

UCH-FC
MAG-BMCN
S 556
C. 1

**CARACTERIZACION DE LA VIABILIDAD, LA ACTIVIDAD
GTPASICA Y LA POLIMERIZACION DE LAS MUTANTES
EcFtsZ E83Q, R85Q Y G67P.**



Tesis

Entregada a la

Universidad de Chile

En cumplimiento parcial de los requisitos

Para optar al grado de

Magister en Ciencias Biológicas con mención

en Biología Molecular Celular y Neurociencias

Facultad de Ciencias

por

Jae Yen Shin ,

Abril, 2003

Director de Tesis: Dr. Octavio Monasterio

Co-director de Tesis: Dra. Rosalba Lagos

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION
TESIS DE MAGISTER

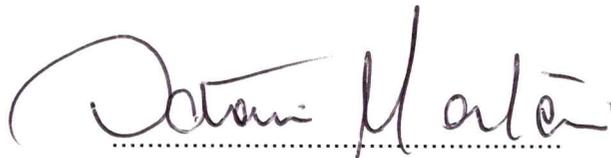
Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis
de Magíster presentada por la candidata

Jae Yen Shin

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la tesis como requisito para
optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas con mención en Biología
Molecular Celular y Neurociencias, en el examen de Defensa de Tesis rendido
el día 04 de Julio 2003.

Director de Tesis:

Dr. Octavio Monasterio



Co-Director de Tesis:

Dra. Rosalba Lagos



Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Víctor Cifuentes



Dra. Margarita Carú

Agradecimientos

Agradezco de manera especial a mi director de tesis el Dr. Octavio Monasterio y a la profe Dra. Rosalba Lagos, por su aporte a mi formación científica y humana. Ellos, más que profesores han sido guías en los momentos difíciles ofreciéndome sus consejos y cariño incondicional.

También agradezco a mis compañeros del laboratorio, por haberme ofrecido un ambiente muy grato de trabajo, ayudado en las discusiones durante el desarrollo de esta tesis y soportado en mis días grises (insoponible, insensible, inetc, conclusión: en mis inhumanos días, "chicos: Muchas Gracias").

Y finalmente mis más sinceros agradecimientos a cada miembro de mi familia, que siempre me ha brindado su apoyo a pesar de la lejanía.

INDICE DE MATERIALES

	Pág.
Fuentes de financiamiento	ii
Agradecimientos	iii
Indice de materias	iv
Lista de tablas	vii
Lista de figuras	viii
Lista de abreviaturas	x
RESUMEN	xi
SUMMARY	xiii
INTRODUCCION	1
MATERIALES Y METODOS	
Reactivos	6
Material biológico	6
Medios de cultivo	8
Electroforesis en geles de agarosa	9
Electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida	10
Aislamiento y purificación de DNA plasmidial	10
Preparación de células electro-competentes	11
Transformación por electroporación	12

	Pág.
Ligación	12
Reacciones de digestión	14
Construcción de mutantes de EcFtsZ	14
Lisogenización con λ DE3	15
Funcionalidad <i>in vivo</i> de genes de <i>ftsZ</i> mutantes	16
Sobre-expresión de EcFtsZ	16
Purificación de EcFtsZ por agregación de Ca^{++}	17
Purificación de EcFtsZ por precipitación con sulfato de amonio	18
Cuantificación de EcFtsZ	20
Western blotting	21
Ensayo de ELISA	22
Determinación de la actividad GTPásica de la EcFtsZ	22
Polimerización de EcFtsZ	23
Microscopía electrónica	24
 RESULTADOS	
Construcción del plásmido pMFV57 y de las mutaciones puntuales en FtsZ.	25
Construcción de la cepa VIP2(DE3)	29
Funcionalidad <i>in vivo</i> de las proteínas EcFtsZ mutantes.	31
Purificación de la EcFtsZ.	35

	Pág.
Curvas de progreso de la actividad GTPásica de las EcFtsZ tipo silvestre y mutantes.	38
Polimerización de las EcFtsZ tipo silvestre y mutantes.	47
DISCUSION	57
CONCLUSIONES	73
BIBLIOGRAFIA	74

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla I. Cepas y plásmidos usados en esta tesis.	7
Tabla II. Oligonucleótidos utilizados.	13
Tabla III. Porcentaje de sobrevivencia de las cepas VIP2(DE3) transformadas con plásmidos que expresan la EcFtsZ tipo silvestre y mutantes.	34
Tabla IV. Constante catalítica aparente de EcFtsZ tipo silvestre y de las mutantes de EcFtsZ E83Q , G67P y R85Q.	39
Tabla V. Inverso del período de latencia de las curvas de progreso de la actividad GTPásica de la EcFtsZ R85Q a varias concentraciones.	43
Tabla VI. Estequiometría de unión de GDP a EcFtsZ tipo silvestre y a las mutantes purificadas.	45
Tabla VII. Diámetro de los polímeros de EcFtsZ observados por microscopía electrónica y número de protofilamentos.	54
Tabla VIII. Resumen de las características de las EcFtsZ.	64

LISTA DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1	Modelo del divisoma de una célula de <i>Escherichia coli</i> .	2
Figura 2	Secuencia de aminoácidos de la EcFtsZ.	26
Figura 3	Estructura de la hélice H3 de la EcFtsZ y de la β -tubulina.	28
Figura 4	Esquema de la construcción de la cepa VIP2(DE3) y pMFV57.	30
Figura 5	Determinación de los porcentajes de sobrevivencia de las cepas de VIP2(DE3) complementadas con plásmidos que expresan: EcFtsZ tipo silvestre (EcFtsZ wt) y EcFtsZ mutantes: G67P, E83Q y R85Q.	32
Figura 6	Gel SDS-PAGE de EcFtsZ.	36
Figura 7	Gel SDS-PAGE e Inmunodetección de la EcFtsZ tipo silvestre y mutantes.	37
Figura 8	Curva de progreso de la EcFtsZ tipo silvestre y mutantes (E83Q, G67P y R85Q).	40
Figura 9	Curva de progreso de la mutante EcFtsZ R85Q.	42
Figura 10	Efecto de la concentración de la EcFtsZ R85Q sobre la velocidad de hidrólisis de GTP.	44
Figura 11	Polimerización de la EcFtsZ tipo silvestre (WT) y	49

de las mutantes (E83Q, G67P y R85Q).

Figura 12	Concentración crítica de EcFtsZ tipo silvestre y de la mutante EcFtsZ E83Q.	51
Figura 13	Microscopía electrónica en presencia y ausencia de DEAE-dextrano de EcFtsZ tipo silvestre y mutantes.	53
Figura 14	Alineamiento de secuencias aminoacídicas de las FtsZ.	60
Figura 15	Esquema de la dinámica de polimerización y despolimerización de la EcFtsZ.	71

LISTA DE ABREVIATURAS

APS	Persulfato de amonio
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indol fosfato
BSA	Albúmina de suero bovino.
EDTA	Etilen diamino tetra acético
GdmCl	Cloruro de guanidinio
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución (High performance liquid chromatography)
IPTG	Isopropil β -D-tiogalactopiranosido
MES	Acido 4-morfolinoetanosulfónico
NaCl	Cloruro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
NBT	Azul de nitro tetrazolium
PIPES	Acido piperazina-N, N'-bis (2-etanosulfónico)
PNPP	p-nitrofenil fosfato
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
Tween 20	Polyoxietilen-sorbitan mono laureato
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-galactósido

Otras abreviaturas se definen en el texto.

RESUMEN

La FtsZ polimeriza para formar el anillo Z alrededor del perímetro transversal en el centro de la célula cuando la bacteria *E. coli* inicia la formación del septo. En este proceso participan varias proteínas Fts para formar el divisoma y FtsZ es la que se encuentra en mayor concentración. Una vez formado el anillo Z no se sabe cómo este induce la división celular. La polimerización de la FtsZ ha sido caracterizada *in vitro* y se sabe que induce su actividad GTPásica y forma protofilamentos por interacciones longitudinales que dan origen a láminas y túbulos a través de interacciones laterales. Estas características también son propias de la tubulina, proteína que presenta similitud estructural con la FtsZ, por esto, ambas proteínas se consideran homólogas. Se desconoce cuales son los polímeros funcionales dentro de la célula y que tipo de interacciones están involucradas. De allí que un buen modelo para entender las interacciones en los polímeros de la FtsZ son los microtúbulos. Una comparación estructural entre la tubulina y la FtsZ mostró que la hélice H3 de la FtsZ, donde se destaca la presencia de aminoácidos cargados, y el "loop" formado entre la hebra beta S3 y la hélice H3, rica en glicinas, estarían involucrados en las interacciones laterales. Con el fin de demostrar la importancia de las interacciones laterales de la FtsZ en la formación de los polímeros funcionales en la división celular de *E. coli* se

construyeron mutantes puntuales de la EcFtsZ: E83Q y R85Q en la hélice H3 y G67P en el "loop" S3-H3. Los resultados mostraron que la viabilidad se redujo en las células que expresan solo las EcFtsZ mutantes con respecto al tipo silvestre en el siguiente orden: tipo silvestre > E83Q > G67P > R85Q. La caracterización *in vitro* de estas mutantes mostró que su polimerización decreció en el mismo orden que la viabilidad y que la actividad GTPásica decreció de manera diferente, de acuerdo al siguiente orden: tipo silvestre > G67P > E83Q > R85Q. Estos resultados muestran que hay una relación directa entre la polimerización y la viabilidad y que la velocidad de hidrólisis de GTP no está relacionada en forma directa con la viabilidad. Se concluye que en la polimerización de EcFtsZ y por ende en la división celular de *E. coli* son necesarias las interacciones intermoleculares de EcFtsZ mediadas por la hélice H3 y el "loop" S3-H3.

SUMMARY

FtsZ polymerizes forming the Z ring around the perimeter in the middle of the *E. coli* dividing cell. In this process many Fts proteins are involved to form the divisome and FtsZ is the most abundant protein. After the Z ring formation, the mechanism that induces the cell cleavage is not totally understood. *In vitro* FtsZ polymerization induces the GTPase activity and form protofilaments, by longitudinal interactions, that assemble into sheets and tubes by lateral interactions. These characteristics are also observed in tubulin, which has a similar tridimensional structure with FtsZ, therefore both proteins are considered homologues. The FtsZ functional polymers in the living cells are unknown as well as the interaction involved. Thus, microtubules are a good model to understand the interactions involved in the FtsZ polymers. The structural comparison between tubulin and FtsZ indicates that lateral interaction of FtsZ through charged aminoacids, could be mediated by the H3 helix as found in tubulin. The same is valid for the glycine rich loop β strand S3–helix H3. To know, the role of the FtsZ lateral interactions in the *E. coli* dividing cells the following point mutations were constructed in the EcFtsZ: E83Q and R85Q located in the H3-helix and G67P in the S3-H3 loop. The viability of the cells that express the mutant EcFtsZ was reduced respect to the wild type in the

following order: wild type > E83Q > G67P > R85Q. The *in vitro* characterization of these mutants showed that the polymerization decreased in the same order that the viability and the GTPase activity decreased in a different manner with following order: wild type > G67P > E83Q > R85Q. These results indicate that a direct relation exists between the viability of the cells and the polymerization of EcFtsZ and that the hydrolysis rate of GTP is not directly related with the viability. It is concluded that in the EcFtsZ polymerization, hence in the cellular division of *E. coli*, the intermolecular interactions of EcFtsZ, mediated by H3 helix and S3-H3 loop, are necessary.

INTRODUCCION

La FtsZ es una proteína que participa en la división celular de todas las eubacterias, arqueas, algunos plástidos y algunas mitocondrias (Addinall y Holly, 2000; Errington, et al., 2003; Gilson y Beech, 2001). La FtsZ de *Methanococcus jannaschii* ha sido cristalizada y en su estructura se observa que posee el mismo tipo de plegamiento, en el dominio de unión a GTP, tipo Rossman, que las tubulinas (Löwe y Amos, 1998). Ambas proteínas hidrolizan GTP al polimerizar *in vitro* y este polímero en su forma GDP es inestable (RayChaudhuri y Park, 1992; de Boer, et al., 1992). Por esto se considera a la tubulina homólogo a la FtsZ (Erickson y Stoffler, 1996; Erickson, 1997; Nogales, et al, 1998).

En la división celular de *E. coli* participan al menos 9 proteínas Fts, (“Filamentous temperature-sensitive”), que interactúan de manera dependiente entre ellas para dar origen al divisoma, estructura responsable de la división bacteriana, cuyo esquema se muestra en la figura 1. De todas las proteínas Fts que forman parte del divisoma, la FtsZ es la más abundante, su presencia es crucial para que se lleve a cabo la división celular y es requerida al comienzo de la formación del divisoma. (Errington, et al., 2003)

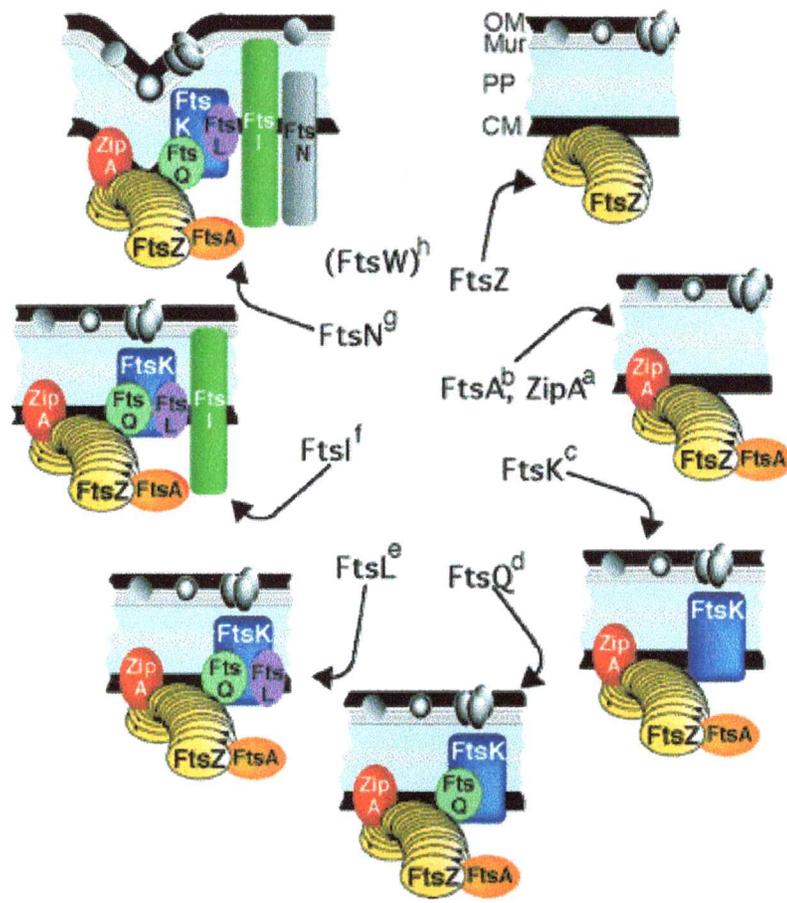


Figura 1. Modelo del divisoma de una célula de *Escherichia coli*. Orden propuesto para el ensamblaje del divisoma en el sitio de la división celular de *Escherichia coli*. Para el ensamblaje de ZipA, FtsA, FtsK, FtsQ, FtsL, FtsI y FtsN se requiere de FtsZ. Este complejo proteico es consecuencia de una cascada de interacciones, que posibilita la invaginación de la membrana interna y su posterior citocinesis.

La FtsZ forma el anillo Z alrededor del perímetro transversal en el centro de la célula, la formación del divisoma depende de este anillo, pues la asociación de todas las proteínas Fts con el anillo ocurre en una cascada de interacciones. El anillo Z y su dinámica en el proceso de la división celular de *E. coli* ha sido visualizado por fluorescencia *in vivo* (Margolin, 1998; Sun y Margolin, 1998). Se cree que este anillo es producto de polímeros de FtsZ que se anclan en la membrana interna (Bi y Lutkenhaus, 1991; Pichoff y Lutkenhaus, 2002), pues *in vitro* la FtsZ forma protofilamentos, láminas y túbulos bajo ciertas condiciones experimentales (Bramhill y Thompson, 1994; Lu, et al., 2000). Sin embargo, los métodos empleados, como inmunomicroscopía electrónica (Bi y Lutkenhaus, 1992) y microscopía de fluorescencia (Margolin, 1998), no han permitido observar *in situ* las estructuras formadas *in vitro*. Por lo tanto, se desconoce la estructura del polímero funcional que forma parte del anillo Z para la división celular.

En cada célula de *E. coli* existen entre 5.000 y 20.000 moléculas de FtsZ (Plá, et al., 1991), que equivale a una concentración de aproximadamente 1-3 mg/ml, la cual es similar a la concentración de la tubulina en células eucariontes. Se puede demostrar que 10.000 moléculas de FtsZ pueden formar un protofilamento simple de 40 μm de largo, suficiente para rodear más de 20 veces el perímetro de una bacteria de 0,6 μm de diámetro (Erickson, et al., 1996). Por lo tanto, es posible que el anillo Z esté constituido por más de un protofilamento de manera similar a las hojas que se forman con tubulina. Si

consideramos que los polímeros se encuentran en equilibrio dinámico, debido a la hidrólisis de GTP, existirá además una cierta concentración de FtsZ libre, equivalente a la concentración crítica. La formación de interacciones longitudinales ha sido demostrada con la mutante D212G (FtsZ2) que no es viable y que hidroliza GTP con muy baja eficiencia y no polimeriza. También ha sido demostrado que las interacciones laterales son importantes para la división celular, pues mutaciones en las caras laterales de FtsZ impiden la división (Mukherjee y Lutkenhaus, 1994).

El objetivo general de este trabajo de tesis fue determinar la participación de las interacciones longitudinales y laterales de la FtsZ en la división celular de *E. coli*. Con este propósito se construyeron las siguientes FtsZ de *E. coli* (EcFtsZ) mutantes: E83Q, R85Q y G67P y se determinó el porcentaje de sobrevivencia para evaluar su viabilidad y también se determinó la actividad GTPásica y la polimerización *in vitro* para conocer a nivel molecular el efecto de estas mutaciones.

Los objetivos específicos de la tesis fueron:

1. Demostrar que mutantes en la hélice H3 y en el "loop"¹ S3-H3 de la EcFtsZ afectan su funcionalidad *in vivo*.
2. Demostrar por microscopía electrónica que estas mutantes no forman túbulos ni láminas *in vitro*.

¹ En adelante se usará la palabra inglesa "loop" que en castellano significa rizo, lazo y vuelta, debido a su uso permanente como un anglicismo.

3. Demostrar que estas mutantes no pierden la actividad GTPásica ni la capacidad de polimerizar en protofilamentos *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

Los reactivos fueron: BSA, SDS, APS, imidazol, azida, fosfato di-ácido de potasio, azul brillante R de Coomassie, GTP sal de sodio hidratado 95 %, anticuerpo Ig-G de conejo conjugado con fosfatasa alcalina, x-gal de Sigma (St. Louis, Missouri, USA). Azul de bromofenol, cloroformo, alcohol isoamílico, isopropanol, etanol, carbonato ácido de sodio de Merck (Darmstadt, Alemania). Cloruro de sodio, agar, cloruro de magnesio hexahidratado, dimetilformamida, GdmCl, Tris, Glicina, Glicerol, EDTA, fenol, fosfato ácido de sodio, TEMED, IPTG, acrilamida de Winkler (Santiago, Chile). Cloruro de potasio, sulfato de magnesio, cloruro de calcio de Fluka Chemie AG (Messerschmittstr, Switzerland). Ácido acético, etanol, metanol, acetona de TCL (Santiago, Chile). Triptona, extracto de levadura de Difco, laboratories (Detroit, Michigan, USA). Bisacrilamida Gibco, BRL (Gran Island, New York, USA). Hidróxido de sodio de J. T. Baker (Edo de México, México). BCIP, NBT de Aplichem (Darmstadt, Alemania). El agua usada en todos los experimentos fue de grado nanopure.

Material Biológico

Cepas y plásmidos: Los microorganismos y plásmidos utilizados durante esta tesis se encuentran listados en la Tabla I donde se muestran las

Tabla I. Cepas y plásmidos usados en esta tesis.

Cepa o plásmido	Fenotipo o genotipo relevante	Fuente
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>recA</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi1</i> , <i>hsdR-17</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> [F' <i>proAB</i> , <i>lacI^qZΔM15</i> , Tn10]	Stratagene
<i>E. coli</i> BL21	F ⁻ <i>ompT</i> , r _B m _B	Novagen
<i>E. coli</i> VIP2(DE3)	FtsZ:: <i>kan</i> , <i>lacX74</i> , <i>str^r</i>	Pla, et al., 1991
pMFV56	Plásmido derivado de pET28a que porta el gen de la EcFtsZ. <i>kan^r</i>	Pla, et al., 1991
pMFV57	Plásmido derivado de pMFV56 donde el gen que confiere resistencia a kan fue interrumpido por el gen de la β-lactamasa. <i>Amp^r</i>	Construído en este trabajo de tesis.

características más relevantes y sus respectivas fuentes de obtención.

Enzimas: Las enzimas de restricción, la DNA polimerasa Taq, los didesoxiribonucleótidos, los estándares de peso molecular de 1 kb utilizados en esta tesis fueron comprados de Gibco, BRL (Grand Island, NY, USA). La T4 DNA ligasa fue de Fermentas Inc. (Hanover, MD, USA). La RNAsa fue de Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA).

Medios de cultivo

Medio Luria-Bertani (LB): Para cada litro de medio de cultivo se agregó 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 10 g de cloruro de sodio pH 7,5 se ajustó pH con de hidróxido de sodio 1 N. El medio de cultivo se esterilizó mediante autoclave y mantenido en una estufa de 37 °C hasta su empleo. Cuando fue necesario se agregaron los siguientes antibióticos: kanamicina (km) 50 µg/ml, cloramfenicol (cm) 25 µg/ml, ampicilina (amp) 100 µg/ml.

Medio SOB: Para un litro de medio de cultivo se agregaron 20 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 0,5 g de cloruro de sodio, 10 ml de 250 mM de cloruro de potasio, fue ajustado a pH 7 con NaOH 5 N. El medio de cultivo se esterilizó mediante autoclave y mantenido en una estufa de 37 °C hasta su empleo.

Medio SOC: Este medio se preparó a partir de SOB y se suplementó con glucosa a una concentración final de 20 mM.

Medio NZY: Para un litro de medio se agregó 10 g de NZ amina (hidrolizado de caseína), 5 g de extracto de levadura, 5 g de cloruro de sodio y fue ajustado a un pH de 7,5 utilizando de hidróxido de sodio 1 N. Posteriormente se autoclavó y se suplementó con 12,5 ml de $MgCl_2$ 1 M y 12,5 ml de $MgSO_4$ 1 M y 10 ml de glucosa esterilizada de 20 % (peso/volumen), antes de usar.

Top agarosa: Para 100 ml se agregó 1 g de triptona, 0,5 g NaCl, 0,6 g de agarosa y fue autoclavado.

Medios sólidos (LB-agar): Para la preparación de placas, al medio líquido se agregó 1 % de agar. La concentración de antibióticos fueron los mismos que en medio LB líquido. El antibiótico se agregó cuando el medio tenía aproximadamente 50 °C justo antes de cargar a las placas.

Electroforesis en geles de agarosa (geles para DNA plasmidial). Esta electroforesis se llevó a cabo horizontalmente, se utilizó TEA (Tris 40 mM pH 8,1, ácido acético glacial 20 mM, EDTA 2 mM) como amortiguador de corrida. La concentración de agarosa se varió entre 1,0 y 2,0 % dependiendo del tamaño de los fragmentos de DNA a separar. La muestra se preparó mezclando el DNA con el amortiguador de carga (glicerol 50 %, EDTA 50 mM, Xilén cianol 1 mg/ml, Azul de bromofenol 1,5 mg/ml). Luego de que las muestras se incorporaran a los pocillos del gel, la electroforesis se llevó a cabo a un potencial de corriente eléctrica de 80-100 V. Una vez finalizada la electroforesis, el gel se tiñó con bromuro de etidio y se puso sobre un transiluminador para observar las bandas de DNA.

Electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida. El gel acrilamida:bisacrilamida separador y concentrador, en condiciones denaturantes se realizó al 10 % y 4 %, respectivamente. Las muestras se suspendieron en amortiguador de muestra (glicerol, 0,5 M Tris-HCl pH 6,8, SDS, β -mercaptoetanol, azul de bromofenol) y se calentaron 15 min a 85 °C. Una vez cargadas las muestras en los pocillos, se separaron en amortiguador (10 % SDS, glicina y tris base) a 25 mA constante hasta la caída del frente de corrida. El gel se tiñó con azul de coomassie (0,25 g de azul de coomassie brillante en 90 ml de metanol:agua (1:1 v/v) y 10 ml de ácido acético glacial) durante dos horas con agitación y se destiñó con la solución de desteñido (45 % de metanol, 10 % ácido acético).

Aislamiento y Purificación de DNA Plasmidial Bacteriano (miniprep).

El DNA plasmidial se extrajo según el método de lisis alcalina descrito por Sambrook *et al.*, 1989: se centrifugó 4,5 ml de un cultivo bacteriano crecido por toda la noche en medio LB y el precipitado bacteriano se suspendió en 200 μ l de amortiguador de lisis (TrisHCl 25 mM pH 8,0, glucosa 50 mM, EDTA 10 mM). Después de incubar por 5 min a temperatura ambiente se agregó 400 μ l de solución SDS/NaOH (SDS 1 % y NaOH 0,2 M) y se mezcló por inversión de los tubos (10 veces). A continuación se adicionó 80 μ l de acetato de sodio (3 M pH 5,2) y se mezcló suavemente por inversión (10 veces). Esta solución se dejó a -20 °C por 15 min y se centrifugó a 15.000 rpm por 15 min. El sobrenadante se pasó a un tubo eppendorf previamente rotulado y se agregó 250 μ l de

fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1) para eliminar proteínas contaminantes. Cada tubo se agitó con "vortex" por 10 segundos y se centrifugó a 15.000 rpm por 5 min en una microcentrífuga. Luego se extrajo la fase acuosa (superior) y se colocó en un tubo eppendorf. Se añadió 250 μ l de cloroformo:isoamílico (24:1) para eliminar los restos de proteínas y fenol. Posteriormente se extrajo la fase superior que contiene el DNA, a la cual se agregó 0,6 volúmenes de isopropanol y se dejó a -20 °C por 15 min para precipitar el DNA. El DNA precipitado después de centrifugar, se lavó con etanol 70 % y se dejó secar en una estufa (37 °C) o en "Speed Vac". El DNA seco se disolvió en 30 - 40 μ l de agua nanopure estéril.

Preparación de células electro-competentes. Estas células se prepararon a partir de un cultivo bacteriano de la fase exponencial de crecimiento. Para ello, 1 ml de un cultivo crecido por toda la noche se inoculó en medio SOB fresco. Las células se cosecharon a una DO_{550} de 0,75. ($3-6 \times 10^8$ cel/ml) en tubos de centrifuga fríos y se lavaron dos veces con glicerol 10 % frío con cuidado de no contaminar las células y usando vórtex para suspenderlas en la solución de glicerol al 10 %. Después de los lavados, las células se mezclaron con pocas gotas del sobrenadante que quedaron en el tubo después de la última centrifugación y se determinó la DO_{550} diluyendo una pequeña porción de ella en glicerol al 10 %. Luego se ajustó el volumen de las células con glicerol 10 % para llegar a una concentración de células de

aproximadamente $3-6 \times 10^9$ células por ml. Las células se alicuotaron y se guardaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ o se usaron directamente para la electroporación.

Transformación por electroporación. Se utilizó un equipo BioRad Gene Pulser acoplado a un controlador de pulso, para realizar la transformación de las células competentes. El aparato se preparó colocando el voltaje a 2.500 V, la resistencia a 200 Ohms y la capacitancia a 25 μFD . Las células, las cubetas y el portacubetas se enfriaron en hielo antes de proceder a la transformación. Se mezclaron 20 μl de células con 1 - 2 μl de DNA plasmidial puro en un tubo eppendorf y se trasladó la mezcla a la cubeta de electroporación de 0,2 cm de separación de los electrodos. La cubeta se colocó en el portacubetas y se apretaron los dos botones que tiene el aparato hasta escuchar la señal. Inmediatamente, se agregó 1 ml de medio SOC estéril a la cubeta con las células electroporadas y se incubó a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1 hora. Las células transformadas se sembraron en un medio selectivo a dos concentraciones de células: 1/10 y 9/10.

Construcción del plásmido pMFV57. El gen de la β -lactamasa se obtuvo por PCR, con los oligonucleótidos Blac1 y Amp2 (ver secuencia en la tabla II), a partir del plásmido pT7_7, en un termociclador GeneAmp PCR System 9600 (Perkin Elmer). El gen se amplificó con el programa: una denaturación inicial a $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ por dos min, 20 ciclos compuestos de: denaturación a $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 s, apareamiento a $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 s y elongación a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1,5 min y extensión final a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 min. El fragmento amplificado confiere

Tabla II. Oligonucleótidos utilizados.

Oligonucleótidos	Secuencia de 5' a 3'
Blac1	CATTCAAATATGGATCCGCTCATG
AMP2	ACCAATGCTTAATCAGTGAGG
Shin1	GCGGTATCACCAAACCACTGGGCGCTGGCGC
Shin2	GCGCCAGCGCCCAGTGGTTTGGTGATACCGC
ZE83Q1	GCAATGCGGCTGATCAGGATCGCGATGCATTGC
ZE83Q2	GCAATGCATCGCGATCCTGATCAGCCGCATTGC
ZR85Q1	GCGGCTGATGAGGATCAGGATGCATTGCGTGCG
ZR85Q2	CGCACGCAATGCATCCTGATCCTCATCAGCCGC



resistencia a ampicilina y se clonó dentro del plásmido pMFV56 digerido con *Sma*I. El sitio *Sma*I se encuentra dentro del gen que confiere resistencia a kanamicina en el mismo plásmido. La reacción de ligación se llevó a cabo mediante T4 DNA ligasa. Como los fragmentos a ligar eran de extremos romos, se utilizó 5 unidades de ligasa y se incubó a 4 °C durante 24 horas. Para corroborar si efectivamente se clonó el gen de la β -lactamasa (931 pb) en el plásmido pMFV56 (resistente a kanamicina) se seleccionó en un medio LB ampicilina 100 μ g/ml y se realizó extracción de DNA plasmidial de colonias que crecieron en este medio de selección. De este DNA plasmidial se realizaron digestiones con varias enzimas de restricción para verificar el tamaño y luego PCR del fragmento clonado.

Reacciones de digestión. Las reacciones de digestión se llevaron a cabo según el protocolo descrito por el fabricante. Las enzimas utilizadas y los fragmentos generados, respectivamente fueron: *Sal*I que linealiza el plásmido pMFV56 dando origen a una banda que corresponde a 8102 bp; *Bam*HI, 1271 bp y 6831bp; *Eco*RV, 366 bp, 562 bp, 2057 bp y 5117 bp; *Eco*RI, 6339 bp y 1763 bp; *Hind*III, 371 bp y 7731 bp.

Construcción de las mutantes de EcFtsZ. Se introdujeron 3 mutaciones puntuales sitio dirigidas en la EcFtsZ. Para ello se utilizó el QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit, Stratagene (La Jolla, CA, USA), número de catálogo 200516.

Este protocolo consistió en amplificar, con *PfuTurbo* DNA polimerasa (versión mejorada de *Pfu* DNA polimerasa que posee una alta eficiencia de elongación y actividad correctora), el vector completo utilizando los oligonucleótidos con la mutación deseada, el par de oligonucleótidos utilizados son complementarios a las hebras opuestas del templado. De esta manera el producto de PCR generado fue un plásmido mutado que contenía un nick. Luego se procedió a digerir con *DpnI* (la endonucleasa *DpnI* es específica para DNA metilados y hemimetilados) el templado parental y fue electroporado en células competentes XL1-Blue. Para verificar la incorporación de las mutaciones deseadas se secuenciaron el gen de la FtsZ del plásmido.

Lisogenización con λ DE3. Se lisogenizaron con la RNA polimerasa de T7, dos cepas, VIP2 y MC1061, para ello se utilizó un kit de novagen: λ DE3 Lysogenization Kit, número de catálogo 69734-3 (Novagen, Inc. Madison, WI, USA). El protocolo de este kit consistió en la integración específica de λ DE3 profago en el cromosoma de *E. coli*, tal que el huésped lisogenizado pueda ser usado para expresar el gen blanco clonado en un vector de expresión bajo el control del promotor T7. Para lizogenizar la cepa huésped se infectó con una mezcla de tres fagos, el λ DE3, el fago Helper y un fago Selección. Con este objeto se crecieron las cepas a lisogenizar en medio LB suplementado con 0,2 % maltosa, 10 mM $MgSO_4$, a 37 °C, hasta un OD_{600} de 0,5. Se mezclaron 10^8 ufp de λ DE3, 10^8 ufp de fago Helper y 10^8 ufp de fago Selección con 5 μ l de célula huésped y la mezcla se incubó a temperatura ambiente por 10 min. La

mezcla se sembró en placas de agar y se incubó a 37 °C toda la noche. Para verificar si las colonias sobrevivientes integraron el gen de la RNA polimerasa del fago T7 en el cromosoma, se crecieron las colonias sobreviviente en medio LB suplementado con 0,2 % maltosa, 10 mM MgSO₄ y se incubó a 37 °C hasta llegar a un OD₆₀₀ de 0,5. Se mezcló la cepa huésped (sobreviviente) con el fago tester y se incubó a temperatura ambiente durante 10 min. Luego se adicionó top agarosa fundida, se traspasó en una placa LB y se incubó a 37 °C toda la noche. La mayoría de las colonias sobrevivientes fueron lisógenos λDE3, pues se observaron placas de lisis en las colonias tratadas con el fago tester.

Funcionalidad *in vivo* de genes de *ftsZ* mutantes. La cepa *E. coli* VIP2(DE3) se transformó, con los plásmidos que expresan las FtsZ tipo silvestre y mutantes, y se creció a 30 °C en medio líquido LB con agitación hasta un OD₆₀₀ de 0,6. Del cultivo bacteriano se realizaron diluciones seriadas hasta 10⁻⁶ y se inocularon por triplicado en placas LB con ampicilina 100 µg/ml. Las placas se incubaron a 42 °C toda la noche y luego se contabilizaron las colonias crecidas. Se consideró como control positivo a la cepa VIP2(DE3) transformada con pMFV57 que porta el gen de la FtsZ tipo silvestre para calcular el porcentaje de sobrevida de las mutantes.

Sobreexpresión de la EcFtsZ. Las cepas de *E. coli* que expresan la EcFtsZ tipo silvestre o mutantes se crecieron a una OD₆₀₀ de 0,5 en medio LB suplementado con el antibiótico correspondiente y la expresión de estas proteínas se indujo con 0,2 mM de IPTG durante 2 horas. 1 ml del cultivo se

centrifugó y se lavó el precipitado 3 veces con 1,5 ml de TEN. El precipitado se suspendió en 120 μ l de TEN y se mezcló con 40 μ l de buffer denaturante azul 4x. Esta mezcla se incubó durante 5 min a 85 °C y se centrifugó por 10 min a 14.000 rpm. Para verificar la sobreexpresión de la proteína se realizó electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones denaturantes con 10 μ l del sobrenadante de la mezcla centrifugada.

Purificación de EcFtsZ por precipitación con Ca^{++} . El precipitado bacteriano se suspendió en 20 ml de tampón PEM (PIPES 50 mM pH 6,5, MgCl_2 5 mM, EDTA 1 mM) por litro de cultivo bacteriano. Las células se lisaron por sonicación (5 pulsos de 20 segundos con pausa de 1 minuto a un 20 % de potencia (output 6) en un sonicador con sonda de 1 cm de diámetro. Se evitó que se caliente el material). La muestra se mantuvo en hielo y el lisado celular se centrifugó a 28.000 rpm a 4 °C durante 90 min en un rotor type 30 con aproximadamente 15 ml/tubo. El sobrenadante se transfirió a un tubo Falcon estéril a temperatura ambiente y se agregó GTP (pH ajustado a 7) a una concentración final de 1 mM y CaCl_2 a una concentración final de 20 mM. Luego se incubó a 30 °C durante 15 min. El contenido del Falcon se traspasó a 2 tubos Pirex Dupont de 10 ml y se centrifugó a 10.000 rpm a 4 °C durante 15 min en un rotor F0650. El sobrenadante se desechó con una pipeta Pasteur con cuidado, pues el precipitado se desprende con facilidad. El precipitado se suspendió en 10 ml de tampón PEM frío con ayuda de una pipeta Pasteur en los mismos tubos Pirex (es decir, 20 ml tampón PEM/L de cultivo) y se centrifugó a 10.000

rpm a 4 °C durante 15 min. El sobrenadante se recogió en un Falcon estéril y el precipitado se desechó. Al sobrenadante se agregó GTP (pH ajustado a 7) a una concentración final de 1 mM y CaCl₂ a una concentración final de 20 mM y se incubó a 30 °C durante 15 min. El contenido del falcon se traspasó a 2 tubos de Pirex Dupont de 10 ml y se centrifugó a 10.000 rpm a 4 °C durante 15 min, en un rotor F0650. El sobrenadante se desechó con una pipeta Pasteur y el precipitado se suspendió en 5 ml de tampón PEM frío. Se centrifugó nuevamente a 10.000 rpm a 4 °C durante 15 min y el sobrenadante se traspasó a un Falcon estéril. El sobrenadante se cargó a la columna de intercambio aniónico Q-Sepharosa (La columna fue lavada y equilibrada en tampón A (Tris-HCl 50 mM pH 7,9, KCl 50 mM, EDTA 1 mM, glicerol 10 %), previo al uso, mediante un "loop" de 5 ml a un flujo de 1 ml/min. La proteína se eluyó con un gradiente de 10 – 70 % con tampón B (Tris-HCl 50 mM pH 7,9, KCl 1 M, EDTA 1 mM, glicerol 10 %) a 1 ml/min a 4 °C colectando 2 ml en cada fracción. La elución de la proteína se visualizó mediante SDS-PAGE y midiendo la densidad óptica a 280 nm. La proteína eluida se dializó en 100 volúmenes de tampón C (Tris HCl Tris-HCl 50 mM pH 7,9, EDTA 1 mM, glicerol 10 %) al menos 4 h o toda la noche con 2 - 3 cambios a 4 °C. La concentración de la proteína se determinó según Rivas et al, (2000). La FtsZ purificada fue concentrada a aproximadamente 15 mg/ml y se guardó a -80 °C hasta su uso.

Purificación de EcFtsZ por precipitación con sulfato de amonio. Este método de purificación se llevó a cabo según el protocolo descrito por

Mukherjee y Lutkenhaus (1998) con algunas modificaciones de acuerdo a las siguientes etapas.

1. *Lisis de las células bacterianas y fraccionamiento del extracto celular.* El precipitado bacteriano se suspendió en 25 ml de tampón A (Tris-HCl 50 mM pH 7,9, KCl 50 mM, EDTA 1 mM, glicerol 10 %) por litro de cultivo bacteriano y se sonicó con 5 pulsos de 20 s a 25 watt con pausa de un min, en un sonicador Sonifier Cell Disruptor Model W185 con sonda de 1 cm (Heat Systems-Ultrasonics, INC, Plainview, L.I., NY. USA). El lisado se centrifugó a 28.000 rpm, a 4 °C durante 90 min (Beckman L5-75B Ultracentrifuge, rotor type 30). El sobrenadante se transfirió a un vaso de precipitado pequeño colocado previamente en hielo. Por cada 100 ml de sobrenadante se agregó 4,16 gr de sulfato de amonio (30 % de sal por volumen del sobrenadante) en frío agitando con una barra magnética. La solución se centrifugó a 10.000 rpm a 4 °C durante 30 min. El sobrenadante se eliminó y el precipitado se disolvió en 3 ml de tampón A y se dializó en 100 volúmenes de tampón A al menos 4 h o toda la noche con 2 cambios a 4°C.

2. *Cromatografía en Mono Q-Sepharosa.* La muestra dializada se inyectó a la columna de intercambio aniónico (Mono Q-Sepharosa, 25 cm x 4,6 mm) mediante un "loop" de 5 ml. La proteína se eluyó con un gradiente 10 – 70 % con tampón B (Tris-HCl 50 mM pH 7,9, KCl 1 M, EDTA 1 mM, glicerol 10 %) a 1 ml/min a 4 °C, colectando 4 ml en cada fracción. La elusión de la proteína se visualizó mediante SDS-PAGE y midiendo la densidad óptica a 280 nm. La

fracción correspondiente a la FtsZ (que eluye alrededor de 200 - 250 mM KCl) se colectó para la siguiente cromatografía.

3. *Cromatografía en Sephacryl S-400*. La FtsZ obtenida de la Mono Q-Sepharosa se inyectó a la columna sephacryl S-400 y se eluyó con tampón A a 1 ml/min, 4 °C y se colectaron fracciones de 3 ml por tubo y se visualizó mediante SDS-PAGE y por su absorbancia a 280 nm. La FtsZ colectada se concentró utilizando Centriprep de 40 kDa de "cut off" (4.000 rpm a 4 °C) hasta un volumen final en que la concentración final de proteína fuera aproximadamente 15 mg/ml. La FtsZ se alícuotó y se congeló inmediatamente por inmersión en nitrógeno líquido y posteriormente se conservó a -80 °C hasta su uso.

Cuantificación de FtsZ. La determinación de la concentración de FtsZ no es lineal porque esta proteína tiene pocos residuos aromáticos (solo tres tirosinas y ningún triptófano), y el nucleótido unido predomina en el espectro de absorción UV. Por este motivo es necesario conocer el contenido de nucleótidos de guanosina en la proteína. Con este objeto los nucleótidos se extrajeron después de precipitar la proteína con ácido perclórico y se separaron en HPLC (par iónico), por medio de una columna SUPELCOSIL LC-18-DB (SUPELCO), que contiene tetrabutyl amonio. Se utilizó un coeficiente de extinción molar de $12.400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 254 nm. La concentración de FtsZ se determinó midiendo la densidad óptica en 6 M GdmCl a 280 nm considerando los coeficientes de extinción molar para las 3 tirosinas ($1280 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para una tirosina) y $8100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para GDP (Pace y Schmid, 1997, Rivas, et al., 2000). Se

consideró un valor de $12770 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para la FtsZ denaturada que contenía 1,1 mol de GDP por mol de proteína. El valor del peso molecular considerado en estos cálculos fue de 40.800 (Rivas, et al., 2000)

Western blotting.

1. *Electrotransferencia.* Después de haber corrido un SDS-PAGE, el gel fue retirado 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. Antes de montar la transferencia, la membrana de nitrocelulosa (Hybond ECL, Amersham) se sumergió completamente en agua y luego en amortiguador de transferencia (Tris 25 mM, glicina 190 mM, metanol 20 %), así como las hojas de papel filtro. La transferencia se realizó por dos horas a 100 voltios y a $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ empleando el amortiguador de transferencia enfriado previamente.

2. *Visualización inmunológica.* La membrana se bloqueó con BSA 3 % en PBS (NaCl 137 mM, KCl 2 mM, Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 2 mM) por 1 hora a temperatura ambiente, luego se traspasó a una solución de BSA 1 % en PBS que contiene el anticuerpo primario. La membrana se incubó con el anticuerpo primario dos horas con agitación y a temperatura ambiente. Luego de 3 lavados con amortiguador TS (TrisHCl 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM) se incubó en TS con BSA 1 % suplementado con el anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa alcalina por 2 horas. La dilución empleada del anticuerpo policlonal anti-FtsZ fue de 1:20.000 y del anticuerpo secundario de acuerdo al consejo del fabricante. Para realizar el revelado, la membrana se colocó en 10 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 %) y 66 µl de NBT (0,5 g de nitro blue tetrazolium disuelto en 10 ml de dimetilformamida al 70 %). Al cabo de algunos minutos de agitación aparecieron las bandas y la reacción se detuvo con abundante agua destilada.

Ensayo de ELISA. Este ensayo se utilizó en la etapa de visualización inmunológica del Western blotting para determinar el título y la dilución adecuada del anticuerpo anti-FtsZ. La placa para ELISA se activó con la incubación de 50 µl de antígeno toda la noche a 4 °C. Luego se bloqueó con BSA 1 % azida 0,02 % en PBS durante 1 hora. Después de los lavados, el anticuerpo se agregó en diluciones seriadas con BSA-azida en PBS y se incubó 2 horas. La placa se lavó con PBS-tween 20 0,1 % y se incubó con el segundo anticuerpo anti Ig-G de conejo conjugado con fosfatasa alcalina dos horas a temperatura ambiente. Después de los lavados con PBS-Tween 20 0,1 % se agregó el sustrato PNPP (1 mg/ml en tampón bicarbonato de sodio 0,05 N, 1 mM MgCl₂, pH 9,6) y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con NaOH 3 N y la absorbancia se leyó a 405 nm.

Determinación de actividad GTPásica de FtsZ. Este método consiste en calcular la cantidad de GDP y GTP a partir del área de los respectivos picos en el cromatograma de la columna SUPELCOSIL LC-18-DB. Para ello, 0,5 mg/ml de FtsZ se incubaron en el amortiguador de incubación (Mes 50 mM pH

6,5, KCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM) a 30 °C durante 2 minutos. La reacción se inició con la adición de GTP a una concentración final de 1 mM y se detuvo después de transferir 100 µl de la reacción en un nuevo tubo eppendorf agregando 8 µl de ácido perclórico 70 % (0,55 M). El tubo se agitó en vortex y se mantuvo en hielo. A la reacción detenida se agregó 100 µl de K₂CO₃ 1,2 M para neutralizar el pH ácido de la mezcla y se centrifugó al vacío (Speed-Vac) a temperatura ambiente por 5 minutos para eliminar el CO₂(g). Para separar el precipitado del sobrenadante se centrifugó a 14.000 rpm durante 15 minutos. 100 µl del sobrenadante se transfirieron a un tubo eppendorf nuevo previamente rotulado. La determinación de GDP y GTP por HPLC se llevó a cabo utilizando como fase móvil, K₂HPO₄ 0,2 M, ácido acético 0,1 M, TBAP 4 mM. El volumen de inyección fue de 20 µl a un flujo de 1 ml/min y la detección se realizó a 260 nm por medio del detector UV incorporado al HPLC.

Polimerización de EcFtsZ. El ensayo de polimerización se realizó bajo las mismas condiciones de determinación de la actividad GTPásica. 0,5 mg/ml de FtsZ se mezclaron en tampón de polimerización (Mes 50 mM pH 6,5, KCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM). Esta solución se incubó a 30 °C durante 2 minutos y se transfirió a la cubeta de cuarzo en el espectrofluorímetro (Luminescence Spectrometer LS 50, Perkin Elmer), regulado por un baño de agua a 30 °C. El ensayo se llevó a cabo a 30 °C, a 350 nm de excitación y emisión, con un atenuador del 2 %, con un ancho de banda de 5 nm y los datos se registraron cada 5 segundos. Luego de seguir la línea base aproximadamente 5 minutos se

agregó GTP a una concentración final de 1 mM y la cubeta se agitó por inversión 5 veces.

Para determinar la concentración crítica de polimerización de la FtsZ se realizaron ensayos de dispersión de luz a 90° bajo las mismas condiciones del protocolo descrito más arriba. Las concentraciones de FtsZ utilizadas fueron 0,2 mg/ml, 0,3 mg/ml, 0,4 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,6 mg/ml y 0,7 mg/ml. La diferencia (Δ) de dispersión de luz (diferencia entre el valor promedio de la línea base y el valor promedio del máximo luego de haber agregado GTP) se calculó después de haber agregado GTP a 1 mM de concentración final. Se graficó la diferencia entre la línea base y los máximos de polimerización alcanzados al medir la dispersión de luz a 350 nm en función de la concentración de FtsZ.

Microscopía electrónica. Se utilizó el método de tinción negativa con acetato de uranilo 1 % en agua. Para la observación de polímeros al microscopio electrónico, se utilizó la misma solución del ensayo de dispersión de luz. La grilla se sumergió en 25 μ l de la solución que contiene FtsZ y se incubó por 30 segundos. Luego de un lavado en 50 μ l de agua nanopure se incubó durante 30 segundos en una solución de acetato de uranilo al 1 %. Seguidamente, la grilla se secó suavemente con un paño absorbente y se guardó en el soporte hasta su observación al microscopio electrónico de transmisión.

RESULTADOS

Construcción del plásmido pMFV57 y de las mutaciones puntuales en *ftsZ*. Las mutantes de EcFtsZ fueron construidas a partir de un plásmido pMFV57 por PCR como se detalló en la sección de Materiales y Métodos. De esta manera se obtuvieron los plásmidos que expresan la EcFtsZ con las siguientes mutaciones: aminoácido glicina 67 sustituido por prolina (G67P), aminoácido arginina 85 sustituido por glutamina (R85Q) y aminoácido glutamato 83 sustituido por glutamina (E83Q) y la ubicación de cada resíduo mutado se observa en la secuencia aminoacídica de la EcFtsZ, mostrada en la figura 2. Las mutaciones introducidas fueron corroboradas por secuenciación del gen de la *ftsZ* de cada uno de los plásmidos obtenidos por PCR. Las mutaciones se escogieron de acuerdo a dos tipos de análisis. Primero, la homología que existe entre las dos proteínas, EcFtsZ y tubulina: en los microtúbulos las interacciones laterales entre subunidades homólogas, esto es, α - α , β - β , poseen interfaces de elementos estructurales equivalentes, por ejemplo, interacciones de tipo electrostática que se producen entre residuo cargados negativamente como glutámico y aspártico con residuo de carga positiva. Estos residuos de aminoácidos se encuentran sobre estructuras secundarias características de la tubulina como son: 1. El "loop" S7-H9 (M loop) que interactúa con la hélice H3, con el "loop" formado entre la hélice 2 y la hebra 3 (H2-S3) y con el "loop"

```

      10      20      30      40      50      60
MFEPMELTNDAVIKVIGVGGGGNAVEHVMRERIEGVEFFAVNTDAQALRKTAVGQTIQI
      --S1-  -----H1-----  --S2-  -H2-  -S3-

      70      80      90      100     110     120
GSGITK[GLGAGANPEVGRNAAD[EDR]DALRAALEGADMVFIAGMGGTGTGAAPVVAEVA
      -----H3-----  --H3---  --S4--  -----H4-----

      130     140     150     160     170     180
KDLGILTVAVVTKPFNFEGKKRMAFAEQGITELSKHVDSLITIPNDKLLKVLGRGISLLD
-  --S5--  -----H5-----  --S6--  -H6--  -H7-

      190     200     210     220     230     240
AFGAANDVLKGA[VQGI]AELITRPLMNVDFA[V]RTVMSEMGHAMMGGV[S]ASGEDRAE[E]AA
-----H7-----  --H8---  --S7-----  ---H9-

      250     260     270     280     290     300
EMAISSP[LE]DIDLSGARGV[LVNITAGFDLRLDEFETVGN]TIRAFASDNATV[VIGTSLDP
-----  --S8--  ---H10---  --S9---

      310     320     330     340     350     360
DMNDELRVTVVATGIGMDKRPEITLV[TKNQVQ]QPVMDRYQ[QHGM]APLTQEQKPVAKVVND
      -S10--  S11  S12

      370     380
NAPQTAKEPDYLDI[PAFLRKQAD]

```

Figura 2. Secuencia de aminoácidos de la EcFtsZ. Los números indican las posiciones de aminoácidos. Las letras, secuencia aminoacídica de EcFtsZ. En amarillo y rojo, estructuras secundarias homólogas a la de tubulina. La nomenclatura usada está de acuerdo con la utilizada para la estructura cristalina de MjFtsZ (Löwe y Amos, 1998). Enmarcados se muestran los aminoácidos mutados.

formado entre la hélice 1 y la hebra 1 (H1-S1) y 2. La hélice 3 (H3) que interactúa con varias estructuras como la hélice 9 (H9), la hélice 10 (H10), el "loop" formado entre la hélice 9 y la hebra 8 (H9-S8), la hélice 6 (H6), el "loop" formado entre la hélice 6 y la hélice 7 (H6-H7) y el "loop" M (Nogales, et al., 1999). De esta manera, son dos estructuras secundarias las que presentan el mayor número de interacciones, mayoritariamente de carácter electrostático, el "loop" y la hélice H3 (figura 3b). En la EcFtsZ existe una estructura homóloga a la hélice H3 de la tubulina, que se encuentra en una de las caras laterales y que está interrumpida por un pequeño "loop", formado por 3 aminoácidos mayoritariamente cargados, expuestos a la superficie (figura 3a). Este antecedente sumado a la conservación de la hélice H3 en las proteínas FtsZ analizadas, permitió predecir que los aminoácidos glutamato 83 y arginina 85 podrían participar en la interacción entre monómeros de EcFtsZ. Segundo, la presencia del "loop" S3-H3 en la estructura de la EcFtsZ, ausente en la tubulina, y la conservación del "loop" M en la tubulina, ausente en la EcFtsZ, permitió postular que el "loop" S3-H3 reemplazaría en su función al "loop" de la tubulina en EcFtsZ. Aunque el "loop" M en la tubulina está ubicada en la cara derecha y es esencial para la interacción lateral de los protofilamentos en los microtúbulos, el "loop" S3-H3, ubicado en la cara izquierda de la EcFtsZ, potencialmente podría participar en la interacción entre los protofilamentos de EcFtsZ. Esta interacción se vería reforzada por el alto porcentaje de glicinas que conforman este "loop", pues le otorgan la flexibilidad necesaria para la

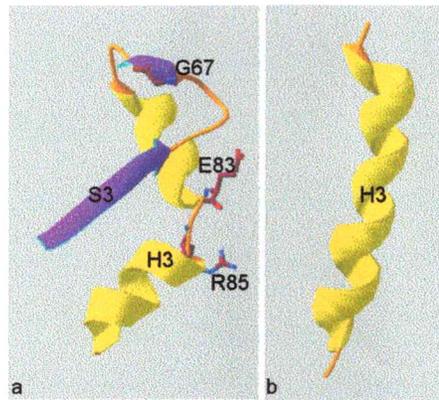


Figura 3. Estructura de la hélice H3 de la EcFtsZ (a) y de la β -tubulina (b). Se muestran los residuos de los aminoácidos mutados en la hélice H3 de la EcFtsZ.

interacción. Para comprobar esta hipótesis, se sustituyó la glicina 67 por prolina, un aminoácido que le confiere mayor rigidez al "loop", figura 3a.

Construcción de la cepa VIP2(DE3). Con el fin de demostrar la funcionalidad de las EcFtsZ mutantes, se realizaron ensayos de complementación *in vivo*. Para esto, se utilizó una cepa termonula (VIP2), en la cual, el gen de la *ftsZ* ha sido reemplazado por el gen que confiere resistencia a kanamicina. Esta delección es letal, por esto se complementa en trans con el gen de la *ftsZ* tipo silvestre por medio de un plásmido pLAR9 que posee un origen de replicación termosensible. De esta manera, si la cepa VIP2 es transformada con un plásmido que expresa una EcFtsZ funcional a temperatura restrictiva, las células serán viables. Para regular la expresión de la EcFtsZ, se lisogenizó la cepa VIP2, a nivel cromosomal, con el gen de la RNA polimerasa del fago T7 que se encuentra bajo promotor *lac* y esta se denominó VIP2(DE3), figura 4a. Con esto, se pudo inducir con IPTG, la expresión de la *ftsZ* que se encuentra bajo el promotor T7 en el plásmido pMFV57. Este plásmido proviene del plásmido pMFV56, donde el gen que confiere resistencia a kanamicina se reemplazó por el gen de la β -lactamasa, que confiere resistencia a ampicilina, pues la cepa VIP2(DE3) posee una resistencia endógena a kanamicina. De esta manera, el plásmido con la resistencia a ampicilina (pMFV57) se utilizó para realizar las mutaciones sitio dirigidas, figura 4b. Por lo tanto, este sistema que se esquematiza en la figura 4c, se utilizó para realizar los ensayos de funcionalidad de las FtsZ mutantes *in vivo*.

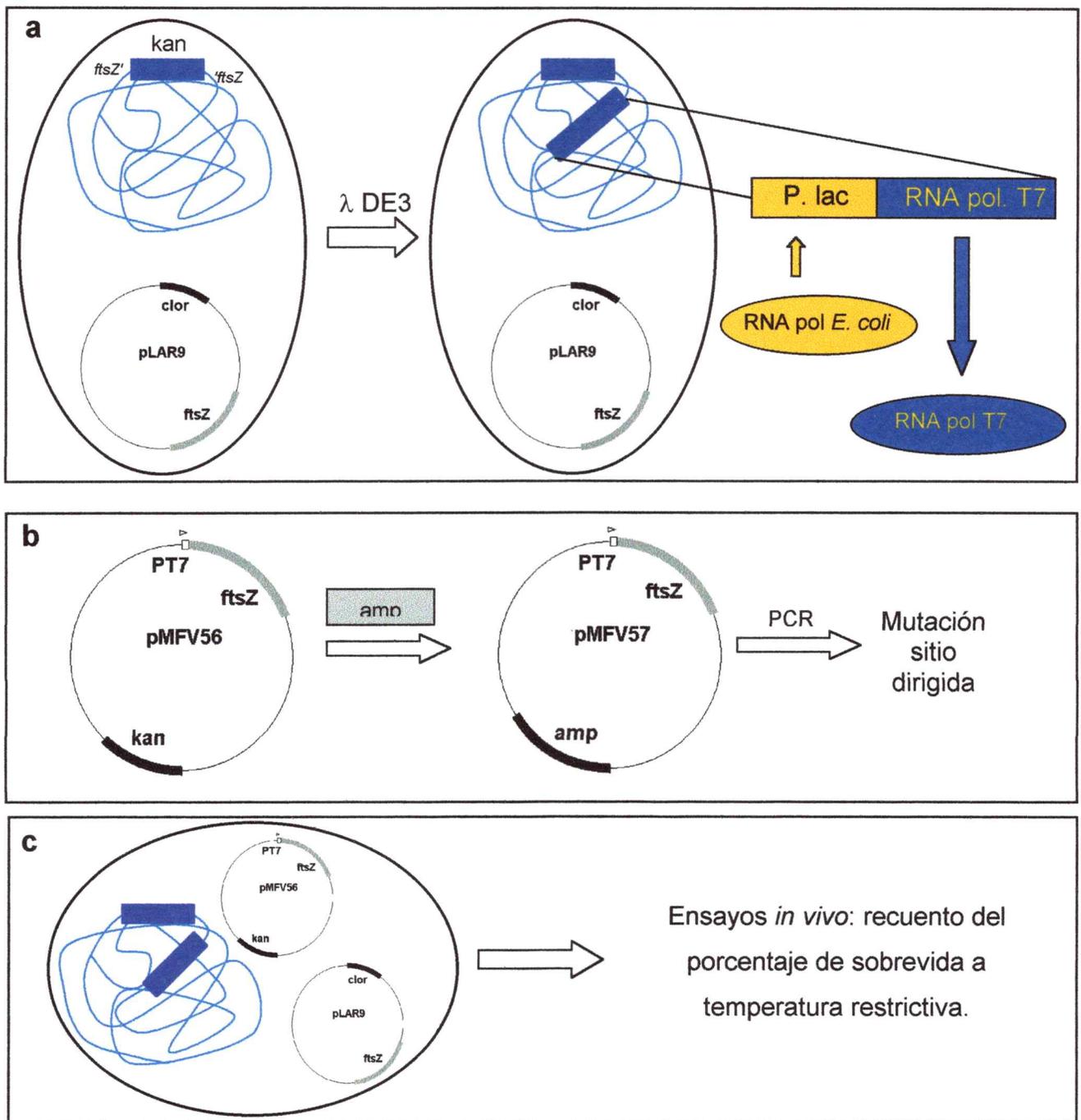


Figura 4. Esquema de la construcción de la cepa VIP2(DE3)pMFV57. a, lisogenización de la cepa VIP2 con el gen de la RNA polimerasa del fago T7; Se ha amplificado la zona del cromosoma con la inserción de DE3 y se señala la interacción de la RNA polimerasa de *E. coli* que induce la síntesis de la RNA polimerasa del fago T7. b, Cambio de la resistencia a kanamicina por resistencia a ampicilina en el plásmido pMFV56 por clonamiento del gen de la β -lactamasa que confiere resistencia a ampicilina; y c, Cepa VIP2(DE3)pMFV57 que se empleó para realizar los ensayos de funcionalidad de la EcFtsZ *in vivo*.

Funcionalidad de las proteínas EcFtsZ mutantes *in vivo*. En la figura 5 se muestra el porcentaje de sobrevivencia de las cepas VIP2(DE3) transformadas con los plásmidos pMFV57 que expresan la EcFtsZ silvestre y las mutantes. El número de las colonias de VIP2(DE3)pMFV57, que expresa la EcFtsZ tipo silvestre (control positivo), crecidas a temperatura restrictiva (42 °C) se consideró como el 100 % de viabilidad, como se muestra en la figura 5. La cepa VIP2(DE3) sin transformar (control negativo) presentó 0,004 % de sobrevivencia, esto es cinco órdenes de magnitud menos que el del control positivo. El pequeño número de colonias que sobrevive se explica por la frecuencia de reversión, más algunas células que logran sobrevivir en las condiciones del ensayo. Este ensayo consiste en determinar el número de colonias sobrevivientes después de someter a temperatura restrictiva (42 °C), las células que fueron crecidas hasta la fase exponencial a temperatura permisiva (30 °C) en un medio líquido. En estas condiciones, cuando se produce el cambio de temperatura, el crecimiento celular no se detiene, pues aunque a la temperatura restrictiva el plásmido no es capaz de replicarse, el número inicial de copias de este plásmido termosensible presente en la célula permite la división celular hasta que se produzca su completa dilución. De allí que el porcentaje de sobrevivencia por sobre la frecuencia de reversión se explica por las condiciones experimentales empleadas. Este ensayo desarrollado especialmente para evaluar la funcionalidad de la EcFtsZ *in vivo*, no se ve alterado por el pequeño porcentaje de sobrevivencia que muestra el control negativo.

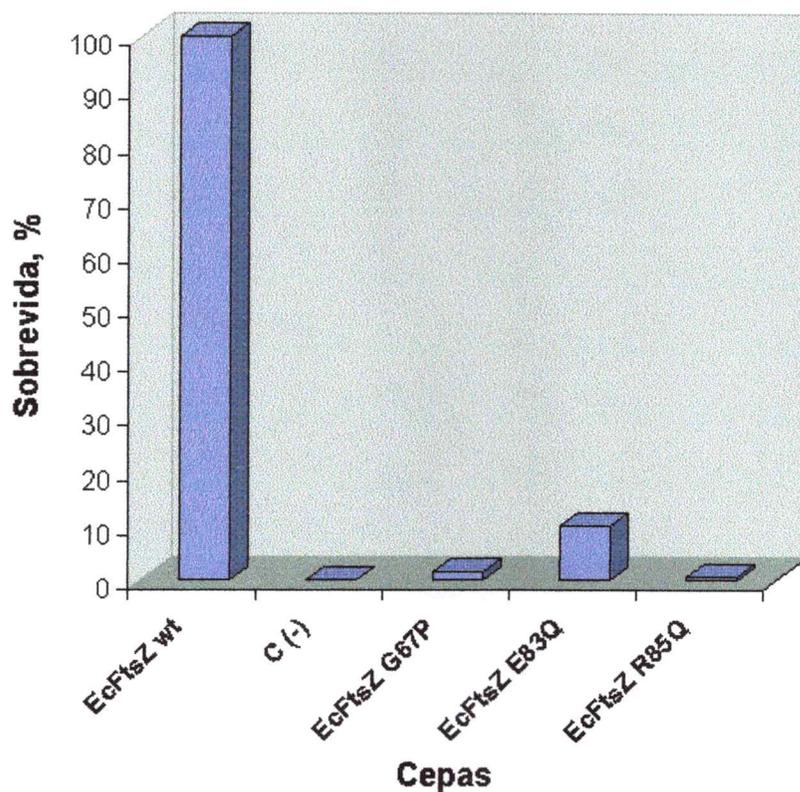


Figura 5. Determinación de los porcentajes de sobrevida de cepas de VIP2(DE3) complementadas con plásmidos que expresan: EcFtsZ tipo silvestre (EcFtsZ wt) y EcFtsZ mutantes: G67P, E83Q y R85Q. Como control negativo se utilizó la cepa sin transformar (C(-)). Las células fueron crecidas en medio LB a 30°C y transferidas a una placa LB agar. Luego de la incubación a 42°C toda la noche, las colonias fueron cuantificadas y se expresan como porcentaje de sobrevida en relación al control positivo que se consideró como 100 %.

El porcentaje de sobrevivencia de las mutantes de EcFtsZ presentó valores de 10 %, 1,4 % y 0,5 % para E83Q, G67P y R85Q, respectivamente, (tabla III), valores que son por lo menos dos órdenes de magnitud mayor con respecto al control negativo. Esto demuestra que si bien las células que expresan las mutantes de EcFtsZ no pueden llevar a cabo una división normal, tampoco pierden la funcionalidad completamente. Los resultados obtenidos del experimento de complementación, además de demostrar la funcionalidad de EcFtsZ *in vivo*, fueron útiles para cuantificar la eficiencia de la EcFtsZ en la división celular, esto es, con el valor del porcentaje de sobrevivencia se puede inferir cuán funcional es la proteína en condiciones fisiológicas de crecimiento celular. Según esta definición podemos ordenar la eficiencia en cuanto a la funcionalidad de la EcFtsZ de acuerdo al siguiente orden: tipo silvestre > E83Q > G67P > R85Q. Para explicar el efecto de las mutaciones sobre la funcionalidad de la EcFtsZ, se hizo necesario purificar y caracterizar las propiedades bioquímicas de las EcFtsZ mutantes para establecer la relación entre la estructura y la función de cada una de ellas. Con este propósito, se determinó la actividad GTPásica y la actividad polimerizante tanto de la EcFtsZ tipo silvestre como de las mutantes.



Tabla III. Porcentaje de sobrevivencia de las cepas VIP2(DE3) transformadas con plásmidos que expresan la EcFtsZ tipo silvestre y mutantes. Se usó como control negativo (C (-)), VIP2(DE3) sin plásmido.

EcFtsZ	Porcentaje de sobrevivencia
Tipo silvestre	100
E83Q	10
G67P	1,4
R85Q	0,5
C (-)	0,004

Purificación de la EcFtsZ. La etapa clave del método habitual de purificación de EcFtsZ consiste en polimerizar la proteína con Ca^{+2} y separarla por centrifugación, como se indica en Materiales y Métodos. Cuando se intentó purificar con este método las mutantes EcFtsZ G67P y EcFtsZ R85Q no se obtuvo polimerización de la proteínas. Por lo tanto, se empleó un método alternativo, donde la etapa más importante fue la precipitación con sulfato de amonio al 30 %, como se detalla en Materiales y Métodos, las proteínas provenientes de esta precipitación fueron separadas por electroforesis en gel SDS-PAGE como se muestra en el carril 3 de la figura 6. El carril 4 muestra la separación de la proteína proveniente de la etapa de intercambio aniónico (mono-Q). Se observa que entre esta etapa y la anterior hay una disminución de las proteínas contaminantes. La etapa de filtración en una columna de exclusión (S-400) no tiene una mejora significativa en la purificación, carril 5 de la figura 6. Esta etapa, parte del método de purificación descrito por Mukherjee y Lutkenhaus (1998), podría ser reemplazada por una diálisis para eliminar el exceso de sal. Esto tendría la ventaja de eliminar una etapa de incubación previa a la filtración, donde hay pérdida de proteínas. El comportamiento de las EcFtsZ mutantes durante el proceso de purificación fue similar a la de tipo silvestre. Con este método de purificación las EcFtsZ tipo silvestre y mutantes mostraron un alto grado de pureza y así se emplearon para los ensayos de la actividad GTPásica y de la polimerización. Además de la identificación de la EcFtsZ por su peso molecular relativo, se utilizó un ensayo de inmunoblotting con suero de conejo inmunizado con la EcFtsZ tipo silvestre, figura 7.

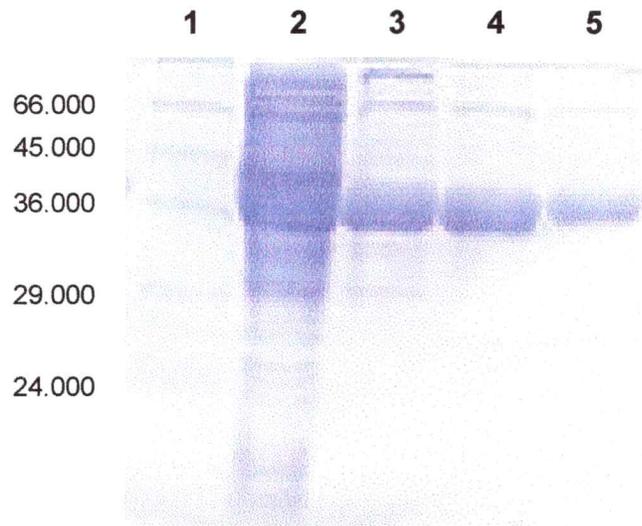


Figura 6. SDS-PAGE de EcFtsZ. Carriles: 1, marcadores de peso molecular; 2, extracto total de proteína; 3, proteínas del precipitado con sulfato de amonio al 30 %; 4, proteínas provenientes de la cromatografía de intercambio aniónico (mono-Q); y 5, proteínas proveniente de la cromatografía de exclusión molecular.

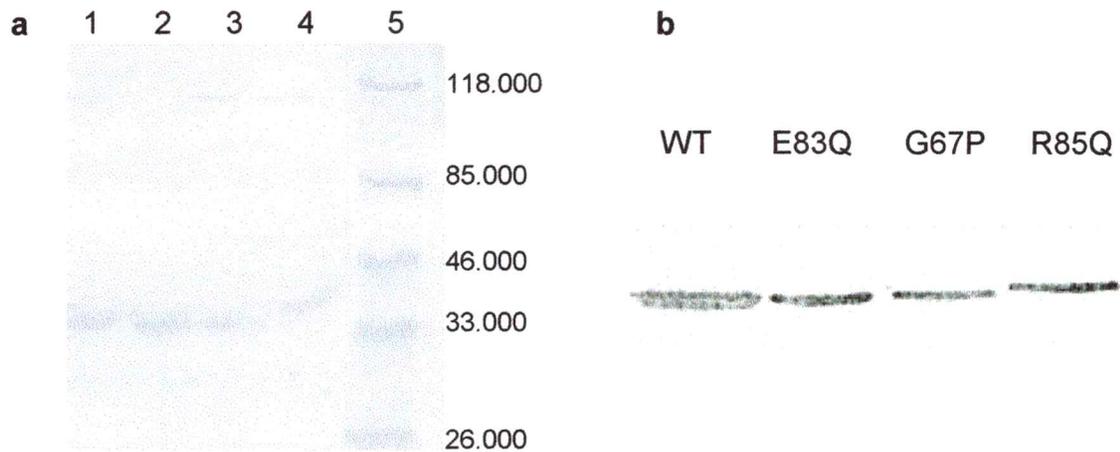


Figura 7. (a) Gel SDS-PAGE y (b) Inmuno blotting de la EcFtsZ tipo silvestre y de las mutantes. La electroforesis y las reacciones de inmuno blotting se llevaron a cabo como se detalla en Materiales y Métodos. **a**, Las muestras que se analizaron en los siguientes carriles fueron: 1, EcFtsZ tipo silvestre; 2, EcFtsZ E83Q; 3, EcFtsZ G67P; 4, EcFtsZ R85Q y 5, marcadores de peso molecular. Un duplicado de este gel se utilizó para la transferencia a la membrana de nitrocelulosa. En **b**, donde se indica, se observa que la EcFtsZ tipo silvestre (WT) y las mutantes (E83Q, G67P y R85Q) reaccionan de manera específica contra un suero policlonal de conejo anti-FtsZ.

Curvas de progreso de la actividad GTPásica. Con el fin de determinar la capacidad de hidrólisis de GTP de las FtsZ mutantes, se siguió el progreso de la reacción según las condiciones detalladas en Materiales y Métodos. En la figura 8 se observa el aumento en el tiempo de la concentración de GDP producida por la hidrólisis de GTP que cataliza EcFtsZ tipo silvestre y las mutantes. La EcFtsZ tipo silvestre muestra una típica curva de progreso de la reacción que se acerca al equilibrio. Las mutantes G67P y E83Q poseen un comportamiento similar a la EcFtsZ tipo silvestre. La EcFtsZ tipo silvestre y las mutantes G67P y E83Q muestran linealidad en los primeros 10 minutos de la hidrólisis. A partir de la pendiente de la parte inicial de estas curvas se determinaron las velocidades iniciales. Las constantes catalíticas aparentes se calcularon dividiendo los valores de la velocidad inicial por la concentración de la proteína. Para comparar la efectividad de la hidrólisis de GTP en las proteínas mutantes respecto a la tipo silvestre, se consideraron los valores de las constantes catalíticas aparentes que se muestran en la tabla IV. Estos resultados demuestran que las mutantes G67P y E83Q son capaces de hidrolizar GTP en forma lineal (v_i) a partir de los primeros minutos de la reacción (inserto de la figura 8). La mutante G67P y E83Q presentan un 60 y un 40 % de la v_i de la proteína silvestre, respectivamente. Bajo las mismas condiciones experimentales la FtsZ R85Q presenta un periodo de latencia en la curva de progreso. Razón por la cual, para determinar la velocidad inicial se consideró la zona de mayor pendiente después de la latencia. De la misma forma se calculó la constante catalítica aparente que se muestra en tabla IV que fue un 5 % de la

forma se calculó la constante catalítica aparente que se muestra en tabla IV que fue un 5 % de la

Tabla IV. Constante catalítica aparente de EcFtsZ tipo silvestre y de las mutantes de EcFtsZ E83Q , G67P y R85Q.

EcFtsZ	Constante de catalítica aparente, min⁻¹
Tipo silvestre	2,90 ± 0,160 ^a
R85Q	0,133 ± 0,015 ^b
E83Q	1,13 ± 0,057 ^a
G67P	1,74 ± 0,096 ^a

^a Los valores de las constantes catalíticas aparentes fueron calculados a partir de las pendientes iniciales de las curvas de progreso para 1 mM GTP que se muestran en el inserto de la figura 8.

^b El valor se ha calculado a partir de la pendiente máxima de la curva de progreso de la EcFtsZ R85Q que se muestra en la figura 8.

El error estándar corresponde a la dispersión de los puntos experimentales respecto a la curva de regresión y fue determinado para cada velocidad inicial con el programa de computación Sigma Plot 7.0

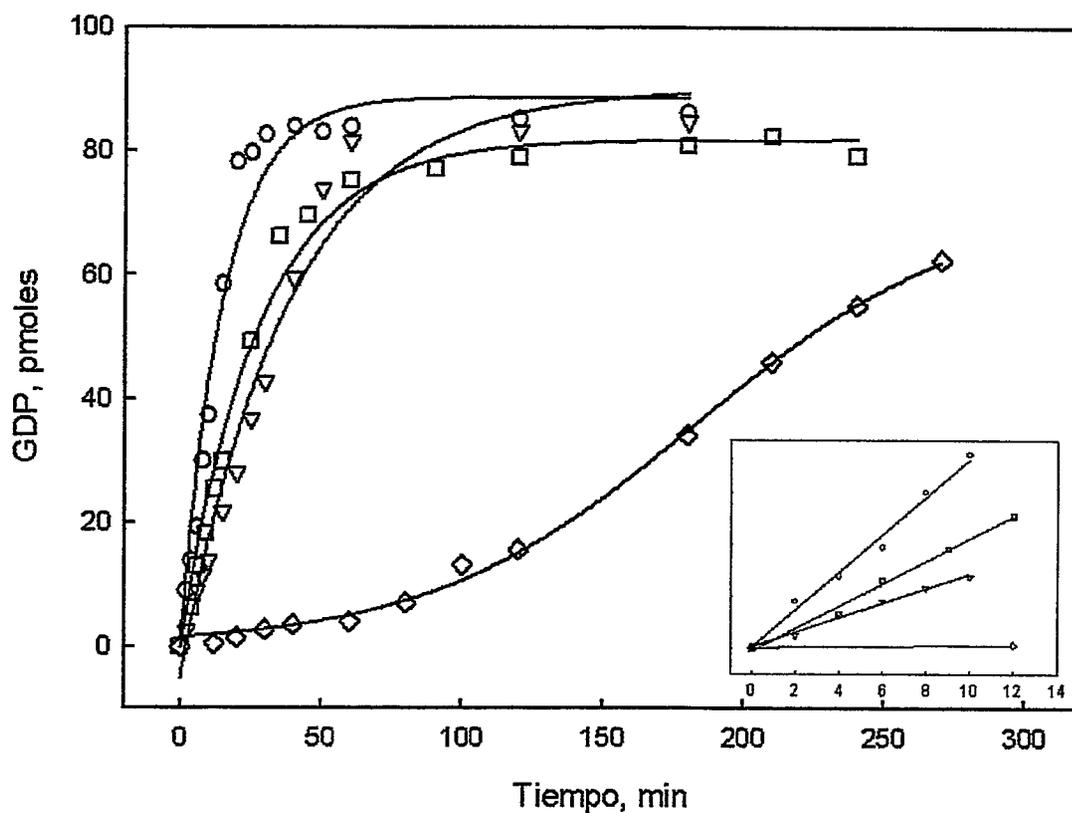


Figura 8. Curva de progreso de EcFtsZ tipo silvestre y de las mutantes (E83Q, G67P y R85Q). La reacción de hidrólisis y la cuantificación del GDP hidrolizado se llevaron a cabo en una solución que contenía: MES pH 6,5 50 mM, KCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM a 30 °C. La reacción se inició con GTP 1 mM. El gráfico inserto es un aumento de la escala de los primeros minutos de la reacción. EcFtsZ tipo silvestre (○), EcFtsZ E83Q (▽), EcFtsZ G67P (□) y EcFtsZ R85Q (◇).

v_i de la EcFtsZ de tipo silvestre. Con el propósito de dilucidar si el período de latencia observado en los primeros eventos de la hidrólisis de la R85Q se debe a una modificación en el sitio activo para GTP o a la falta de inducción de la actividad por una pobre polimerización, se hicieron curvas de progreso a diferentes concentraciones de proteína, que van desde 0,25 mg/ml hasta 2 mg/ml, que se muestran en la figura 9. Las 7 curvas muestran un período de latencia que va disminuyendo a medida que aumenta la concentración de la proteína, tabla V. A partir de los valores de las pendientes máximas de cada una de las curvas se construyó la curva del efecto de la concentración de la FtsZ sobre la velocidad de hidrólisis de GTP y se observa que esta velocidad a 1 mM GTP es directamente proporcional al aumento de la concentración de la EcFtsZ R85Q hasta 1,5 mg/ml. En estas condiciones experimentales la concentración de GTP es saturante para la mutante R85Q (dentro del error experimental, no existe una concentración crítica para la aparición de la forma activa) figura 10. A esta concentración de GTP se obtiene un 97 % de la velocidad máxima y una constante catalítica aparente de $4,7 \text{ min}^{-1}$, valor obtenido a partir de la pendiente de la curva de la figura 10. Estos resultados indican que la hidrólisis de GTP catalizada por la EcFtsZ R85Q es dependiente de su concentración y por lo tanto de su polimerización, que en este caso es defectuosa. Resultados que se muestran en la tabla VI demuestran que, dentro del error experimental, la afinidad para GDP de las EcFtsZ mutantes es similar a la EcFtsZ tipo silvestre, para la unión de un mol de GDP por mol de proteína.

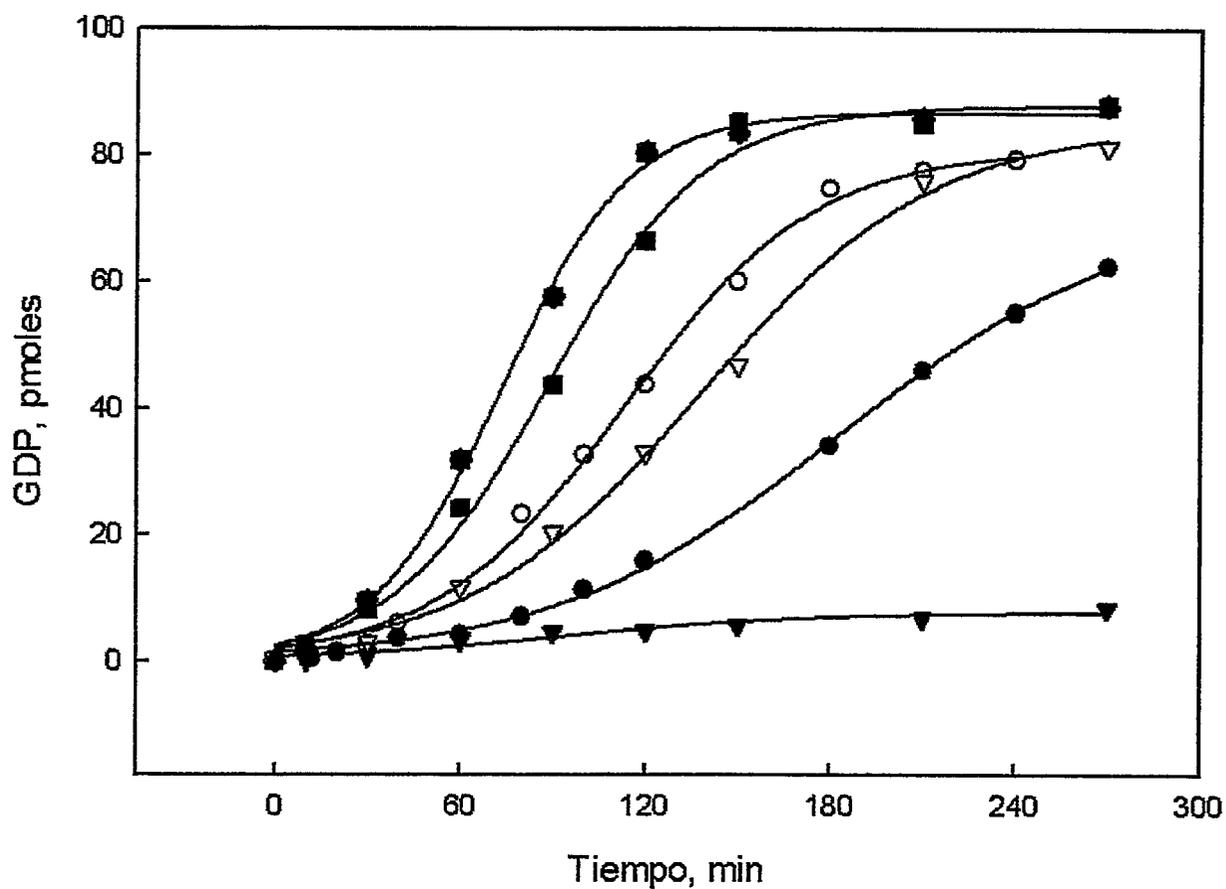


Figura 9. Curvas de progreso de la mutante EcFtsZ R85Q a diferentes concentraciones de proteína. Las condiciones del ensayo son las mismas que se describen en la figura 8. Se utilizaron diferentes concentraciones de EcFtsZ R85Q. 0,25 mg/ml (▼); 0,5 mg/ml (●); 0,75 mg/ml (▽); 1 mg/ml (○); 1,25 mg/ml (■); 1,5 mg/ml (□) y 2 mg/ml (◆).

Tabla V. Inverso del período de latencia de las curvas de progreso de la actividad GTPásica de la EcFtsZ R85Q a varias concentraciones.

EcFtsZ R85Q, mg/ml	^a1/τ, min⁻¹
0,50	0,011
0,75	0,020
1,00	0,025
1,25	0,031
1,50	0,043

^a Los valores de $1/\tau$ corresponden al inverso del número que se determinó desde la intersección con el eje x de las rectas con la máxima pendiente de las curvas de la figura 9.

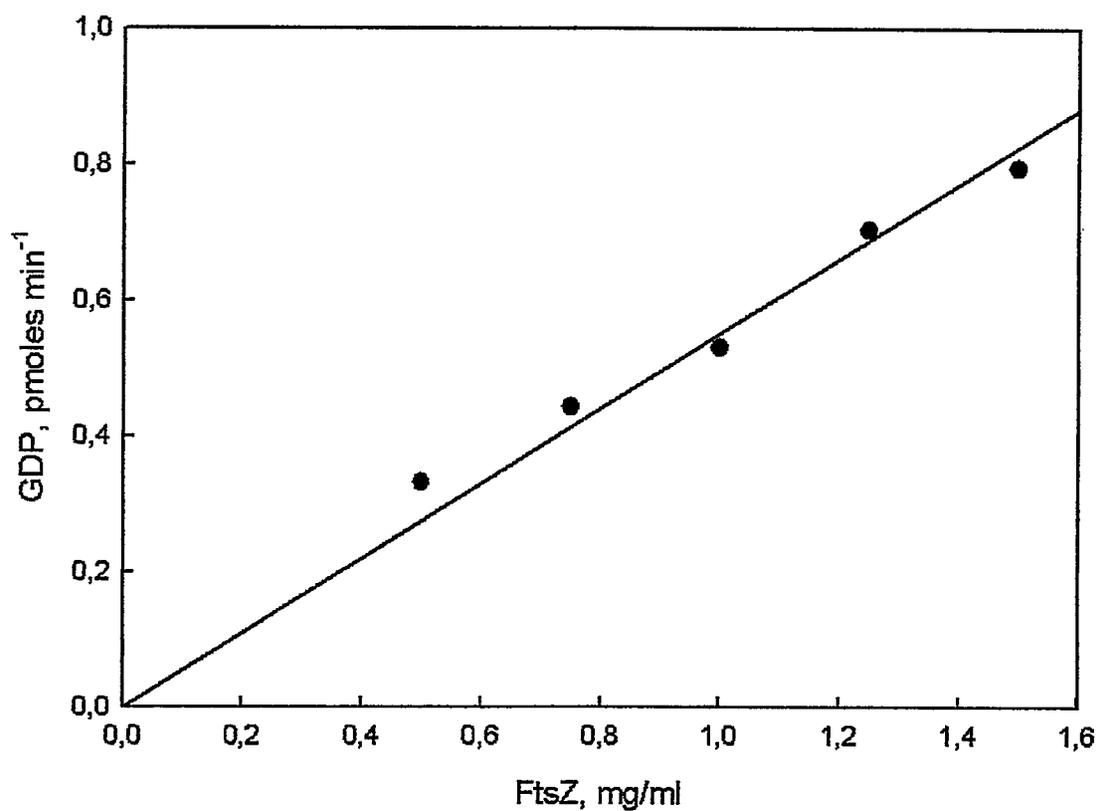


Figura 10. Efecto de la concentración de la EcFtsZ R85Q sobre la velocidad de hidrólisis de GTP. La velocidad se determinó de la máxima pendiente de las curvas de progreso que se muestran en la figura 9. Las condiciones experimentales son las mismas de la figura 8 y las concentraciones de la EcFtsZ R85Q son las mismas de la figura 9.

Tabla VI. Estequiometría de unión de GDP a EcFtsZ tipo silvestre y a las mutantes purificadas.

EcFtsZ	Moles de GDP unido por mol de FtsZ^a
Tipo silvestre	0,9
R85Q	1,08
E83Q	1,08
G67P	1,08

^a La cantidad de GDP unido y de FtsZ fueron determinadas como se describe en Materiales y Métodos.

El valor de la constante de disociación (K_d) es de $82 \mu\text{M}$ (Sossong, et al., 1999) y ha sido determinada en el laboratorio por Esteban Nova, ($K_d = 32 \mu\text{M}$) (Nova y Monasterio, 2001). De allí que, un cambio en el valor de la K_m para GTP de las mutantes debiera ser producido por un cambio en la constante catalítica. Una disminución en la constante catalítica implica una disminución de la K_m , situación que no ocurre en este caso, por esto, la concentración de GTP utilizada en estos experimentos fueron saturantes (\geq a $97 \% V_{\text{max}}$).

Polimerización de la EcFtsZ tipo silvestre y mutantes. La EcFtsZ polimeriza *in vitro* en protofilamentos, los cuales, en presencia de cationes como el calcio o el DEAE-dextrano, pueden asociarse entre ellos y formar polímeros como láminas y túbulos. La formación de estos polímeros es consecuencia de dos tipos de interacciones, la longitudinal y la lateral. Las interacciones longitudinales de los monómeros de EcFtsZ dan origen a los protofilamentos y las interacciones laterales dan origen a láminas y túbulos. Algunos aminoácidos involucrados en la interfase de la interacción longitudinal son conocidos, a diferencia de los que participan en la interacción lateral. Para identificar los residuo aminoacídicos que participarían en la interacción lateral en esta tesis se generaron tres mutantes de la EcFtsZ, donde los aminoácidos glicina 67, glutamato 83 y arginina 85, fueron sustituidos por prolina, glutamina y glutamina, respectivamente, como se explicó en la construcción del plásmido pMFV57 y de las mutaciones puntuales en EcFtsZ. Para determinar la influencia de estas mutaciones en la formación de polímeros de EcFtsZ, se realizaron ensayos de polimerización utilizando dos metodologías: dispersión de luz a 90° con una longitud de onda de 350 nm y microscopía electrónica con tinción negativa.

1. *Dispersión de luz a 90°.* El ensayo de dispersión de luz se hizo bajo las mismas condiciones experimentales que el ensayo de la determinación de la actividad GTPásica de la EcFtsZ (ver Materiales y Métodos). Para seguir el curso de la polimerización de la proteína se registró la dispersión de luz durante 5 minutos (valores que se usaron como línea base) y se agregó 1 mM de GTP

para iniciar la polimerización y se continuó registrando la dispersión de luz. El progreso de la polimerización de EcFtsZ R85Q se siguió por más tiempo debido a que la actividad GTPásica mostró un largo período de latencia. En la figura 11, se muestra la cinética de polimerización de las EcFtsZ tipo silvestre y las mutantes. Se observa que la EcFtsZ tipo silvestre polimeriza de forma habitual alcanzando un máximo de 40 unidades arbitrarias de dispersión de luz después de agregar 1 mM de GTP. La dispersión de luz empieza a disminuir después de los 15 minutos de incubación como producto de la despolimerización de los polímeros de EcFtsZ. La mutante EcFtsZ E83Q alcanza un máximo de 20 unidades arbitrarias después de agregar GTP y se produce una demora de aproximadamente una hora para que se inicie la despolimerización. Las mutantes EcFtsZ G67P y R85Q no mostraron ningún incremento significativo de la dispersión de luz, aún a concentraciones mayores de la proteína, como fue el caso de EcFtsZ R85Q que se incrementó hasta 2 mg/ml (resultados no mostrados).

Un parámetro importante para conocer la funcionalidad de la proteína es la determinación de la concentración crítica de polimerización (C_c). Este valor muestra la concentración de proteína libre remanente una vez que se ha alcanzado el máximo de polimerización. Un aumento de este valor se puede deber a la presencia de proteína inactiva que ha copurificado o a la pérdida de la funcionalidad de la proteína por las mutaciones introducidas. Existe controversia respecto al mecanismo de polimerización de EcFtsZ. El valor de la C_c es un fiel reflejo del mecanismo de polimerización, pues permite discriminar

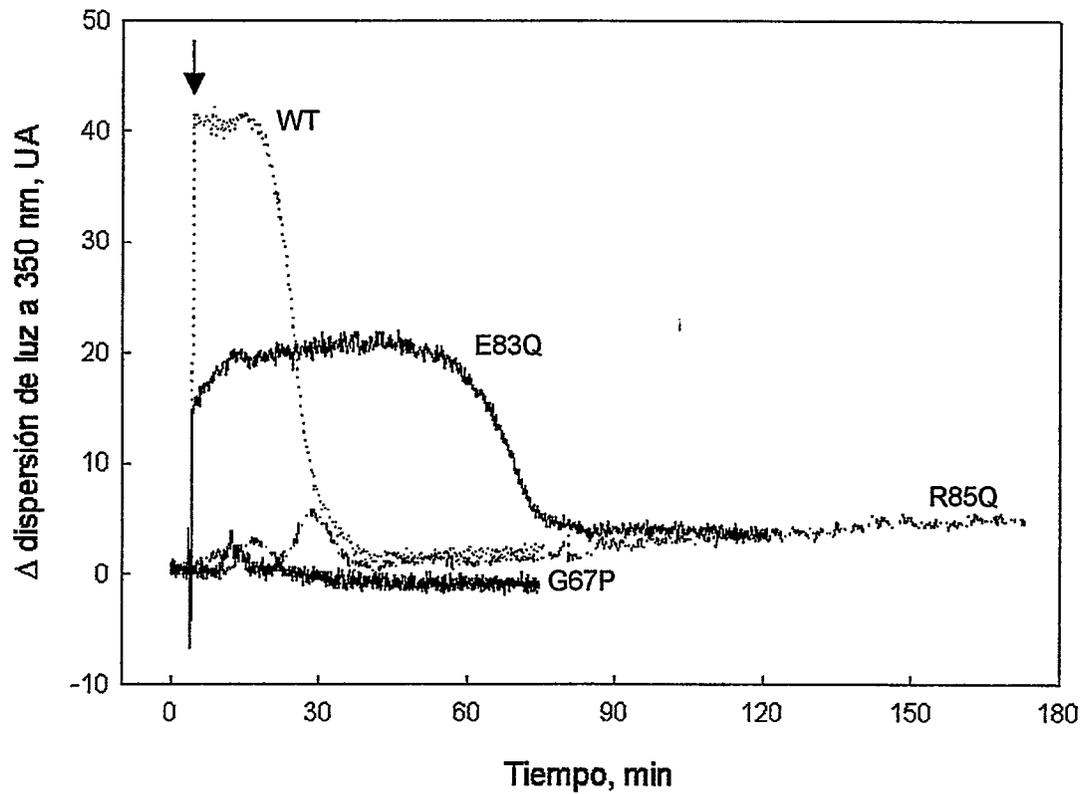


Figura 11. Polimerización de la EcFtsZ tipo silvestre (WT) y de las mutantes (E83Q, G67P y R85Q). La cinética de polimerización se siguió por el cambio de la dispersión de la luz a 90° en una solución MES 50 mM pH 6,5, KCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM a 30 °C. La flecha indica la adición de 1 mM de GTP para dar inicio a la polimerización.

entre un mecanismo isodésmico ($C_c = 0$) y uno con nucleación ($C_c > 0$). Con el fin de determinar la C_c de la EcFtsZ silvestre y de la mutante EcFtsZ E83Q se registró la cinética de polimerización de estas proteínas siguiendo la dispersión de luz a 350 nm, después de iniciar la polimerización con 1 mM GTP, a diferentes concentraciones de la proteína. En la figura 12 se muestra el gráfico del máximo de dispersión de luz producido por la polimerización de la EcFtsZ versus la concentración de las proteínas. Las diferentes pendientes de las líneas rectas reflejan un cambio en las dimensiones de los polímeros y la extrapolación de las rectas al eje de la abscisa permite obtener el valor de la C_c . Los valores de la intersección de las rectas con el eje de la abscisa son 40 $\mu\text{g/ml}$ y 75 $\mu\text{g/ml}$, para la EcFtsZ tipo silvestre y la EcFtsZ E83Q, respectivamente. La pérdida de la capacidad de polimerizar de las mutantes de EcFtsZ R85Q y G67P, no permitió determinar sus C_c .

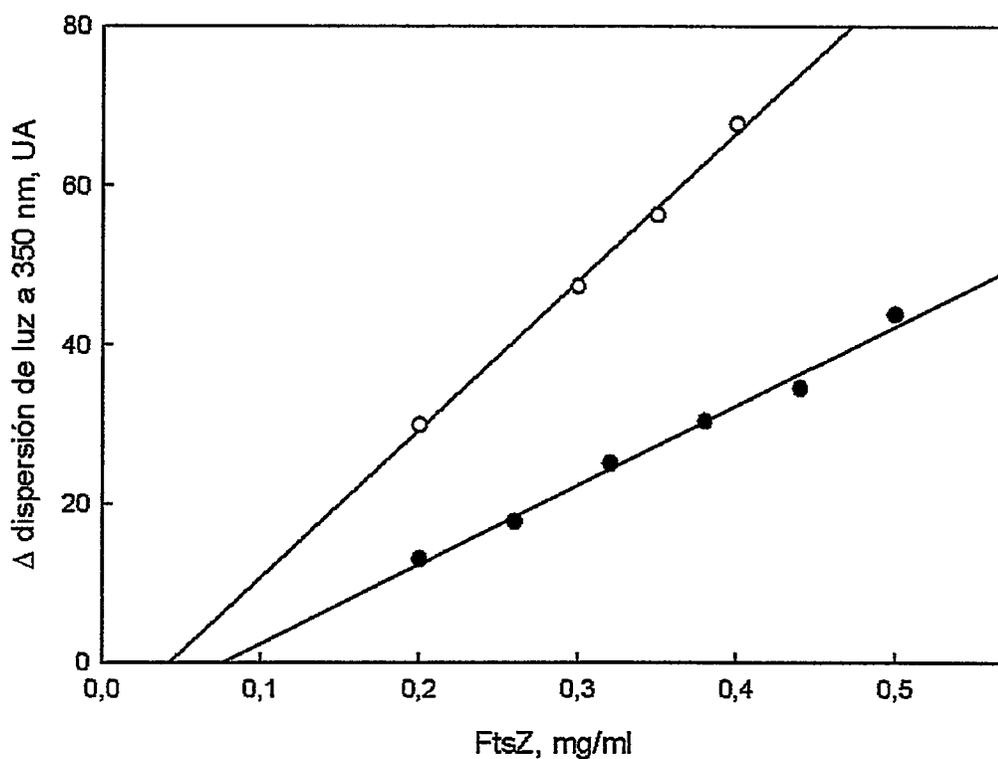
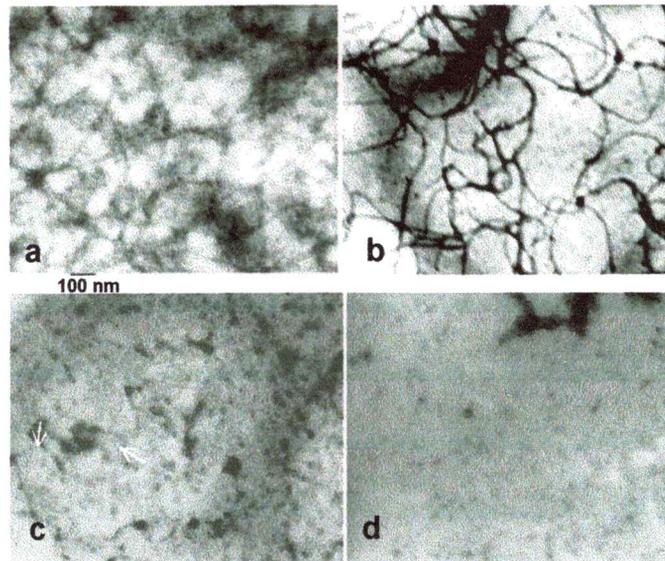


Figura 12. Concentración crítica de la EcFtsZ tipo silvestre y de la mutante EcFtsZ E83Q. Cada punto representa el máximo de dispersión de la luz producido por la polimerización de la proteína a las diferentes concentraciones de las EcFtsZ utilizadas. La intersección con la abscisa corresponde a la mínima concentración necesaria para que ocurra la polimerización, es decir la concentración crítica. EcFtsZ tipo silvestre (○) y EcFtsZ E83Q (●). Las condiciones experimentales son iguales a las del ensayo de dispersión de luz a 350 nm, a 90° mostrado en la figura 11.

2. *Microscopia electrónica.* Con el propósito de identificar el tipo de estructura de los polímeros de la EcFtsZ tipo silvestre y de las EcFtsZ mutantes se tomaron muestras desde el ensayo de polimerización cuando se alcanzó el máximo de polimerización de acuerdo a su cinética seguida por dispersión de luz (figura 11). Los tiempos de la toma de las muestras, después de agregar GTP, fueron los siguientes: tipo silvestre, 5 min; E83Q, 15 min; R85Q, 30 min y G67P, 15 min. En la figura 13 se muestran las fotografías obtenidas de las observaciones por microscopía electrónica de las muestras teñidas con acetato de uranilo al 1 %, como se detalla en Materiales y Métodos. Se observa que las EcFtsZ de tipo silvestre y las mutantes E83Q y G67P forman polímeros de diámetros diferentes (figura 13a, 13b y 13c). En la tabla VI se muestra el valor del diámetro de los polímeros de la EcFtsZ tipo silvestre y de las mutantes y sus errores estándar. Para el cálculo del número de protofilamentos que componen cada polímero se consideró un ancho de 4 nm por cada protofilamento (Addinall y Holland, 2002). El diámetro de los polímeros de las EcFtsZ tipo silvestre y EcFtsZ E83Q fueron 13,97 nm y 10,58 nm, respectivamente, que correspondería a aproximadamente 3 y 2 protofilamentos por polímero de EcFtsZ tipo silvestre y de EcFtsZ E83Q, respectivamente. Aunque ambos formaron polímeros largos los polímeros de la EcFtsZ E83Q fueron más curvos que los del tipo silvestre (figura 13a y 13b, EcFtsZ tipo silvestre y E83Q, respectivamente). A diferencia de estos dos polímeros, la EcFtsZ G67P forma polímeros más cortos, curvos y con 9,56 nm de diámetro, lo que correspondería a 2 protofilamento de EcFtsZ, figura 13c. Esta puede ser la razón del por qué en

Sin DEAE-dextrano



Con DEAE-dextrano

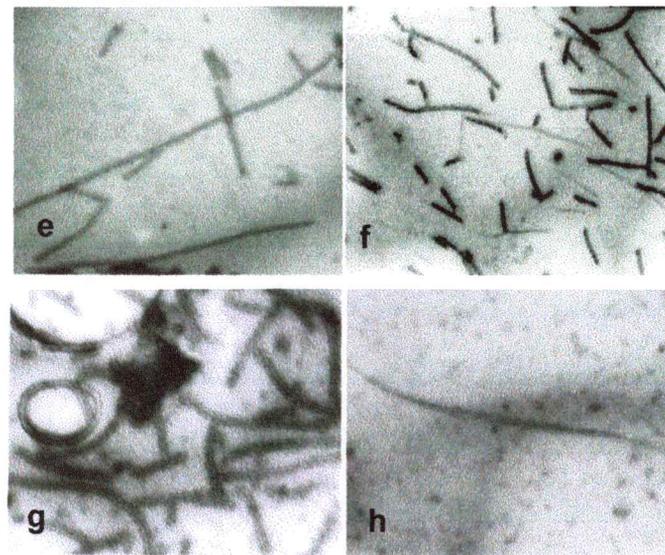


Figura 13. Microscopía electrónica en presencia y ausencia de DEAE-dextrano de EcFtsZ tipo silvestre y mutantes. Las muestras que se visualizaron provenían de la polimerización de 0,5 mg/ml de EcFtsZ tipo silvestre y mutante E83Q incubadas en ausencia y en presencia de 200 μ g/ml de DEAE-dextrano, bajo las condiciones descritas en la figura 11. Se tomaron 50 μ l de la mezcla de incubación cuando la polimerización alcanzó su grado máximo a los tiempos indicados en el texto. Se tiñeron con acetato de uranilo al 1 % de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos y se visualizaron por microscopía electrónica a 50.000x, la barra en a indica 100 nm. **a**, EcFtsZ WT; **b**, EcFtsZ E83Q; **c**, EcFtsZ G67P; y **d**, EcFtsZ R85Q (no se observan filamentos). El diámetro de los filamentos de FtsZ WT, E83Q y G67P son aproximadamente de 11,4 nm, 10 nm y 5,4 nm, respectivamente. El diámetro de los filamentos en presencia de DEAE-Dextran son: **e**, 20 nm (EcFtsZ wt); **f**, 16 nm (EcFtsZ E83Q); **g**, 30 nm (EcFtsZ G67P) y **h**, 12,8 nm (EcFtsZ R85Q).

Tabla VII. Diámetro de los polímeros de EcFtsZ observados por microscopía electrónica y número de protofilamentos.

EcFtsZ	Diámetro, del polímero (nm) sin Dd^a	Número de protofilamentos^b sin Dd^a	Diámetro, del polímero (nm) con Dd^a	Número de protofilamentos^b con Dd^a
Tipo silvestre	13,97±2,23	3	20,02±1,17	4
E83Q	10,58±1,37	2	15,37±2,05	3
G67P	9,65±1,48	2	29,42±1,34	6
R85Q	No observado	-	14,3±1,17	3

^a Dd = 200 µg/ml de DEAE-dextrano.

^b El número de protofilamentos se calculó dividiendo el diámetro del polímero por 4 nm, que corresponde al ancho de un protofilamento.

El error estándar se calculó a partir del promedio de los diámetros de varios polímeros. El diámetro de cada polímero se determinó como el promedio de 4 medidas en diferentes lugares del polímero.

el ensayo de polimerización por dispersión de luz no se observó un incremento en la curva de polimerización al agregar GTP. Consistente con el resultado del ensayo de la dispersión de luz, en la microscopía electrónica de la EcFtsZ R85Q, figura 13d no se observó polímeros.

DEAE-dextrano es un polication que induce la formación de láminas. Para identificar el efecto de este polication sobre la formación de los polímeros de las mutantes de EcFtsZ, se utilizó el mismo protocolo del ensayo anterior pero en presencia de 200 $\mu\text{g/ml}$ de DEAE-dextrano. En la figura 13 se observa que en presencia de este polication todas las EcFtsZ forman láminas rectas o curvas que presentan un mayor contenido de protofilamentos que en ausencia de DEAE-dextrano. La EcFtsZ tipo silvestre forma polímeros más largos, curvos o rectos, en ausencia y presencia de DEAE-dextrano, respectivamente (figura 13e). El diámetro de las láminas de EcFtsZ tipo silvestre en presencia de DEAE-dextrano es casi el doble que en su ausencia. Esta característica también se observa en las láminas formadas por la EcFtsZ E83Q (figura 13f). Sin embargo, en esta mutante se observan láminas curvas en ausencia del polication que tienden a ser rectas y cortas en presencia de DEAE-dextrano. Los polímeros de EcFtsZ G67P en presencia de DEAE-dextrano mostraron láminas con un ancho mayor que las formadas por la EcFtsZ tipo silvestre y la mutante E83Q. El ancho de la lámina de la EcFtsZ G67P fue de 29,42 nm, lo que corresponde aproximadamente a 6 protofilamentos asociados. También se observó la presencia de anillos formados por 5 protofilamentos con un espesor

de 26,46 nm (figura 13g). La mutante EcFtsZ R85Q mostró escasos polímeros por campo en presencia de DEAE-dextrano como se puede observar en la figura 13h. No obstante, se pudo medir el diámetro de estos polímeros que fue de 14,3 nm, lo que corresponde a 3 protofilamentos asociados. Estas láminas fueron las de menor ancho al compararlas con las obtenidas para la EcFtsZ tipo silvestre (figura 13e) y las mutantes E83Q (figura 13f) y G67P (figura 13g).

DISCUSION

En este trabajo de tesis se construyeron tres mutantes de EcFtsZ, una en el "loop" S3-H3 (G67P) que le confiere rigidez al "loop", otra en la hélice H3 (E83Q) que elimina una carga negativa y otra en esta misma hélice (R85Q) que elimina una carga positiva. Se determinó que la sobrevivencia de las mutantes disminuía de la siguiente manera: E83Q > G67P > R85Q. Para explicar estos resultados se analizó la polimerización y la actividad GTPásica de las mutantes y por microscopía electrónica se encontró que el número de los polímeros de EcFtsZ por campo observado disminuía de la siguiente forma: E83Q > G67P > R85Q. También se comprobó que la actividad GTPásica disminuía en el siguiente orden: G67P > E83Q > R85Q. Estos resultados indican que solo hay relación directa entre la sobrevivencia y la polimerización de la proteína para las mutantes construidas.

Es importante destacar que los métodos utilizados hasta la fecha para evaluar el efecto de las mutaciones sobre la viabilidad de las células no son capaces de cuantificar niveles intermedios de funcionalidad asociada a la división celular, pues se cuantifica en términos del todo o nada. Es así, como se considera una mutante de EcFtsZ no funcional si las células en medio líquido, al incubar toda la noche a temperatura restrictiva (42 °C) no muestra turbidez y crecen como filamentos (Lu, et al., 2001, Bi y Lutkenhaus, 1990, Wang, et al., 1997). La metodología desarrollada en este trabajo de tesis hace posible

cuantificar la funcionalidad de la EcFtsZ en células en crecimiento mediante un protocolo sencillo como se detalla en Materiales y Métodos. La virtud de este método es que permite evaluar pequeñas diferencias en la viabilidad celular cuando se crece la mutante a temperatura restrictiva, porque al no expresarse la EcFtsZ tipo silvestre, la división celular se debe solamente a la EcFtsZ mutante. Esta característica es la que no se encuentra en los métodos habitualmente utilizados.

La carencia de una relación directa entre la actividad GTPásica y el porcentaje de sobrevivencia de las EcFtsZ mutantes no es un resultado sorprendente, pues existen mutantes de EcFtsZ que tienen severamente afectada la actividad GTPásica y la polimerización, pero aun son capaces de sobrevivir a temperatura restrictiva, como es el caso de la mutante Z84, cuando se sobreexpresa la EcFtsZ con la mutación G105S (Bramhill y Tompson, 1994). Lo mismo se observa en el caso de la mutante Z2, con la mutación de EcFtsZ en D212G, cuando no es sobreexpresada (Mukherjee, et al., 2001). En esta misma mutante la sobreexpresión de la EcFtsZ (D212G) induce la formación de polímeros y muestra una baja eficiencia en la hidrólisis de GTP (Mukherjee y Lutkenhaus, 1994, Mukherjee, et al., 2001). También existen mutantes que no sobreviven a temperatura restrictiva pero muestran actividad GTPásica y no son capaces de polimerizar, como la mutante FtsZ₃₂₀ (mutante trunca en el extremo carboxilo terminal) (Wang, et al., 1997). Estos resultados en su conjunto sugieren que la actividad GTPásica no es esencial para la función de la EcFtsZ y que la formación de polímeros es necesaria para que se lleve a cabo la

división celular. Nuestros resultados de sobrevivencia, polimerización y actividad GTPásica son consistentes con lo descrito anteriormente.

A continuación se discutirán en detalle los resultados correspondientes a cada una de las EcFtsZ mutantes en términos de su construcción, viabilidad y su respectiva caracterización de la polimerización y la actividad GTPásica, con el objeto de establecer una relación entre la estructura y la función de la proteína.

Construcción de las mutaciones puntuales en ftsZ. El alineamiento de las secuencias aminoacídicas de FtsZ, de trece organismos pertenecientes a ocho Familias diferentes (ver figura 14), muestra una alta conservación de aminoácidos en la región de la hélice H3 y un porcentaje menor en un "loop" formada entre S3-H3. No ha sido demostrada la participación de este "loop" en la actividad GTPásica ni en la formación de protofilamentos. En la secuencia del "loop" S3-H3 de EcFtsZ, formado por 14 residuo de aminoácidos, se encontró que 7 son residuo apolares conservados, de los cuales 5 son glicinas, que le confieren movilidad a este "loop". En general "loop" de este tipo son flexibles, se encuentran expuestos en la superficie de la proteína y participan en la interacción con otras proteínas (Janin y Wodak, 2002), como es el caso de la tubulina (Nogales, et al., 1999).

En la estructura modelada de EcFtsZ a partir de la estructura tridimensional de FtsZ de *M. jannaschii* (MjFtsZ) se puede observar que este "loop" se encuentra expuesto en la cara izquierda próxima a la hélice H3. Por lo tanto, dadas sus características y su cercanía a la hélice H3, se postuló que

Alineamiento de secuencias aminoacídicas de las FtsZ

Bacillus subtilis	-----	
Enterococcus hirae	-----	
Mycobacterium tuberculosis	-----	
Streptomyces coelicolor	-----	
Nostoc sp. PCC_P	-----MTLDNNQELTYRNSQSLGQPGFSLAVNSSN	30
Anabaena sp	-----	
cp_Guillardia theta	-----MYFTQN-----	6
p_Cyanidioschyzon merolae	-MNHRTPLSARGEARAAYAAFVPATGTVWSASRHRSGLGRSYFTASRPGTL	49
cp_Mallomonas splendens	-----	
p_Chlamydomonas reinhardtii	-----	
p_Oryza sativa	-----MASAACSSSA	10
Escherichia coli	-----	
mt_Mallomonas splendens	-----MRITGANRILSLSRIRHFSDGASLNKAFI	29
Bacillus subtilis	-----MLEFETNIDGLAS-----	13
Enterococcus hirae	-----MEFSIDNNINDGAV-----	14
Mycobacterium tuberculosis	-----MTPPHNY LAV-----	10
Streptomyces coelicolor	-----MAAPQNY LAV-----	10
Nostoc sp. PCC_P	PFNHSGLNFGQNNDSKKISVENNRIGEIVPGRVAN-----	65
Anabaena sp	-----MENNRIGEIVPGRVAN-----	16
cp_Guillardia theta	-IKCYQFDKKNIFKTIIN-KFRCRSQSLIKSNISEDSFFN-----QEISSS	49
p_Cyanidioschyzon merolae	QPHCSSRGRKRNVDWLRSMRVQANGASYPGRGNDRQLSSPLSSDSSAP	99
cp_Mallomonas splendens	-----	
p_Chlamydomonas reinhardtii	--MATLSVQRQRCVAPGARARAPARRLVRLYASSD-----	33
p_Oryza sativa	SALVRLTGP IHLCSAPPFRGSARRRHASVRCSEFAPVETAR-----	49
Escherichia coli	-----MFEFEMELTNDAV-----	12
mt_Mallomonas splendens	RSVKPGVKPEQYDSRSGNSSQAQSTEHVKDKFVEPGNLRFRTG-EYITTEF	78
Bacillus subtilis	---IKVIGVGGGGNAVNRMIEENEVQGVVEYIAVNTDAQALNLSK---AEVK	58
Enterococcus hirae	---IKVIGVGGGGNAVNRMIEENVKGEVFI TANTDVQALKNSK---AETV	59
Mycobacterium tuberculosis	---IKVVGIGGGGNAVNRMIEQGLKGVFI INTDAQALLMSD---ADVK	55
Streptomyces coelicolor	---IKVIGVGGGGNAVNRMIEVGLKGVFI INTDAQALLMSD---ADVK	55
Nostoc sp. PCC_P	---IKVIGVGGGGNAVNRMIESDVSQGVFEFWSINTDAQALTLAG---APSR	110
Anabaena sp	---IKVIGVGGGGNAVNRMIESDVSQGVFEFWSINTDAQALTLAG---APSR	61
cp_Guillardia theta	PCVKVIGVGGGGNAVNRMVVG-GVEGVFEFWSINTDAQALRSR---LAPNT	96
p_Cyanidioschyzon merolae	PCLIKVIGVGGGGNAVNRMADTGISGVFEFWSINTDVQALKRS---AAHHT	147
cp_Mallomonas splendens	-----GVELWVVNTDAQALRSR---SAKRR	22
p_Chlamydomonas reinhardtii	QAI IKVLGVGGGGNAVNRMVNSDVSQGVFEFWSINTDAQALATSPVNGKCK	83
p_Oryza sativa	---IKVVGVGGGGNAVNRMIGSGLQGEFFYIAINTDSQALLNS---QAQYP	94
Escherichia coli	---IKVIGVGGGGNAVEHMRERIEGVFEFVAVNTDAQALRKTA---VGQT	57
mt_Mallomonas splendens	LPKICVFGVGGGGNAVNRMIAARKLSGVFEFVCANTDAQHLSTCL---TENK	126
: *** * *		
Bacillus subtilis	MQIGAKLTRGLGAGANPEVGGKAAEESKEQIEEALKGADMVFTAGMGGG	108
Enterococcus hirae	IQLGPKYTRGLGAGSQFVGGKAAEESQALREALDGDAMI FITAGMGGG	109
Mycobacterium tuberculosis	LDVGRDSTRGLGAGADPEVGRKAAEDAKDEIEELLRGADMVFTAGEGGG	105
Streptomyces coelicolor	LDVGRELTRGLGAGANPAVGRKAAEDHREEIEEVLKADMVFTAGEGGG	105
Nostoc sp. PCC_P	LQIGQKLTRGLGAGGNPAIGKAAEESRDEIATALEGADLVFITAGMGGG	160
Anabaena sp	LQIGQKLTRGLGAGGNPAIGKAAEESRDEIATALEGADLVFITAGMGGG	111
cp_Guillardia theta	CNIGAKLTRGLGAGGNPEIGRKAEEESRDIAEAVSAGDLVFTAGMGGG	146
p_Cyanidioschyzon merolae	LSIGNKLTRGLGAGGNPEVGRKAAEESCDQIAEAVRGADLVFTAGMGGG	197
cp_Mallomonas splendens	LNIGKVLSTRGLGAGGNPAIGAKAAEESREEIMAVVKNADLVFTAGMGGG	72
p_Chlamydomonas reinhardtii	VQIGGKLTRGLGAGGNPEIGAKAAEESRDSIAAALQDTMVFVFTAGMGGG	133
p_Oryza sativa	LQIGEQLTRGLGTGGNPNLGEQAAEESKEAIANALKDSDLVFITAGMGGG	144
Escherichia coli	IQTGSGITKGLGAGANPEVGRNAEDEDRLRALRLEGADMVFTAGMGGG	107
mt_Mallomonas splendens	LQLGKSTQGLGCGANPESGRRRAEESKEELARYIADANMVFITAGMGGG	176
.:* ::* *:* * .*: : : : : :*::* * * *		
Bacillus subtilis	TGTGAAPVIAQIAKDLGALTVGVVTRPFTFEGRKR--QLQAAGGISAMKE	156
Enterococcus hirae	TGTGAAPIVAGIAKELGALTVGVVTRPFTFEGPKR--GRFAAEGIARLKE	157
Mycobacterium tuberculosis	TGTGGAPVVASIARKLGAITVGVVTRPFSFEGKRR--SNQAENGIAALRE	153
Streptomyces coelicolor	TGTGGAPVVAIARSIGALTVGVVTRPFTFEGRRR--ANQAEDGIAELRE	153
Nostoc sp. PCC_P	TGTGAAPIVAEVAKEMGALTVGVVTRPFFVEGRRR--TSQAEQIEGLKS	208
Anabaena sp	TGTGAAPIVAEVAKEMGALTVGVVTRPFFVEGRRR--TSQAEQIEGLKS	159
cp_Guillardia theta	TGSGAAPIVAEVAKEMGCLTVGVVTKPFAFEGKRR--MQQANDAILNLRN	194
p_Cyanidioschyzon merolae	TGSGAAPVVAEAREQGCLTVGVVTKPFAFEGKRR--MQQALEAIEALRE	245
cp_Mallomonas splendens	TGSGAAPVVAECAKEAGALTVGVVTKPFGFEGKRR--MQQARNAILMKD	120
p_Chlamydomonas reinhardtii	TGSGAAPVVAEVARELGLITVGLVTPFTFEGRQR--AQQARSALANLRA	181
p_Oryza sativa	TGSGAAPVVAQISKEAGYLTGVVTPFFSFEGRKRSLOASALEALEKLR	194
Escherichia coli	TGTGAAPVVAEVAKDLGILTVAVVTKPFNFEGKRR--MAFAEQGIELESK	155
mt_Mallomonas splendens	TGTGAAPVVAEVCMEKDLTVAVVTKPFSFEGKRR--ARLANEGIRSLD	224
::*:*:* . . . *:*:*:* * * * * * * : : :		

Bacillus_subtilis	-----HTSQPADDTLDIPTFLNRNRKRG-	382
Enterococcus_hirae	-----ETKAKGDDELSTPPFFRSK----	413
Mycobacterium_tuberculosis	-----GDDDDVDVPPFMRR-----	379
Streptomyces_coelicolor	-----RTYSDSAAEELDVDFLK-----	399
Nostoc_sp._PCC__P	-----LDIPDFLQRRRPPKN	428
Anabaena_sp	-----LDIPDFLQRRRPPKN	379
cp_Guillardia_theta	-----DLWKKFY----	398
p_Cyanidioschyzon_merolae	VPPENRQVTPPPPQFGPSRTIGNIPDFLRRFQK---	503
cp_Mallomonas_splendens	----SKERDQDGKKDEKPKGGGFRGFIKRLFS---	368
p_Chlamydomonas_reinhardtii	----PVTTAAPETPPGASSSGVEIPAFLLRRRVQGK	434
p_Oryza_sativa	-----AATWSRRLFS---	404
Escherichia_coli	-----DYLDIPAFLLRQAD---	383
mt_Mallomonas_splendens	-----	

Figura 14. Alineamiento de secuencias aminoacídicas de las FtsZ. En los recuadros se indican las secuencias aminoacídicas que corresponden a las estructuras secundarias donde se encuentran las mutaciones. El primer recuadro muestra el "loop" S3-H3 y el segundo la hélice H3.

ambas estructuras participarían en las interacciones longitudinales o laterales, necesarias para la formación del polímero de EcFtsZ.

Las tres mutantes construidas suplementan el trabajo que se ha hecho con mutantes de EcFtsZ para entender las interacciones que median la formación de polímeros, pues estas interacciones han permanecido veladas. En la tabla VIII se ha hecho un resumen de las mutantes de EcFtsZ utilizadas con el propósito de conocer la relación entre la estructura y la función. En ella se muestran las características en cuanto a la viabilidad de las mutantes, la polimerización y la actividad GTPásica de EcFtsZ de cada una de ellas.

En esta tabla se muestran las características de las mutantes de EcFtsZ existentes hasta la fecha. En la columna 2 y 3 se puede observar la localización de las mutaciones introducidas en la estructura terciaria y secundaria, respectivamente. La localización de las mutaciones en la estructura terciaria se indica de acuerdo a su homología estructural con la tubulina (Nogales, et al., 1999). La tubulina de acuerdo a su localización en los microtúbulos presenta un "arriba" en la β -tubulina que corresponde a la superficie de contacto entre esta y la α -tubulina vecina en el sentido - a + en un protofilamento, o el "arriba" de la α -tubulina que corresponde a la superficie de contacto con la β -tubulina en el heterodímero (Amos, 2000). Se define un "frente" como la superficie expuesta de la tubulina hacia el exterior del microtúbulo y un lado "izquierdo" que corresponde a la superficie entre protofilamentos a la izquierda al mirar el microtúbulo desde el exterior. La misma nomenclatura se utiliza para la FtsZ al

Tabla VIII. Resumen de las características de las mutantes de EcFtsZ.

n° aa, Ec FtsZ ^a	localización ^b	est. secundaria ^c	complementación ^d	hidroliza GTP ^e	polimerización ^f
tipo silvestre					
A70T (Z1)	arriba	S3 - H3	+	100%	P ^g (3) (Lu, et al., 2001)
A81V/F268C (Z100)	arriba	H3/loop S8 - H10	+ (Bi y Lutkenhaus, 1990)	< 10 % (Dai, et al., 1994)	PF ^h (Lu, et al., 2001)
D158A	frente	loop H5 - S6	+ (Bi y Lutkenhaus, 1990)	15 % (Dai, et al., 1994)	no determinado
D158N	frente	loop H5 - S6	+ (Lu, et al., 2001)	150 % (Wang, et al., 1997)	PF (Lu, et al., 2001)
D187A	atras	H7	+ (Lu, et al., 2001; Wang, et al., 1997)	no determinado	no determinado
F268C (Z114)	abajo	loop S8 - H10	+ (Lu, et al., 2001)	no determinado	PF (Lu, et al., 2001)
D269A	abajo	loop S8 - H10	+ (Bi y Lutkenhaus, 1990)	70 % (Dai, et al., 1994)	no determinado
D299A	atras	loop S9 - S10	+ (Lu, et al., 2001)	10 % (Lu, et al., 2001)	PF (Lu, et al., 2001)
N43D	arriba-GTP	S2	+/?	200 % (Lu, et al., 2001)	no determinado
D45A	arriba-GTP	S2	- (Lu, et al., 2001)	31 % (Wang, et al., 1997)	no determinado
D45N	arriba-GTP	S2	- (Lu, et al., 2001)	5 % (Lu, et al., 2001)	NF ^g (Lu, et al., 2001)
G105S (Z84)	arriba-GTP	loop S4 - H4 (T3)	- (Lu, et al., 2001)	5 % (Wang, et al., 1997)	no determinado
T108A(Z3)	arriba-GTP	loop S4 - H4 (T3)	- (Bramhill y Park, 1994)	aprox 10 % (Raychaudhuri y Park, 1992)	NF (Bramhill y Thompson, 1994)
N165D/Y	arriba-GTP	H6	- (Dai, et al., 1994)	< 10 % (Dai, et al., 1994)	NF (Mukherjee, et al., 1994)
N207D	abajo-GTP	loop H7 - H8	- (Wang, et al., 1997; Lu, et al., 2001)	17 % (Wang, et al., 1997)	no determinado
D209A	abajo-GTP	loop H7 - H8	- (Wang, et al., 1997; Lu, et al., 2001)	5 % (Wang, et al., 1997)	no determinado
D209N	abajo-GTP	loop H7 - H8	- (Lu, et al., 2001)	7 % (Lu, et al., 2001)	PF (Lu, et al., 2001)
D212G(Z2)	abajo-GTP	H8	+ (Mukherjee, et al., 2001)	no determinado	no determinado
D212A	abajo-GTP	abajo-GTP	+ (Lu, et al., 2001)	0,5 % (Trusca, et al., 1998)	P (Mukherjee, et al., 1994), NF (Lu, et al., 2001)
D212N	abajo-GTP	abajo-GTP	- (Lu, et al., 2001)	7 % (Lu, et al., 2001)	NF (Lu, et al., 2001)
D212C	abajo-GTP	abajo-GTP	no determinado	38 % (Scheffers, et al., 2001)	P (Scheffers, et al., 2001)
D212E	abajo-GTP	abajo-GTP	no determinado	10,8 % (Scheffers, et al., 2001)	P (Scheffers, et al., 2001)
G67P	izquierda	S3 - H3	no determinado	10,8 % (Scheffers, et al., 2001)	no determinado
E83Q	izquierda	H3	1,4 % (en esta tesis) ^h	60 % (en esta tesis) ^h	P (2) y anillos (en esta tesis)
R85Q	izquierda	H3	10 % (en esta tesis)	39 % (en esta tesis) ^h	P (2) (en esta tesis)
D86K	izquierda	H3	0,5 % (en esta tesis)	4,5 % (en esta tesis) ^h	NF (en esta tesis)
D96A	izquierda	loop H3 - S4	-	49%	Polímero (2) y T ^g (Lu, et al., 2001)
D166K/F268V	derecha	H6/loop S8 - H10	-	no determinado	PF (Lu, et al., 2001)
E238A	derecha	H9	-	15%	PF (Lu, et al., 2001)
S245F	derecha	H9	-	145%	PF (Lu, et al., 2001)
E250A	derecha	loop H9 - S9	-	75%	PF y T (Lu, et al., 2001)
E250A/D253K	derecha	loop H9 - S9	-	67%	PF (Lu, et al., 2001)
			-	23%	PF (Lu, et al., 2001)

^a Aminoácido mutado, entre paréntesis se indica el nombre común de algunas mutantes.

^b Ubicación de la mutación en la estructura tridimensional de la EcFtsZ. La localización de las mutaciones en EcFtsZ corresponde con la de la tubulina en los microtúbulos, de acuerdo a como se describe en el texto: arriba, superficie de contacto de la EcFtsZ que une GTP con el siguiente monómero; frente, superficie expuesta hacia afuera en el microtúbulo; atrás, superficie hacia el interior del microtúbulo; arriba-GTP, zona de la superficie de arriba que hace contacto con GTP; abajo-GTP, zona de la superficie de abajo que hace contacto con GTP; izquierda, superficie izquierda del protofilamento en el microtúbulo.

^c Ubicación de la mutación en la estructura secundaria de la EcFtsZ.

^d Funcionalidad in vivo de las EcFtsZ mutantes, (+) muestra turbidez en un medio líquido crecido toda la noche a 42 °C, (-) no muestra turbidez a 42 °C crecidas toda la noche.

^e Los porcentajes de la actividad GTPásica in vitro de las EcFtsZ mutantes están referidos a la de tipo silvestre.

^f Tipo de polímero de EcFtsZ, entre paréntesis se muestra el número de protofilamentos.

^g P = polímero de varios protofilamentos asociados; PF = un solo protofilamento; NF = no se observan filamentos; T = túbulos.

^h Valor obtenido de la razón entre las constantes catfíticas, donde un 100 % corresponde a la de EcFtsZ tipo silvestre.

La bibliografía correspondiente se indica entre paréntesis.

superponer su estructura tridimensional con la de la tubulina. En la columna 4, 5 y 6 se muestran la viabilidad representada como complementación a temperatura restrictiva, el porcentaje de actividad GTPásica con respecto al tipo silvestre y la polimerización *in vitro*, respectivamente. Debido a que la viabilidad de las mutantes de EcFtsZ generadas en este trabajo de tesis se representaron en porcentaje de sobrevivencia se hace difícil comparar nuestros resultados con la viabilidad de las mutantes que se listan en la tabla VIII. Por esto, se comparará el efecto de las mutaciones introducidas sobre la actividad GTPásica y la polimerización.

Las mutaciones en las regiones de la cara de “abajo” de la EcFtsZ que no presentan un contacto directo con la superficie expuesta hacia arriba del sitio del nucleótido, las mutaciones en la superficie del “frente” y de “atrás”: son viables, forman polímeros y muestran actividad GTPásica. Como se había señalado antes, la actividad GTPásica no muestra correlación directa con respecto a la viabilidad, pues en algunas mutantes la actividad se ve inducida y en otras disminuida. Esto sugiere que las mutaciones en las regiones antes mencionadas no afectan la función de la EcFtsZ en la división celular.

Las mutaciones introducidas en el sitio del nucleótido “arriba” y la región de contacto con el sitio del nucleótido, “abajo”, tienen una actividad GTPásica reducida, en un intervalo de 5 a 38 %, todas no forman polímeros a diferencia de las mutaciones introducidas al aspartato 209 (D209) y 212 (D212), que participan en la activación de la hidrólisis de GTP. Todas las mutantes que se muestran en la tabla, excepto D212 son letales. Esto indica que las mutaciones

en las dos zonas de contacto en la región del sitio del nucleótido, aunque inhiben la actividad GTPásica no son esenciales para la polimerización. Por esto, concluimos que la actividad GTPásica es una consecuencia de la polimerización y su papel más bien es importante para la despolimerización.

Las mutaciones en las caras laterales muestran actividad GTPásica, polimerizan *in vitro* pero no son capaces de complementar *in vivo*. Estos resultados sugieren que estas zonas son necesarias para la función de la EcFtsZ en la división celular. Una explicación razonable es que de manera indirecta las mutaciones afectan la estabilidad del anillo Z *in vivo*. El carboxilo terminal de la EcFtsZ interactúa de manera directa con la FtsA y la ZipA (Errington, et al., 2003; Ohashi, et al., 2002), que son proteínas que forman parte del divisoma (figura 1). Se piensa que la interacción de la EcFtsZ con las dos proteínas estabiliza el anillo Z, por tanto una de las posibilidades es que la zona donde se introdujeron las mutaciones afecte la interacción con estas dos proteínas y con esto disminuya la estabilidad del anillo. Las dos mutantes que afectan la hélice H3 de la cara lateral izquierda, glutamato 83 y arginina 85, como se muestra en los resultados, reducen la viabilidad en un orden de magnitud y 3 órdenes de magnitud, respectivamente, con respecto al tipo silvestre. Estos resultados hacen compatible la funcionalidad de la EcFtsZ con la viabilidad de las mutantes. Es interesante mencionar que si se hubiese usado el método convencional de complementación, base de los resultados presentados en la tabla VIII, estas mutantes no hubiesen sido viables. Por esto,

pensamos que se hace necesario revisar los datos de la tabla VIII y compararlos con los obtenidos al usar la metodología introducida en esta tesis.

¿Cómo podemos explicar entonces el efecto de las mutaciones en términos más moleculares?

Las mutaciones E83Q y R85Q se encuentran en la región denominada hélice H3 que está formada por 2 hélices que tienen un total de 5 vueltas. Entre la tercera y la cuarta vuelta existe un pequeño quiebre de la hélice, donde se encuentran estos aminoácidos, expuestos en la superficie (EcFtsZ modelada por Arbildua y Nova, resultados no publicados).

El efecto del cambio del glutamato en la mutante EcFtsZ E83Q se puede explicar de la siguiente manera: el glutamato es un aminoácido de cadena lateral del mismo largo que la glutamina y capaz de formar puentes de hidrógeno con dadores de hidrógeno que calcen con los oxígenos del grupo carboxilo, como la arginina, con quién también forma un puente salino. La glutamina también puede formar puentes de hidrógenos y no forma un puente salino, la diferencia radica en que el glutamato posee un oxígeno en lugar del grupo NH_2 de la glutamina. Esta mutación puede influir sobre la interacción lateral, si esta es favorecida por una interacción electrostática a distancia en que participa la carga del glutamato. Si el quiebre de la hélice H3 participa en la interacción lateral y se encuentra estabilizado por la carga del glutamato, la mutación puede inducir un cambio conformacional en esta región de la hélice, que desestabilice la interacción lateral. Por lo tanto, cualquiera de estas dos situaciones por sí solas o en su conjunto explican la disminución de la

polimerización debido a un debilitamiento de la interacción lateral, como muestran los resultados de microscopía electrónica, donde el número promedio de protofilamentos es menor en la mutante. El aumento de la concentración crítica de la mutante E83Q apoya esta hipótesis, pues es producto de una disminución de la polimerización.

Las mismas explicaciones dadas para la mutante E83Q son válidas para la mutante R85Q, pues la arginina posee una cadena lateral más larga que la glutamina, puede formar un puente salino y dos puentes de hidrógeno a través del grupo guanidinio, a diferencia de la glutamina que solo puede formar dos puentes de hidrógeno, a través de su grupo amida. Al término de las primeras tres vueltas de la hélice H3, en el sentido amino → carboxilo terminal, se encuentra el aminoácido D82. La secuencia del quiebre de la hélice H3 que contiene a la arginina es E83D84R85 y al comienzo de las dos últimas vueltas de la misma hélice está el aminoácido D86. Una explicación plausible para la formación del quiebre es la concentración de aminoácidos con cargas negativas, que se ve interrumpida por la arginina 85 que estabiliza la formación de las dos últimas vueltas de la hélice H3. El cambio de la arginina por glutamina puede tener un efecto desestabilizante sobre las últimas dos vueltas que podría ser el responsable de la pérdida de interacción lateral por el cambio conformacional inducido. El efecto de las dos mutaciones sobre la interacción lateral se puede explicar por una disminución de la constante de equilibrio de elongación que es inversamente proporcional a la concentración crítica, como

se observa para la mutante E83Q (figura 12). Ha sido demostrado que DEAE-dextrano favorece la formación de polímeros con un mayor número de protofilamentos que dan origen a sábanas y túbulos (Bramhill y Thompson, 1994, Erickson, et al., 1996). Las dos mutantes en presencia de este polication también forman polímeros con un número mayor de protofilamentos, sin embargo, su número sigue siendo menor que el de la EcFtsZ silvestre en presencia del polication, lo cual es congruente con la mutación que afecta la interacción lateral, tabla VII. Estos resultados son consistentes con los encontrados para la mutante D86K donde la pérdida de una carga negativa es menos significativa que la pérdida de una carga positiva en la hélice H3, resultados similares a los de la mutante EcFtsZ E83Q (Lu, et al., 2001).

La mutación G67P se encuentra en el "loop" S3-H3, segmento precedente a la hélice H3. Este "loop" que también está presente en la MjFtsZ posee una gran movilidad debido a la presencia de varias glicinas (Díaz, et al., 2001). La cadena lateral de la glicina es un hidrógeno que permite una mayor movilidad de la cadena peptídica debido a su menor restricción en los ángulos dihedros, a diferencia de la prolina, por la cual fue sustituida. Esta sustitución podría impedir en parte un cambio conformacional del "loop" necesario para la interacción lateral, desfavoreciendo así la formación de polímeros (figura 13c). Sustituciones aminoacídicas que no afectan la movilidad del "loop" S3-H3 no presentan un mayor efecto sobre la polimerización de la EcFtsZ, como ha sido demostrado con la mutante EcFtsZ A70T (Z1), donde el aminoácido alanina ha sido sustituido por treonina en este mismo "loop" (Lu, 2001).

Como se mencionó antes, ha sido demostrado que la actividad GTPásica de la EcFtsZ es dependiente de su polimerización. Los resultados obtenidos con las mutaciones introducidas tanto en la hélice H3 como en el "loop" S3-H3, confirman este hecho. Es así, como en las mutantes EcFtsZ E83Q y R85Q, la disminución de la actividad GTPásica, podría deberse a que la conformación EcFtsZ-GDP (polímero curvo) es más estable que la conformación EcFtsZ-GTP (polímero recto) lo que disminuiría la velocidad de despolimerización, ver esquema en la figura 15. Esto tendría como consecuencia una disminución de la actividad GTPásica (figura 8), debido a que el intercambio de GDP por GTP se vería desfavorecido al disminuir la especie monomérica EcFtsZ-GDP y en esta situación debieran predominar los polímeros curvos, como se muestra en la figura 13b.

El efecto de la mutación en la EcFtsZ R85Q se puede explicar por un aumento de la velocidad de despolimerización respecto a la EcFtsZ E83Q y una disminución de la velocidad de la polimerización. Un aumento de la velocidad de despolimerización debiera aumentar la velocidad de hidrólisis de GTP y disminuir el número de polímeros. Una disminución de la velocidad de polimerización debiera disminuir la actividad GTPásica y hacerla más dependiente de la concentración de la proteína, como se muestra en el esquema de la figura 15. Los resultados apoyan la segunda opción, pues el período de latencia de la actividad GTPásica disminuye al aumentar la concentración de proteína y esto induce un aumento de la velocidad de hidrólisis de GTP, figura 9.

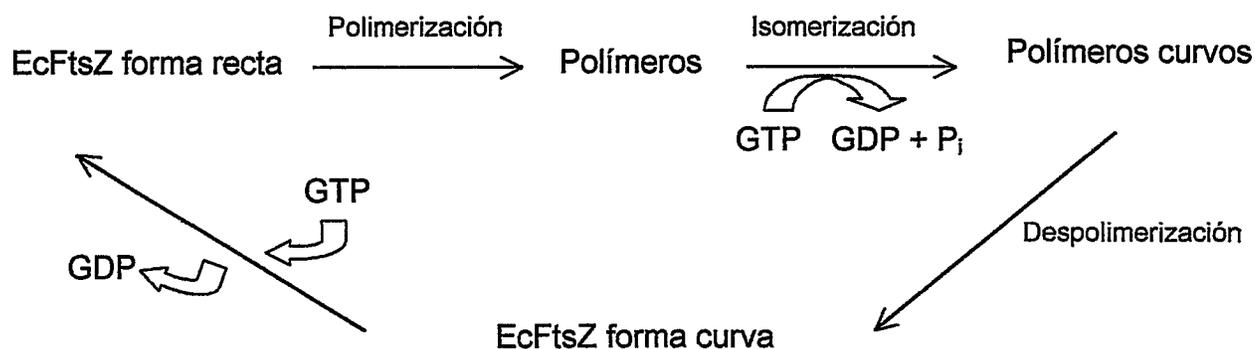


Figura 15. Modelo propuesto para la dinámica de la polimerización y de la despolimerización de la FtsZ de *Escherichia coli*. La forma recta de la EcFtsZ con GTP unido, polimeriza para dar origen a polímeros, los cuales inducen la hidrólisis de GTP y a través de la isomerización de la proteína se curvan los polímeros. Esta forma es inestable y se despolimeriza generando la forma curva de la EcFtsZ que tiene unido GDP. El intercambio del GDP por el GTP origina la forma EcFtsZ recta y se reinicia el ciclo.

Se ha postulado por modelamiento que el "loop" S3-H3 de la MjFtsZ participa en forma directa en la unión del fosfato gamma del GTP y que su movilidad juega un papel importante en la hidrólisis de GTP (Díaz, et al., 2001). De este modo, una restricción de la movilidad de este "loop" debiera afectar en forma significativa la actividad GTPásica. La movilidad de este "loop" en la EcFtsZ G67P debiera ser menor, sin embargo se encontró que la actividad GTPásica se conserva en un 60 % respecto a la de tipo silvestre.

CONCLUSIONES

1. Los aminoácidos glicina 67, glutamato 83 y arginina 85 son esenciales para el mantenimiento de la estructura funcional de la EcFtsZ en el proceso de la división celular.
2. Los residuo de aminoácidos glicina 67, glutamato 83 y arginina 85 tienen relación con la actividad GTPásica a través del mantenimiento de una conformación dependiente de la fosforilación del nucleótido.
3. Las regiones de la proteína correspondiente a la hélice H3 y al "loop" S3-H3 participan en la actividad GTPásica y en la polimerización de la EcFtsZ.
4. En la región de la hélice H3 una posible interacción electrostática y la formación de puentes de hidrógeno serían necesarios para la actividad GTPásica y la polimerización. La flexibilidad del "loop" S3-H3 es requerida para ambas actividades
5. La polimerización es necesaria para la inducción de la actividad GTPásica.

BIBLIOGRAFIA

- Addinall, S. G. y Holland, B. 2002. The tubulin ancestor, FtsZ, draughtsman, designer and driving force for bacterial cytokinesis. *J. Mol. Biol.* **318**: 219-236.
- Amos, L. A. 2000. Focusing-in on microtubules. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**:236-41.
- Bi, E. y Lutkenhaus, J. 1990. Analysis of ftsZ Mutations That confer resistance to the cell division inhibitor SulA (Sfi A). *J. Bacteriol.* **172**: 5602-5609.
- Bi, E. y Lutkenhaus, J. 1991. FtsZ ring structure associated with division in *Escherichia coli*. *Nature.* **354**: 161-164.
- Bi, E. y Lutkenhaus, J. 1992. isolation and characterization of ftsZ alleles that affect septal morphology. *J. Bacteriol.* **174**: 5414-5423.
- Bramhill, D. y Thompson, C. T. 1994. GTP-dependent polymerization of *Escherichia coli* FtsZ protein to form tubules. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**: 5813-5817.
- Dai, K., Mukherjee, A., Xu, Y. y Lutkenhaus, J. 1994. Mutations in ftsz that confer resistance to SulA affect the interaction of FtsZ with GTP. *J. Bacteriol.* **175**: 130-136.
- de Boer, P., Crossley, R. y Rothfield, L. 1992. The essential bacterial cell-division protein FtsZ is a GTPase. *Nature.* **359**: 254-256.
- Díaz, J. F., Kralicek, A., Mingorance, J., Palacios, J. M., Vicente, M., y Andreu, J. M. 2001. Activation of cell division protein FtsZ controls of switch loop T3 conformation by the nucleotide γ -phosphate. *J. Biol. Chem.* **276**: 17307-17307.
- Erickson, H. P. 1997. FtsZ, a tubulin homologue in prokaryote cell division. *Trens in Cell Biology.* **7**: 362-367.

- Erickson, H. P. y Stoffler, D. 1996. Protofilaments and rings, two conformations of the tubulin family conserved from bacterial FtsZ to α/β and γ tubulin. *J. Cell Biol.* **135**: 5-8.
- Erickson, H. P., Taylor, D. W., Taylor, K. A. y Bramhill, D. 1996. Bacterial cell division protein FtsZ assembles into protofilament sheets and minirings, structural homologs of tubulin polymers. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**: 519-523.
- Errington, J., Daniel, R. A., y Scheffers, D. 2003. Cytokinesis in bacterias. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**: 52-65.
- Gilson, P. R. y Beech P. L. 2001. Cell division protein FtsZ: running rings around bacteria, chloroplasts and mitochondria. *Res. Microbiol.* **152**: 3-10.
- Janin, J. y Wodak, S. 2002. Structural basis of macromolecular recognition. *Adv. Protein Chem.* **61**: 9-73.
- Löwe, J. y Amos, L. 1998. Crystal structure of the bacterial cell-division protein FtsZ. *Nature.* **391**: 203-206
- Lu, C., Reedy, M. y Erickson, H. 2000. Straight y curved conformations of FtsZ are regulated by gtp hydrolysis. *J. Bacteriol.* **182**: 164-170.
- Lu, C., Stricker, J. y Erickson, H. 2001. Site-specific mutations of FtsZ – effects on GTPase and in vitro assembly. *BMC Microbiology.* **1**:7. <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/1/7>
- Margolin, W. 1998. A green light for the bacterial cytoskeleton. *Trends in Microbiology.* **233**: 513-514
- Murkherjee, A. y Lutkenhaus, J. 1994. guanine nucleotide-dependent assembly of FtsZ into filaments. *J. Bacteriol.* **176**: 2754-2758.
- Murkherjee, A. y Lutkenhaus, J. 1998. Purification, assembly, and localization of FtsZ. *Methods Enzymol.* **298**: 296-305.
- Mukherjee, A., Saez, C. y Lutkenhaus, J. 2001. Assembly of an FtsZ Mutant Deficient in GTPase Activity has implications for FtsZ assembly and the role of the z ring in cell division. *J. Bacteriol.* **183**: 7190-7197.

- 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., Whittaker, M., Milligan, R. y Downing, K. 1999. High-Resolution model of the microtubule. *Cell* **96**:79-88
- Nova, E. y Monasterio, O. 2001. Unión de 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), al monómero y al oligómero de FtsZ de *E. coli*. XXIV Reunión Anual Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile.
- Ohashi, T., Hale, C. A., de Boer, P. A. y Erickson, H. 2002. Structural evidence that the p/q domain of ZipA is an unstructured, flexible tether between the membrane and the c-terminal FtsZ-binding domain. *J. Bacteriol.* **184**: 4313-4315.
- Pace, C. N., y Schmid, F. X. (1997). en *Protein Structure: A Practical Approach* (Creighton, T., ed) 2da Ed. Pp. 253-259. Oxford University Press, Oxford.
- Pichoff, S. y Lutkenhaus, J. 2002. Unique y overlapping roles for ZipA y FtsA in septal ring assembly in *Escherichia coli*. *The EMBO Journal.* **21**: 685-693.
- Pla, J., Sánchez, M., Palacios, P., Vicente, M. y Aldea, M. 1991. Preferencial cytoplasmic location of FtsZ, a protein essential for *Escherichia coli* septation. *Mol. Microbiol.* **5**: 1681-1686.
- RayChaudhuri, D. y Park, J. T. 1992. *Escherichia coli* cell-division gene *ftsZ* encode a novel GTP-binding protein. *Nature.* **359**: 251-254.
- Rivas, G., López, A., Mingorance, J., Ferrándiz, 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. *J. Biol. Chem.* **275**: 11740-11749.
- Scheffers, D., de Wit, J. G., den Blaauwen, T. y Driessen, J. M. 2001. Substitution of a conserved aspartate allows cation-induced polymerization of FtsZ. *FEBS Lett.* **494**: 34-37
- Sossong, Jr. T., Brigham-Burke, M., Hensley, P. y Pearce, Jr. K. 1999. Self activation of guanosine triphosphatase activity by oligomerization of the bacterial cell division protein FtsZ. *Biochemistry* **38**: 14843-14850.

- Sun, Q. y Margolin, W. 1998. FtsZ dynamics during the division cycle of live *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **180**: 2050-2056.
- Trusca, D., Solomon, S., Thompson, C. y Bramhill, D. 1998. Bacterial SOS checkpoint protein SulA Inhibits polymerization of purified FtsZ cell division protein. J. Bacteriol. **180**: 3946-3953.
- Wang, S., Huang, J., Mukherjee, A., Cao, C. y Lutkenhaus, J. 1997. Analysis of the interaction of FtsZ with itself, GTP, and FtsZ. J. Bacteriol. **179**: 5551-5559.