col., 2000), su estructura tridimensional ha sido resuelta por cristalografía de rayos X, como complejo formado con un péptido C-terminal de FtsZ (Moy y col., 2000), posee homología con proteínas asociadas a microtúbulos MAPs (RayChaudhuri, 1999). Se ha determinado *in vitro* que la unión de ZipA a FtsZ favorece la formación de polímeros de FtsZ, estabilizando las interacciones laterales entre estos (RayChaudhuri, 1999; Shin, 2007). FtsA es una proteína citoplasmática que se asocia a membrana (Sanchez y col., 1994), posee una hélice C-terminal de carácter anfipático, muy conservada, que ha sido descrita como una MTS "membrane targeting sequence" (Pichoff y Lutkenhaus, 2005). Para formar el anillo Z se requiere solo ZipA o FtsA, pero este solo es funcional cuando ambas proteínas están presentes, pues la formación del protoanillo es necesaria para reclutar el resto de los componentes del divisoma (Pichoff and Lutkenhaus, 2002). En una cepa mutante para ambos genes no se forma el anillo Z, lo que indica que se necesita al menos una de ellas para fijar el anillo a la membrana, y que ambas proteínas son capaces de complementar su función entre sí (Pichoff y Lutkenhaus, 2005; Rueda y col., 2003; Ma y col., 1996).

Si bien ambas proteínas pueden unir al anillo Z a la membrana, se ha planteado que FtsA es más importante, por tres razones: 1) porque FtsA es mucho más conservada que ZipA. De las proteínas del divisoma, la más distribuida en el dominio bacteria, después de FtsZ, es FtsA; en cambio ZipA esta presente solo en γ -

proteobacterias (Rothfield y col., 1999; Margolin, 2000). 2) Se ha determinado que la mutante puntual FtsA R286W complementa la ausencia de ZipA en *E. coli* sin un costo significativo para la célula (Geissler y col., 2003). 3) Estudios de colocalización de proteínas fluorescentes (Goehring y col., 2005; Bernard y col., 2007) y análisis de doble híbrido (Di Lallo y col. 2003; Karimova y col., 2005), indican que FtsA interactúa directamente con FtsN y FtsI; por otro lado, no se ha descrito que ZipA interactúe con otra proteína además de FtsZ. FtsN y FtsI son proteínas bitópicas, ambas interactúan en el periplasma (Wissel y Weiss, 2004). FtsI es una transpeptidasa necesaria para la síntesis de peptidoglicano en el septo (Weiss y col., 1999), FtsN se une al peptidoglicano, pero su función se desconoce (Ursinus y col., 2004).

Para que la célula se divida correctamente, es necesario que exista un balance entre la cantidad de moléculas de FtsA y de ZipA, respecto de FtsZ. Se estima que la cantidad de moléculas por célula de FtsZ es de 4000 a 15000 (Lu y col., 1998; Rueda y col., 2003); para FtsA es de 50 a 700 (Wang y Gayda, 1992) y para ZipA es de 100 a 1500 (Hale y de Boer, 1997; Rueda y col., 2003). La estequiometría relativa entre FtsZ : ZipA : FtsA es de 150:10:1; en *Bacillus subtilis*, bacteria que no posee homólogo de ZipA, FtsA es mucho más abundante, la proporción de FtsZ : FtsA es de 5:1. La sobreexpresión de FtsA o de ZipA bloquea la septación, este efecto inhibitorio es suprimido al sobreexpresar la FtsZ. (Dai y Lutkenhaus, 1992; Hale y de Boer, 1997; Begg y col., 1998).

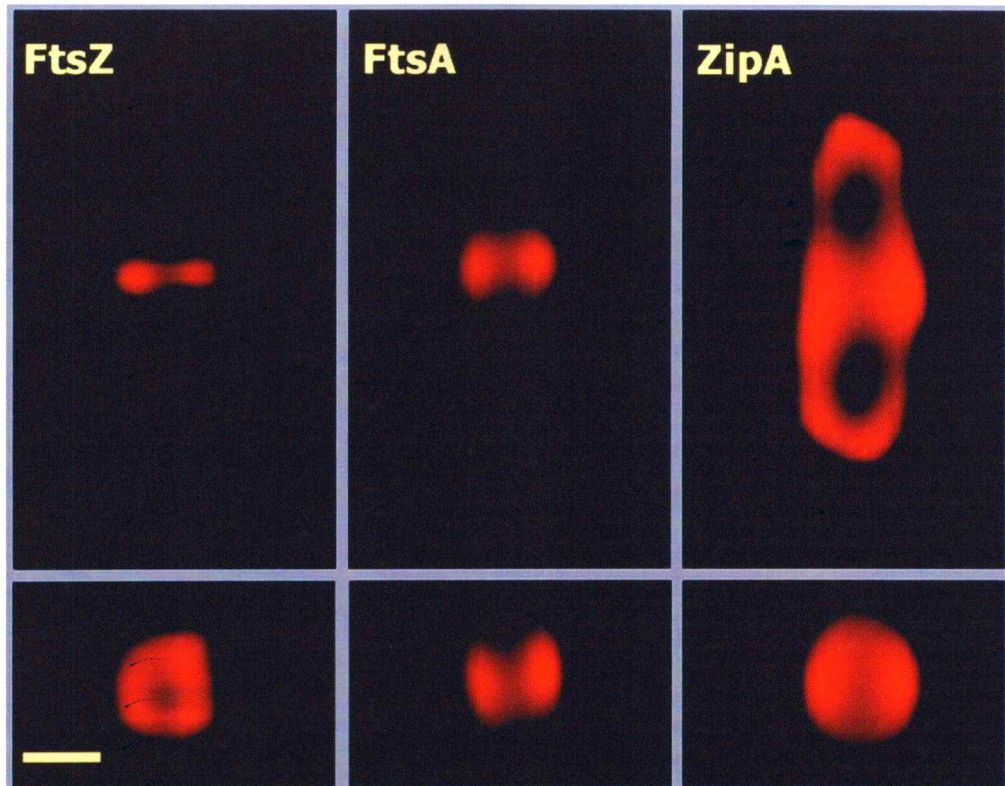


Figura 2. Inmunolocalización de FtsZ, FtsA y ZipA en *E. coli* (modificada de Vicente y col., 2006). Las células se tiñeron con suero policlonal para cada antígeno, y con un anticuerpo secundario de conejo conjugado con alexa 594. La barra corresponde a 0,5 μm . En la fila superior se observa la localización de las proteínas en una célula, a través de su eje longitudinal, en la fila inferior se observa un corte transversal en el punto medio de la misma célula.

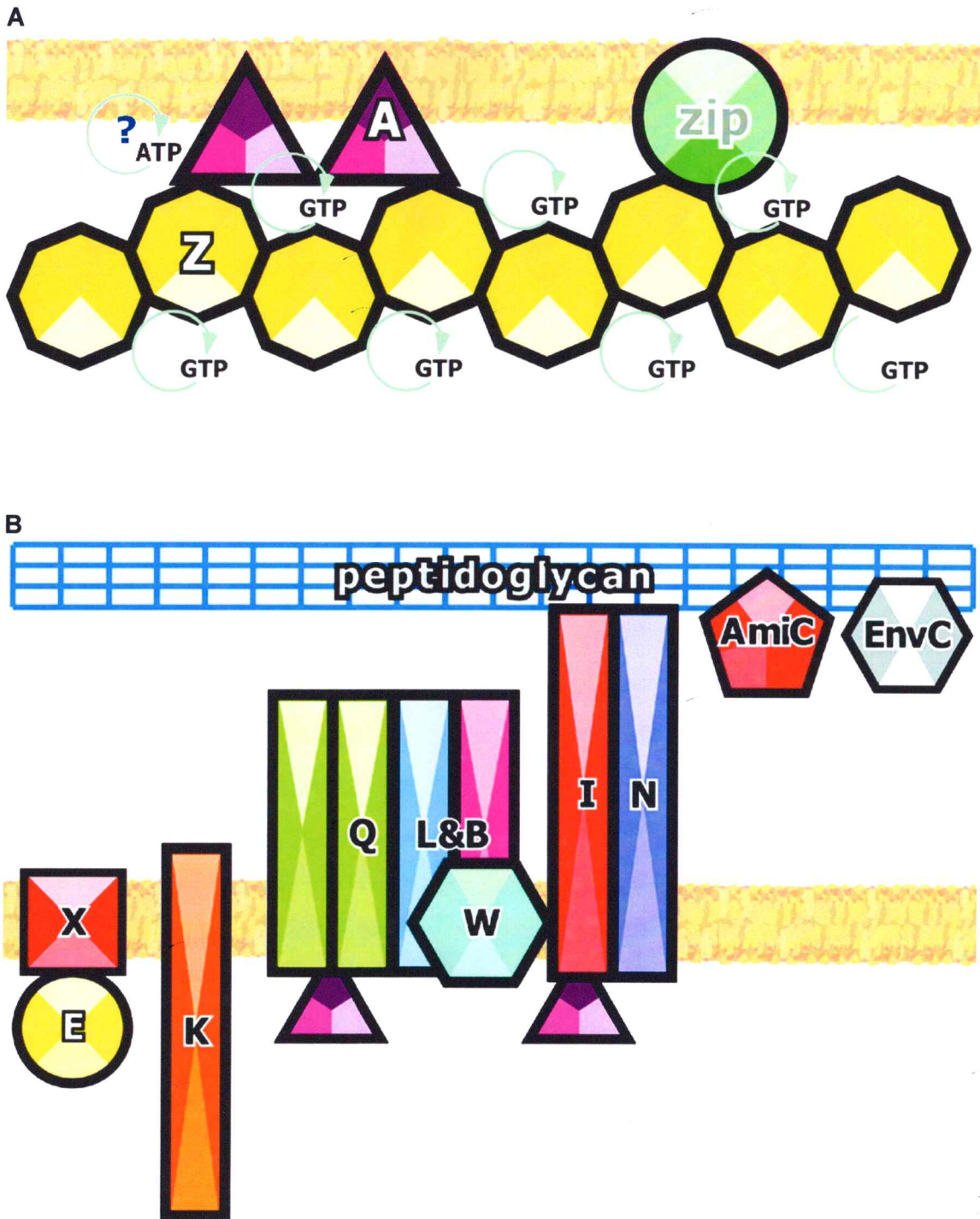


Figura 3. Modelo del divisoma en *E. coli* (modificado de Vicente y col., 2006). **A.** Modelo del protoanillo, FtsA y ZipA unen al anillo Z a la membrana interna. **B.** Modelo del ensamblaje tardío del divisoma, los iconos están dispuestos de izquierda a derecha, de acuerdo a su orden de ensamblaje propuesto.

FtsA es una proteína citoplasmática de 45 kDa, posee dos dominios, y un sitio de unión a ATP, su estructura tridimensional ha sido resuelta por cristalografía de rayos X (van den Ent y Löwe, 2000). Estructuralmente pertenece a una familia de ATPasas que incluye a actina, HSP70, y hexoquinasa; todas las proteínas estudiadas de esta familia poseen actividad ATPásica (Hurley, 1996). Si FtsA es una ATPasa, entonces cabe preguntarse: ¿Cual es el papel que cumple la actividad ATPásica de FtsA en la septación?

En la literatura no existe publicación científica alguna a la fecha, sobre una caracterización bioquímica de FtsA de *E. coli*. Solamente existe un trabajo referente a FtsA de la bacteria esporuladora Gram (+) *Bacillus subtilis*, una donde se purificó la proteína recombinante, se determinó que esta se encontraba formando dímeros mayoritariamente y oligómeros en una menor proporción; también se detectó que une e hidroliza ATP (Feucht y col., 2001). No está claro si la actividad ATPásica de FtsA está relacionada a el ensamblaje y desensamblaje de polímeros, como en el caso de de actina y ParM, ambas proteínas homólogas de FtsA (Møller-Jensen y col., 2002).

Hipótesis:

“La actividad ATPásica de FtsA participa en la formación de polímeros, y a través de ellos en la constricción del anillo Z”.

Objetivos:

- 1.- Determinar si FtsZ interactúa como oligómeros pequeños, con los polímeros de FtsA de *E. coli in vitro*.
- 2.- Determinar como influye la presencia de FtsZ en la actividad ATPásica de FtsA de *E. coli*.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

Reactivos. Reactivos utilizados en este trabajo: BSA, persulfato de amonio, azida de sodio, imidazol, fosfato di-ácido de potasio, azul de coomassie R-250, azul brillante de coomassie G-250, GTP sal sódica, ATP, TEMED, nitro azul de tetrazolio (NTB), fluorescamina, ioduro de sodio y glutaraldehído de Sigma (St. Louis, Missouri, EE.UU.). Azul de bromofenol, cloroformo, alcohol isoamílico, oxaloacetato de verde de malaquita, isopropanol, etanol, cloruro de cesio, ácido bórico, molibdato de amonio y bicarbonato de sodio de Merck (Darmstadt, Alemania). Cloruro de sodio, agar, cloruro de magnesio hexahidratado, dimetilformamida, citrato de sodio dihidratado, cloruro de guanidinio, Tris, glicina, glicerol, EDTA, fenol, fosfato ácido de sodio, tritón x-100, tween 20, DTT, acrilamida y agarosa de Winkler (Santiago, Chile). Cloruro de potasio, sulfato de magnesio y cloruro de calcio de Fluka (Messerschmitstr, Suiza). Ácido acético, etanol, metanol, etanol y acetona de TCL (Santiago, Chile). Triptona y extracto de levadura de Difco Laboratories (Detroit, Michigan, EE.UU). Bisacrilamida de Gibco (Grand Island, New York, EE.UU). Hidróxido de sodio de J.T. Baker (Estado de México, México). BCIP, NBT, DAPI y SDS de Applichem (Damstadt, Alemania). Hapes e IPTG de USBiological (Swampscott, Masachusett, EE.UU.). Anticuerpo de cabra contra Ig-G de ratón conjugado con fosfatasa alcalina de Pierce (Rockford, Illinois, EE.UU.). Reactivo de Bradford, cubetas de electroporación, cámaras de SDS-PAGE y resina ProBond de BioRad (Hercules, California, EE.UU.). Bolsas de diálisis de celulosa de "cut-off" 12 a 14 kDa de Spectrum Laboratories (Rancho Dominguez, California, EE.UU.). Filtro GyroDisc de acetato de celulosa de Orange Sientific (Alleud, Bélgica). Cóctel de inhibidores de proteasas sin EDTA Roche (Mannheim, Alemania).

10-d-camfor sulfonato de amonio de Katabama Chem (Japón). Todas las soluciones empleadas en espectroscopía fueron filtradas con un filtro de 0,2 nm. El agua utilizada en todos los experimentos se ultrapurificó (agua nanopura), hasta una resistencia de $18,3 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ a 25 °C.

Cepas y Plásmidos. Para la expresión de proteínas recombinantes se utilizó el sistema de expresión T7. La cepa de *E. coli* C41 (Miroux y Walker, 1996) es lisogénica para el bacteriófago λ DE3, que contiene el gen de la RNA polimerasa del bacteriófago T7, bajo el control del promotor IPTG inducible *lac UV5*. El gen de interés se clonó bajo el control del promotor ϕ 10 del fago T7, que es reconocido por la RNA polimerasa de T7, y no por la bacteriana. De esta manera, la expresión de la proteína se indujo en presencia de IPTG, un análogo no hidrolizable de la lactosa.

La FtsZ de *E. coli* silvestre se expresó en forma recombinante sin cola de histidinas, esta, de acuerdo a la secuencia del gen, correspondería a una proteína de 383 residuos, de una masa molecular de 40323,9 Da y de punto isoelectrico 4,65. La FtsA de *E. coli* se expresó como proteína de fusión unida a un péptido N-terminal con 6 residuos histidina, de acuerdo a la secuencia del gen, esta correspondería a una proteína de 440 residuos, de una masa molecular de 47493,2 Da y de punto isoelectrico de 6,21. La FtsA Δ 27 corresponde a una deleción de los últimos 27 residuos de la FtsA de *E. coli* (MTS), al igual que esta última, se expresó como proteína de fusión unida a un péptido N-terminal con 6 residuos histidina, de acuerdo a la secuencia del gen, esta correspondería a una proteína de 420 residuos, de una masa molecular de 44291,6 Da, y de punto isoelectrico 6,05.

Los vectores pMFV12, pMFV56, pPNV1, pSRV2, pLYV40, pARV12, pARV35 y pPNV1 se obtuvieron por gentileza del Dr. Miguel Vicente y del Dr. Paolo Natale (Centro Nacional de Biotecnología, Madrid, España).

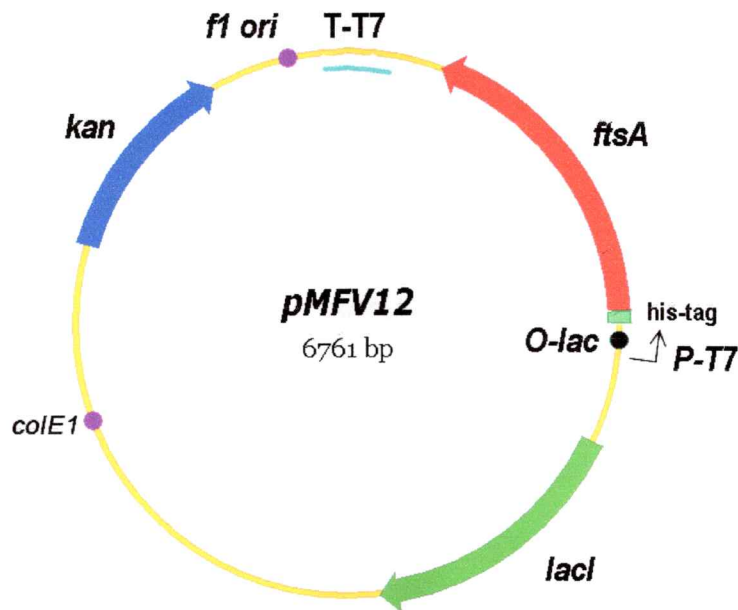


Figura 4. Esquema del vector de expresión pMFV12. Se destacan el genes de *ftsA* fusionado a una cola de histidinas, el promotor $\phi 10$ del fago T7 (P-T7), el operador *lac* (*O-lac*), el terminador T7 (T-T7); el represor *lacI*; el gen de resistencia a kanamicina (*kan*); el origen de replicación bidireccional *colE1*; y el origen de replicación unidireccional *f1 ori*.

Tabla I. Plásmidos utilizados en este trabajo (todo derivados del pET28a).

Plásmido	Característica	Resistencia	Fuente
pET28a	vector de expresión	Kan	Novagen
pMFV56	expresa FtsZ silvestre	Kan	Díaz y col., 2007
pMFV57	expresa FtsZ silvestre	Amp	Díaz y col., 2007
pMFV12	expresa his-FtsA	Kan	Yim y col., 2000
pPNV1	expresa FtsA silvestre	Kan	Natale P.
pSRV2	expresa his-FtsA Δ 27	Kan	Yim y col., 2000
pLYV40	expresa his-FtsA Δ 5	Kan	Rico y col., 2004
pARV12	expresa his-FtsA Δ 1C	Kan	Rico y col., 2004
pARV35	expresa his-FtsA Δ S12-13	Kan	Rico y col., 2004

MEDIOS DE CULTIVO

Medio LB (Luria-Bertani): Contiene bacto triptona 10 g L^{-1} , extracto de levadura 5 g L^{-1} , NaCl 10 g/L . Se preparó con agua destilada, se ajustó el pH a 7,0 con NaOH 5 N y se esterilizó en un autoclave. Cuando se necesitó se agregaron antibióticos: kanamicina $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ y ampicilina $50 \mu\text{g mL}^{-1}$; que se prepararon de acuerdo a lo descrito por Sambrook y col. (1989), y se esterizaron por filtración en filtros de $0,2 \mu\text{m}$. Este medio se usó para cultivar las cepas bacterianas.

Medio SOB: Contiene bacto triptona 20 g L^{-1} , extracto de levadura 5 g L^{-1} , NaCl $0,5 \text{ g L}^{-1}$ y KCl $0,18 \text{ g L}^{-1}$. Se preparó con agua destilada, se ajustó el pH a 7,0 con NaOH 5 N y se esterilizó en un autoclave. Este medio se usó en la preparación de células electrocompetentes.

Medio SOC: Se preparó suplementado el medio SOB con glucosa 20 mM, para ello se mezclaron 9,8 mL de SOB fresco, con 0,18 mL de glucosa 20 % p/v esterilizada por filtración con un filtro de $0,2 \mu\text{m}$. Este medio se usó en la preparación de células electrocompetentes.

Agar LB: Se añadió Agar 20 g L^{-1} a un medio LB, se esterilizó en un autoclave. Para suplementar con antibióticos se enfrió a $55 \text{ }^\circ\text{C}$ y luego se añadieron los antibióticos.

MÉTODOS

Aislamiento de DNA plasmidial (Miniprep). El DNA plasmidial se extrajo con el método de lisis alcalina (Sambrook y col., 1989). Se creció un cultivo de *E. coli* transformado con el plásmido, por 12 a 16 hrs. a 37 °C con agitación, en 5 mL de medio LB suplementado con el antibiótico respectivo. Se colectaron las bacterias centrifugando a 15000 x g por 5 min. Se descartó el sobrenadante y se suspendió perfectamente el precipitado bacteriano en 200 µL de amortiguador de lisis (glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8,0, EDTA 10 mM). Se incubó a temperatura ambiente por 5 min, luego se agregó 400 µL de una solución fresca de SDS/NaOH (SDS 1% p/v, NaOH 0,2 N); se mezcló invirtiendo los tubos 10 veces y se incubó en hielo por 5 min, para obtener una solución clara y viscosa. Se agregó 300 µL de una solución de acetato de amonio 7,5 M y se mezcló suavemente por inversión de los tubos (10 veces). Se incubó a -20 °C por 10 min, y se centrifugó a 15000 x g. Se traspasó el sobrenadante a un nuevo tubo, con la precaución de no tomar el precipitado, y se agregó 250 µL de una mezcla fenol : cloroformo : alcohol isoamílico en proporción 25:24:1, se agitó enérgicamente el tubo con un vortex por 10 s, y se centrifugó por 5 min a 15000 x g. Se extrajo la fase acuosa (superior) y se colocó en un tubo nuevo, al que se le agregó 250 µL de una mezcla cloroformo / alcohol isoamílico en proporción 24:1. Se agitó enérgicamente el tubo con un vortex por 10 s, luego se centrifugó por 10 min a 15000 x g. Se extrajo la fase acuosa (superior) y se colocó en un tubo nuevo, al que se le agregó 500 µL de isopropanol frío, se agitó enérgicamente el tubo con un vortex por 10 s, y se incubó a -20 °C por 10 min. Después se centrifugó a 15000 x g por 10 min en una microcentrífuga refrigerada a 4 °C, para precipitar el DNA. Se eliminó el sobrenadante y se lavó el DNA precipitado con 200 µL de etanol 70% v/v frío, y se centrifugó durante 5 min a 15000 x g. Se removió el etanol mediante aspiración al

vacío y se dejaron los tubos invertidos sobre papel limpio por 15 min a temperatura ambiente para evaporar los restos de etanol. El precipitado de DNA se disolvió en 50 μL de agua nanopura estéril.

Cuantificación de DNA. Se determinó la absorbancia a 260 y 280 nm, de una dilución 1:100 de la muestra, en una cubeta de cuarzo. Una unidad de A_{260} corresponde a 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de DNA en la solución. Se estimó el grado de pureza del DNA mediante la relación A_{260}/A_{280} (Sambrook y col., 1989), que siempre resultó cercana a 1,8, lo cual indica una pureza superior al 95%.

Electroforesis de DNA plasmidial en geles de agarosa. El DNA plasmidial se analizó mediante electroforesis en una cámara horizontal. Dependiendo del tamaño de los fragmentos a separar, se varió la concentración de agarosa entre 1 y 2 % p/v. Como amortiguador se utilizó TAE (Tris-HCl 40 mM pH 8,1, ácido acético glacial 20 mM, EDTA 2 mM). La muestra se preparó mezclando el DNA con amortiguador de carga (glicerol 50% v/v, EDTA 50 mM, xilén cianol 1 mg mL^{-1} , azul de bromofenol 1,5 mg mL^{-1}). La electroforesis se llevó a cabo bajo un potencial eléctrico entre 70 y 100 V. La tinción se realizó con una solución de bromuro de etidio 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en TAE, las bandas se visualizaron por fluorescencia en un transiluminador, excitando con luz ultravioleta, y se fotografiaron con una cámara digital Olympus Camedia de 4 megapíxeles y se analizaron con el programa LabWorks 4.5 de UVP (Upland, California, EE. UU.)

Preparación de células de *E. coli* electrocompetentes. Se inoculó 500 mL de medio SOB con 5 mL de un cultivo en fase exponencial de un clon de una cepa de *E. coli*

crecida en medio LB. Las células se crecieron a 37 °C con agitación moderada hasta una OD₆₀₀ de 0,75 (3-6 x 10⁸ UFC mL⁻¹), y se colectaron en tubos fríos y se centrifugaron por 15 min a 10000 x g a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante, y se suspendieron las células con vortex en un mismo volumen de glicerol 10% v/v estéril y frío. Este procedimiento de centrifugación y lavado se repitió dos veces más, con la precaución de no contaminar las células. Después se eliminó el sobrenadante, y resuspendieron las células con las pocas gotas de sobrenadante que quedaron en el tubo. La suspensión celular se ajustó a un volumen tal que al medir la OD₆₀₀ de una dilución 1:100, se obtuviera un valor entre 2 a 2,5. Se repartió la suspensión celular en alícuotas de 60 µL, se congelaron en metanol a -80 °C, y se almacenaron a -80 °C hasta el momento de su uso.

Electrotransformación de *E. coli*. Se mezcló 40 µL de células electrocompetentes con 1-2 µL de DNA plasmidial, en cubetas de electroporación de 2 mm. Se utilizó un electroporador GenePulser Xcell (BioRad) en condiciones de voltaje de 2,5 KV, capacitancia de 25 µF y resistencia de 200 ohm. Inmediatamente después de la electroporación, las células se pasaron a 1 mL de medio SOC y se incubaron por 1 hora a 37 °C, y se sembraron en agar-LB suplementado con antibiótico, y se incubaron por 12-14 hrs. para obtener colonias, que se sometieron posteriormente a la prueba de sobreexpresión.

Electroforesis de proteínas en condiciones denaturantes (SDS-PAGE). El análisis de proteínas por electroforesis en geles denaturantes se realizó según Laemmli (Laemmli, 1970). Se utilizó acrilamida al 10% en el gel separador y 4% en el gel

concentrador (proporción acrilamida : bisacrilamida fue de 37,5:1), el grosor del gel fue de 1 mm.

Las muestras se disolvieron en amortiguador de carga (Tris-HCl 62,5 mM pH 6,75, SDS 2% p/v, 2-mercaptoetanol 0,5%, glicerol 10% p/v, azul de bromofenol 0,001% p/v).

La muestra se calentó a 90 °C por 10 min, luego se centrifugó por 15 min a 15000 x g.

Del sobrenadante se tomaron 20 µL y se cargó en los pocillos. Se utilizó como amortiguador de corrida (Tris 25 mM pH 8,3, glicina 192 mM, SDS 0,1% p/v), se aplicó un potencial de 100 V, hasta la caída del frente de corrida.

El gel se tiñó con azul brillante de coomassie R-250 0,3% p/v disuelto en metanol 50% v/v, ácido acético 10% v/v, durante dos horas con agitación constante, y se destiñó con metanol 50% v/v, ácido acético 10% v/v, hasta obtener un gel de fondo incoloro.

Cuando se necesitó, las muestras se tifieron con fluorescamina. La fluorescamina es un reactivo fluorescente que se une covalentemente a aminas primarias no protonadas.

Se disolvió ~10 mg de fluorescamina en 100 µL de DMSO, se agregó 5 µL a la muestra, se mezcló y luego de 10 min se agregó el amortiguador de carga. Una vez finalizada la electroforesis, se colocó el gel en un transiluminador ultravioleta, se tomó una fotografía digital con una cámara Olympus, y se analizó con el programa LabWorks 4.5 (UVP).

Para calcular la masa molecular relativa de una proteína partir de su migración electroforética, se uso el estándar de masa molecular sigma VIII, que contiene proteínas de 66, 45, 36, 29, 24, 20 y 14,2 kDa. Excepto en el "western blot", donde se uso el estándar de masa molecular preteñido NEB de rango amplio, que contiene proteínas de 175, 83, 62, 47,5 y 32,5 kDa.

Electrotransferencia. Para corroborar que las proteínas purificadas correspondían a FtsA y a sus mutantes, se realizaron ensayos de "western blot". Primero se retiró el gel de SDS-PAGE de los vidrios e inmediatamente se construyó el sándwich para la transferencia colocando 3 papeles filtro, seguidos del gel, de la membrana de nitrocelulosa y por último de otros tres papeles filtro. La membrana de nitrocelulosa se sumergió completamente en amortiguador de transferencia (Tris 25 mM pH 8,3, glicina 192 mM, metanol 20% v/v) enfriado previamente, así como las hojas papel filtro y las esponjas antes de montar la transferencia, con la precaución de que no quedaran burbujas. La transferencia se realizó por dos horas a 100 V (~250 mA) y a -20 °C.

Desarrollo inmunológico de la membrana de nitrocelulosa. Una vez realizada la transferencia, se procedió a revelar la membrana de nitrocelulosa. Primero la membrana se bloqueó con leche descremada en polvo 3% p/v en PBS (Na₂HPO₄ 10 mM pH 7,4, KH₂PO₄ 2 mM, NaCl 137 mM, KCl 2 mM) por ~12 horas a 4 °C, luego se traspasó a una solución de leche 3% p/v en PBS que contenía el anticuerpo primario en una dilución de 1:15000 y se incubó durante una hora con agitación a temperatura ambiente. Luego de 3 lavados con tween-20 0,1% v/v en PBS, la membrana se incubó en leche 3% en PBS con el anticuerpo secundario en una dilución de 1:15000, durante una hora con agitación a temperatura ambiente. Como anticuerpo primario se usó suero de ratón, inmunizado contra FtsA extraída de una banda de SDS-PAGE; como anticuerpo secundario se usó suero de cabra contra IgG de conejo (molécula completa H+L), conjugado con fosfatasa alcalina (Pierce).

Para revelar, se colocó la membrana en 50 mL de amortiguador para fosfatasa alcalina (Tris 100 mM pH 9,5, NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM), complementado con 33 µl de BCIP (0,5 g de 5-bromo 4-cloro 3-indolil fosfato disuelto en 10 mL de dimetilformamida al

100% v/v) y 66 μ l de NBT (0,5 g de nitro azul de tetrazolio disuelto en 10 mL de dimetilformamida al 70% v/v). Al cabo de una hora de agitación aparecieron las bandas y posteriormente la reacción se detuvo diluyendo con abundante agua destilada.

Prueba de sobreexpresión de la proteína recombinante. Después de obtener transformantes, se seleccionaron 5 colonias individuales, con cada una de ellas se inoculó 8 mL de medio LB suplementado con el antibiótico respectivo. Se incubó a 37 °C con agitación hasta alcanzar una OD_{600} de 0,5, luego se tomaron 4 mL y se colocaron en un nuevo tubo, a uno de estos tubos se agregó IPTG 0,5 mM, los cultivos se incubaron por 3 horas más. Las células fueron colectadas por centrifugación, a 14000 x g por 5 min. El precipitado se lavó dos veces en amortiguador TEN (Tris-HCl 20 mM pH 8, NaCl 100 mM y EDTA 1 mM) y luego se suspendió en 80 μ L de agua, se agregó amortiguador de carga 1x final, las muestras se calentaron a 90 °C por 10 min, se centrifugaron a 14000 x g por 15 min, y finalmente se cargó el sobrenadante al gel de SDS-PAGE.

Purificación de FtsA y FtsA Δ 27. Un cultivo de 2 L de *E. coli* C41 (λ DE3) transformada con pMFV12 (para sobreexpresar FtsA), o con pSRV2 (para sobreexpresar FtsA Δ 27) se incubó a 37 °C con agitación hasta alcanzar una OD_{600} de 0,5, y se indujo con IPTG 0,5 mM por 3 hrs. Las células se colectaron por centrifugación, a 7000 x g por 40 min, a 4 °C. El precipitado se lavó con amortiguador TN (Tris-HCl 20 mM pH 8, NaCl 100 mM) y luego se almacenó a -80 °C. Así se obtuvieron aproximadamente 1,5 g de precipitado bacteriano.

Para purificar se suspendió completamente el precipitado en 40 mL de amortiguador A (Hepes-NaOH 25 mM pH 8, NaCl 500 mM, Na₂O₅S₂ 10 mM) suplementado con una

pastilla de cóctel de inhibidores de proteasas sin EDTA, y PMSF 0,1 mM. Para lisar las células se utilizó un sonicador Misonix 3000, con una sonda de 1 cm de diámetro, se aplicaron 5 pulsos de 20 seg con output 6 (45 Watts), con pausas de 1 min, en hielo.

El extracto se centrifugó en una ultracentrífuga Beckman L5-75B refrigerada, a 28000 RPM por 90 min (92000 x g). El sobrenadante se sometió a una cromatografía de afinidad a Ni⁺², en una columna de resina ProBond. Se cargó 4 mL de resina ProBond en una columna de vidrio (1,2 x 10 cm), se equilibró en amortiguador A, luego se tomó la resina y se colocó en un vaso de precipitado junto con el extracto crudo, se incubaron a 4 °C por 30 min con agitación suave. Se cargó la mezcla en la columna de vidrio, y se lavó con amortiguador A suplementado con concentraciones crecientes de imidazol (50, 100 y 200 mM), utilizando 4 volúmenes de columna para cada lavado (aprox. 20 mL), a un flujo de 1 mL min⁻¹, usando una bomba peristáltica EconoPump (BioRad).

Se recolectaron fracciones de 1 volumen de columna, para determinar en cuales eluyó FtsA, las muestras se analizaron por SDS-PAGE utilizando tinción con fluorescamina. Se juntaron las fracciones que contenían la proteína y se dializaron por 12 hrs a 4 °C en amortiguador Hepes-NaOH 50 mM pH 8, NaCl 500 mM, Na₂O₅S₂ 10 mM, sacarosa 1 M, DTT 2,5 mM, ATP 0,1 mM y MgCl₂ 2 mM; para ello se utilizaron bolsas de diálisis de celulosa regenerada de un "cut-off" de 12-14 kDa, previamente tratadas de acuerdo a lo descrito (Sambrook y cols, 1989).

La proteína se cuantificó por el método de Bradford (BioRad) usando BSA como estándar, la pendiente de la curva de calibración para BSA y para FtsA fue la misma, de manera que las cuantificaciones realizadas con este ensayo son confiables. No se concentró la proteína para evitar su agregación. La proteína se congeló en metanol frío a -80 °C, y se almacenó a -80 °C para su posterior uso.

Purificación de FtsZ. Un cultivo de 2 L de *E. coli* C41 (λ DE3) pMFV12, se incubó a 37 °C con agitación hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 0,7, y se indujo con IPTG 0,2 mM por 3 hrs.

Las células se colectaron por centrifugación, a 7000 x g por 40 min a 4 °C. El precipitado se lavó con amortiguador PEM (Pipes-NaOH 50 mM pH 6,5, MgCl₂ 5 mM y EDTA 1 mM) y se almacenó a -80 °C. Así se obtuvieron aproximadamente 1,5 g de precipitado bacteriano.

Para purificar se suspendió completamente el precipitado en 40 mL de amortiguador PEM. Para lisar las células se utilizó un sonicador Misonix 3000, con una sonda de 1 cm de diámetro, se aplicaron 5 pulsos de 20 s con un output 6 (45 Watts), con pausas de 1 minuto, en hielo, y se centrifugó en una ultracentrífuga Beckman L5-75B refrigerada, a 28000 RPM por 90 min (92000 x g). Al extracto crudo se le agregó GTP 1 mM y CaCl₂ 20 mM, y se incubó a 30 °C por 15 min para inducir la polimerización de FtsZ. Se centrifugó a 10000 x g por 15 min a 4 °C, se descartó el sobrenadante, el precipitado se disolvió en 20 mL de PEM, se centrifugó a 10000 x g por 15 minutos a 4 °C, para eliminar material insoluble; el sobrenadante se sometió a un segundo ciclo de polimerización/centrifugación.

Para purificar FtsZ, se hizo una cromatografía de intercambio aniónico en un equipo de HPLC Beckman Gold equipado con dos bombas y un detector de absorbancia. El cromatograma se registró siguiendo la absorbancia a 280 nm. La muestra se filtró con un filtro de 0,2 μ m, para inyectarla a una columna de mono-Q sefarosa de 5 mL, equilibrada en amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 8,0, MgCl₂ 5 mM, EDTA 0,1 mM y glicerol 10% v/v, a un flujo constante de 1 mL/min, usando un "loop" de 5 mL. Para la elusión de FtsZ se utilizó un gradiente lineal de KCl entre 0,1 y 0,7 M, en 20 mL. Se recolectaron fracciones de 1 mL. Las fracciones en que eluyó FtsZ, de acuerdo al

cromatograma, se colocaron en una bolsa de diálisis de celulosa de un "cut-off" de 12 a 14 kDa, previamente tratadas de acuerdo a lo descrito (Sambrook y col., 1989). La muestra se dializó por 12 horas a 4 °C, contra 1,5 L (aprox. 100 volúmenes) de amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 8,0, KCl 250 mM, glicerol 10% v/v. La proteína purificada se concentró en cetriprep, hasta 20 mg mL⁻¹ aproximadamente. Se determinó su concentración por el método de Bradford (Biorad), se congeló en metanol frío a -80 °C, y se almacenó a -80 °C para su posterior uso.

Polimerización. Se determinó la polimerización de FtsZ y de FtsA, siguiendo la dispersión de luz a 90° en el tiempo, en un espectrofluorímetro Perkin Elmer LS50.

La FtsZ se incubó a diferentes concentraciones, en un amortiguador indicado en el pie de la figura respectiva, a 30 °C en un baño termoregulado. La muestra en una cubeta de 0,5 mL se excitó a 350 nm, y se siguió la dispersión a 350 nm, se utilizó un ancho de banda de los monocromadores de 5 nm, se registraron los datos cada 2 s, se colocó un filtro en el paso de emisión que permite pasar un 6% del haz lumínico. Luego de seguir la línea base por 5 min aprox., se agregó inmediatamente GTP a una concentración final de 1 mM, la cubeta se agitó por inversión 5 veces, y se continuó midiendo la dispersión. Se calculó la diferencia entre la intensidad máxima y la intensidad de la línea base, que corresponde a la diferencia (Δ) de dispersión de luz.

Para determinar el efecto de la concentración de FtsA sobre su polimerización, se incubó la proteína a diferentes concentraciones, en amortiguador Mes-NaOH 50 mM pH 6,5, KCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 2,5 mM, se midió a 30 °C en un baño termoregulado. La dispersión se midió inmediatamente después de agregar la proteína al amortiguador en la cubeta.

Para determinar el efecto del ATP en la polimerización de FtsA, se incubó la proteína a diferentes concentraciones, en amortiguador Hepes-NaOH pH 8,0 50 mM, KCl 100 mM, DTT 2,5 mM, EDTA 1 mM, MgCl₂ 3 mM, a 30 °C en un baño de agua termoregulado. Luego de seguir la línea base por 5 min aprox., se agregó inmediatamente ATP a una concentración final de 1 mM, la cubeta se agitó por inversión 5 veces, y se continuó midiendo la dispersión. Se calculó la diferencia entre la intensidad máxima y la intensidad de la línea base, que corresponde a la diferencia (Δ) de dispersión de luz.

En todos los experimentos con FtsA se excitó a 350 nm, y se siguió la dispersión a 350 nm. Se utilizó un ancho de banda de los monocromadores de 5 nm, y los datos se registraron cada 2 s. La adición de ATP o GTP no modificó el pH de la solución.

Determinación de la actividad ATPásica una preparación de FtsA. Se utilizó el método de verde de malaquita, por ser rápido y sensible (Lanzeta, 1979). El método de verde de malaquita permite la detección colorimétrica de fosfato inorgánico, de 1 a 13 nmoles. Se utilizaron las soluciones VM (verde de malaquita 0,045% p/v), AM (molibdato de amonio 4,2% p/v, disuelto en HCl 4 N), TX (Tritón X-100 0,05% p/v) y citrato de sodio 34% p/v. Se mezcló VM:AM en proporción 3:1, luego de 20 min se filtró por decantación con papel filtro (Millipore), y se agregó 80 μ L de TX. Para la detección de fosfato, a 800 μ L de mezcla se agregó 30 μ L de la mezcla de reacción, se mezcló rápidamente en un vortex, la reacción se detuvo por el bajo pH de esta mezcla (pH \sim 0), luego de 1 min se agregó 100 μ L de amortiguador citrato. Se midió la absorbancia de las muestras a 630 nm, en un espectrofotómetro de arreglo de diodos Hewlett Packard 8452A, entre 30 min a 3 hrs de realizada la mezcla con el fosfato. Para

confeccionar la curva de calibración se utilizó KH_2PO_4 secado por 2 horas a 100 °C, como estándar.

La actividad ATPásica de FtsA se determinó en amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 8,0 KCl 100 mM, EDTA 1 mM, DTT 2,5 mM y MgCl_2 2 mM por sobre la concentración de ATP, a una temperatura de 30 °C. La reacción se inicio al agregar ATP. Se usó una concentración de proteína de 2,25 μM , en el experimento señalado como FtsA+FtsZ, las proteínas se coincubaron en concentración equimolar por 5 min antes de comenzar la reacción. Se confeccionaron curvas de progreso de 6 puntos (tiempos 0, 5, 10, 15, 20 y 25 min). Para determinar los parámetros cinéticos de las curvas de saturación, se utilizó regresión hiperbólica con el software Sigmaplot 11.

Unión de FtsA a FtsZ. La unión de FtsA a FtsZ se determinó por anisotropía de la fluorescencia intrínseca de FtsA. La anisotropía de un fluoróforo esta relaciona con el tiempo de correlación rotacional de acuerdo a la ecuación de Perrin-Weber (Lakowicz, 2006; Jameson y col., 2003):

$$\frac{r_0}{r} = \left(1 + \frac{\tau}{\tau_c} \right) \quad (\text{ec. 1})$$

Donde r es la anisotropía del fluoróforo en las condiciones experimentales; r_0 es la anisotropía limitante del fluoróforo, que se mide en ausencia de movimiento (como en glicerol a -80 °C); y τ es el tiempo de vida de la sonda, que generalmente esta en el orden de los nanosegundos. Se define el tiempo de correlación rotacional τ_c para una proteína esférica como:

$$\tau_c = \frac{\eta V}{RT} \quad (\text{ec. 2})$$

Donde R es la constante de los gases ideales, T la temperatura, η la viscosidad de la solución y V el volumen molar de la molécula que rota. De acuerdo a la ecuación 2, el volumen es directamente proporcional al τ_c . A su vez, de acuerdo a la ecuación 1, el τ_c es directamente proporcional a la anisotropía. Lo que se aprecia mejor en la ecuación 3, que se obtiene al reemplazar la definición de τ_c de la ecuación 2, en la ecuación 1.

$$\frac{r_0}{r} = \left(1 + \tau \frac{RT}{\eta V} \right) \quad (\text{ec. 3})$$

Por lo tanto, un aumento de la anisotropía indica un aumento del tiempo de correlación rotacional. Dado que la sonda corresponde a un residuo dentro de una proteína indica un aumento del volumen hidrodinámico de la proteína, y con ello, una disminución de su libertad rotacional.

Las anisotropía se midió en un espectrofluorímetro Perkin-Elmer LS 50, que posee una configuración de tipo L, equipado con polarizadores de film cuyo alineamiento se evaluó midiendo la polarización de una suspensión diluida de glicógeno, y se obtuvo un valor de 0,988; se considera que el límite aceptable es de 0,97 (Lakowicz, 2006), por lo tanto, los polarizadores estaban correctamente alineados.

La FtsA expresada en forma recombinante, al igual que la proteína silvestre, posee dos residuos triptófanos y 12 residuos tirosina, mientras que FtsZ posee 3 tirosinas y ningún triptófano. Generalmente para excitar al residuos triptófano se usa una longitud de onda de 280 nm, que corresponde a su máximo de absorción, pero dado que la FtsA posee más residuos de tirosina que de triptófano, se éxito a una λ de 295 nm, a la cual la absorción de los residuos tirosina es despreciable frente a la de los residuos

triptófano. Se detectó la emisión a 348 nm, que corresponde al máximo de emisión del triptófano libre en solución y de la FtsA. El experimento se realizó en un espectrofluorímetro Perkin-Elmer LS 50, con un ancho de banda de los monocromadores de 5 nm para la excitación y de 8 nm para la emisión. Se utilizó un amortiguador Hepes-KOH 50 mM pH 8,0, KCl 100 mM, EDTA 1 mM, DTT 2,5 mM. Los experimentos se hicieron en una cubeta de cuarzo de 500 μ L, a una temperatura controlada de 25 °C, y con un tiempo de integración de 40 s lo que entrega una desviación estándar asociada a la medición del equipo de $\pm 0,003$. FtsA se agregó a una concentración de 1 o 5 μ M, se midió la anisotropía, luego se agregó 2 μ L de FtsZ 500 μ M (2 μ M final), se agitó por inversión 3 veces, se incubó por 2 min y se midió la anisotropía. Se procedió de esta forma, hasta alcanzar un valor de anisotropía cercano a 0,3. Cada valor registrado en la curva realizada a una concentración de FtsA de 5 μ M corresponde a una medición individual; y cada valor registrado en la curva realizada a una concentración de FtsA 1 μ M corresponde a un promedio de 3 mediciones. Los valores de anisotropía informados están corregidos por el factor G, que corresponde a la relación entre la eficiencia de la transmisión por el polarizador de emisión de la luz verticalmente polarizada respecto de la horizontalmente polarizada.

Entrecruzamiento químico de FtsA y FtsA Δ 27. Para determinar si la proteína purificada se encontraba en estado monomérico, o agregada, se realizó un experimento de entrecruzamiento químico con glutaraldehído (1,5-pentanodial). El glutaraldehído es un agente entrecruzante homobifuncional (tiene dos grupos reactivos idénticos), que reacciona con grupos amina primarios en proteínas. Si dos proteínas interactúan, al agregar glutaraldehído, van a quedar covalentemente unidas, este complejo se puede observar por SDS-PAGE.

Se utilizaron alícuotas de 100 μL de FtsA 1,52 mg mL^{-1} y FtsA Δ 27 2,37 mg mL^{-1} que estaban disueltas en amortiguador de diálisis (Hepes-NaOH 50 mM pH 8, NaCl 500 mM, $\text{Na}_2\text{O}_5\text{S}_2$ 10 mM, sacarosa 1 M, DTT 2,5 mM, y MgCl_2 2 mM), se incubaron en hielo y se agregó 0,8 μL de glutaraldehído 25% v/v (0,2% v/v final). La reacción se detuvo a diferentes tiempos (0, 15, 30, 60 y 180 s) al agregar a una alícuota de 18 μL de la mezcla de reacción, 2 μL de Tris-HCl 1 M pH 8,0, más 5 μL de amortiguador de carga 5X. De esta mezcla se cargó 20 μL en el gel de electroforesis.

Apagamiento dinámico de la fluorescencia intrínseca de FtsA. Las muestras se midieron en un espectrofluorímetro Perkin-Elmer LS 50, en una cubeta de cuarzo de 500 μL a una temperatura controlada de 25 $^\circ\text{C}$, se excitó a 295 nm, y se registró el espectro de emisión entre 310 y 420 nm, con un ancho de banda de los monocromadores de 8 nm para la excitación y la emisión. Para el apagamiento se utilizó amortiguador Hepes-KOH 50 mM pH 8,0, KCl 100 mM, EDTA 1 mM, DTT 2,5 mM. FtsA se agregó a una concentración de 5 μM , se midió la intensidad de fluorescencia a 348 nm (que es el máximo de emisión del triptófano), luego se agregó 2 μL de la solución del apagador 5 M (2 μM final), se agitó por inversión 3 veces, se incubó por 2 min y se midió nuevamente la intensidad de fluorescencia. Se procedió de esta forma, hasta haber alcanzado una concentración de apagador de 0,5 M.

Como apagadores se usaron acrilamida (2-propenamida, masa molecular de 71,08 g mol^{-1} , no posee carga), yoduro (masa atómica de 126,9 g mol^{-1} , posee carga negativa) como sal de sodio y cesio (masa atómica de 132,9 g mol^{-1} , posee carga positiva) como sal de cloruro. Las soluciones madre (5 M) de estos reactivos, se filtraron con un filtro de 0,2 μm . Se utilizó triptófano 10 μM , como control de la sonda completamente expuesta al solvente.

Los datos se graficaron con la ecuación de Stern-Volmer:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV} \cdot [Q] \quad (\text{ec. 4})$$

Donde la intensidad inicial de fluorescencia corresponde a F_0 , la intensidad de fluorescencia en función de la concentración del apagador $[Q]$ corresponde a F . La pendiente del gráfico de F_0/F en función de $[Q]$ corresponde a la constante de Stern-Volmer K_{SV} , y su valor es proporcional al apagamiento de la sonda, y da cuenta del grado de exposición al solvente del fluoróforo (Lakowicz, 2006).

Union de DAPI a FtsA. Se determinó la concentración de la sonda fluorescente DAPI utilizando un ε_{242} de $23000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ en agua (Barcellona y Gratton, 1996). Se siguió su unión a FtsA, por FRET. El experimento se realizó en un espectrofluorímetro Perkin-Elmer LS 50, se excitó a 295 nm, y se registró el espectro de emisión entre 310 y 530 nm, con un ancho de banda de los monocromadores de 5 nm para la excitación y de 8 nm para la emisión. Se utilizó un amortiguador Hepes-KOH 50 mM pH 8,0, KCl 100 mM, EDTA 1 mM, DTT 2,5 mM. Los experimentos se hicieron en una cubeta de cuarzo de 500 μL , a una temperatura controlada de 25 °C. FtsA se agregó a una concentración de 5 μM , se midió la fluorescencia, luego se agregó 2 μL de la solución de DAPI 1 mM (4 μM final), se agitó por inversión 3 veces, se incubó por 2 min y se midió nuevamente la intensidad de fluorescencia. Se procedió de esta forma, hasta haber alcanzado una concentración de DAPI de 50 μM . El experimento se repitió utilizando el amortiguador de diálisis de la purificación de FtsA, como control. El espectro del control se restó al de cada muestra, dado que a 295 nm DAPI tiene una absorbancia (que a una concentración de 50 μM , a una longitud de onda de 295 nm, es de 0,04), que si bien es mucho menor que la de FtsA, no es despreciable.

RESULTADOS

Purificación de FtsA y de FtsA Δ 27. En las **figuras 5 y 6**, se muestran los resultados de un gel SDS-PAGE de las fracciones colectadas de la elusión con imidazol de la columna de afinidad a níquel, de FtsA y FtsA Δ 27, respectivamente. La mayoría de las contaminantes eluyeron con los lavados con imidazol 50 mM. Tanto FtsA como FtsA Δ 27 eluyeron desde la columna al agregar 100 mM y 200 mM de imidazol. Al cabo de la purificación las proteínas se obtuvieron con un grado de pureza promedio mayor al 96 %, de acuerdo al análisis densitométrico de los geles. A partir de la migración relativa de FtsA y FtsA Δ 27 respecto a los marcadores de masa molecular en el gel SDS-PAGE, se determinó una masa molecular de 47,5 kDa para FtsA y 44,3 kDa para FtsA Δ 27, valores prácticamente iguales a los calculados desde sus secuencias. Por lo tanto, ambas proteínas tienen una migración electroforética normal, demostrando que la hélice anfipática C-terminal (MTS), que se postula interactúa con la membrana citoplasmática, no modificaría la cantidad de SDS unida a la proteína a diferencia del caso de ZipA, que posee una migración electroforética anormal probablemente debida a la presencia de una hélice transmembrana en el extremo N-terminal (Ordenes, 2006). El rendimiento promedio de varias preparaciones se mantuvo entre 4 a 6 mg de FtsA y 10 mg de FtsA Δ 27, por dos litros de cultivo bacteriano (~1,5 g de "pellet"). Esto podría explicarse de la siguiente manera: 1) la expresión de FtsA Δ 27 es menos toxica para la célula, que la expresión de FtsA, 2) el nivel de expresión de ambas proteínas es el mismo, pero la fracción soluble de FtsA Δ 27 es mayor que la de FtsA, dada su menor hidrofobicidad, pues no posee su MTS.

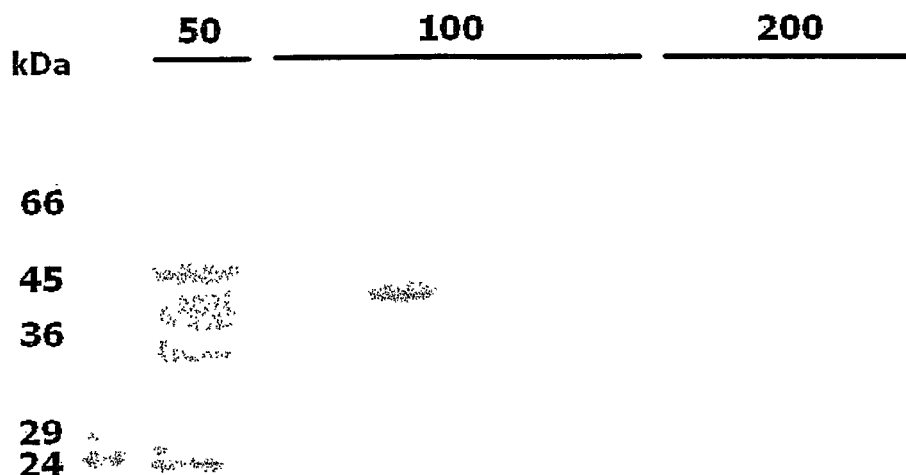


Figura 5. Gel SDS-PAGE 10% de las fracciones de FtsA eluidas desde una columna de afinidad a níckel con imidazol. Fracciones eluidas de la columna ProBond, con imidazol 50 mM, 100 mM y 200 mM. En el primer carril se muestra la separación de las proteínas del estándar de masa molecular. El gel se tiñó con fluorescamina.

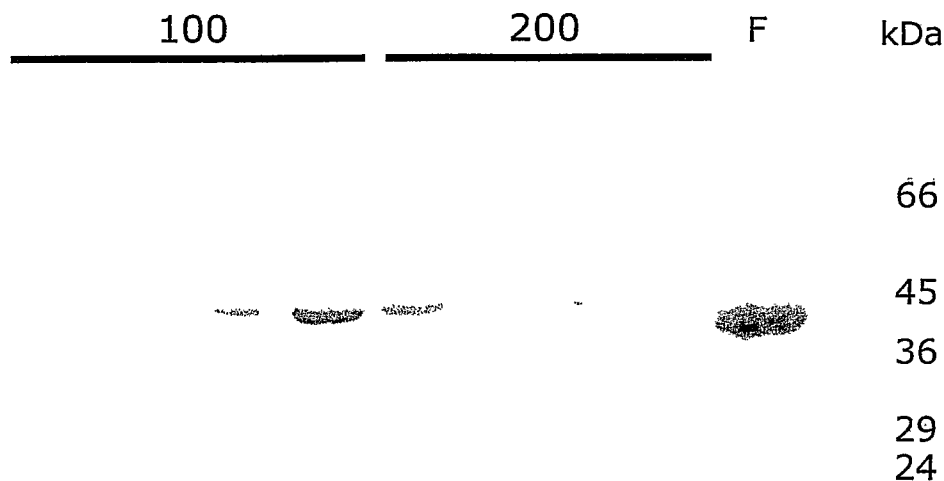


Figura 6. Gel SDS-PAGE 10% de las fracciones de FtsAΔ27 eluidas desde una columna de afinidad a níckel con imidazol. Fracciones eluidas de la columna ProBond, con imidazol 100 mM y 200 mM. En el carril F se cargó la proteína pura. En el último carril se muestra la separación de las proteínas del estándar de masa molecular. El gel se tiñó con fluorescamina.

Expresión de mutantes en los dominios de FtsA. Los vectores pLYV40, pARV12 y pARV35 expresan las proteínas mutantes FtsA Δ 5, FtsA Δ 1C y FtsA Δ S12-13, respectivamente. Se observa en la **figura 7** que de todas las proteínas de *E. coli* cargadas en el gel, solo las tres proteínas mutantes reaccionaron con un anticuerpo policlonal de ratón contra FtsA, lo que indica especificidad en esta reacción. Las tres proteínas mutantes mostraron un bajo nivel de expresión, no se observaron bandas definidas de estas proteínas en el SDS-PAGE, pero si se pudieron observar en el “western blot”. Al separar el extracto crudo de la fracción insoluble por centrifugación, se observó que las proteínas mutantes sedimentaron completamente. Esto indica que estas mutantes podrían estar formando cuerpos de inclusión, o bien, que su unión a la membrana es muy fuerte, lo que las arrastra a la fracción insoluble. Este comportamiento es diferente al de FtsA y FtsA Δ 27, que se expresan en forma soluble, y es similar al de la mutante catalítica FtsA D210A, que se expresa en forma insoluble (Gallardo, 2006).

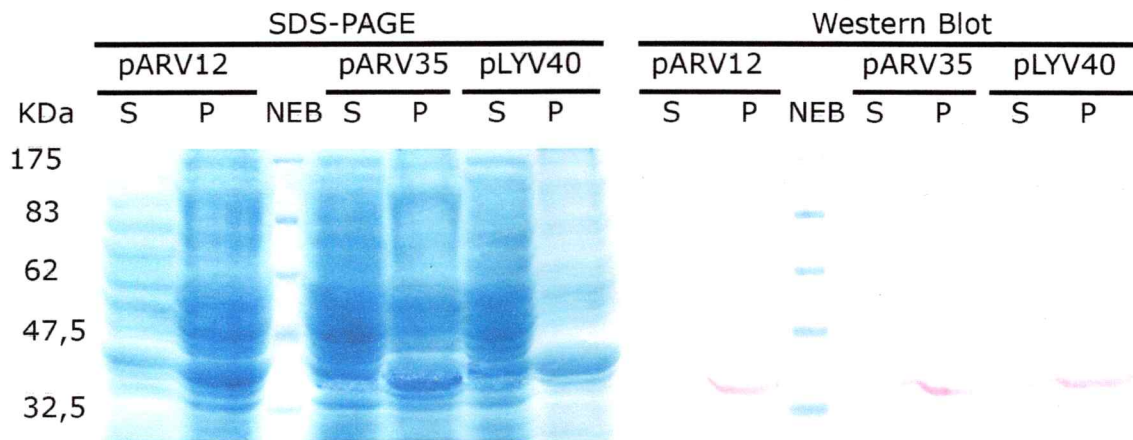


Figura 7. Sobreexpresión de las mutantes de FtsA. Las células que sobreexpresaron las proteínas mutantes se lisaron y centrifugaron a 16000 x g a 4 °C por 40 min. Se separó el extracto crudo (S, soluble) del precipitado (P). Se suspendió el precipitado en la misma cantidad de volumen de la fracción soluble. En el carril NEB se muestra la separación de las proteínas del estándar de masa molecular preteñido.

Purificación y polimerización de FtsZ. La FtsZ es una proteína capaz de formar polímeros al agregar GTP, esta actividad se favorece en presencia de cationes divalentes como el Ca^{+2} . Se utilizó esta característica para purificarla. En la **figura 8 B** se muestra un SDS-PAGE del "test" de sobreexpresión de FtsZ, se observó que la FtsZ no se expresó en ausencia del inductor IPTG (carril NI), y que si se expresó al inducir con IPTG (carril I), obteniéndose una banda intensa de proteína en el gel. En la **figura 8 A** se muestra el cromatograma de la purificación, en el que se observan 4 picos que corresponden a: la inyección de la proteína a la columna desde el "loop", a los 20 min; la elusión de proteínas contaminantes al lavar la columna, a los 43 min; la elusión del GTP a los 72 min, al lavar con 0,2 a 0,3 M de KCl; la elusión de la FtsZ a los 89 min, al lavar con 0,4 a 0,5 M de KCl. En la **figura 8 C** se muestra un SDS-PAGE de distintas etapas de la purificación de FtsZ. Se obtuvo la FtsZ con un grado de pureza promedio mayor al 99%, de acuerdo al análisis densitométrico del gel.

Para determinar la funcionalidad de la FtsZ purificada, se siguió la polimerización de inducida por GTP, mediante dispersión de luz de 350 nm a 90° (**figura 9**). Al agregar el nucleótido, se observó un aumento inmediato de la dispersión de luz, que da cuenta de la formación de polímeros de FtsZ, que se mantuvieron relativamente estables en el tiempo, hasta su fase de despolimerización. Se observa que el período de estabilidad depende de la concentración de proteína. De esta manera, a mayores concentraciones de FtsZ se hace menor el tiempo de estabilidad de los polímeros formados, debido al agregar más enzima la actividad GTPásica aumenta y el GTP se hace limitante.

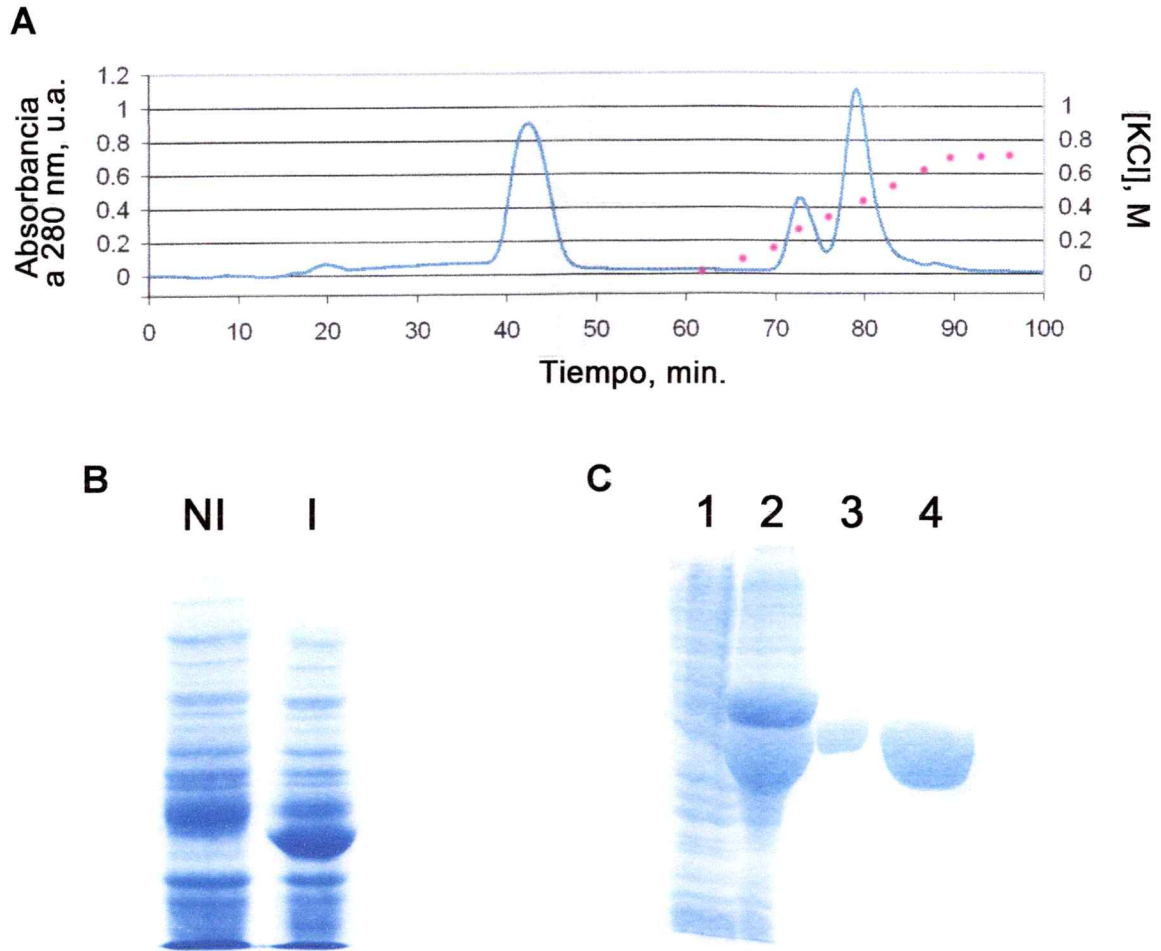


Figura 8. Purificación de FtsZ. **A.** Cromatograma (HPLC) en una columna mono-Q sefarosa de 5 mL, a flujo de 1 mL min^{-1} , seguido por absorbancia a 280 nm (azul). Se eluyó la proteína por fuerza iónica, con un gradiente lineal de KCl desde 0,1 M a los 65 min, hasta 0,7 M a los 85 min. La muestra se inyectó a la columna a los 20 min. **B.** SDS-PAGE 10% del “test” de expresión de la proteína. NI: no inducido, I: inducido con IPTG 0,2 mM por 3 h. **C.** SDS-PAGE 10% de muestras de algunas etapas de la purificación. 1: precipitado de la ultracentrifugación a $92000 \times g$ por 90 min. 2: precipitado de la primera centrifugación de polímeros inducidos con GTP 1 mM y CaCl_2 20 mM, a $10000 \times g$ por 15 min. 3. Muestra antes de cargar a la columna. 4. Muestra final obtenida después de la diálisis.

Se define como concentración crítica C_r , a la mínima concentración de proteína a la cual se forman polímeros. En la **figura 9 B** se muestra que al graficar los valores de máxima dispersión de luz en función de la concentración de proteína se obtuvo una línea recta que cortó el eje de la abscisa a un valor de $1,07 \mu\text{M}$, valor que es muy similar al detectado por métodos mas sensibles (Chen y col., 2005) lo cual indica que en ambos casos la funcionalidad de la proteína no cambia.

También se investigó la polimerización de FtsZ a pH 8,0, en las condiciones experimentales en las que se midió la actividad ATPásica de FtsA, lo que se muestra en la **figura 10**. Al agregar GTP 1 mM se observó un aumento de la dispersión de luz mayor que en la curva a pH 6,5, que se mantuvo constante durante los primeros 5 min, al cabo de los cuales comenzó a aumentar nuevamente la dispersión de luz, no se observó una fase de desensamblaje durante el tiempo registrado. El hecho de que FtsZ polimerice en forma irreversible a este pH indica que FtsZ no es funcional en las condiciones experimentales en las que se midió la actividad ATPásica de FtsA.

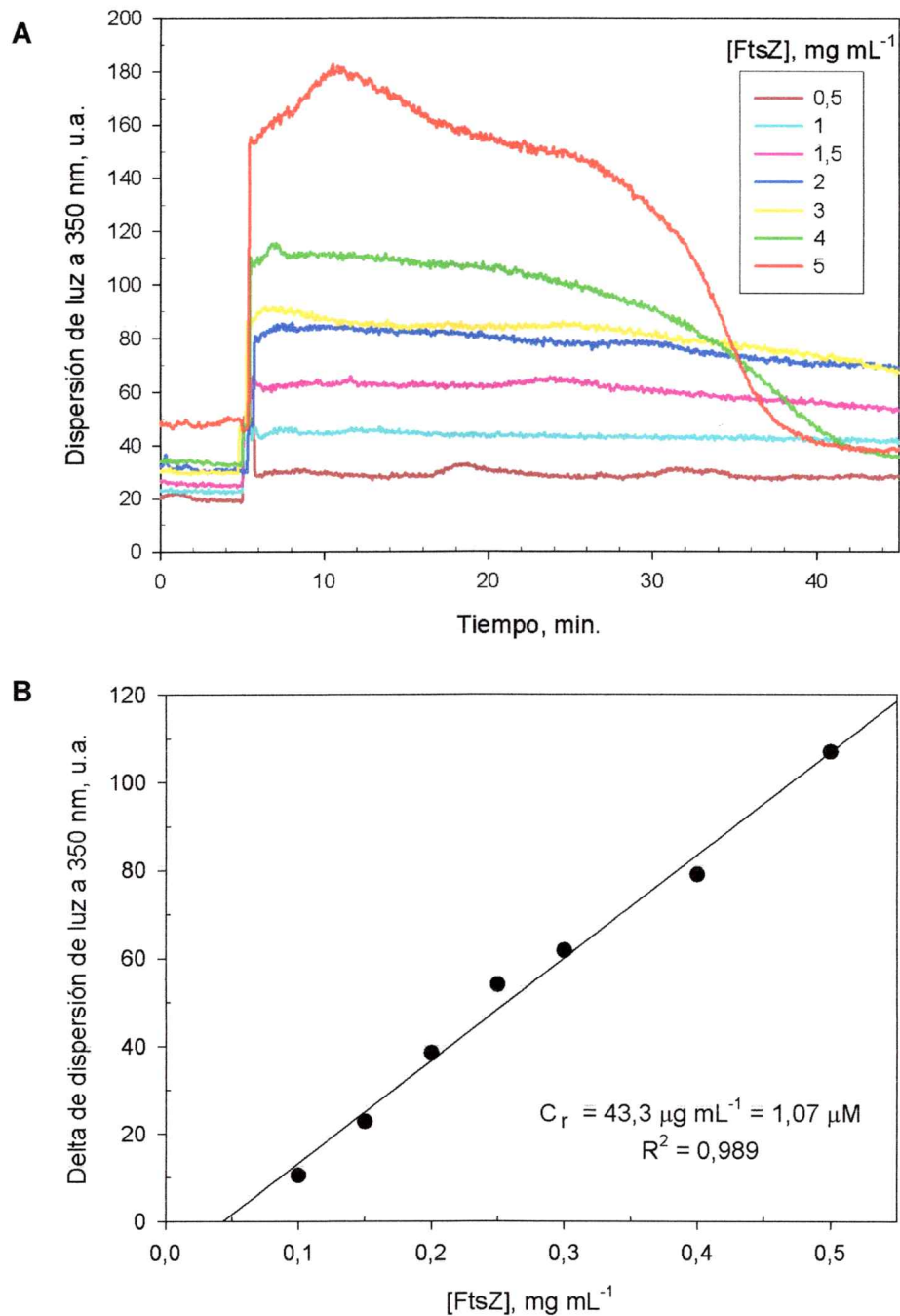


Figura 9. Polimerización de FtsZ a pH 6,5 seguida por dispersión de luz. A. Cinética de polimerización de FtsZ en amortiguador Mes-KOH 50 mM pH 6,5, KCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM. Trascorridos 5 min se agregó GTP 1 mM. **B.** Determinación de la concentración crítica (C_r). La línea de ajuste corresponde a un polinomio de grado 1.

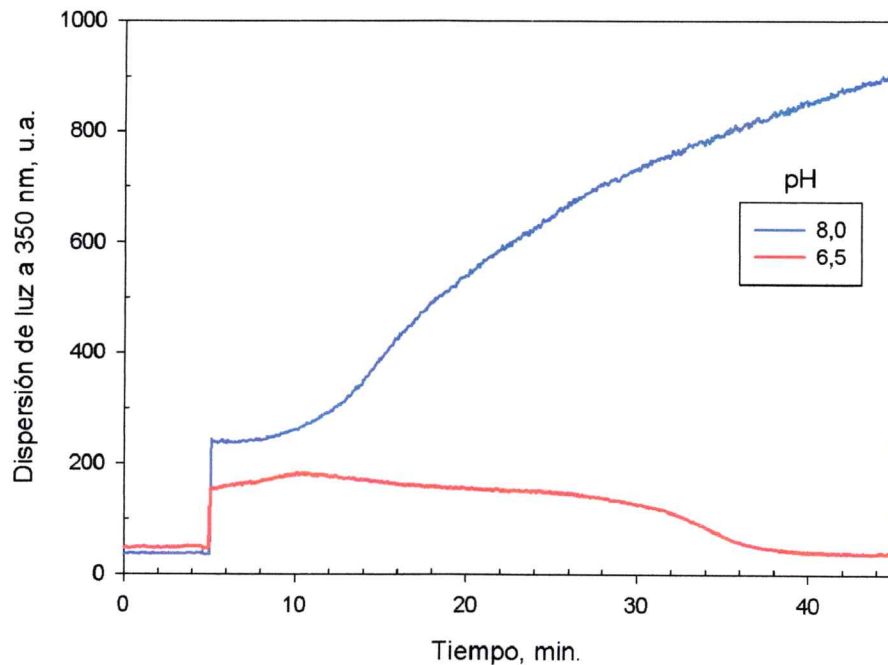


Figura 10. Efecto del pH en la polimerización de FtsZ. A. Cinética de polimerización de FtsZ $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ en amortiguador Mes-KOH 50 mM pH 6,5, KCl 50 mM, MgCl_2 10 mM en rojo, y en amortiguador Hepes-KOH 50 mM pH 8,0, KCl 100 mM, EDTA 1 mM, DTT 2,5 mM, MgCl_2 15 mM, en azul. Trascorridos 5 min se agregó GTP 1 mM. Se uso un filtro que dejó pasar el 4% de la luz.

Polimerización de FtsA. FtsA forma polímeros en amortiguador Tris-HCl 20 mM pH 8,0, NaCl 50 mM; en presencia de 5 mM ATP y a una concentración de proteína de $2,25 \mu\text{M}$, cuya morfología se determinó por microscopía electrónica, (Gallardo, 2006). La agregación de los polímeros se atenúa en presencia de sacarosa (Gallardo, 2006). En la **figura 11 A** se muestra la polimerización de FtsA seguida por dispersión de luz de 350 nm a 90° . Se diluyó la proteína, que estaba almacenada en un amortiguador con sacarosa 1 M, a un amortiguador a pH 5,5, con diferentes concentraciones de sacarosa en cada experimento. Al agregar la proteína se observó un aumento de la

dispersión de luz en forma constante dentro de los primeros 10 minutos, después mostró una segunda fase mucho más lenta, a las diferentes concentraciones de sacarosa, y con la misma pendiente, e independiente de la concentración de sacarosa al igual que la primera fase. Sin embargo la extensión de la primera fase en cuanto a la dispersión de luz se comportó de manera inversa a la concentración de sacarosa.

Estos resultados confirman que la presencia de sacarosa 1 M inhibe la polimerización de FtsA, este efecto se puede percibir más claramente en la **figura 11 B**, donde se graficó el delta de dispersión de luz, en función de la concentración de sacarosa. Por ejemplo, la intensidad de dispersión de luz a los 60 min de la curva con 1,05 M de sacarosa, es un 36,5% menor que en la curva con 0,05 M de sacarosa.

Se determinó el efecto del pH sobre la polimerización de FtsA, lo que se muestra en la **figura 12 A**. Se observó un aumento de la polimerización de FtsA a pH 5,5, y que esta disminuyó progresivamente a pHs más básicos, hasta ser casi completamente inhibida a pH 8,5.

Se determinó que las sales NaCl y KCl inhiben la polimerización de FtsA, como se observa en las **figuras 13 A y 13 B**, respectivamente. Si bien hubo un mayor efecto de NaCl respecto a KCl, ambos efectos se hacen similares a una concentración de 0,7 M (**figura 13 C**).

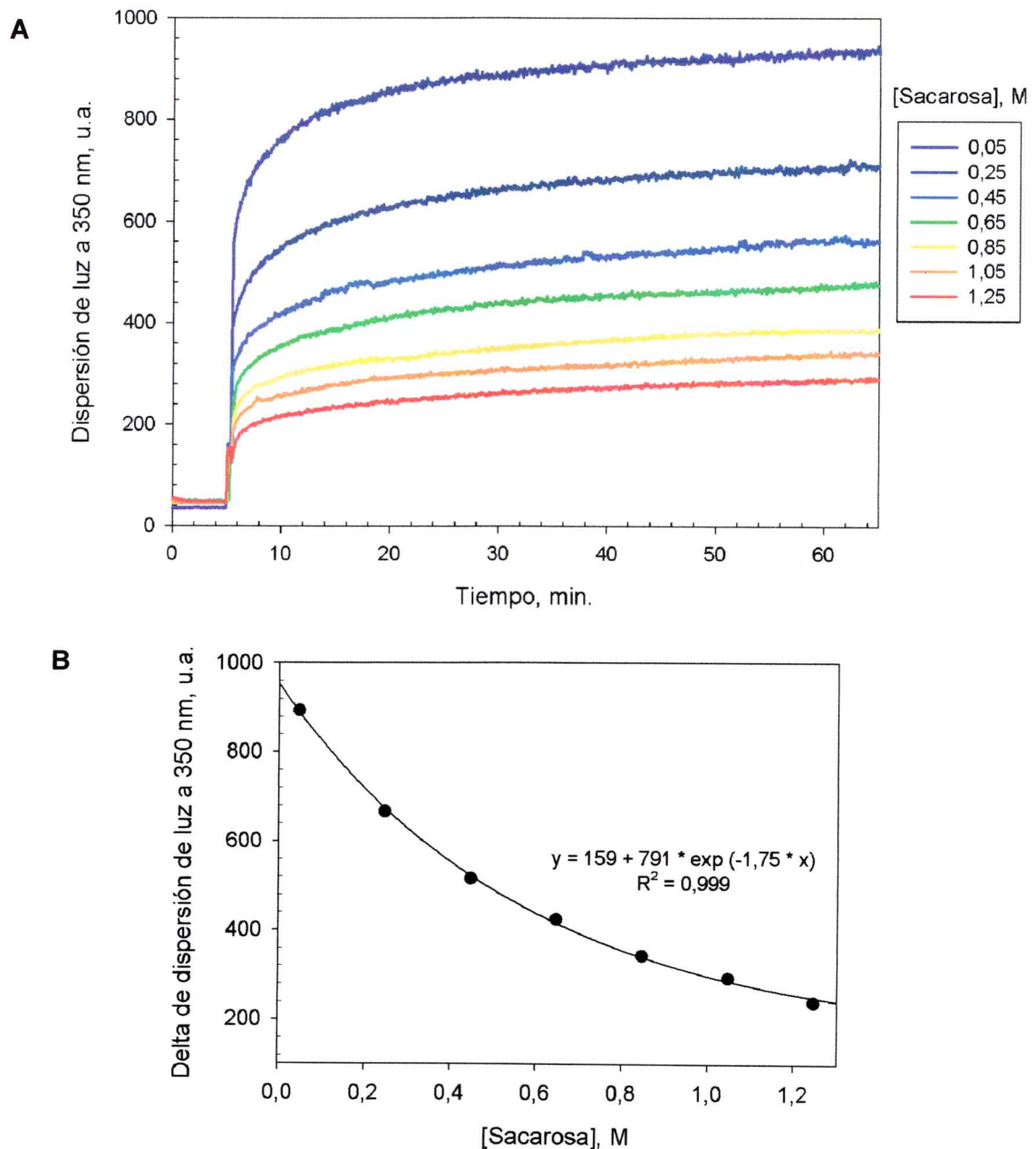


Figura 11. Inhibición de la polimerización de FtsA por sacarosa. **A.** Cinética de polimerización de FtsA 1,5 μ M en amortiguador Mes-KOH 50 mM pH 5,5, KCl 50 mM, $MgCl_2$ 7 mM, a diferentes concentraciones de sacarosa. Transcurridos 5 min se agregó la proteína a la cubeta, alcanzando la concentración de sacarosa señalada. Se midió la dispersión de luz a 350 nm, con un filtro que dejó pasar el 6% de la luz. **B.** Diferencia de intensidad de dispersión de luz entre los tiempos 2 y 65 min, para cada curva en A. La línea de ajuste corresponde a un decaimiento exponencial de tres parámetros.

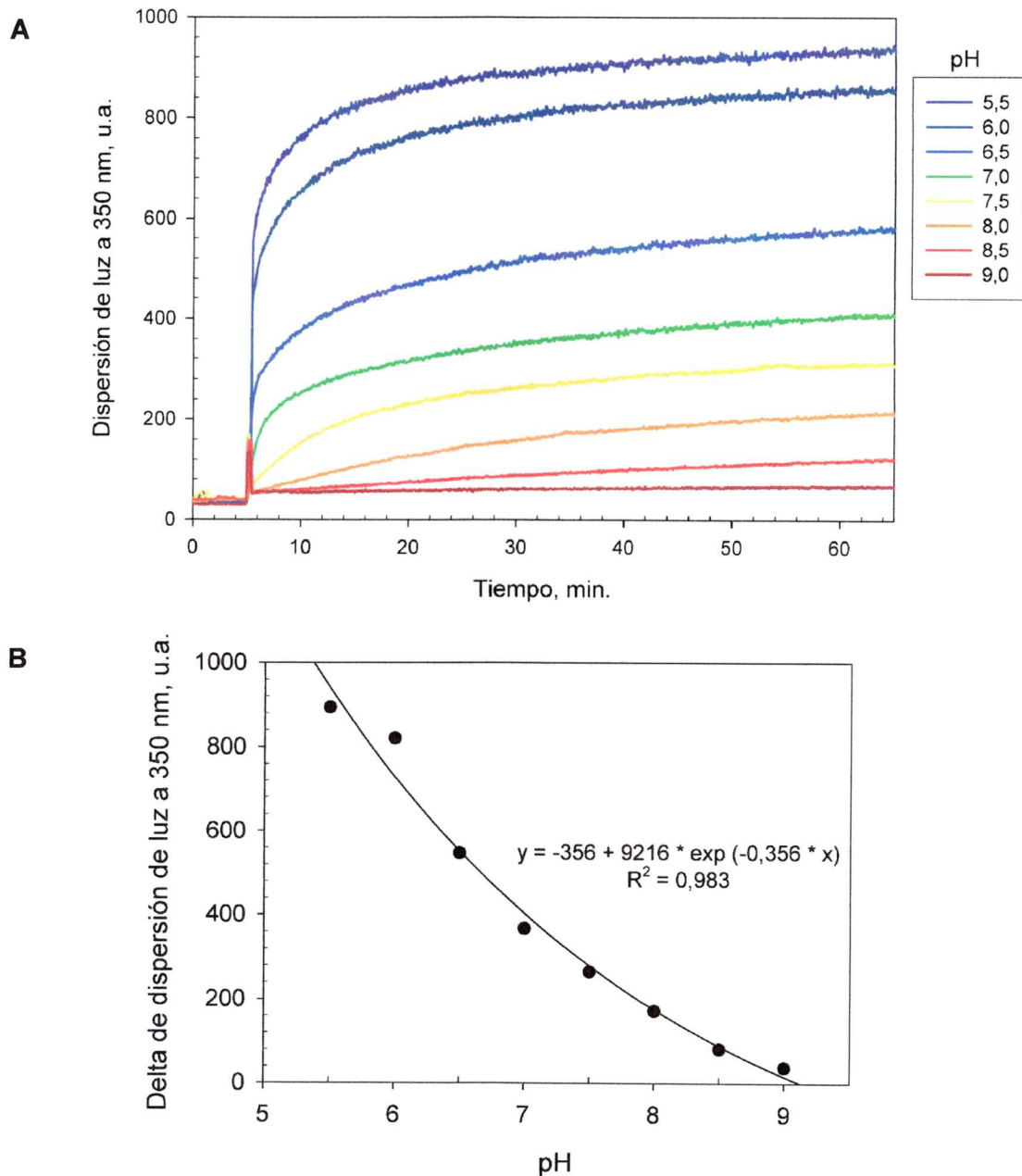


Figura 12. Efecto del pH sobre la polimerización de FtsA. **A.** Cinética de polimerización de FtsA 1,5 μM en amortiguador Mes-KOH (pH 5,5 y 6,0), Hepes-HCl (pH 6,5, 7,0, 7,5, 8,0 y 8,5) o borato-KOH (pH 9,0) 50 mM, KCl 50 mM, MgCl_2 7 mM, Transcurridos 5 min se agregó la proteína concentrada a la cubeta. Se midió la dispersión de luz a 350 nm, con un filtro que dejó pasar el 6% de la luz **B.** Diferencia de intensidad de dispersión de luz entre los tiempos 2 y 65 min, para cada curva en A. La línea de ajuste corresponde a un decaimiento exponencial de tres parámetros.

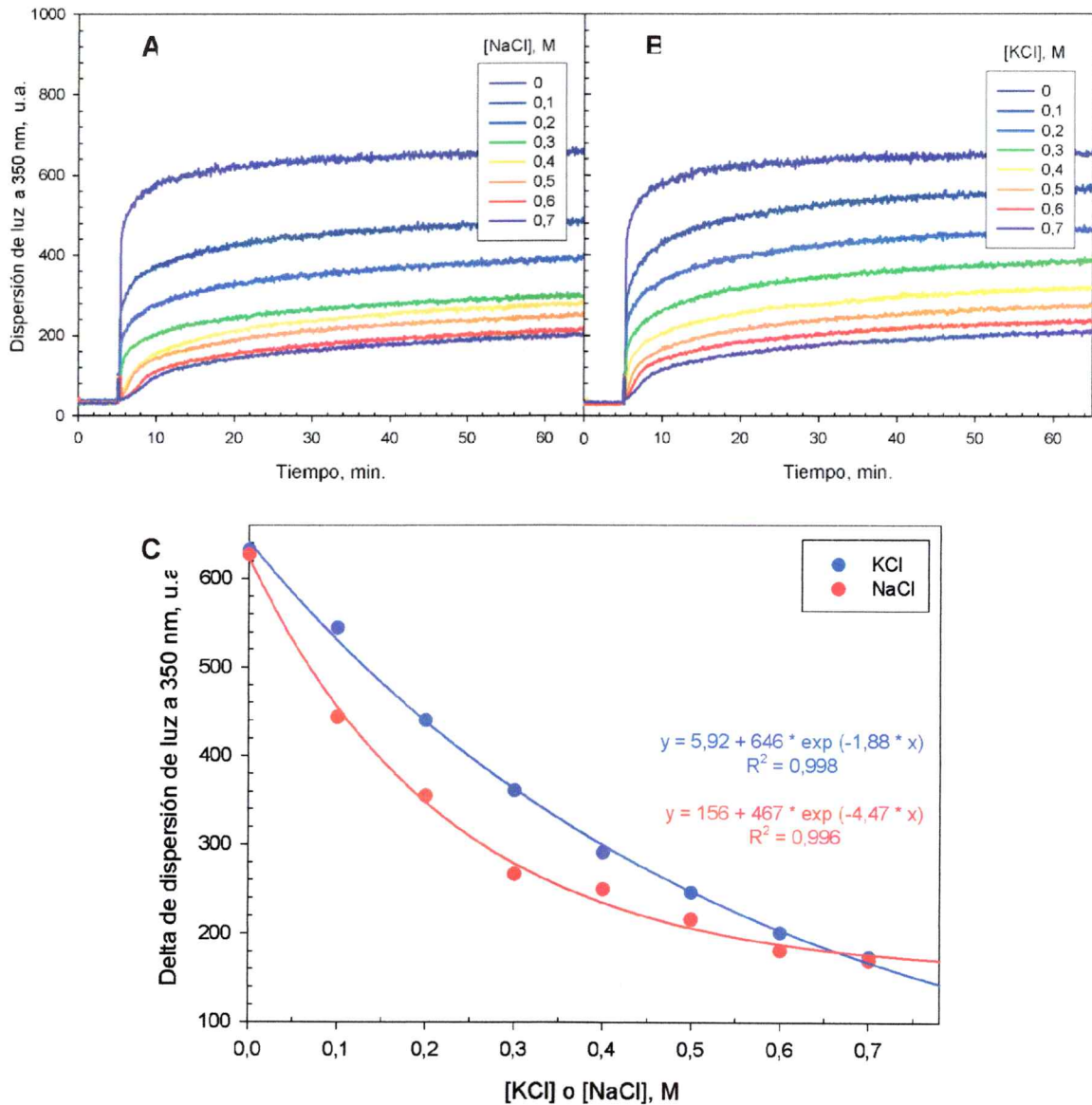


Figura 13. Efecto de NaCl y KCl sobre la polimerización de FtsA. **A.** Cinética de polimerización de FtsA 1,5 μ M. **A.** En amortiguador Mes-NaOH 50 mM pH 5,5, MgCl₂ 7 mM a diferentes concentraciones de NaCl. **B.** En amortiguador Mes-KOH 50 mM pH 5,5, MgCl₂ 7 mM a diferentes concentraciones de NaCl. Transcurridos 5 min se agregó la proteína a la cubeta. Se usó un filtro que dejó pasar el 6% de la luz **C.** Diferencia de intensidad de dispersión de luz entre los tiempos 2 y 65 min, para cada curva. Las líneas de ajuste corresponden a un decaimiento exponencial de tres parámetros.

En el experimento de la **figura 14** se estudio el efecto de la concentración de FtsA y del ATP en su polimerización, a diferentes pH, seguida por dispersión de luz a 350 nm. Se observó que entre una concentración de FtsA de 0,5 y 3 μM , la polimerización fue proporcional a la concentración de proteína, a los 4 pH estudiados. A los pH básico (7,4, 8 y 9) la pendiente fue la misma, en cambio a 5,5, la pendiente fue mucho mayor. Se observó que a mayor concentración de proteína se obtuvo un aumento proporcional en la intensidad de dispersión en todas las curvas, excepto en los últimos puntos de la curva, especialmente en 5 μM , donde se observó cierto grado de saturación, que en la curva a pH 5,5, llegó a ser inhibición, registrándose una cinética mucho más lenta.

Para determinar la funcionalidad de la proteína se investigó el efecto de la adición de ATP 1 mM en su polimerización, resultado que se resume en la **figura 15 B**. En la cinéticas de polimerización realizadas a pH básico se observó que al añadir ATP, aumentó la dispersión de luz, y que este efecto fue máximo a una concentración de FtsA de 2 a 3 μM , en cambio a concentraciones mayores de proteína, en la cuales la polimerización es mayor, el efecto del ATP fue menor. Este resultado indicaría que el ATP favorece la polimerización de monómeros-oligómeros de FtsA, pero que no tiene efecto sobre los polímeros ya formados de FtsA. A pH 5,5 el ATP tuvo un efecto contrario, disminuyó levemente la polimerización de FtsA. Al hacer el control del efecto de agregar ATP, se observó que a pH 5,5 la disminución de la dispersión de luz al agregar un volumen de ATP a la cubeta, fue la misma al agregar un volumen idéntico de amortiguador, de manera que el ATP no tendría efecto sobre la FtsA a pH 5,5.

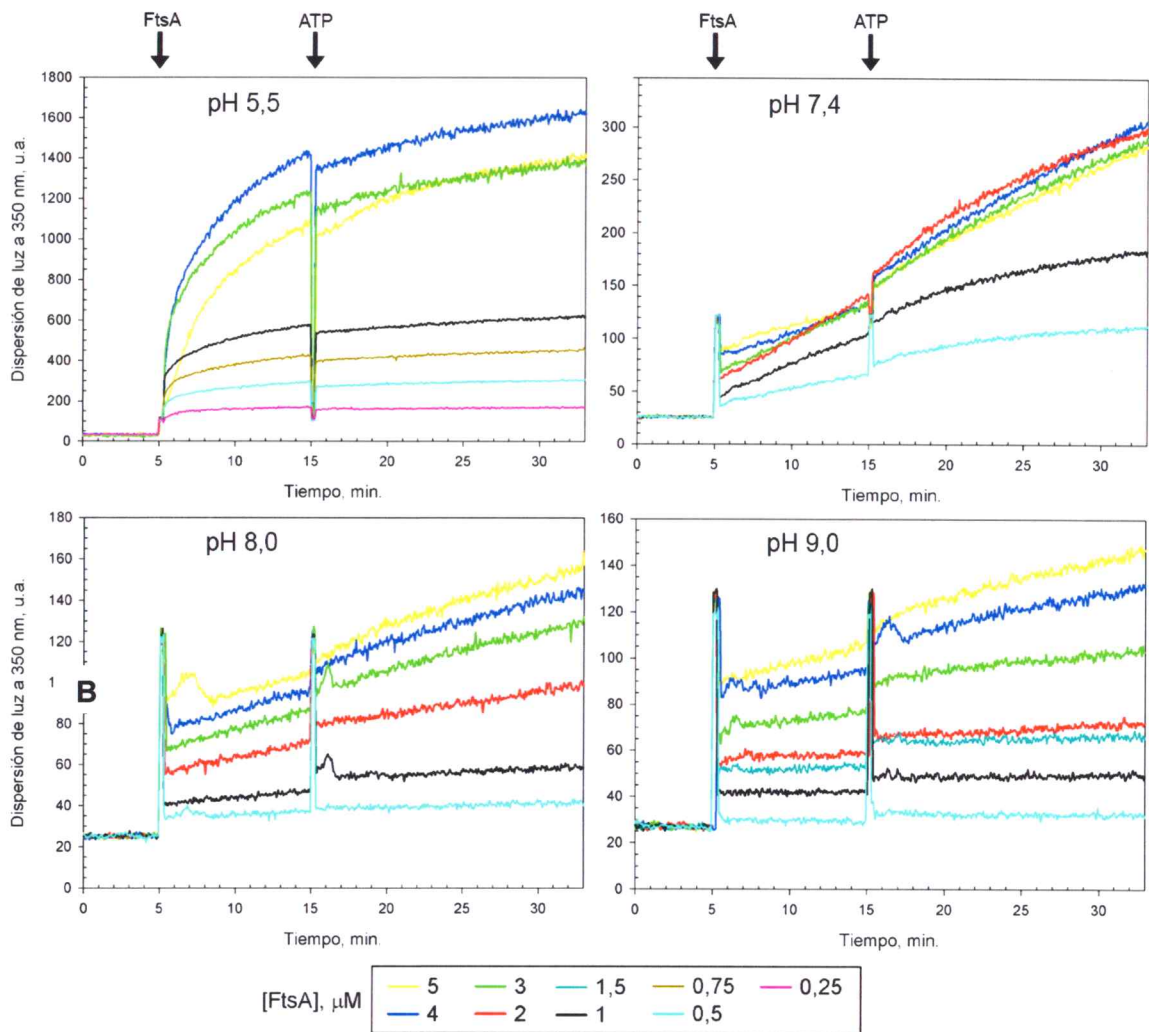


Figura 14. Efecto de la concentración de FtsA y el ATP en su cinética de polimerización. Cinética de polimerización de FtsA a diferentes concentraciones, en amortiguador 50 mM a diferentes pH (Mes-KOH pH 5,5; Tris-HCl 50 mM pH 7,4; Tris-HCl 50 mM pH 8; Borato-KOH p 9), con KCl 100 mM, MgCl₂ 3 mM, seguida por dispersión de luz a 350 nm. A los 5 min se agregó la proteína a la cubeta, luego de 10 min se agregó ATP 1 mM, como indican las flechas. Se usó un filtro del 6% en el paso óptico.

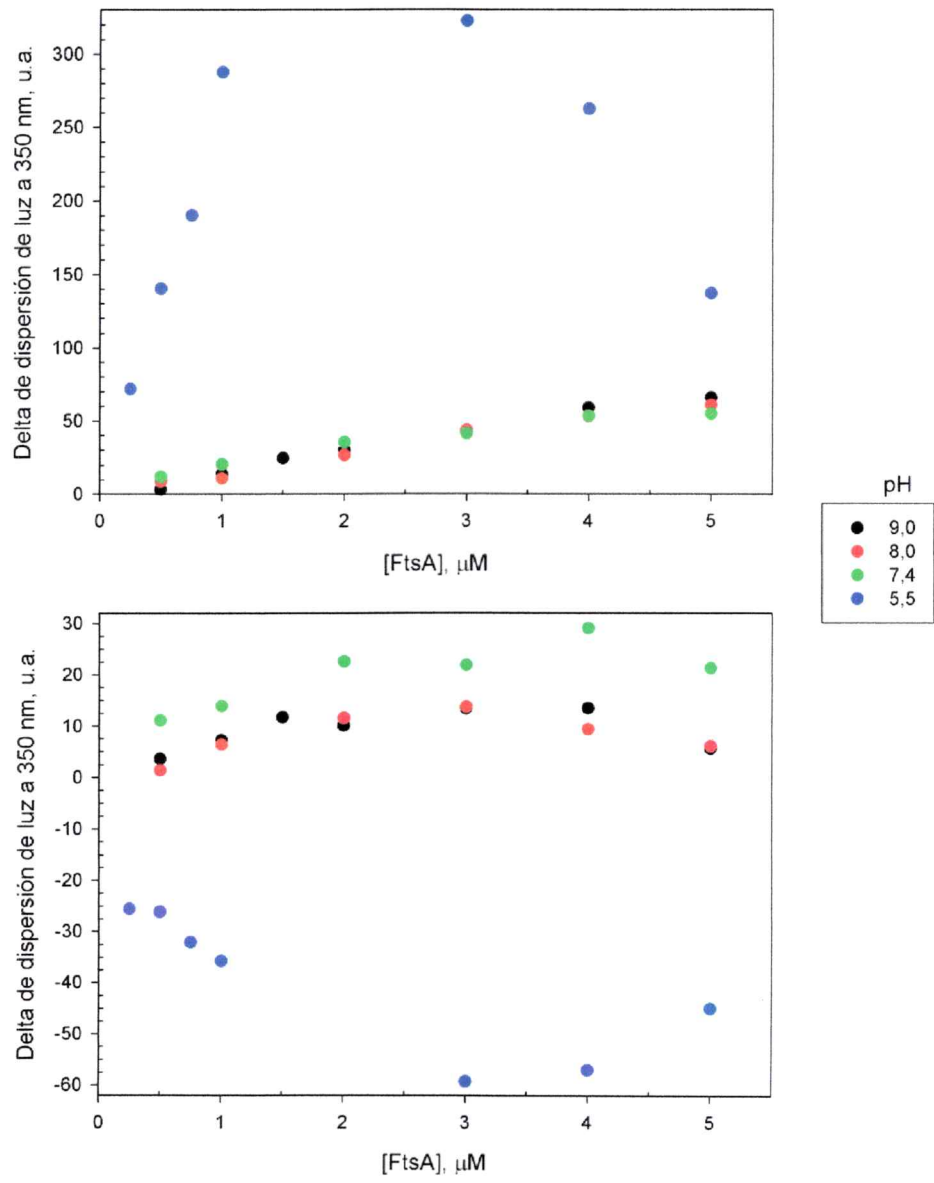


Figura 15. Efecto de la concentración de FtsA y el ATP en el delta de polimerización. Se graficó el valor del incremento de dispersión de luz, luego de agregar la proteína a la cubeta (A), y luego de agregar ATP a la cubeta con la proteína (B), para cada curva de la figura 14.

Determinación de la actividad ATPásica de una preparación de FtsA. Para seguir la actividad de ATPásica de FtsA se probaron tres métodos diferentes: 1) ensayo acoplado Lactato deshidrogenada - Pirubato kinasa, en el cual se mide indirectamente el consumo de ADP producido por la hidrólisis enzimática del ATP, acoplándolo enzimáticamente a la oxidación de NADH_2 , seguida en tiempo real espectrofotométricamente por la disminución de la absorbancia a 340 nm (Monasterio, 1980). 2) Hidrólisis de ATP marcado con fósforo radiactivo en el fosfato gamma ($\gamma^{32}\text{ATP}$), seguida midiendo la radioactividad del Pi liberado con un contador de centelleo, separando previamente el ATP no hidrolizado (quelándolo con carbón activado) (Gallardo, 2006). 3) Detección colorimétrica de Pi liberado con el método de verde de malaquita, que en presencia de ácido molíbdico, cambia su color de amarillo a verde al agregar Pi (Lanzetta y col., 1979). De los tres métodos empleados, el de verde de malaquita resultó ser igual de sensible que el método radiactivo, y el más repetible de los tres. Además de ser considerablemente más barato que el resto de los métodos, es insensible al fosfato liberado después de detenida la reacción, y su color es estable en el tiempo.

En la **figura 16** se muestra una curva de calibración obtenida con verde de malaquita, que permite relacionar la absorbancia a 630 nm, con la cantidad de Pi, que resultó ser lineal hasta 13 nmoles de Pi, y muy preciso.

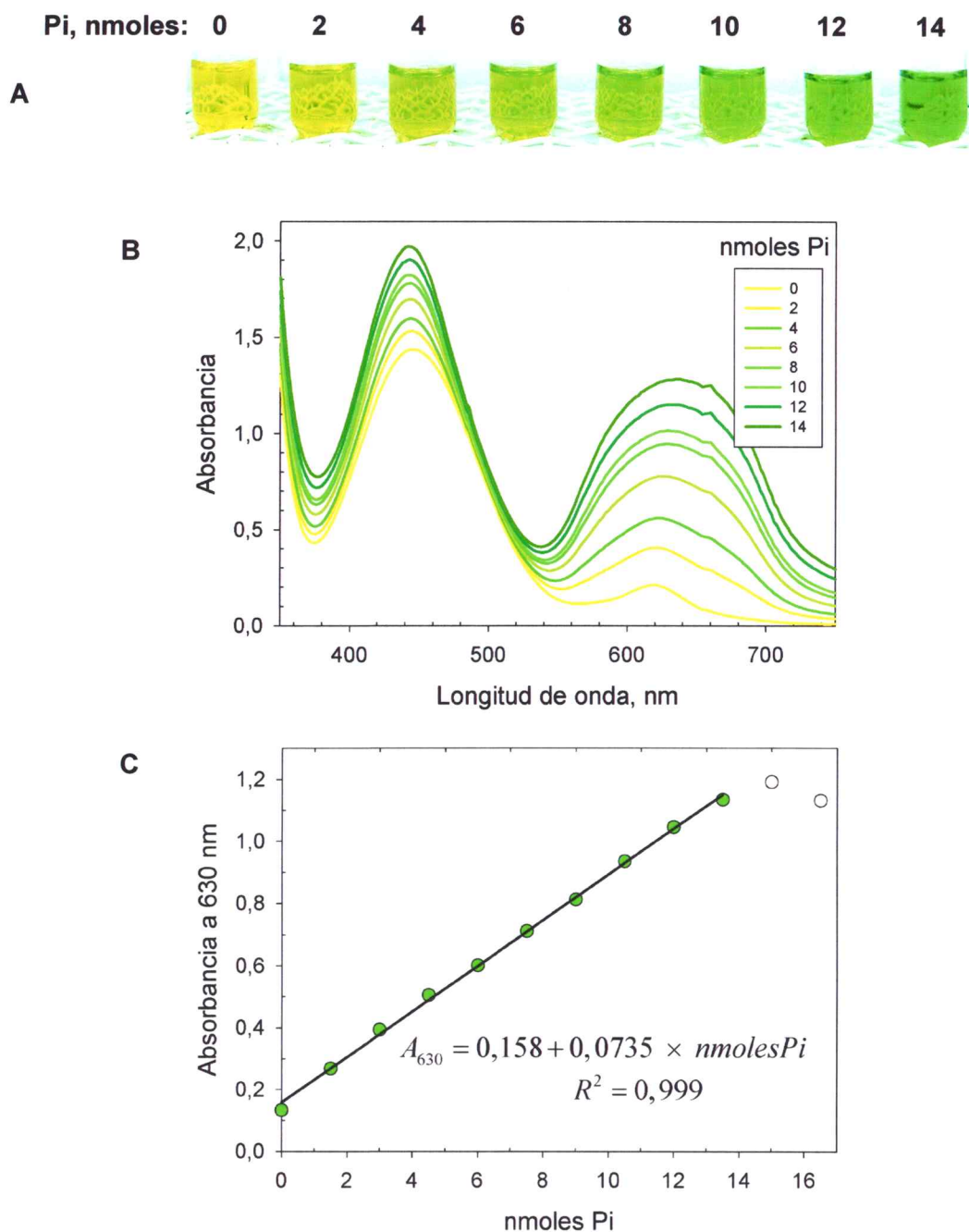


Figura 16. Curva de calibración para la cuantificación de fosfato inorgánico usando el método de verde de malaquita. La curva se confeccionó usando KH_2PO_4 secado por 2 horas a $100\text{ }^\circ C$ secado como estándar, se repitió para cada experimento en **A**. Fotografía de las muestras **B**. Espectro de absorción visible de las muestras. **C** curva de calibración, el rango lineal del método va entre 0,5 a 13 nmoles de fosfato, se destaca con los círculos llenos verdes.

En la **figura 17** se muestra la curva de saturación de la actividad ATPásica de FtsA, en el panel superior de esta figura se grafica el coeficiente de determinación (R^2), para el cálculo de la velocidad inicial a partir de cada curva de progreso, utilizando una línea recta como función de ajuste.

Se observó que a bajas concentraciones de ATP, la curva se ajustó muy bien a una hipérbola, y que las curvas de progreso tienen un R^2 mayor a 0,98. A concentraciones de ATP mayores de 2 mM este comportamiento cambio abruptamente, las curvas de progreso perdieron su linealidad, lo que se refleja en valores de R^2 menores de 0,9. Este comportamiento podría deberse a que existen cambios en el estado de agregación de FtsA a mayores concentraciones de ATP.

También se determinó el efecto de FtsZ sobre la actividad ATPásica de FtsA (**figura 18**). De acuerdo a estos resultados, la presencia de FtsZ no tiene un efecto significativo sobre la K_M , pero si sobre la V_{MAX} , la cual disminuye, por lo tanto se concluyó que la presencia de FtsZ inhibe la actividad ATPásica de FtsA. Dado que se ha planteado en esta tesis que la V_{MAX} de la actividad ATPásica de FtsA depende del estado de agregación de la proteína, y que FtsZ tiene un efecto sobre la V_{MAX} y no sobre la K_M , cabe preguntarse si FtsZ tiene mas bien un efecto directo sobre la agregación de FtsA, y como consecuencia de ello, disminuye la actividad ATPásica de FtsA.

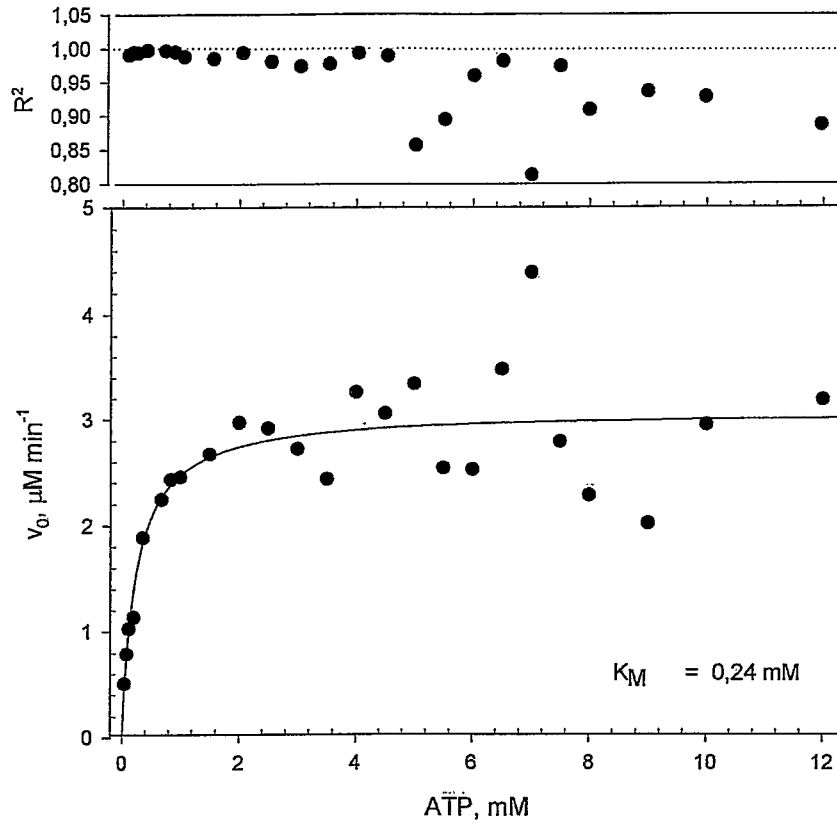


Figura 17. Curva de saturación de la actividad ATPásica de una preparación de FtsA. Se incubó FtsA 2,25 μM en amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 8,0 KCl 100 mM, EDTA 1 mM, DTT 2,5 mM y MgCl_2 2 mM por sobre la concentración de ATP, a una temperatura de 30 °C. La reacción se inició al agregar ATP. Se graficó la velocidad inicial en función de la concentración de sustrato. En el panel superior se graficó el coeficiente de determinación R^2 , para el cálculo de la velocidad inicial de cada curva de progreso.

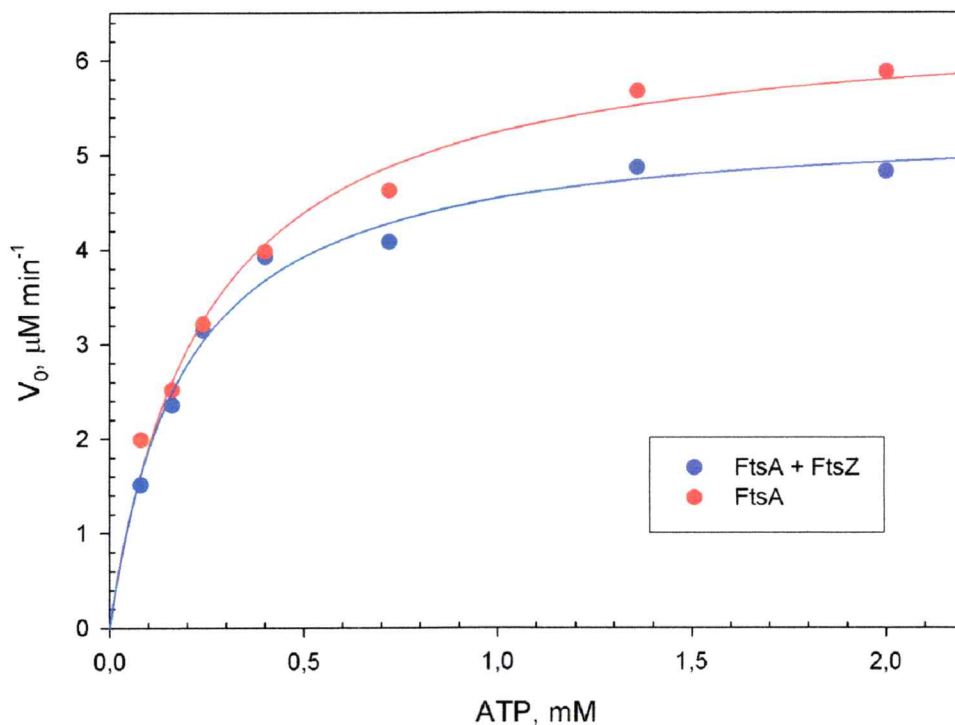


Figura 18. Curva de saturación de la actividad ATPásica de una preparación de FtsA, y FtsA más FtsZ. Se incubó por 5 min FtsA 2,25 μM (en rojo), y FtsA en presencia de una cantidad equimolar de FtsZ (en azul), en amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 8,0, KCl 100 mM, EDTA 1 mM, DTT 2,5 mM y MgCl_2 2 mM por sobre la concentración de ATP, a una temperatura de 30 $^{\circ}\text{C}$. La reacción se inició al agregar ATP. Se graficó la velocidad inicial en función de la concentración de sustrato.

Tabla II. Parámetros cinéticos de la actividad ATPásica de una preparación de FtsA, y de FtsA más FtsZ.

	K_M^a mM	V_{MAX}^b $\mu\text{M min}^{-1}$	k_{CAT}^c s^{-1}	Cte. Esp. ^d $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$
FtsA	$0,24 \pm 0,03$	$6,50 \pm 0,23$	173	$9,12 * 10^5$
FtsA + FtsZ	$0,19 \pm 0,02$	$5,39 \pm 0,16$	144	$7,56 * 10^5$

a constante de Michaelis.

b velocidad máxima.

c constante catalítica.

d Cte. constante de especificidad.

Determinación de la unión de FtsZ a FtsA. En la **figura 19 A** se muestra una curva de titulación de la unión de FtsZ a FtsA, seguida por la anisotropía de la fluorescencia intrínseca de los residuos triptófano de FtsA. Al agregar FtsZ, se observó un aumento de la anisotropía, esto implica un aumento del tiempo de correlación rotacional τ_c de la sonda de acuerdo a la ecuación 2, lo que indica que existe una interacción entre ambas proteínas. En la curva de titulación de FtsA 5 μM se observó un aumento de anisotropía cada vez que aumentó en 5 μM la concentración de FtsZ. En toda la curva se registraron 10 de estos aumentos.

Dado que las curvas de titulación se hicieron a diferentes concentraciones de FtsA, para hacer comparables las curvas, se graficó en el eje de la abscisa la razón entre las concentración de FtsZ y FtsA (**figura 19 B**). Se observa que la interacción de FtsZ con FtsA es más favorable a mayor concentración de FtsA, lo que sugiere que hay un proceso de polimerización que depende de la concentración de FtsA.

En la curva de titulación de FtsA 1 μM se observó que los resultados se podrían ajustar a tres hipérbolas, que corresponderían a tres poblaciones de sitios, se hizo un ajuste a cada una de ellas por regresión hiperbólica, y se calculó las respectivas constantes de disociación, que se muestran en la **tabla III**, se observa que estas caen el rango micromolar, y que se diferencian muy poco, lo cual indicaría que la población de polímeros no es homogénea, o bien que la unión de FtsZ a una población más homogénea de polímeros generaría una pequeña interferencia que sería responsable del aumento del valor de la constante de disociación.

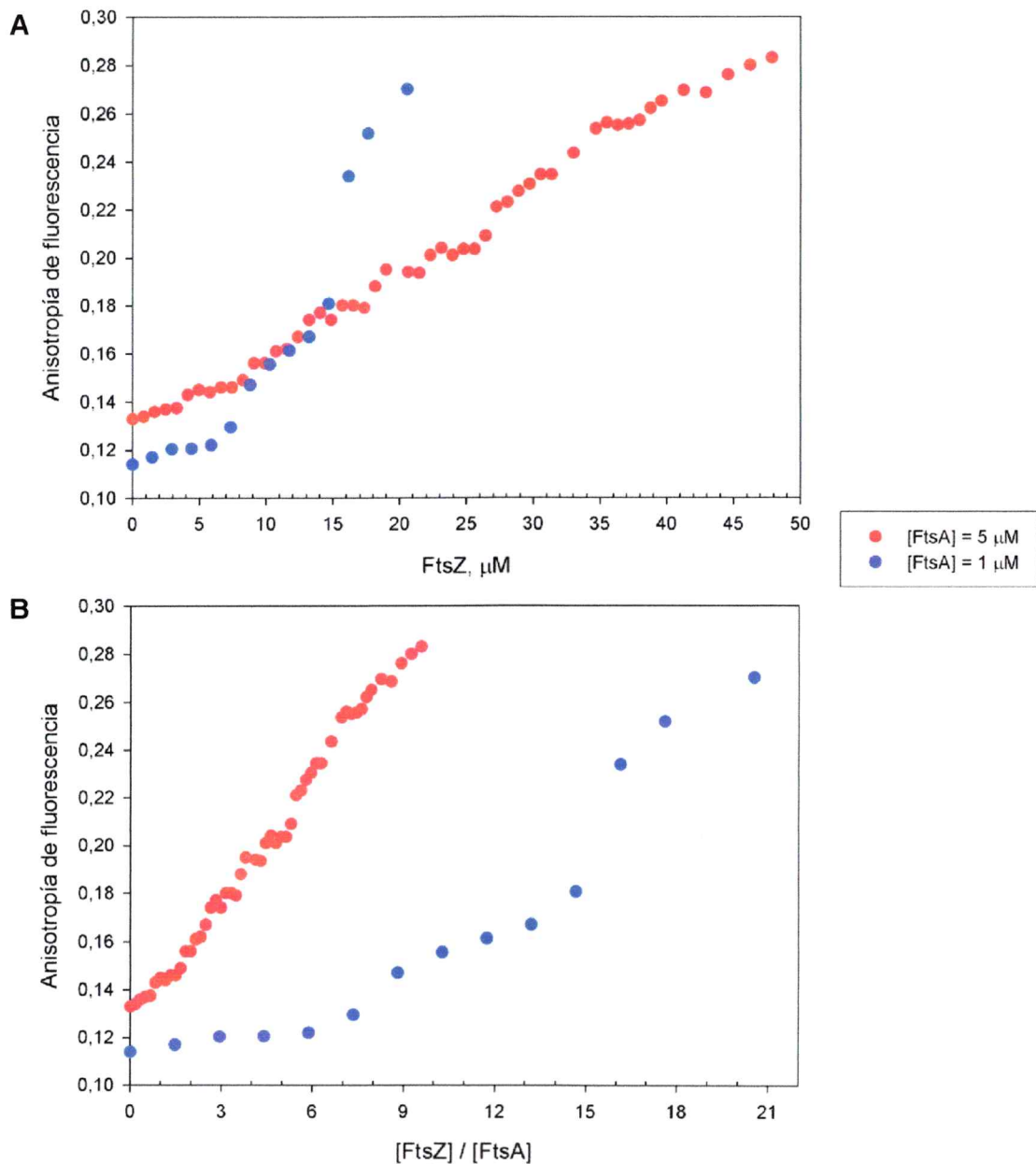


Figura 19. A. Curva de titulación de FtsA con FtsZ, siguiendo la anisotropía de la fluorescencia intrínseca de FtsA. Se incubó la proteína en amortiguador Hepes-KOH 50 mM pH 8,0, KCl 100 mM, EDTA 1 mM, DTT 2,5 mM, a una temperatura controlada de 25 °C. Para obtener la anisotropía se excitó a 295 y se registró la emisión a 348 nm.
B. Curva corregida por la concentración de FtsA.

Tabla III. Constantes de disociación para los tres sitios observados en la curva de titulación de FtsA 1 μM con FtsZ (**figura 19**).

Sitio	$K_D, \mu\text{M}$
1	4,4
2	11,6
3	16,4

Entrecruzamiento químico de FtsA y FtsA Δ 27. Para determinar si FtsA y FtsA Δ 27 se encuentran en solución como monómeros, o como polímeros, se realizó una cinética de entrecruzamiento químico con glutataldehído. Los polímeros entrecruzados se separaron de los monómeros por SDS-PAGE (**figura 20**). Al tiempo inicial (0 s) se observó únicamente una banda de FtsA, cuya masa molecular relativa respecto del estándar resultó ser de 46 kDa. Conforme aumentó el tiempo de la reacción, se observó que esta banda se hizo cada vez más tenue. A partir de los 15 s, apareció una nueva banda, justo en el límite entre el gel resolutivo y el gel concentrador, que corresponden agregados de FtsA de una masa molecular relativa mayor a 250 kDa. La intensidad de esta banda aumentó con el tiempo de reacción. Para el caso de FtsA no se observó la presencia de bandas de masa molecular intermedia.

En el caso de FtsA Δ 27 se observó un comportamiento muy parecido, al tiempo inicial se observó solo una banda de FtsA, de masa molecular relativa de 44,7 kDa, la banda entre el gel concentrador y el gel resolutivo apareció a los 30 s. Se observaron dos diferencias entre los casos: 1) la agregación de FtsA fue menos y más lenta, y 2) se detectó la presencia de bandas de masa molecular intermedia. En la **figura 21** se muestra el análisis densitométrico del gel de FtsA Δ 27, donde se observa la intensidad promedio de los píxeles a lo largo de cada carril, expresado como migración electroforética relativa o R_F . Para calcular la masa molecular relativa de cada banda, se

confeccionó una curva de calibración con el estándar (**figura 21 A**), dado que esta establecido que existe una relación lineal entre el logaritmo de R_F y a la masa molecular de la proteína (Creighton, 1997). Utilizando esta función, se construyó la **figura 21 B**, que muestra la intensidad de pixeles en función de la masa molecular relativa, y en función de la masa del monómero de FtsA Δ 27, esta última, expresada como la razón entre la masa molecular relativa y la masa del monómero calculada a partir del gel (44,7 kDa).

Se observó claramente la presencia de: 1) un dímero de FtsA Δ 27 de 86 kDa; 2) especies oligoméricas de mayor masa molecular; 3). una banda tenue de 52 kDa a los tiempos 30, 60 y 180 s, que no se pudo identificar, y que seguramete correspondería a un contaminante entrecruzado.

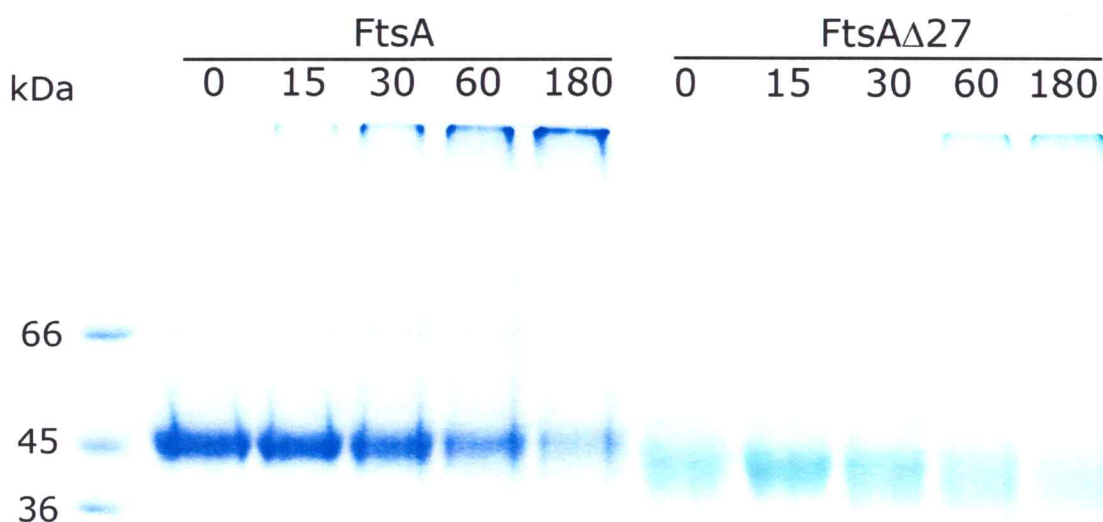


Figura 20. Gel SDS-PAGE 10% de la cinética de entrecruzamiento químico con glutaraldehído de FtsA y FtsA Δ 27. Se agregó glutaraldehído 0,2% v/v final a alícuotas de FtsA y de FtsA Δ 27, a 2,3 mg mL⁻¹, que estaban disueltas en amortiguador de diálisis. La reacción se detuvo a diferentes tiempos (0, 15, 30, 60 y 180 s) al agregar amortiguador de carga. En el primer carril se muestra el estándar de masa molecular.

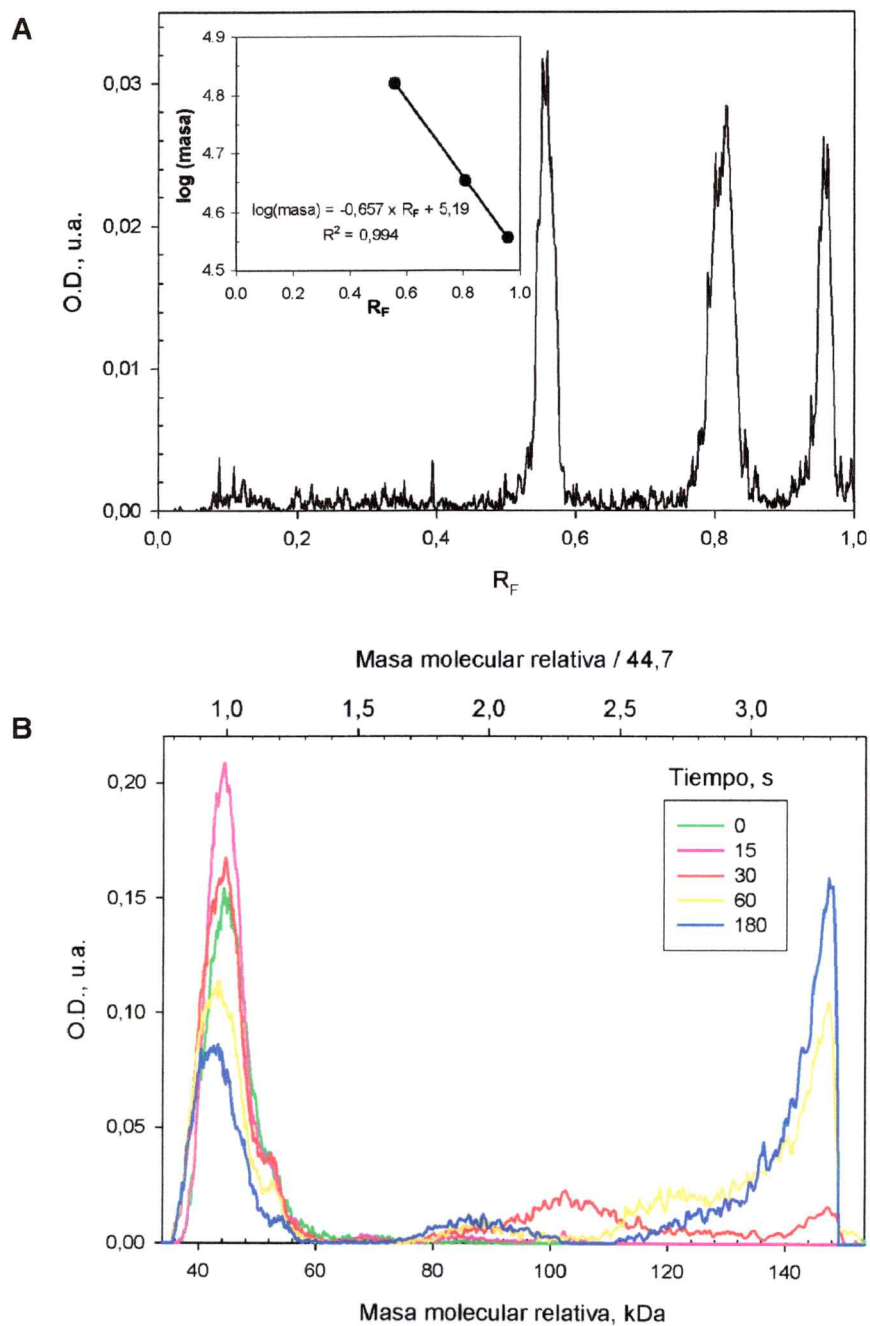


Figura 21. Análisis del gel SDS-PAGE de entrecruzamiento de FtsA Δ 27. A. Curva de calibración confeccionada con proteínas de 66, 45 y 36 kDa. **B** Análisis de la migración de las especies de FtsA Δ 27 obtenidas por entrecruzamiento, deteniendo la reacción a diferentes tiempos. En el segundo eje de la abscisa se muestra el valor de la masa molecular relativa, respecto a la masa calculada para el monómero de FtsA en el gel (44,7 kDa).

Apagamiento dinámico de la fluorescencia intrínseca de FtsA. FtsA posee dos residuos triptófanos que se encuentran en la hélice C-terminal (**figura 22**), que es flexible (van den Ent y Löwe, 2000), y que le permite interactuar con la membrana (Pichoff y Lutkenhaus, 2005). Se observa que esta hélice es muy conservada, y que posee un carácter anfipático. El apagamiento dinámico, corresponde a una disminución en la intensidad de fluorescencia, dada por la colisión entre el fluoróforo y el apagador, de modo que el paso del fluoróforo en estado excitado al estado basal es no radiativo, como consecuencia disminuye el rendimiento cuántico. Acrilamida es un apagador neutro, ioduro es un apagador de carga negativa y cesio es un apagador de carga positiva. Dado que el tamaño de los apagadores cargados se similar (**tabla IV**), el apagamiento depende de la atracción o repulsión de cargas que existan en el ambiente en que se encuentra el fluoróforo y de la calidad del apagador, pero no del tamaño del apagador.

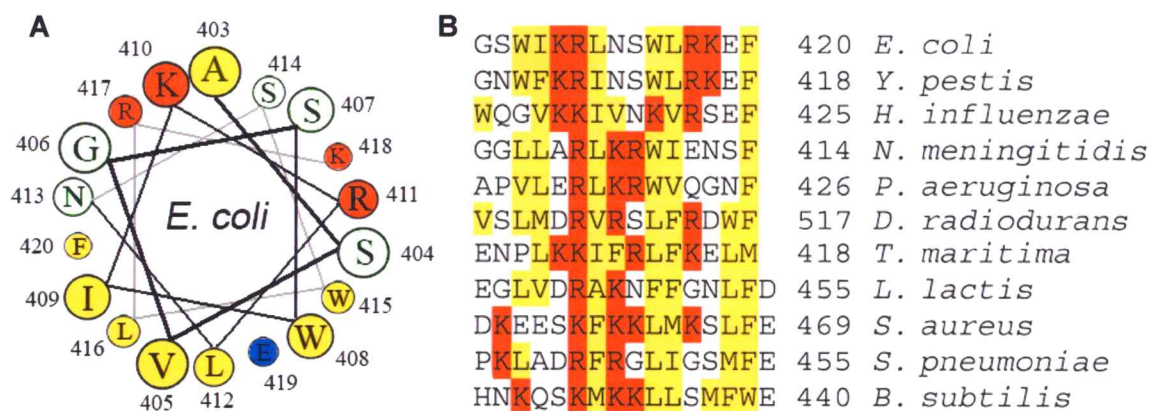


Figura 22. A. Diagrama de rueda para la supuesta α -hélice C-terminal de FtsA de *E. coli* (A403 a F420), contruido con cti.itc.virginia.edu/~cmg/Demo/wheel/wheelApp.html B. Alineamiento múltiple de secuencias C-terminal de FtsA de varios organismos (modificada de Pichoff y Lutkenhaus, 2005). Se destacan con amarillo los residuos apolares, y con rojo los residuos con carga positiva. El número corresponde al último residuo de la secuencia.

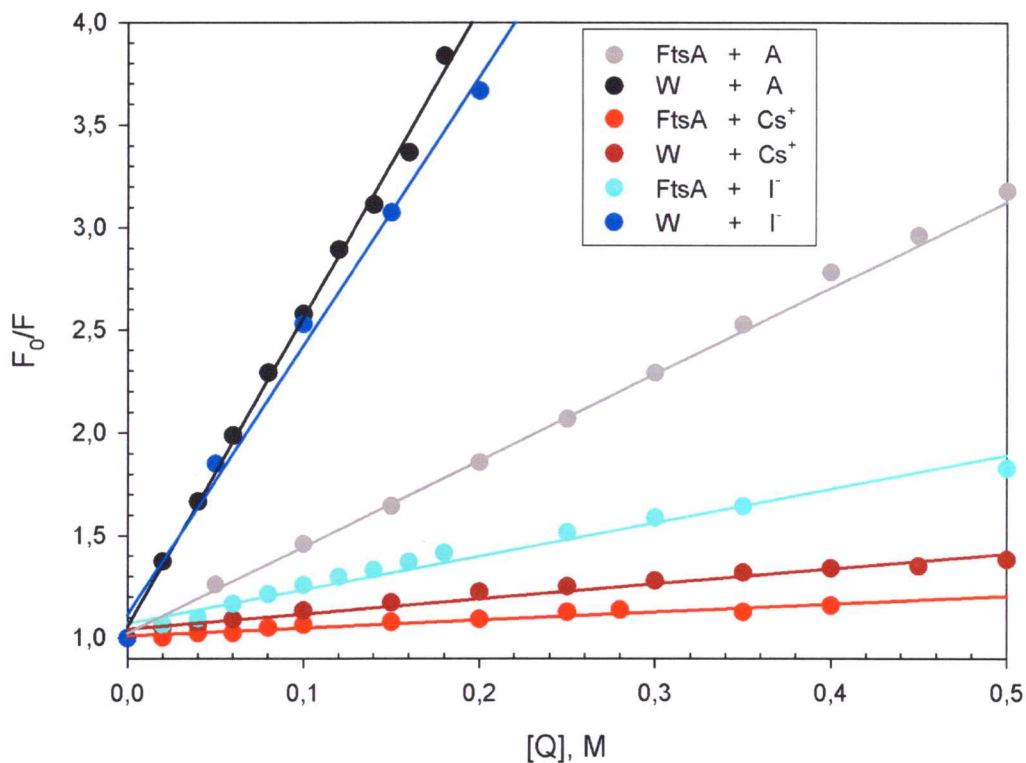


Figura 23. Gráfico de Stern-Volmer para el apagamiento dinámico de la fluorescencia de los triptófanos de la hélice C-terminal de FtsA. Se midió el apagamiento de la fluorescencia de FtsA 5 μM , y de triptófano (W) 10 μM (como control de sonda libre expuesta al solvente), en amortiguador Hepes-KOH 50 mM pH 8,0, KCl 100 mM, EDTA 1 mM, DTT 2,5 mM, a 25 $^{\circ}\text{C}$. Como apagadores se usaron acrilamida (A), cesio (Cs^+) e ioduro (I^-). Se excitó a 295 nm y se registró la emisión a 348 nm.

Como se observa en la **figura 23**, acrilamida, cesio e ioduro apagaron la fluorescencia de FtsA y de triptófano. Para cada curva de apagamiento, se calculó la constante de Stern-Volmer, de acuerdo a la ecuación 4. Como se observa en la **tabla IV**,

De acuerdo a esto resultados, el mejor apagador para la fluorescencia intrínseca de los triptofanos de FtsA es la acrilamida, seguida del ioduro, y el cesio. De por si, los distintos apagadores tienen una diferente eficiencia para apagar la fluorescencia del

anillo indol del triptófano (Valeur, 2002), por esta razón se corrigió la constante de Stern-Volmer para el apagamiento de los triptófanos en FtsA, expresándola como el porcentaje de la constante de Stern-Volmer del apagamiento de la sonda libre en solución, valor que da cuenta del grado de exposición al solvente de la sonda en la proteína. De acuerdo a estos cálculos, los triptófanos presentes en FtsA son apagados con mayor eficiencia, en términos comparativos, por cargas positivas que por cargas negativas, lo cual indica que en la vecindad de estas sondas, existirían cargas negativas.

Tabla IV. Constantes de Stern-Volmer calculadas para del apagamiento dinámico de la fluorescencia de los triptófanos de la hélice C-terminal de FtsA y su grado de exposición al solvente.

Apagador	Masa Molecular g mol ⁻¹	K _{SV} Triptófano M ⁻¹	K _{SV} FtsA M ⁻¹	%
Acilamida	71,1	15,1 ± 0,3	4,20 ± 0,07	27,9 ± 1,6
Cesio	132,9	0,74 ± 0,04	0,39 ± 0,03	54,0 ± 0,1
Ioduro	126,9	12,0 ± 0,51	1,65 ± 0,08	12,6 ± 1,3

Union de DAPI a FtsA. DAPI es una sonda fluorescente que se ha utilizado para estudiar el plegamiento y la dinámica de FtsZ y tubulina (Bonne y col., 1985; Arbildúa y col., 2006; Nova y col., 2007).

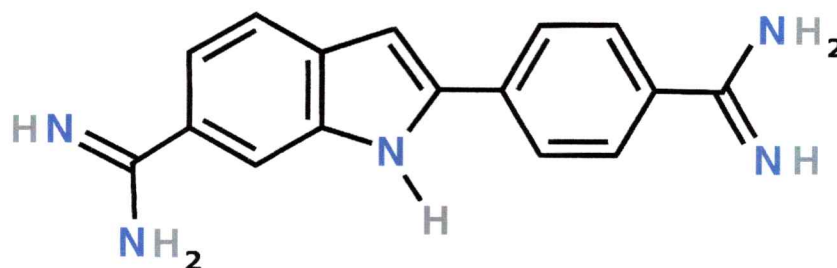


Figura 24. Estructura química de la sonda fluorescente DAPI.

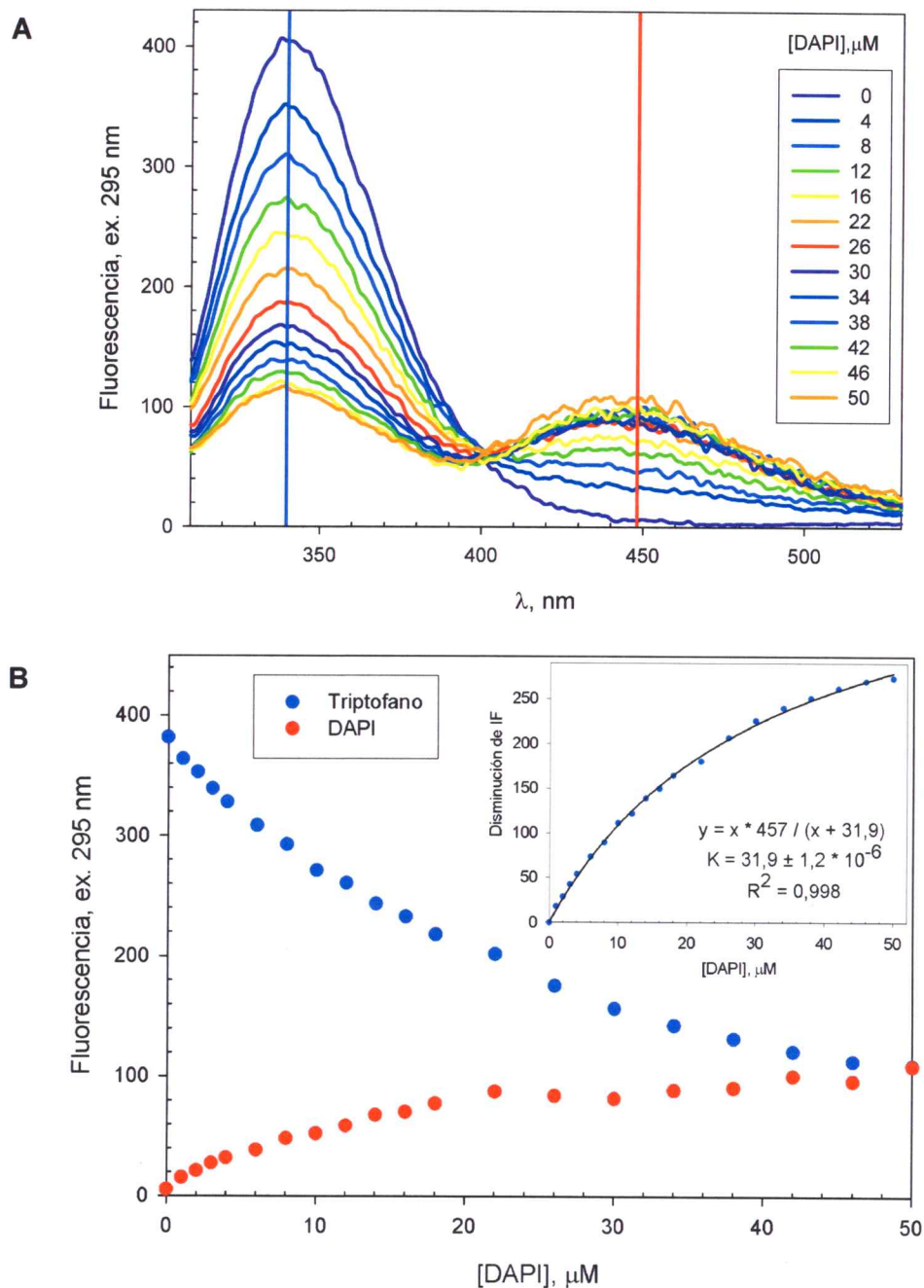


Figura 25. Titulación de FtsA con DAPI seguida por FRET. A. Espectro de emisión de FtsA 5 μM en amortiguador Hepes-KOH 50 mM pH 8,0, KCl 100 mM, EDTA 1 mM, DTT 2,5 mM, a 25 $^{\circ}\text{C}$, con diferentes concentraciones de DAPI. **B.** Se destaca el máximo de emisión de FtsA (342 nm, en azul), y el máximo de emisión de DAPI (448 nm, en rojo). En el panel interno se determinó a partir de la emisión a 342 nm, una constante de disociación de $31,9 \pm 1,2 \mu\text{M}$, ajustando los datos a una hipérbola.

Con el objetivo de determinar si DAPI se une a FtsA, se siguió su unión a FtsA por FRET (**figura 25 A**). Se observó que al agregar DAPI disminuyó la intensidad de fluorescencia de triptófano a 342 nm, y apareció un máximo de fluorescencia a 448 nm que corresponde a la emisión de DAPI, lo cual indica que DAPI se une a FtsA, y se encuentra a una distancia menor que el diámetro de la proteína. En la **figura 25 B** se grafican los valores de los máximos de emisión de triptófano y de DAPI, se utilizó la disminución de la fluorescencia de triptófano para ajustar los datos a una hipérbola, y se obtuvo una constante de disociación de $31,9 \pm 1,2 \mu\text{M}$. No se utilizó la fluorescencia de DAPI para calcular la constante de disociación, dado que a 295 nm se excita también a DAPI.

8

DISCUSION

Polimerización de FtsA y FtsZ. Se sabe que FtsA es capaz de formar polímeros *in vitro*, sin embargo, se desconoce si interactúa con los polímeros de FtsZ *in vitro* e *in vivo*, como monómero o bien como polímero, también se desconoce el rol del ATP y la posible actividad ATPásica de FtsA en este proceso. De acuerdo a los experimentos de polimerización seguida por dispersión de luz, se determinó que FtsA tiene tendencia a agregarse, para formar polímeros que dispersan la luz, esta agregación es inhibida en presencia del cosolvente estabilizador sacarosa, por lo que es conveniente almacenar la proteína en sacarosa.

Los resultados de entrecruzamiento químico indican que inclusive en sacarosa 1M, la proteína se encuentra mayoritariamente formando agregados de masa molecular mayor a 250 kDa. En el caso de la mutante FtsA Δ 27, la mayor parte de la proteína se encuentra como monómero, solo una fracción de ella se encontraría formando polímeros de gran tamaño como en el caso de la proteína silvestre. Esto indica que la hélice anfipática C-terminal es importante en la polimerización de FtsA, pero no es esencial. También en los experimentos de entrecruzamiento químico, se logró detectar la presencia de un dímero de FtsA Δ 27, resultado que tiene gran relevancia, pues se ha propuesto en base a experimentos de complementación genética que el dímero de FtsA es la unidad funcional de la proteína (Shiomi y cols., 2007).

Se determinó que la cinética de polimerización de FtsA, depende fuertemente del pH de la solución, si bien las curvas de polimerización mantuvieron la misma forma a los diferentes pH estudiados, la polimerización es mucho mayor a pH ácido que a pH básico, así a pH 9 se encuentra casi completamente inhibida.

Se ha estimado por experimentos de cuantificación por SDS-PAGE de proteínas extraídas de cultivos en crecimiento sincrónico de *E. coli*, que la cantidad de moléculas de FtsA por célula promedio es de 740, la cual se mantiene constante durante todo el ciclo celular, al igual que la concentración de FtsZ y de ZipA (Rueda y col., 2003). Se sabe que el volumen del citoplasma de una célula de *E. coli* es de $6,7 \times 10^{-16}$ L, es decir 0,67 fL (Godsell, 1991). Tomando estos datos de volumen y cantidad de moléculas, se estimó que la concentración de FtsA en el citoplasma de *E. coli*, sería de $\sim 2 \mu\text{M}$. De manera que se determinó el efecto de la concentración de FtsA sobre su polimerización, tanto a concentraciones menores de la fisiológica, como a concentraciones mayores, lo que se muestra en la **figura 14**.

Se determinó que a pH básico (7,4, 8 y 9), aumenta la dispersión de luz de FtsA al agregar ATP, y que este efecto es máximo a una concentración de FtsA de 2 a 3 μM , en cambio a concentraciones mayores de proteína, en la cuales la polimerización es mayor, el efecto del ATP es menor. Este comportamiento se explicaría debido a que a una alta concentración de proteína se favorece la formación de polímeros, entonces existiría una menor proporción de moléculas susceptibles a formar polímeros, por lo tanto, sería menor el aumento de dispersión de luz ocasionado al agregar ATP a una mayor concentración de FtsA.

Los resultados indican que el ATP no tiene efecto en la polimerización de FtsA a un pH ácido (5,5), dado que la disminución de dispersión de luz ocasionada al agregar ATP a la cubeta, fue la misma que al agregar un volumen idéntico de agua, esto además concuerda con el hecho de que el efecto del ATP a este pH haya sido proporcional al efecto de la concentración de FtsA. Este resultado indicaría que la proteína no es funcional a este pH. Información adicional fue provista gentilmente por Marcin Krupka de el grupo del Dr. Miguel Vicente (Centro Nacional de Biotecnología, Madrid, España),

quien determinó por microscopia electrónica que los agregados formados por FtsA a pH ácido (5-6) no corresponden a polímeros, sino más bien a agregados amorfos de proteínas; no así a pH 8,0, en el cual se observaron manojos de polímeros de FtsA (Gallardo, 2006). Cuando las proteínas se encuentran a un pH cercano a su punto isoeléctrico, su carga eléctrica neta es cero, de manera que pueden ocurrir interacciones entre parches hidrofóbicos en las superficies, formando agregados inespecíficos, muchas proteínas precipitan cerca de su punto isoeléctrico. El punto isoeléctrico de la FtsA expresada del pMFV12 es de 6,2, esto explicaría por que a este pH se observó una mayor dispersión de luz y se formaron de agregados amorfos de proteína en la microscopia electrónica. La inhibición de la agregación de FtsA por NaCl y KCl (**figura 12**) indica que una alta fuerza iónica es capaz de disgregar las moléculas de FtsA, esto contribuiría a sustentar la hipótesis anterior, pues la nube de contra-iones es capaz de enmascarar las cargas de la superficie de la proteína, separando estos complejos.

La polimerización de FtsZ inducida por GTP también depende del pH, a 6,5 es instantánea, y disminuye una vez que se ha hidrolizado todo el GTP, en cambio, a pH de 8,0, la polimerización es mucho mayor y aumenta en el tiempo hasta llegar a un estado estacionario que se mantiene en el tiempo. El hecho de que FtsZ polimerice en forma irreversible a este pH, indica que FtsZ no es funcional a pH 8,0, en el que se midió la actividad ATPásica de FtsA. Se concluye así que tanto la polimerización de FtsA, como la de FtsZ dependen fuertemente del pH. Un efecto muy similar al del pH básico en la polimerización de FtsZ se observó usando inhibidores desarrollados para la tubulina, derivados de la fenstatina (Gutierrez, 2009).

El pH en el citoplasma de *E. coli* varía entre 7,2 a 7,8 (Wilks y Slonczewski, 2007). Se ha determinado que de los distintos procesos fisiológicos de *E. coli*, el único que se

inhibe completamente a un pH externo de 8,3 es la división celular, y como consecuencia se forman largos filamentos celulares (Zilberstein y col., 1984). En este trabajo se determinó que a pH 8,0 se forman polímeros permanentes de FtsZ, que no serían funcionales, de manera que este hecho podría dar cuenta de la sensibilidad del proceso de división celular a pH básico.

Actividad ATPásica de una preparación de FtsA. Se determinó que la curva de saturación de la actividad ATPásica de FtsA posee una K_M de 0,24 mM. No se pudo determinar la V_{MAX} con certeza, dado que a concentraciones de ATP mayores de 2 mM, las curvas de progreso perdieron su linealidad. Este comportamiento podría deberse a que existen cambios en el estado de agregación de FtsA a mayores concentraciones de ATP. Existe en la literatura un trabajo donde se purificó la FtsA de la bacteria esporuladora Gram (+) *Bacillus subtilis*, y se determinó que esta unió e hidrolizó ATP, con una K_M de 0,7 mM ; a una concentración de 50 nM (Feucht y col., 2001). Valor que está en el rango del valor 0,24 mM, obtenido en este trabajo.

En presencia de FtsZ la K_M se mantuvo constante, pero disminuyó la V_{MAX} , de acuerdo a esto, la actividad ATPásica de FtsA se inhibiría de manera no competitiva. Es probable que FtsZ no tenga un efecto sobre la actividad ATPásica de FtsA en forma directa, ya que no cambio la K_M en su presencia, sino más bien, que tenga un efecto sobre la agregación de FtsA, y como consecuencia de ello, disminuya indirectamente la actividad ATPásica de FtsA.

Unión de FtsZ a FtsA. Utilizando la anisotropía de la fluorescencia intrínseca de FtsA, se determinó que FtsZ se une a FtsA (**figura 19 A**). En la curva de titulación de FtsA 1 μ M se observaron dos puntos de inflexión, que corresponderían a tres poblaciones de

sitios, cuyas respectivas constantes de disociación, que se muestran en la **tabla III**, están en el rango de 4 a 16 micromolar.

Se ha estudiado la unión de FtsZ a ZipA, ambas de *E. coli*, en solución y en presencia de proteoliposomas de ZipA, por anisotropía de fluorescencia, y se determinó que ZipA se une a dos poblaciones de sitios de unión de FtsZ, dos sitios de alta afinidad ($K_{D1} = 1,72 \mu\text{M}$) y cinco sitios de baja afinidad ($K_{D2} = 14,3 \mu\text{M}$) (Ordenes, 2006).

La presencia de varios sitios de unión para FtsA y ZipA en FtsZ se explica por que FtsZ se encuentra formando oligómeros en solución. Se ha descrito la presencia de dímeros, trímeros y tetrámeros de FtsZ en solución mediante experimentos de entrecruzamiento químico (Weinstein y cols. 2002) y de ultracentrifugación analítica (Rivas y cols., 2000). El hecho de que las constantes de unión de FtsA y de ZipA, con FtsZ, estén en el mismo orden de magnitud, indica que probablemente ambas proteínas compiten *in vivo* por la unión a FtsZ.

El efecto de la concentración de FtsA sobre las curvas de anisotropía permite concluir que la unión es más favorable a mayor concentración de FtsA. Este resultado indica que probablemente la polimerización de FtsA es importante para la unión de FtsZ *in vivo*, y por lo tanto, tiene un rol en la formación del divisoma. Recientemente se determinó por experimentos de complementación genética, que la oligomerización de FtsA promueve la formación del anillo Z, favoreciendo la interacción de FtsA con FtsZ (Shiomi y Margolin, 2007), y de FtsA con la membrana (Shiomi y Margolin, 2008), lo cual concuerda muy bien con el resultados obtenidos en este trabajo que indican que la interacción de FtsZ es más fuerte por los polímeros de FtsA.

Apagamiento de la fluorescencia intrínseca de FtsA y unión de DAPI. Se determinó que los residuos triptófanos de la hélice C-terminal de FtsA están

relativamente inaccesibles al solvente, y que se encontraría en un ambiente con carga negativa. El residuo glutamato 419 se encuentra cercano en la secuencia a los dos residuos triptófano, en el diagrama de rueda para la supuesta α -hélice C-terminal (**figura 22 A**) este quedaría en la misma cara que ambos triptofanos, a una vuelta del W415 y a 3 vueltas del W408, de manera que el residuo E419, sería un buen candidato para explicar la carga negativa en la vecindad de los residuos triptófanos.

Esta información se puede utilizar para evaluar modelos computacionales Ab-initio o mixtos de la estructura que adopta la hélice C-terminal, que al ser flexible, su estructura no se ha logrado resolver por cristalografía; y también para estudiar como cambia la accesibilidad al solvente de estos residuos en presencia de liposomas de *E. coli*, y así utilizarlos como sonda para estudiar la interacción de la hélice a la membrana.

Se determinó además que la sonda DAPI se une a FtsA, pues ocurre transferencia de energía entre los residuos triptófanos y el DAPI, con una constante disociación de $31,9 \pm 1,2 \mu\text{M}$. Realizando más experimentos sería posible determinar la distancia entre los triptófanos y el DAPI, también interesante determinar si esta distancia cambia en presencia de liposomas de *E. coli*. También se puede marcar el extremo N-terminal de la proteína y usarlo como sonda para calcular el posible cambio de distancia producto de la unión a membrana.

CONCLUSIONES

1. En solución FtsA se encuentra mayoritariamente formando polímeros, esta tendencia se favorece a una alta concentración de proteína y a menor pH; y se inhibe con sacarosa (cosolvente estabilizador), fuerza iónica, y pH alcalino.
2. El ATP estimula la polimerización de FtsA solo cuando su estado de agregación es bajo.
3. FtsZ se une a FtsA, y esta interacción es más favorable a mayor concentración de FtsA. La forma de las curvas indica que hay al menos tres poblaciones de sitios, que se hacen más evidentes a menor concentración de FtsA. A su vez esta interacción inhibe la actividad ATPásica de FtsA.
4. Los residuos de triptófanos de la hélice C-terminal están medianamente accesibles al solvente y se encuentran en un ambiente donde dominan las cargas negativas.
5. La sonda DAPI se une a FtsA con una constante disociación de $31,9 \pm 1,2 \mu\text{M}$, el sitio de unión esta relativamente cerca de los triptófanos, pues hay transferencia de energía entre las sondas.

REFERENCIAS

- Aarsman M.E., Piette A., Fraipont C., Vinkenvleugel T.M., Nguyen-Disteche M., y den Blaauwen T. (2005). Maturation of the *Escherichia coli* divisome occurs in two steps. *Mol. Microbiol.* **55**: 1631-1645.
- Addinall S.G., Bi E. y Lutkenhaus J. (1996). FtsZ ring formation in *fts* mutants. *J. Bacteriol.* **178**: 3877-3884.
- Addinall S.G. y Lutkenhaus J. (1996). FtsZ-spirals and -arcs determine the shape of the invaginating septa in some mutants of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **22**(2): 231-237.
- Andreu J.M., Oliva M.A., y Monasterio O. (2002). Reversible Unfolding of FtsZ Cell Division Proteins from Archaea and Bacteria. *J. Biol. Chem.* **277** (45): 43262-43270.
- Arbildúa J.J., Brunet J.E., Jameson D.M., López M., Nova E., Lagos R. y Monasterio O. (2006). Fluorescence resonance energy transfer and molecular modeling studies on 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) complexes with tubulin. *Protein Science* **15**: 410-419.
- Ayala J.A., Garrido T., de Pedro M.A. Y Vicente, M. (1994) Molecular biology of bacterial septation. En Hakenbeck R. y Ghuyssen, J.M (eds.) *Bacterial Cell Wall*. pp. 73-101. Elsevier Science, Amsterdam.
- Barcellona M.L. y Gratton E. (1996). Fluorescence anisotropy of DNA/DAPI complex: torsional dynamics and geometry of the complex. *Biophys. J.* **70**: 2341-2351.
- Bi E.F. y Lutkenhaus J. (1991). FtsZ ring structure associated with division in *Escherichia coli*. *Nature* **354**(6349): 161-164.
- Beech P.L., Nheu T., Schultz T., Herbert S., Lithgow T., Gilson P.R. y McFadden G.I. (2000). Mitochondrial FtsZ in a chromophyte alga. *Science* **287**: 1276-1279.
- Begg K., Nikolaichik Y., Crossland N. y Donachie W.D. (1998). Roles of FtsA and FtsZ in Activation of Division Sites. *J. Bacteriol.* **180**: 881-884.
- Bernard C.S., Sadasivam M., Shiomi D. y Margolin W. (2007). An altered FtsA can compensate for the loss of essential cell division protein FtsN in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **64**(5): 1289-1305.
- Bernhardt T.G. y de Boer P.A. (2003). The *Escherichia coli* amidase AmiC is a periplasmic septal ring component exported via the twin-arginine transport pathway. *Mol. Microbiol.* **48**: 1171-1182.
- Beuria T.K., Krishnakumar S.S., Sahar S., Singh N., Gupta K., Meshram M. y Panda D. (2003). Glutamate-induced assembly of bacterial cell division protein FtsZ. *J. Biol. Chem.* **278**: 3735-3741.
- Bonne D., Heusele C., Simon C. y Pantaloni D. (1985). 4',6'-Diamidino-2-phenylindole, a fluorescent probe for tubulin and microtubules. *J. Biol. Chem.* **260**: 2819-2825.

- Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Bramhill D. y Thompson C.M. (1994). GTP-dependent polymerization of Escherichia coli FtsZ protein to form tubules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 5813-5817.
- Buddelmeijer N., y Beckwith J. (2002). Assembly of cell division proteins at the E. coli cell center. *Curr. Opin. Microbiol.* **5**: 553-557.
- Carballido-López R. (2006). The Bacterial Actin-Like Cytoskeleton. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**: 888-909.
- Chen J.C. y Beckwith J. (2001). FtsQ, FtsL and FtsI require FtsK, but not FtsN, for colocalization with FtsZ during Escherichia coli cell division. *Mol. Microbiol.* **42**: 395-413.
- Corbin B.D., Geissler B., Sadasivam M. y Margolin W. (2004). Z-ring-independent interaction between a subdomain of FtsA and late septation proteins as revealed by a polar recruitment assay. *J. Bacteriol.* **186**: 7736-7744.
- Creighton T. E. (1997). Protein Structure: A Practical Approach. Second ed. Oxford University Press, New York, USA.
- Dai K. y Lutkenhaus J. (1992). The proper ratio of FtsZ to FtsA is required for cell division to occur in Escherichia coli. *J. Bacteriol.* **174**:6145-6151.
- de Boer P., Crossley R. y Rothfield L. (1992). The essential bacterial cell-division protein FtsZ is a GTPase. *Nature* **359**: 254-256.
- Descoteaux A. y Drapeau G.R. (1987). Regulation of cell division in Escherichia coli K-12: probable interactions among proteins FtsQ, FtsA, and FtsZ. *J. Bacteriol.* **169**: 1938-1942.
- Di Lallo G., Fagioli M., Barionovi D., Ghelardini P. y Paolozzi L. (2003). Use of a two-hybrid assay to study the assembly of a complex multicomponent protein machinery: bacterial septosome differentiation. *Microbiol.* **149**: 3353-3359.
- Díaz-Espinoza R., Garcés A.P., Arbildua J.J., Montecinos F., Brunet J.E., Lagos R. y Monasterio O. (2007). Domain folding and flexibility of Escherichia coli FtsZ determined by tryptophan site-directed mutagenesis. *Protein Sci.* **16**:1543-1556.
- Donachie W.D. (1993). The cell cycle of Escherichia coli. *Annu. Rev. Microbiol.* **47**: 199-230.
- Erickson H.P. (1997). FtsZ, a tubulin homolog, in prokaryote cell division. *Trends Cell. Biol.* **7**: 362-367.
- Erickson H.P. (2000). Dynamin and FtsZ. Missing links in mitochondrial and bacterial division. *J. Cell Biol.* **148**:1103-1105.
- Errington J., Daniel R.A. y Scheffers D.J. (2003). Cytokinesis in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**: 52-65.
- Frishman D. y Argos P. (1995). Knowledge-Based Protein Secondary Structure Assignment. *Proteins: Structure, Function, and Genetics* **23**: 566-579.

- Fersht A. (1999). Structure and mechanism in protein science. A guide to enzyme catalysis and protein folding. Second ed. Freeman, New York, USA.
- Feucht A., Lucet I., Yudkin M.D. y Errington J. (2001). Cytological and biochemical characterization of the FtsA cell division protein of *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **40**(1): 115-125.
- Gallardo R. (2006). Purificación de la proteína FtsA de *Escherichia coli* y caracterización de su actividad ATPásica. Tesis de pregrado, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Geissler B., Elraheb D. y Margolin W. (2003). A gain-of-function mutation in *ftsA* bypasses the requirement for the essential cell division gene *zipA* in *Escherichia coli*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **100**: 4197-4202.
- Geissler B., Shiomi D. y Margolin W. (2007). The *ftsA** gain of function allele of *Escherichia coli* and its effects on the stability and dynamics of the Z ring. *Microbiol.* **153**: 814-825.
- Greenfield N.J. (2006). Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nature Protocols* **1**: 2876-2890.
- Goodsell D.S. (1991). Inside a living cell. *Trends in Biochem. Sci.* **16**: 203-206.
- Gonzalez J.M., Jiménez M., Velez M., Mingorance J., Andreu J.M., Vicente M. y Rivas. G. (2003). Essential cell division protein FtsZ assembles into one monomer-thick ribbons under conditions resembling the crowded intracellular environment. *J. Biol. Chem.* **278**: 37664-37671.
- Goehring N.W., Gueiros-Filho F. y Beckwith J. (2005). Premature targeting of a cell division protein to midcell allows dissection of divisome assembly in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* **19**: 127-137.
- Goehring N.W., Gonzalez M.D. y Beckwith J. (2006). Premature targeting of cell division proteins to midcell reveals hierarchies of protein interactions involved in divisome assembly. *Mol. Microbiol.* **61**: 33-45.
- Gutierrez E. (2009). Unidad de investigación. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Hale C.A. y de Boer P.A. (1997). Direct binding of FtsZ to ZipA, an essential component of the septal ring structure that mediates cell division in *E. coli*. *Cell* **88**: 175-185.
- Hale C.A., Rhee A.C. y de Boer P.A. (2000). ZipA-induced bundling of FtsZ polymers mediated by an interaction between C-terminal domains. *J. Bacteriol.* **182**: 5153-5166.
- Hurley J.H. (1996). The sugar kinase/heat shock protein 70/actin superfamily: implications of conserved structure for mechanism. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **25**: 137-62.
- Jameson D.M., Croney J.C. y Moens P.D. (2003). Fluorescence: basic concepts, practical aspects, and some anecdotes. *Methods Enzymol.* **360**: 1-43.
- Jenkins C., Samudrala R., Anderson I., Hedlund B.P., Petroni G., Michailova N., Pinel N., Overbeek R., Rosati G. y Staley, J.T. (2002). Genes for the cytoskeletal protein tubulin in the bacterial genus *Prostheco bacter*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **99**, 17049-17054.

- Kabsch W. y Sander C. (1983). Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen bond and geometrical features. *Biopolymers* **22**: 2577-2637.
- Karimova G., Dautin N. y Ladant D. (2005). Interaction network among Escherichia coli membrane proteins involved in cell division as revealed by bacterial two-hybrid analysis. *J. Bacteriol.* **187**: 2233-2243.
- Lakowicz J.R. (2006). Principles of Fluorescence Spectroscopy. Tercera ed. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lanzetta P.A., Alvarez L.J., Reinach P.S y Candia O.A. (1979). An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate. *Anal. Biochem.* **100**: 95-97.
- Lees J.G., Miles A.J., Wien F., y Wallace B.A. (2006). A reference database for circular dichroism spectroscopy covering fold and secondary structure space. *Bioinformatics* **22**: 1955-1962.
- Levin P.A., Schwartz R.L. y Grossman A.D. (2001). Polymer stability plays an important role in the positional regulation of FtsZ. *J. Bacteriol.* **183**: 5449-5452.
- Li Z., Trimble M.J., Brun Y.V. y Jensen G.J. (2007). The structure of FtsZ filaments in vivo suggests a force-generating role in cell division. *EMBO J.* **26**: 4694-4708.
- Liu Z, Mukherjee A. y Lutkenhaus J. (1999). Recruitment of ZipA to the division site by interaction with FtsZ. *Mol. Microbiol.* **6**: 1853-1861.
- Löwe J., y Amos L.A. (1998). Crystal structure of the bacterial cell-division protein FtsZ. *Nature* **391**: 203-206.
- Löwe J., van den Ent F. y Amos L.A. (2004). Molecules of the bacterial cytoskeleton. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **33**:177-198.
- Lu C., Stricker J. y Erickson H.P. (1998). FtsZ from Escherichia coli, Azotobacter vinelandii, and Thermotoga maritima-quantitation, GTP hydrolysis, and assembly. *Cell Motil. Cytoskeleton* **40**: 71-86.
- Lutkenhaus J. y Addinall S.G. (1997). Bacterial cell division and the Z ring. *Annu. Rev. Biochem.* **66**: 93-116.
- Ma X., Ehrhardt D.W. y Margolin W. (1996). Colocalization of cell division proteins FtsZ and FtsA to cytoskeletal structures in living Escherichia coli cells by using green fluorescent protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **23**: 12998-13003.
- Ma X., Sun Q., Wang R., Singh G., Jonietz E.L. y Margolin W. (1997). Interactions between heterologous FtsA and FtsZ proteins at the FtsZ ring. *J. Bacteriol.* **179**:6788-6797.
- Mao D., Wachter E. y Wallace B.A. (1982). Folding of the H⁺-ATPase proteolipid in phospholipid vesicles. *Biochemistry* **21**: 4960-4968.

- Margolin W. (2000). Themes and variations in prokaryotic cell division. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**(4): 531-548
- Michie K.A. y Löwe J. (2006). Dynamic filaments of the bacterial cytoskeleton. *Annu. Rev. Biochem.* **75**: 467-492.
- Miroux B. y Walker J.E. (1996). Over-production of proteins in Escherichia coli: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J. Mol. Biol.* **260**: 289-298.
- Møller-Jensen J., Bugge Jensen R., Löwe J. y Gerdes K. (2002). Prokaryotic DNA segregation by an actin-like filament. *EMBO J.* **21**: 3119-3127.
- Moy F.J., Glasfeld E., Mosyak L. y Powers R. (2000). Solution structure of ZipA, a crucial component of Escherichia coli cell division. *Biochemistry* **39**: 9146-9156.
- Monasterio O. (1980). Mecanismo cinético de la glucoquinasa. Tesis de doctorado. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Mukherjee A. y Lutkenhaus J. (1999). Analysis of FtsZ assembly by light scattering and determination of the role of divalent metal cations. *J. Bacteriol.* **181**: 823-832.
- Nogales E., Downing K.H., Amos L.A. y Löwe J. (1998). Tubulin and FtsZ form a distinct family of GTPases. *Nature Struct. Biol.* **5**: 451-458.
- Nogales E., Wolf S.G., y Downing K.H. (1998). Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography. *Nature* **391**: 199-203.
- Nova E., Montecinos F., Brunet J.E., Lagos R. y Monasterio O. (2007). 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) induces bundling of Escherichia coli FtsZ polymers inhibiting the GTPase activity. *Arch. Biochem. Biophys.* **465**: 315-319.
- Orengo C.A., Michie A.D., Jones S., Jones D.T., Swindells M.B., y Thornton J.M. (1997). CATH - A hierarchic classification of protein domain structures. *Structure* **5**: 1093-1108.
- Ordenes A. (2006). Caracterización por espectroscopia de fluorescencia de la interacción de las proteínas de E. coli, ZipA inserta en liposomas con FtsZ. Tesis de pregrado. Instituto de Química, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso.
- Osawa M., Anderson D.E. y Erickson, H.P. (2008). Reconstitution of contractile FtsZ rings in liposomes. *Science* **320**: 792-794.
- Osteryoung K.W. y McAndrew R.S. (2001). The plastid division machine. *Ann. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* **52**: 315-333.
- Osteryoung K.W., Stokes K.D., Rutherford S.M., Percival A.L. y Lee W.Y. (1998). Chloroplast division in higher plants requires members of two functionally divergent gene families with homology to bacterial ftsZ. *Plant Cell* **10**: 1991-2004.
- Pettersen E.F., Goddard T.D., Huang C.C., Couch G.S., Greenblatt D.M., Meng E.C. y Ferrin T.E. (2004). UCSF Chimera - A Visualization System for Exploratory Research and Analysis. *J. Comput. Chem.* **25**(13): 1605-1612.

- Pichoff S. y Lutkenhaus J. (2002). Unique and overlapping role for ZipA and FtsA in septal ring assembly in *Escherichia coli*. *EMBO J.* **21**: 685-93.
- Pichoff S. y Lutkenhaus J. (2005). Tethering the Z ring to the membrane through a conserved membrane targeting sequence in FtsA. *Mol. Microbiol.* **55**: 1722-34.
- Pichoff S. y Lutkenhaus J. (2007). Identification of a region of FtsA required for interaction with FtsZ. *Mol. Microbiol.* **64**: 1129-38.
- Pilhofer M., Rosati G., Ludwig W., Schleifer K.H. y Petroni G. (2007). Coexistence of Tubulins and ftsZ in Different *Prostheco bacter* Species. *Mol. Biol. Evol.* **24**(7): 1439-1442.
- Pla J., Sanchez M., Palacios P., Vicente M. y Aldea M. (1991). Preferential cytoplasmic location of FtsZ, a protein essential for *Escherichia coli* septation. *Mol. Microbiol.* **5**: 1681-1686.
- Provencher S.W. y Glockner J. (1981). Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism. *Biochemistry* **20**: 33-37.
- RayChaudhuri D. (1999). ZipA is a MAP-Tau homolog and is essential for structural integrity of the cytokinetic FtsZ ring during bacterial cell division. *EMBO J.*; **18**(9): 2372-2383.
- RayChaudhuri D. y Park J.T. (1992). *Escherichia coli* cell-division gene ftsZ encodes a novel GTP-binding protein. *Nature* **359**: 251-254.
- Rico A.I., García-Ovalle M., Mingorance J. y Vicente M. (2004). Role of two essential domains of *Escherichia coli* FtsA in localization and progression of the division ring. *Mol. Microbiol.* **53**: 1359-1371.
- Rivas G., Lopez A., Mingorance J., Ferrandiz M. J., Zorrilla S., Minton A.P., Vicente M. y Andreu J.M. (2000). Magnesium-induced linear self-association of the FtsZ bacterial cell division protein monomer. The primary steps for FtsZ assembly. *J. Biol. Chem.* **275**: 11740-11749.
- Rothfield L., Justice S. y García-Lara J. (1999). Bacterial cell division. *Annu. Rev. Genet.* **33**: 423-448.
- Romberg L. y Levin P.A. (2003). Assembly dynamics of the bacterial cell division protein FTSZ: poised at the edge of stability. *Annu. Rev. Microbiol.* **57**:125-154.
- Romberg L., Simon M. y Erickson H.P. (2001). Polymerization of Ftsz, a bacterial homolog of tubulin. is assembly cooperative?. *J. Biol. Chem.* **276**: 11743-11753.
- Rueda S., Vicente M. y Mingorance J. (2003). Concentration and Assembly of the Division Ring Proteins FtsZ, FtsA, and ZipA during the *Escherichia coli* Cell Cycle. *J. Bacteriol.* **180**: 3344-3351.
- Rudd K.E. (2000). EcoGene: a genome sequence database for *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res.* **28**(1): 60-4.
- Sali A. y Blundell T.L. (1993). Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.* **234**: 779-815.

- Sambrook J., Fritsch E.F. y Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning, a laboratory manual*. Segunda ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanchez M., Valencia A., Ferrandiz M.J., Sandler C. y Vicente M. (1994). Correlation between the structure and biochemical activities of FtsA, an essential cell division protein of the actin family. *EMBO J.* **13**, 4919–4925.
- Shen M.Y. y Sali A. (2006). Statistical potential for assessment and prediction of protein structures. *Protein Sci.* **15**: 2507-2524.
- Shimizu S. y Smith D.J. (2004). Preferential hydration and the exclusion of cosolvents from protein surfaces. *J. Chem. Phys.* **121**: 1148-1154.
- Shiomi D. y Margolin W. (2008). Compensation for the loss of the conserved membrane targeting sequence of FtsA provides new insights into its function. *Mol. Microbiol.* **67**: 558-69.
- Shiomi D. y Margolin W. (2007). Dimerization or oligomerization of the actin-like FtsA protein enhances the integrity of the cytokinetic Z ring. *Mol. Microbiol.* **66**:1396-1415.
- Shin J.Y. (2007). Papel del glutamato 83 y la arginina 85 de EcFtsZ en la formación y anclaje del anillo Z en el sitio de la división celular. Tesis de doctorado. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Sreerema N. y Woody R.W. (1993). A self-consistent method for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism. *Anal. Biochem.* **209**: 32-44.
- Sreerama N. y Woody R.W. (2000). Estimation of protein secondary structure from CD spectra: Comparison of CONTIN, SELCON and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Anal. Biochem.* **287**: 252-260.
- Stricker J., Maddox P., Salmon E.D. y Erickson H.P. (2002). Rapid assembly dynamics of the Escherichia coli FtsZ-ring demonstrated by fluorescence recovery after photobleaching. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 3171-3175.
- Takakuwa T., Konno T. y Meguro H. (1985). A new Standard substance for calibration of Circular Dichroism: ammonium d-10-camphorsulfonate. *Anal. science* **1**: 215-218.
- Timasheff S.N. y Arakawa T. (1997). Stabilization of protein structure by solvents. En Creighton T.E. (ed.), *Protein structure. A practical approach*. pp 349-363. Oxford University Press, New York.
- Ursinus A., van den Ent F., Brechtel S., de Pedro M., Höltje J.V., Löwe J. y Vollmer W. (2004). Murein (Peptidoglycan) Binding Property of the Essential Cell Division Protein FtsN from Escherichia coli. *J. Bacteriol.* **196**: 6728-6737.
- van den Ent F., Amos L.A. y Löwe J. (2001). Bacterial ancestry of actin and tubulin. *Curr. Opin. Microbiol.* **4**: 634–638.
- van den Ent F. y Löwe J. (2000). Crystal structure of the cell division protein FtsA from *Thermotoga maritima*. *EMBO J.* **19**: 5300–5307.

- Valeur B. (2002) *Molecular Fluorescence Principles and Applications*. First ed. Wiley-VCH, Weinheim, Alemania.
- Vaughan S., Wickstead B., Gull K. y Addinall S.G. (2004). Molecular evolution of FtsZ protein sequences encoded within the genomes of archaea, bacteria, and eukaryota. *J. Mol. Evol.* **58**: 19-29.
- Vicente M., Gomez M.J. y Ayala J.A. (1998). Regulation of transcription of cell division genes in the *Escherichia coli* dcw cluster. *Cell. Mol. Life Sci.* **54**(4): 317-24.
- Vicente M. y Löwe J. (2003). Ring, helix, sphere and cylinder: the basic geometry of prokaryotic cell division. *EMBO reports* **4**(7): 655-660
- Vicente M., Rico A.I., Martínez-Arteaga R. y Mingorance, J. (2006). Septum Enlightenment: Assembly of Bacterial Division Proteins. *J. Bacteriol.* **188**: 19-27.
- Vitha S., McAndrew R.S. y Osteryoung K.W. (2001). FtsZ ring formation at the chloroplast division site in plants. *J. Cell. Biol.* **153**: 111-120.
- Wang H. y Gayda R.C. (1992). Quantitative determination of FtsA at different growth rates in *Escherichia coli* using monoclonal antibodies. *Mol. Microbiol.* **6**: 2517-2524.
- Wang X., Huang J., Mukherjee A., Cao C. y Lutkenhaus J. (1997). Analysis of the interaction of FtsZ with itself, GTP and FtsA. *J. Bacteriol.* **179**: 5551-5559.
- Weinstein D., López M. y Monasterio O. (2002) Entrecruzamiento químico de especies oligoméricas de FtsZ. Unidad de investigación, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Weiss D.S., Chen J.C., Ghigo J.M., Boyd D. y Beckwith J. (1999). Localization of FtsI (PBP3) to the septal ring requires its membrane anchor, the Z ring, FtsA, FtsQ, and FtsL. *J. Bacteriol.* **181**: 508-520.
- Wilks J.C. y Slonczewski J.L. (2007). pH of the Cytoplasm and Periplasm of *Escherichia coli*: Rapid Measurement by Green Fluorescent Protein Fluorimetry. *J. Bacteriol.* **189**: 5601-5607.
- Wissel M.C. y Weiss D.S. (2004). Genetic Analysis of the Cell Division Protein FtsI (PBP3): Amino Acid Substitutions That Impair Septal Localization of FtsI and Recruitment of FtsN. *J. Bacteriol.* **186**: 490-502.
- Whitmore L. y Wallace B.A. (2004). DICHROWEB, An Online Server For Protein Secondary Structure Analyses from Circular Dichroism Spectroscopic Data. *Nucleic Acids Res.* **32**: 668-673.
- Yim L., Vandenbussche G., Mingorance J., Rueda S., Casanova M., Ruyschaert J.M. y Vicente M. (2000). Role of the carboxy terminus of *Escherichia coli* FtsA in self-interaction and cell division. *J. Bacteriol.* **182**: 6366-6373.
- Zilberstein D., Agmon V., Schuldiner S. y Padan E. (1984). *Escherichia coli* intracellular pH, membrane potential, and cell growth. *J. Bacteriol.* **158**: 246-252.