

Estado de la publicación: No informado por el autor que envía

# CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE DOS TRÍMEROS DE LA PROTEÍNA DE LA DIVISIÓN CELULAR BACTERIANA (FtsZ) DE *E. coli*.

Nelson Alexander Araujo Alvarez, Marcelo Veloso, Luis Pouchucq

<https://doi.org/10.1590/SciELOPreprints.7828>

Enviado en: 2024-01-02

Postado en: 2024-01-16 (versión 1)

(AAAA-MM-DD)

La moderación de este preprint recibió lo endoso de:

Jose Bubis (ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8839-6745>)

1 **TITULO (Español): CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE DOS TRÍMEROS DE**  
2 **LA PROTEÍNA DE LA DIVISIÓN CELULAR BACTERIANA (FtsZ) DE *E. coli*.**

3 Nelson A. ARAUJO<sup>1\*</sup>, Marcelo VELOSO<sup>2</sup>, Luis POUCHUCQ<sup>3</sup>.

4 <sup>1</sup>Escuela de Ciencias Agroalimentarias, Animales y Ambientales, Universidad de  
5 O'Higgins, Campus Colchagua, San Fernando, Chile.

6 <sup>2</sup>Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

7 <sup>3</sup>Laboratorio de Biotecnología Vegetal y Ambiental Aplicada, Universidad Tecnológica  
8 Metropolitana, Santiago, Chile.

9 Nelson A. Araujo (Magíster en Química y Doctor en Química).

10 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-8031-9219>

11 Marcelo Veloso (Magíster en Biotecnología).

12 ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0007-4225-0170>

13 Luis Pouchucq (Doctor en Ciencias Biológicas).

14 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-1731-5976>

15 \*Autor para correspondencia:

16 Dirección postal: Avenida Manuel de Salas 655, departamento 86, Ñuñoa, Santiago, Chile,  
17 Código postal 7750000.

18 Correo electrónico institucional: [nelson.araujo@uoh.cl](mailto:nelson.araujo@uoh.cl)

19 **RESUMEN** (*Maximo 250 palabras*)

20 La FtsZ es una proteína del divisoma bacteriano responsable de la formación del anillo Z  
21 en la citocinesis. La caracterización de los oligómeros de la proteína FtsZ de *Escherichia*  
22 *coli* (EcFtsZ) en su estado nativo es un desafío porque la proteína se encuentra como un  
23 multioligómero en equilibrio de autoasociación-disociación. Nosotros caracterizamos el

24 estado trimérico de la EcFtsZ a través de técnicas de PAGE nativo, cromatografía de  
25 filtración en gel y gradiente de sacarosa combinada con entrecruzamiento químico. Los  
26 resultados por filtración indican que el trímero de EcFtsZ tiene una masa molecular de  
27 ~131 kDa y un coeficiente de fricción por filtración ( $R_s/R_{min}$ ) igual a 1.9, mientras que el  
28 coeficiente de fricción por filtración teórico ( $f_n/f_1$ ) calculado para un trímero lineal arrojó  
29 un valor igual a 1.8 que está muy cercano al valor experimental. Por otro lado, la EcFtsZ  
30 entrecruzada con formaldehído presentó una banda de ~128 kDa reconocida por  
31 anticuerpos anti-FtsZ y un coeficiente de fricción por sedimentación ( $S_{max}/S_{20,w}$ ) igual a 1.9,  
32 mientras que el coeficiente de fricción por sedimentación teórico ( $S_n/S_1$ ) calculado para un  
33 trímero triangular resultó igual a valor experimental. Estos resultados sugieren que la  
34 EcFtsZ tiene dos estructuras homotriméricas (lineal y triangular). Finalmente, reportamos la  
35 agregación de la EcFtsZ a concentraciones micromolares de Capsaicina sin GTP y  $Mg^{2+}$ .

36

37 **Palabras Clave:** Capsaicina, coeficiente de fricción, PAGE nativo, Proteína FtsZ,  
38 trímeros.

39

40 **TITLE (Inglés): Biochemical characterization of two trimers of the bacterial cell**  
41 **division protein (FtsZ) from *E. coli***

42

#### ABSTRACT

43 FtsZ is a bacterial divisome protein responsible for Z-ring formation in cytokinesis.  
44 Characterization of *Escherichia coli* FtsZ protein oligomers (EcFtsZ) in native conditions is  
45 defiance because the protein is found as a multi-oligomer in self-association-dissociation  
46 equilibrium. We characterize the trimeric state of EcFtsZ through native PAGE, gel  
47 filtration chromatography and sucrose gradient techniques combined with chemical cross-  
48 linking. The filtration results indicate that the EcFtsZ trimer has a molecular mass of ~131  
49 kDa and a filtration friction coefficient ( $R_s/R_{min}$ ) equal to 1.9, while the theoretical filtration  
50 friction coefficient ( $f_n/f_1$ ) calculated for a linear trimer yielded a value equal to 1.8 very  
51 close to the experimental value. On the other side, formaldehyde-crosslinked EcFtsZ

52 showed a band ~128 kDa recognized by anti-FtsZ antibodies, and a sedimentation friction  
53 coefficient ( $S_{\max}/S_{20,w}$ ) equal to 1.9, while the theoretical sedimentation friction coefficient  
54 ( $S_n/S_1$ ) calculated for a triangular trimer was equal to the experimental value. These results  
55 suggest that EcFtsZ has two homotrimeric structures (linear and triangular). Finally, we  
56 report the aggregation of EcFtsZ at micromolar concentrations of Capsaicin without GTP  
57 and  $Mg^{2+}$ .

58

59 **Keywords:** Capsaicin, friction coefficient, FtsZ protein, PAGE native, trimers.

60

61

## INTRODUCCIÓN

62 La FtsZ (Filamento Z mutante sensible a la temperatura) es una proteína de la citocinesis  
63 bacterial homóloga a la tubulina de 40.3 kDa, (Nogales et al., 1998, Addinall et al., 2002)  
64 que interviene en los pasos iniciales de la división por fisión unicelular (Bramhill, 1997).  
65 La FtsZ se ensambla de manera Guanósín trifosfato (GTP) dependiente para formar  
66 protofilamentos que finalmente forman un anillo contráctil llamado anillo Z a lo largo de la  
67 circunferencia interna de la membrana citoplasmática de las bacterias (Lutkenhaus y  
68 Addinall, 1997). Estas hebras de protofilamentos se ensamblan a partir de unidades de FtsZ  
69 de forma cooperativa (Ramírez-Aportela et al., 2014). La formación y contracción del  
70 anillo Z es absolutamente necesaria para la división de las células bacterianas. Se ha  
71 demostrado por ultracentrifugación analítica que la FtsZ se encuentra en estado  
72 multimérico antes de formar estos protofilamentos (Sossong et al., 1999). El estado  
73 dimérico es el responsable de la actividad GTPasa en la proteína, debido a que el sitio  
74 catalítico está formado por la asociación de dos unidades monoméricas (Scheffers et al.,  
75 2002). El estado dimérico de la proteína es crucial para el mecanismo de polimerización ya  
76 que funciona como núcleo para la formación del filamento, por esta razón la  
77 oligomerización de la FtsZ es un proceso importante para la división bacterial (den  
78 Blaauwen et. al., 2014). La FtsZ en solución se encuentra como un homomultioligómero  
79 en equilibrio de autoasociación-disociación (Rivas et al., 2000). Esto plantea una gran  
80 dificultad para estudiar un solo tipo de oligómero de FtsZ pero combinando el

81 entrecruzamiento químico de la proteína con técnicas de separación se puede aislar con alta  
82 pureza uno o varios oligómeros entrecruzados. El entrecruzamiento químico de la FtsZ ha  
83 sido probado con dimetilpimelimidato (DMP), la reacción produce dímeros, trímeros y  
84 tetrámeros entrecruzados que pueden separarse por SDS-PAGE (Sossong et al., 1999). Por  
85 otro lado, los tipos de oligómeros de la FtsZ varían con la concentración de la proteína en  
86 solución. A concentraciones submicromolares de FtsZ el monómero es la estructura más  
87 abundante, mientras que entre 4 a 10  $\mu\text{M}$  la cantidad de dímeros y trímeros aumenta hasta  
88 un 70 y 20 % respectivamente. Cuando la concentración de FtsZ es igual o mayor a 100  
89  $\mu\text{M}$  el trímero es la estructura más abundante (Sossong et al., 1999). Poco o nada se sabe de  
90 la función que tienen los trímeros, tetrámeros y otros oligómeros de mayor tamaño de la  
91 FtsZ. Una hipótesis es que estos oligómeros participan en el ensamblaje longitudinal de los  
92 protofilamentos como ocurre con los trímeros y hexámeros de la Proteína Z de  
93 Organización Polar (PopZ) de *Caulobacter crescentus* (Bowman et al., 2013), otra hipótesis  
94 es que los trímeros, tetrámeros y otros oligómeros de mayor tamaño de la FtsZ funcionan  
95 como estructuras de almacenamiento de la proteína en un estado inactivo cuando disminuye  
96 la concentración intracelular de los dímeros durante la formación del filamento.

97 La Capsaicina es un compuesto químico natural responsable del sabor picante presente en  
98 varias especies de *Capsicum* (Chiles). Este compuesto se aisló por primera vez a principios  
99 del siglo XIX y se atribuye su descubrimiento al químico alemán Christian Friedrich  
100 Bucholz en el año de 1816 (Bucholz CF, 1816), mientras que el químico escocés John  
101 Clough Thresh la purificó en el año de 1876 (Thresh JC, 1876). Su estructura molecular  
102 determinada por Nelson y Dawson consiste en una amida del ácido decilénico y un ciclo  
103 aromático de vanililamina (Nelson y Dawson, 1923) (Fig. 1A). Se ha informado de muchos  
104 efectos farmacológicos de la Capsaicina y sus derivados, entre los más relevantes se  
105 encuentra el alivio del dolor debido a que la Capsaicina es un agonista del receptor  
106 vaniloide del potencial transitorio 1 (TRPV1), también conocido como receptor de  
107 Capsaicina que reduce el umbral de activación y disminuye la sensación de dolor en las  
108 células nerviosas cutáneas (Sharma SK et. al., 2013). Por otro lado, la Capsaicina y la  
109 Dihidrocapsaicina (DHC) aisladas del polvo de fruta de *Capsicum annum* reveló que ambas

110 moléculas ejercen actividad antimicrobiana contra 16 cepas diferentes de bacterias  
111 grampositivas y gramnegativas resistente a múltiples drogas clínicamente relevantes con  
112 una eficacia variable pero alta (Füchtbauer et al., 2021). Las proteínas de división celular  
113 bacteriana como la FtsZ han sido estudiadas como moléculas dianas de antibióticos (den  
114 Blaauwen et. al., 2014) y la Capsaicina o sus derivados pueden ser dirigidas hacia la FtsZ  
115 de bacterias con el propósito de interferir su funcionamiento.

116 En este trabajo, caracterizamos bioquímicamente dos trímeros de la FtsZ de *E. coli*  
117 (EcFtsZ) obtenida por ciclos de polimerización con glutamato y GTP a través de técnicas  
118 de electroforesis en geles nativos y geles disociantes, immunoblotting, cromatografía de  
119 filtración en gel, gradiente de sedimentación y entrecruzamiento químico. Nuestros  
120 resultados sugieren que durante el proceso de purificación por ciclos de polimerización con  
121 glutamato y GTP se obtiene una cantidad mayoritaria de EcFtsZ en estado trimérico junto a  
122 otros oligómeros. El cociente friccional experimental  $R_s/R_{min}$  de la EcFtsZ obtenido por  
123 filtración, fue similar al cociente friccional teórico  $f_n/f_1$  de un trímero lineal. Mientras que el  
124 cociente friccional experimental  $S_{max}/S$  de la EcFtsZ entrecruzada con formaldehído  
125 obtenido por gradiente de sedimentación fue similar al cociente friccional teórico  $S_n/S_1$  de  
126 un trímero triangular. Finalmente reportamos la agregación de la EcFtsZ a concentraciones  
127 micromolares de Capsaicina en ausencia de GTP y  $Mg^{2+}$ .

128

129

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 130 **EcFtsZ recombinante**

131 Se sembraron bacterias con asa de níquel en una placa con LB agar/ampicilina (0.1 mg/ml)  
132 a partir de un stock de glicerol con *E. coli* cepa BL21(DE3) transformadas con el vector  
133 PMFV57, que proporciona un sistema de transcripción del gen EcFtsZ inducible por  
134 Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) que presenta resistencia a la ampicilina. La  
135 placa se incubó toda la noche a 37 °C y se seleccionaron varias colonias que fueron  
136 crecidas por duplicado en 5 ml de medio LB líquido/ampicilina (0.1 mg/ml) con agitación a  
137 37 °C hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6 UA a 600 nm (preinóculos). Un grupo de  
138 los preinóculos fueron inducidos con IPTG (0.3 mM) y se incubó por tres horas.

139 Finalmente las bacterias inducidas fueron centrifugadas a 14.000 rpm por cinco minutos y  
140 lavadas dos veces con 50 mM tampón de fosfato salino (PBS). Los pellets de las bacterias  
141 fueron disueltos en tampón de carga y hervidas para verificar la expresión de la EcFtsZ por  
142 electroforesis en geles SDS-PAGE al 10 %. Se inoculó 1 ml del preinóculo de la mejor  
143 colonia en 4 L de medio LB líquido/ampicilina (0.1 mg/ml) por cuadruplicado y se  
144 crecieron las bacterias a 37 °C con agitación (200 rpm) hasta alcanzar una densidad óptica  
145 de 0.6 UA a 600 nm para luego inducir con IPTG (0.5 mM) la expresión de la EcFtsZ  
146 durante 4 horas a 37 °C. Seguidamente el medio se centrifugó a 10.000 rpm por 10 minutos  
147 a 5 °C y el pellet se resuspendió en 40 ml de tampón A (50 mM Tris-HCL, 50 mM KCl,  
148 1mM EDTA y 10 % glicerol) previamente filtrado en membranas MCE (Mezcla de éster de  
149 celulosa) de 0.22 µm tamaño de poro.

#### 150 **Extracción de la EcFtsZ**

151 Una tableta de cóctel de inhibidor de proteasa (Roche #1187358001) disuelta en 1 ml de  
152 tampón A con 400 µl de lisozima (30 mg/ml) fueron agregados en 40 ml de un  
153 homogenato de bacterias inducidas en tampón A y mantenida por hora y media bajo hielo  
154 agitando por inversión periódicamente. Luego se agregó 200 µl de ácido desoxicólico 10 %  
155 p/v y se incubó a 37 °C hasta la formación de una solución viscosa, seguidamente se agregó  
156 300 µl de DNAasa I (10 mg/ml) hasta la pérdida de viscosidad. Finalmente el homogenato  
157 se centrifugó a 100.000xg por 60 minutos a 5 °C recuperando el sobrenadante. Se midió el  
158 volumen del sobrenadante recuperado para agregar sulfato de amonio hasta alcanzar una  
159 concentración de 30 % p/v, la mezcla se agitó por 20 minutos a 10 °C y se centrifugó a  
160 10.000xg por 30 minutos a 5 °C. El precipitado se resuspendió en 5 ml de tampón A y fue  
161 dializado toda la noche en 2 L de tampón A a 10 °C.

#### 162 **Ciclos de polimerización con glutamato**

163 La EcFtsZ dializada después del tratamiento con sulfato de amonio, se centrifugó a  
164 10.000xg, 5 °C por 30 minutos y 5 ml del sobrenadante se mezcló por inversión con 15 ml  
165 de tampón de polimerización (Tampón P: 50 mM MES, pH 6.5, 1 M glutamato  
166 monosódico, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM MgCl<sub>2</sub>), luego se agregó 200 µl de Guanosín

167 Trifosfato (GTP) 200 mM y se dejó incubando por 30 minutos sin agitación a 37 °C hasta  
168 la formación de un precipitado blanco (ciclo de polimerización). La solución se centrifugó a  
169 10.000xg por 30 minutos a 25 °C y el precipitado recuperado se resuspendió en 5 ml de  
170 tampón A frío y se dejó 10 minutos bajo hielo (ciclo de despolimerización) para luego  
171 centrifugar a 10.000xg por 30 minutos a 5 °C. Este procedimiento se repitió 3 veces y en el  
172 tercer ciclo de polimerización el precipitado se resuspendió en 2 ml de tampón A frío que  
173 fue dializado en 2 L de tampón A a 10 °C toda la noche. La purificación de la EcFtsZ se  
174 siguió por electroforesis en geles SDS-PAGE al 12 %.

### 175 **Turbidez por polimerización**

176 El ensayo de turbidez se realizó en una solución que contenía tampón MES 50 mM (pH  
177 6,5), KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM y EcFtsZ 15 μM a 30°C. La muestra se calentó hasta  
178 alcanzar 30°C y seguidamente se inició la reacción de polimerización añadiendo 1 mM de  
179 GTP. La turbidez que produce la polimerización de la EcFtsZ fue monitoreada a 90°  
180 iluminando la muestra a 350 nm en un Espectrofluorímetro Perkin-Elmer LS-50 con un  
181 filtro de transmisión del 2% en el haz de emisión.

### 182 **Actividad GTPasa**

183 Se prepararon soluciones de verde de malaquita 0.045 % w/v (solución VM) y de  
184 molibdato de sodio 4.2 % w/v (solución M) en ácido clorhídrico 4M. Se mezclaron tres  
185 partes de solución VM con una parte de solución M (proporción 3:1), se dejó reposar por  
186 20 minutos y luego se filtró con papel Whatman número cinco. A 5 ml de la mezcla VM-M  
187 filtrada se agregó 100 μl de Triton X-100 0.02 % v/v (solución VM-M-TX). Para la curva  
188 de calibración se prepararon soluciones de fosfato de sodio 5, 10, 20, 50, 100, 170 y 230  
189 μM. Se mezcló 50 μl de cada solución de fosfato con 800 μl de solución VM-M-TX, luego  
190 se agitaron fuertemente por un minuto y se agregó 100 μl de citrato de sodio 34 % w/v. Las  
191 soluciones se dejaron en reposo por 20 minutos y en un equipo UV-Vis LKB 4050 se  
192 midió la absorbancia a 630 nm. Por otro lado, la solución de reacción GTPasa contiene 50  
193 mM HEPES, 100 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub> y 0.5 mM GTP sal sódica. La actividad GTPasa  
194 se midió mezclando 98 μl de solución de reacción GTPasa con 2 μl de EcFtsZ (Cf ~6 μM)

195 incubando a 37 °C por 10, 15, 30 y 45 minutos utilizando como control negativo de  
196 reacción la Albúmina Sérica Bovina (BSA) 10 mg/ml. Al finalizar el tiempo de reacción se  
197 tomó 70 µl de la mezcla de reacción y se le agregó 12 µl de ácido perclórico 70 % v/v y por  
198 10 minutos se dejó en reposo. La mezcla se centrifugó a 10.000xg por 5 minutos y 50 µl del  
199 sobrenadante se mezcló con 800 µl de solución VM-M-TX siguiendo el mismo  
200 procedimiento para la curva de calibración.

### 201 **Cromatografía de filtración en gel**

202 Las proteínas se separaron en un equipo de FPLC que consistió en una bomba L-6000  
203 Merck-Hitachi, inyector Rheodyne, una columna Superose 12 (1.0 cm x 30 cm) Pharmacia  
204 Biotech equilibrada con tampón de fosfato 10 mM a pH 7.5 y 100 mM NaCl, detector UV-  
205 Vis L-4250 Merck-Hitachi. Fueron inyectadas 150 µl de varias proteína estándar (10  
206 mg/ml) disueltas en tampón fosfato para calibrar la columna. Se mantuvo un flujo  
207 constante de 0.66 ml/min. Las proteínas utilizadas para la calibración fueron α-  
208 Lactoalbúmina (14 kDa), Inhibidor de tripsina (20 kDa), Anhidrasa carbónica (29 kDa),  
209 Ovoalbúmina (45 kDa), Albúmina Sérica Bovina (66 kDa), Alcohol deshidrogenasa (150  
210 kDa). La detección de las proteínas se realizó a 280 nm. El volumen de exclusión fue  
211 determinado con Azul de dextrano. Finalmente se inyectó a la columna 150 µl de EcFtsZ  
212 (~11 mg/ml).

213 El tamaño molecular de las proteínas según Irvine, 2000, se determinó por la ecuación:

$$214 \quad K_{av} = (V_e - V_o) / (V_t - V_o)$$

215 donde  $K_{av}$  corresponde al coeficiente de reparto,  $V_e$  es el volumen de elución de cada  
216 proteína,  $V_o$  es el volumen de exclusión,  $V_t$  es el volumen total de la columna estimada a  
217 partir de las dimensiones de la columna ( $V_t = \pi \cdot r^2 \cdot \text{longitud}$ ). El volumen de exclusión  
218 así como el volumen de inclusión se determinaron con Azul dextrano (2.000 kDa) y  
219 dicromato de potasio respectivamente.

220 El peso molecular nativo se determinó graficando los valores de  $K_{av}$  de cada proteína  
 221 estándar en función del logaritmo del peso molecular. La ecuación de la recta de  
 222 calibración obtenida fue empleada para estimar por extrapolación el tamaño nativo de la  
 223 EcFtsZ. Adicionalmente se determinó el radio de Stokes empleando la relación lineal que  
 224 se obtiene al representar  $(-\log K_{av})^{1/2}$  en función del radio de Stokes de las proteínas  
 225 estándares.

226 El cociente friccional  $f/f_0$  fue calculado mediante la siguiente ecuación:

$$227 \quad f/f_0 = R_s/R_{\min}$$

228 donde  $R_s$  es el radio de Stokes y  $R_{\min}$  es el radio de una esfera lisa no hidratada. Dado que  
 229 el volumen específico parcial ( $v$ ) de una proteína globular promedio es  $0.73 \text{ cm}^3/\text{g}$ , se  
 230 calculó el volumen ocupado por una proteína esférica de masa molecular ( $M$ ) en Daltons  
 231 (Da) de la siguiente manera:

$$232 \quad V (\text{nm}^3) = (0.73 \text{ cm}^3/\text{g}) (1021 \text{ nm}^3/\text{cm}^3) \times M (\text{Da}) / (6.023 \times 10^{23} \text{ Da/g})$$

$$233 \quad V (\text{nm}^3) = 1.212 \times 10^{-3} (\text{nm}^3/\text{Da}) \times M (\text{Da})$$

$$234 \quad V = (1.212 \times 10^{-3} \times M) \text{ nm}^3$$

235 El radio de una esfera es  $(3V/4\pi)^{1/3}$  y asumiendo que la proteína es esférica, el  $R_0$  fue  
 236 calculado de la manera siguiente:

$$237 \quad R_{\min} = (3V/4\pi)^{1/3} = (0.066 \times M^{1/3}) \text{ nm}$$

### 238 **Entrecruzamiento químico**

239 Se preparó una solución de 0.1 M de formaldehído (CHO) en 50 mM tampón fosfato  
 240 ( $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), pH 7.5. La EcFtsZ fue previamente dializada con tampón fosfato en un  
 241 tubo Amicon 0.5 ml, 3 kDa MWCO antes de la reacción con CHO. A 20  $\mu\text{l}$  de CHO (0.1  
 242 M) se le agregó 3  $\mu\text{l}$  de EcFtsZ ( $C_f \sim 35 \mu\text{M}$ ), se incubó por 20 minutos a 25 °C. La  
 243 reacción se detuvo agregando 2  $\mu\text{l}$  de glicina 1.4 M.

## 244 **Gradiente de sedimentación**

245 La EcFtsZ entrecruzada y sin entrecruzar con formaldehído fueron separadas por gradiente  
246 de sedimentación en tubos de 1.2 ml (Beckman #347287) usando una ultracentrífuga  
247 Optima L-100XP con rotor SW40Ti (Beckman). Se prepararon dos gradientes discontinuos  
248 de sacarosa en dos tubos de centrífuga formando capas de 120  $\mu$ l con soluciones de  
249 sacarosa de 16, 20, 23, 26, 29, 32 y 36 % p/v respectivamente colocadas de abajo hacia  
250 arriba del tubo con una inyectora Hamilton de 200  $\mu$ l. Sobre un gradiente se colocó 10  $\mu$ l  
251 de EcFtsZ sin formaldehído y en otro gradiente 25  $\mu$ l de EcFtsZ entrecruzado con  
252 formaldehído, ambos gradientes se centrifugaron a 100.000xg por 24 horas a 5 °C.  
253 También se preparó una mezcla de proteínas estándares (10 mg/ml) de  $\alpha$ -Lactoalbúmina  
254 (14.2 kDa), Inhibidor de tripsina (20 kDa), Albúmina Sérica Bovina (66 kDa), Alcohol  
255 deshidrogenasa (151 kDa) para la calibración del gradiente. Inmediatamente después de  
256 terminar el centrifugado, la solución se dividió en fracciones de 50  $\mu$ l que fueron tomadas  
257 por el menisco del gradiente. La concentración de sacarosa en cada fracción se midió con  
258 un refractómetro óptico.

## 259 **Determinación de parámetros hidrodinámicos**

260 La determinación experimental del valor del coeficiente de sedimentación ( $S_{20,w}$ ) y el  
261 coeficiente de fricción a través de la relación  $S_{\max}/S$  de la EcFtsZ, fue calculada utilizando  
262 el método de interpolación según Clark RW, 1976 y el método a través de tablas de  
263 concentración de sacarosa según McEwen CR, 1967. Los coeficientes de sedimentación en  
264 unidad Svedberg de las proteínas estándar utilizadas fueron:  $\alpha$ -Lactoalbúmina 1.75 S  
265 (Morris GA, 2002), Inhibidor de Tripsina de soya 2.6 S (Heppard and McLaren, 1953),  
266 Albúmina Sérica Bovina 4.3 S y Alcohol deshidrogenasa 7.4 S (Siegel and Monty, 1966).

267 El cálculo teórico de las propiedades hidrodinámicas para un trímero rígido triangular y  
268 lineal se calcularon a partir del modelo formado por elementos esféricos utilizando la  
269 aproximación desarrollada por Kirkwood, Bloomfield y sus colaboradores (Erickson,  
270 2009).

271 Ecuaciones de Kirkwood-Bloomfield:

$$272 \quad \frac{f_n}{f_1} = n \left( 1 + \frac{r}{n} + \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n \frac{1}{R_{ij}} \right)^{-1}$$

$$273 \quad \frac{S_n}{S_1} = 1 + \frac{r}{n} + \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n \frac{1}{R_{ij}}$$

274 Donde n es el número de monómeros, r: Radio de la esfera, R: Distancia desde el centro  
 275 entre dos esferas,  $f_n/f_1$  o  $S_n/S_1$  : Cociente friccional del multímero de n monómeros,  $S_1$ :  
 276 Coeficiente de sedimentación de un monómero,  $S_n$ : Coeficiente de sedimentación del  
 277 multímero de n monómeros.

### 278 **Agregación de EcFtsZ por la Capsaicina**

279 Se incubó EcFtsZ (Cf ~15  $\mu$ M) en DMSO (20 % v/v) con Capsaicina 2, 5, 10, 15, 30 y 50  
 280  $\mu$ M respectivamente por 30 minutos, usando como control negativo 5  $\mu$ L de BSA  
 281 (2 $\mu$ g/ $\mu$ L). Las muestras fueron analizadas por electroforesis en geles de poliacrilamida en  
 282 condiciones no disociantes (PAGE nativo). En otro experimento de agregación, las  
 283 muestras fueron centrifugadas previamente a 14.000 rpm por 20 minutos y separadas en  
 284 fracción soluble y fracción particulada. La fracción particulada que contiene los agregados  
 285 fue lavada y centrifugada una vez con tampón Tris-HCl 10 mM, pH 8.5. Todas estas  
 286 muestras fueron analizadas en geles de poliacrilamida en condiciones disociantes (SDS-  
 287 PAGE) al 10 %.

### 288 **Otros procedimientos**

289 Las muestras separadas por SDS-PAGE se realizaron según Laemmli (1970) y las  
 290 muestras separadas por PAGE-nativo se realizaron sin gel de apilado según Anh et al. 2001.  
 291 Todos los geles fueron revelados usando azul de coomassie o tinción con plata. La  
 292 concentración de la EcFtsZ se midió usando BSA como proteína estándar (Bradford, 1976).  
 293 Para el análisis immunoblot, las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE y  
 294 eléctricamente transferidas desde el gel a una membrana de nitrocelulosa (Towbin, 1979).

295 Las membranas fueron bloqueadas con leche descremada al 5 % en tampón TBS-T (Tris-  
296 Base 100 mM, NaCl 150 mM y Tween-20 0.1%). Las membranas fueron incubadas con  
297 anticuerpos policlonales anti-FtsZ de Conejo Abcam (ab225991) (1:1000) en TBS-T y  
298 luego con anticuerpos anti-IgG conjugado a fosfatasa alcalina de Conejo Rockland (800-  
299 656-7625) (1:10000) en TBS-T. El revelado se realizó incubando las membranas con una  
300 mezcla de 10 ml de Tampón de fosfatasa alcalina (Tris-Base 100 mM, NaCl 100 mM y  
301  $MgCl_2$  5mM), 66  $\mu$ l de NBT (Nitrobluetetrazolium) 1mg/ml y 33  $\mu$ l de BCIP (5-bromo-4-  
302 cloro-3-indoil-fosfato) 5mg/ml ambos sustratos disueltos previamente en  
303 Dimetilformoamida (DFA). Los geles de electroforesis se analizaron por densitometría con  
304 el software GelAnalyzer 2010a ([www.gelanalyzer.com](http://www.gelanalyzer.com)) por Istvan Lazar Jr. y Istvan Lazar  
305 para determinar el porcentaje de pureza y el peso molecular aparente de la proteína.

## 306 RESULTADOS

### 307 Purificación de la EcFtsZ

308 La EcFtsZ expresada en *E. coli*, extraída por precipitación con sulfato de amonio y  
309 purificada por sucesivas etapas de polimerización y despolimerización inducida con  
310 glutamato de potasio y GTP, mostró un peso molecular aparente de ~39 kDa por SDS-  
311 PAGE (Fig. 1B). Luego del proceso de purificación se obtuvieron 33 mg de proteína total  
312 con una pureza del 89 % y una concentración de 11 mg/ml (~273  $\mu$ M). Aunque no se  
313 cuantificó el porcentaje de recuperación de la proteína, se observó pérdida de EcFtsZ  
314 durante la etapa de despolimerización (datos no mostrados). Para probar la integridad y  
315 funcionamiento de la proteína purificada, se midió su actividad enzimática así como la  
316 reacción de polimerización. La EcFtsZ purificada presentó una actividad GTPasa de ~8.8  
317  $\mu$ M  $Pi \cdot min^{-1} \cdot \mu M^{-1}$  EcFtsZ, que se encuentra en el mismo orden de magnitud en  
318 comparación con las actividades GTPasas reportadas por Rivas et al., 2000, ~4.8  $\mu$ M  
319  $Pi \cdot min^{-1} \cdot \mu M^{-1}$  EcFtsZ y Beuria et al., 2006, ~13.8  $\mu$ M  $Pi \cdot min^{-1} \cdot \mu M^{-1}$  EcFtsZ. La reacción de  
320 polimerización de la EcFtsZ inducida por GTP y  $Mg^{2+}$  en tampón MES 50 mM (pH 6,5),  
321 fue medida por turbidez de la solución a través de la dispersión de la luz (Fig. 1C). La  
322 gráfica de progreso de la reacción de polimerización de la EcFtZ presentó un aumento

323 rápido de la turbidez inmediatamente después de agregar GTP y  $Mg^{2+}$  seguido de un  
324 cambio de la velocidad hasta los 8 minutos cuando comenzó a disminuir la turbidez muy  
325 posiblemente por agotamiento del GTP. Estos resultados fueron similares a las curvas de  
326 progreso reportadas en otros estudios por Rivas et. al., 2000, Scheffers et al., 2002, Chen et.  
327 al., 2007 y Díaz-Espinoza et al., 2007.

### 328 **PAGE Nativo de la EcFtsZ**

329 Utilizamos la electroforesis en condiciones nativas sin gel de apilamiento según Ahn et al.,  
330 2001, para observar de manera directa el estado de oligomerización de la EcFtsZ reportados  
331 con otras técnicas analíticas por Sossong et al., 1999 y Rivas et. al., 2000. Los  
332 experimentos presentaron bandas polipeptídicas significativamente anchas que dificultó  
333 inicialmente la identificación de los oligómeros (Fig. 1D). A pesar de esto, se observaron  
334 dos bandas polipeptídicas por encima de 66 y 146 kDa que corresponden a los estados  
335 dímérico y tetramérico de la EcFtsZ respectivamente. El aumento de la concentración de  
336 EcFtsZ produce un aumento del ensanchamiento de las bandas polipeptídicas que afectó  
337 negativamente la resolución de los oligómeros en el gel. Este ensanchamiento de banda  
338 disminuyó significativamente al agregar cloruro de magnesio (5 mM) y cloruro de potasio  
339 (50 mM) al gel de electroforesis (Fig 1E). En estas condiciones se observaron cuatro  
340 bandas polipeptídicas que correspondieron a los estados dímérico, trimérico, tetramérico y  
341 hexamérico de la EcFtsZ. Este resultado nos indicó que la EcFtsZ se encuentra en un estado  
342 multioligomérico en solución y que además la concentración y tipos de oligómeros varían  
343 con la concentración de la proteína. Para observar mejor esta variación, se midieron por  
344 densidad óptica cada una de las bandas polipeptídicas y se graficaron en función de la  
345 concentración de EcFtsZ (Fig. 1F). Los resultados indicaron que la cantidad máxima de los  
346 estados dímérico, trimérico y tetramérico se alcanzaron a 10, 15 y 30  $\mu M$  de EcFtsZ  
347 respectivamente.

### 348 **Entrecruzamiento químico**

349 Para fundamentar aún más los resultados obtenidos por PAGE-nativo, utilizamos el  
350 entrecruzamiento químico con formaldehído para identificar los estados oligoméricos de la

351 EcFtsZ en presencia o ausencia de cloruro de magnesio y cloruro de potasio. Al entrecruzar  
352 la proteína con formaldehído en ausencia de cloruro de magnesio y cloruro de potasio se  
353 detectó por electroforesis SDS-PAGE e immunoblotting el estado trimérico de la EcFtsZ  
354 ( $\sim 35 \mu\text{M}$ ) (Fig. 2A), mientras que no se observó el trímero entrecruzado en presencia de  
355 estas sales (Fig. 2B). Los resultados sugieren el apantallamiento de los iones  $\text{Mg}^{+2}$  y  $\text{K}^+$  en  
356 los aminoácidos ácidos involucrados en la interacción proteína-proteína y que son  
357 requeridos para estabilizar la estructura trimérica de la proteína. Curiosamente, en presencia  
358 de estas sales fueron detectados dímeros resistentes a las condiciones disociantes de la  
359 electroforesis SDS-PAGE (Fig. 2B). Finalmente, la EcFtsZ entrecruzada con formaldehído  
360 fue analizada por gradiente de sacarosa para estudiar sus propiedades hidrodinámicas.

### 361 **Determinación de la masa molecular y parámetros hidrodinámicos**

362 La EcFtsZ fue aplicada a una columna de filtración en gel que fue calibrada usando  
363 marcadores de masa molecular conocidos. Se detectaron tres picos cromatográficos  
364 durante veinticinco minutos de elusión. El pico con la mayor absorbancia que presentó un  
365 tiempo de retención de 21.04 minutos (pico 3) fue analizado por immunoblotting y se  
366 comprobó la presencia de la EcFtsZ (Fig. 2C). La concentración que alcanzó la EcFtsZ  
367 dentro de la columna fue  $\sim 15 \mu\text{M}$ . Al representar gráficamente el coeficiente de partición  
368 ( $K_{av}$ ) de cada estándar frente al logaritmo de sus masas moleculares (Laurent y Killander,  
369 1964), se determinó una masa molecular de 131 kDa para la EcFtsZ presente en el pico 3  
370 del cromatograma (Figs. 2C y 2D). Esta masa molecular fue 3.3 veces mayor a la masa  
371 molecular aparente de la proteína ( $\sim 39 \text{kDa}$ ) observada por SDS-PAGE. Estos resultados  
372 por cromatografía de filtración indican que la EcFtsZ detectada en el pico 3 se encuentra en  
373 estado trimérico. Seguidamente se obtuvo una relación lineal graficando  $(-\log K_{av})^{1/2}$  frente  
374 al radio de Stokes de cada proteína estándar (Siegel y Monty, 1966) y se calculó un radio de  
375 Stokes para la EcFtsZ de 4.41 nm (Figs. 2E y 2F). Para calcular el coeficiente friccional  
376 experimental por filtración ( $f/f_0$ ) del trímero de EcFtsZ, se utilizó la masa molecular teórica  
377 de un monómero igual a 40.3 kDa (Erikson, 2009) y el radio de Stokes (Bloomfield et al.,  
378 1967), resultando un  $f/f_0$  igual a 1.9 (Fig. 2F). Según Erickson, 2009, el monómero de FtsZ  
379 tiene un  $f/f_0$  de 1.25 que está dentro del rango de una proteína típicamente globular,

380 mientras que una proteína moderadamente alargada presenta un rango de  $f/f_0$  entre 1.5 a  
381 1.9. La EcFtsZ trimérica que se ubicó en el pico 3 del cromatograma con un valor  
382 experimental  $f/f_0$  igual a 1.9 debe corresponder a una cadena lineal de tres monómeros  
383 globulares de EcFtsZ y no a un monómero alargado. Para apoyar esta suposición,  
384 calculamos el coeficiente de fricción teórico ( $f_n/f_1$ ) a partir de las ecuaciones de Kirkwood-  
385 Bloomfield para un trímero lineal. El cálculo arrojó un valor de 1.8 que es bastante cercano  
386 al valor experimental (Fig. 2F). También se realizó el cálculo del coeficiente de fricción  
387 teórico ( $f_n/f_1$ ) para un trímero triangular que con un valor de 1.5 se alejó del valor obtenido  
388 experimentalmente.

### 389 **Separación por gradiente de sedimentación y parámetros hidrodinámicos**

390 La EcFtsZ y la EcFtsZ entrecruzada con formaldehído se cargaron respectivamente a un  
391 gradiente de sacarosa y fueron separadas mediante ultracentrifugación (Figs. 3A y 3B). La  
392 Fig. 3A presenta el perfil polipeptídico de las fracciones separadas por sedimentación de la  
393 EcFtsZ. En este perfil polipeptídico se observaron cuatro bandas correspondientes a los  
394 estados dímérico, trimérico, tetramérico y hexamérico de la EcFtsZ. La banda polipeptídica  
395 correspondiente al estado trimérico fue más ancha e intensa con respecto a las otras bandas  
396 polipeptídicas entre las fracciones 7 y 14. Las bandas polipeptídicas de los oligómeros  
397 identificados en el gradiente de sedimentación se distribuyeron simétricamente alrededor de  
398 las fracciones 9 y 10 sin que se lograran separar por su tamaño dentro del gradiente de  
399 sacarosa. Esto se produjo posiblemente por el equilibrio de autoasociación-disociación de la  
400 EcFtsZ. (Sossong et al., 1999; Rivas et. al., 2000). La sedimentación de la proteína se  
401 realizó durante 24 horas, tiempo suficiente para que durante el movimiento de la proteína  
402 dentro del gradiente se alcanzaran nuevas condiciones de equilibrio de autoasociación-  
403 disociación de la EcFtsZ que produjeron en las fracciones una cantidad de oligómeros muy  
404 similar. El inmunoblot realizado en la fracción 9 mostró una banda de ~39 kDa y otra  
405 banda de ~75 kDa que fueron reconocidas por los anticuerpos anti-EcFtsZ. Estas bandas  
406 corresponden a la EcFtsZ disociada y a un dímero que ha mostrado resistencia a las  
407 condiciones disociantes de la electroforesis SDS-PAGE (Fig. 3A).

408 La Fig. 3B presenta el perfil polipeptídico de las fracciones separadas por sedimentación de  
409 la EcFtsZ entrecruzada con formaldehído. Se tomaron alícuotas de la fracción 8 a la  
410 fracción 13 y se reunieron en un tubo para formar el grupo 8-13 que se analizó por  
411 inmunoblotting. En este grupo 8-13 se observó una banda de ~128 kDa que fue reconocida  
412 por los anticuerpos anti-EcFtsZ y que correspondió a un trímero de la EcFtsZ entrecruzado  
413 con formaldehído. El pico de este grupo 8-13 en el gradiente de sacarosa se ubicó en la  
414 fracción 11. El gradiente de sacarosa fue calibrado con proteínas estándares (datos no  
415 mostrados) y mostró una relación lineal entre el coeficiente de sedimentación ( $S_{20,w}$ )  
416 frente al volumen de migración de cada proteína estándar (Clark RW, 1976) (Fig. 3C). Con  
417 esta gráfica obtuvimos el coeficiente ( $S_{20,w}$ ) de la EcFtsZ entrecruzada con formaldehído  
418 en la fracción 11 que resultó con un valor de 4.7 Svedberg (S) (Figs. 3C y 3D). Por otro  
419 lado, el coeficiente  $S_{max}$  de un hipotético trímero de EcFtsZ con masa teórica igual a 120.9  
420 kDa fue de 8.8 S. Con estos datos, se determinó el coeficiente de fricción experimental  
421  $S_{max}/S_{20,w}$  de la EcFtsZ con formaldehído que arrojó un valor de 1.9 mientras que el  
422 coeficiente de fricción teórico  $S_n/S_1$  calculado para un trímero triangular con las ecuaciones  
423 de Kirkwood-Bloomfield arrojó el mismo valor. De la misma manera, se realizó el cálculo  
424 de  $S_n/S_1$  para un trímero longitudinal que con un valor de 1.6 se alejó del valor obtenido  
425 experimentalmente (Fig. 3D). Finalmente, los resultados obtenidos por cromatografía de  
426 filtración en gel así como por gradiente de sedimentación nos sugieren que la EcFtsZ  
427 presenta dos estructuras triméricas, una de tipo lineal y otra de tipo triangular.

#### 428 **La Capsaicina produce agregación de la EcFtsZ**

429 Dado que diferentes productos naturales como la Curcumina (Rai D. et. al. 2008) y el  
430 Cinnamaldehído (Domadia P. et al. 2007) han sido descritos como inhibidores del  
431 ensamblaje de la FtsZ, nosotros en este trabajo caracterizamos el efecto que produce la  
432 Capsaicina sobre la EcFtsZ ya que comparte con la Curcumina un grupo vanilílico (Fig.  
433 1A). Nuestros resultados mostraron que la Capsaicina funciona como un eficiente agente de  
434 agregación de la proteína. Para demostrar esto medimos durante 23 minutos la velocidad de  
435 agregación de la EcFtsZ en ausencia de GTP y  $Mg^{2+}$  mediante dispersión de luz. Luego de  
436 estabilizar la señal de dispersión de luz, se añadió Capsaicina a la cubeta ( $C_f \sim 1 \mu M$ ) y se

437 monitorizó la cinética de la agregación durante 20 minutos más. De manera inesperada, la  
438 adición de Capsaicina aumentó la magnitud de la señal de dispersión de la luz que aún  
439 después de 23 minutos no alcanzó una condición estable (Fig. 4A). La agregación de  
440 EcFtsZ por Capsaicina se midió también por PAGE-nativo utilizando albúmina sérica  
441 bovina como control de carga (Fig. 4B). Las bandas polipeptídicas observadas en el gel  
442 PAGE-nativo correspondieron a los estados triméricos y tetraméricos de la EcFtsZ. Estas  
443 bandas comienzan a desaparecer del gel a partir de 15  $\mu\text{M}$  de Capsaicina y  
444 simultáneamente aparece un precipitado de color blanco en el bolsillo del gel (Fig. 4B).  
445 Debido a la presencia de este precipitado, realizamos el seguimiento de la agregación de la  
446 EcFtsZ por centrifugación, analizando por SDS-PAGE la fracción soluble (sobrenadante) y  
447 la fracción particulada (precipitado) de la EcFtsZ tratada con Capsaicina (Figs. 4C y 4D).  
448 A 2  $\mu\text{M}$  de Capsaicina, no observamos en la fracción soluble disminución de la intensidad  
449 de la banda de la EcFtsZ y tampoco observamos la aparición de EcFtsZ en la fracción  
450 particulada. A partir de 10  $\mu\text{M}$  de Capsaicina, comenzamos a observar en la fracción  
451 soluble la disminución de la intensidad de la banda de la EcFtsZ, mientras que en la  
452 fracción particulada comenzamos a observarse el aumento de la intensidad de la banda de la  
453 EcFtsZ (Figs. 4 C y 4D). Finalmente la EcFtsZ se agregó casi totalmente a 30  $\mu\text{M}$  de  
454 Capsaicina (Figs. 4 C y 4D).

## 455 DISCUSIÓN

456 Para caracterizar una proteína es necesario obtenerla con un alto grado de pureza. Los  
457 trabajos de Beuria et al., 2003, reportan un sencillo y novedoso método de purificación de  
458 la EcFtsZ a través de la polimerización inducida con glutamato alcanzando hasta un 95 %  
459 de pureza con un rendimiento de 15 mg de proteína/litro de cultivo después del segundo  
460 ciclo de polimerización. Utilizando este método de purificación de la EcFtsZ, nosotros  
461 alcanzamos una pureza del 89 % después del tercer ciclo de polimerización, un cuarto ciclo  
462 de polimerización no mejoró significativamente la pureza de la proteína (datos no  
463 mostrados). Aunque no alcanzamos los valores de pureza esperados, las impurezas no  
464 interfirieron en la movilidad electroforética de la EcFtsZ en los geles nativos, en la  
465 actividad GTPasa así como en la reacción de polimerización.

466 La PAGE nativa ha sido una técnica muy eficiente para estudiar proteínas oligoméricas y  
467 complejos de proteínas de membranas (Gallagher y Huber, 1997; Wittig y Schägger, 2005;  
468 Wittig et al., 2007). La PAGE nativa separa proteínas ácidas solubles en un gel de  
469 acrilamida con una resolución mucho menor que las obtenidas en otras condiciones de  
470 separación electroforética en gel debido a que la movilidad electroforética depende  
471 principalmente de la carga intrínseca de las proteínas. Las masas moleculares y los estados  
472 oligoméricos de proteínas y complejos no se determinan fácilmente mediante PAGE nativa  
473 a menos que las proteínas tengan parámetros físicos favorables, especialmente puntos  
474 isoelectricos por debajo de 5.4 (Wittig y Schägger, 2005). La EcFtsZ tiene un punto  
475 isoelectrico teórico igual a 4.6 que es un valor favorable para estudiar la proteína por PAGE  
476 nativo pero esto no evitó el ensanchamiento de las bandas polipeptídicas que presentan los  
477 oligómeros de la EcFtsZ. Este efecto se logró disminuir al agregar cloruro de magnesio y  
478 potasio en el gel de separación. La PAGE nativa ha sido utilizada con buenos resultados en  
479 el estudio del estado oligomérico de proteínas homólogas a la FtsZ de plantas como las  
480 FtsZ1 y FtsZ2 (Smith et al., 2011) así como para estudiar los componentes de los  
481 complejos de proteínas que forman el divisoma de *E. coli* (Trip y Scheffers, 2015).

482 Una manera de estudiar las interacciones proteína-proteína en el proceso de  
483 oligomerización de la EcFtsZ es a través del uso de entrecruzadores químicos. El  
484 dimetilpimelimidato (DMP) es un entrecruzador homobifuncional de imidoéster con un  
485 largo brazo espaciador de 9.2Å que está dirigido específicamente a la modificación de  
486 aminas primarias como el grupo amino lateral de la lisina (Hermanson, 2013). Sossong et  
487 al. 1999 utilizaron DMP para entrecruzar la EcFtsZ y obtuvieron tres tipos de oligómeros  
488 entrecruzados que fueron fácilmente observables por electroforesis SDS-PAGE. Este  
489 sencillo experimento demostró la multiplicidad de estados oligoméricos que presenta la  
490 EcFtsZ en solución pero el DMP tiene la desventaja de que puede entrecruzar interacciones  
491 proteína-proteína no específicas apareciendo estas en los geles de SDS-PAGE como  
492 múltiples bandas polipeptídicas alrededor de la banda central del oligómero (Sossong et al.  
493 1999). Para disminuir este tipo de reactividad cruzada inespecífica entre dos monómeros de  
494 proteína, nosotros utilizamos agentes entrecruzadores de longitud igual a cero como el

495 formaldehído. La formilación de la EcFtsZ o aminación reductora consiste en la reacción  
496 del formaldehído con el grupo amino lateral de una lisina en la que se forma una base de  
497 Schiff en la proteína o subunidad y esta reacciona rápidamente con el grupo amido lateral  
498 de una glutamina o asparagina o con el grupo guanidinio lateral de una arginina ubicada en  
499 una segunda proteína o subunidad produciéndose una amina secundaria entrecruzada  
500 (Fraenkel-Conrat y Olcott, 1945). En la electroforesis SDS-PAGE de la EcFtsZ con  
501 formaldehído se observó el entrecruzamiento del estado trimérico de la proteína en ausencia  
502 de magnesio y potasio. Para explicar cómo se formaron los trímeros de la EcFtsZ, hemos  
503 realizado el análisis de la secuencia de aminoácidos junto a la estructura cristalina de la  
504 EcFtsZ (PDB: 6UMK). La secuencia de la EcFtsZ contiene diecisiete lisinas en total pero  
505 solo cinco lisinas (K51, K121, K140, K155 y K167) están expuestas al solvente y las  
506 mismas están ubicadas en el dominio GTPasa N-terminal (Figs. 5A y 5B). Esto sugiere que  
507 las lisinas K51, K121, K140, K155 y K167 son susceptibles de reaccionar con el  
508 formaldehído para formar la base Schiff. Nosotros proponemos tres posibles tipos de  
509 interacciones proteína-proteína entre las subunidades de EcFtsZ que son: interacciones  
510 entre el extremo N-terminal de una subunidad con el extremo C-terminal de una segunda  
511 subunidad (interacción N-C), interacciones entre el extremo N-terminal de una subunidad  
512 con el extremo N-terminal de una segunda subunidad (interacción N-N) e interacciones  
513 entre el extremo C-terminal de una subunidad con el extremo N-terminal de una segunda  
514 subunidad (interacción C-N) o interacción N-C invertida. A través de interacciones N-C, la  
515 base de Schiff N-terminal de una subunidad puede reaccionar con las asparaginas expuestas  
516 al solvente N207, N280 y N289 ubicadas en el dominio C-terminal de una segunda  
517 subunidad y la base de Schiff N-terminal de esta segunda subunidad reaccionaría con las  
518 asparaginas N207, N280 y N289 C-terminal de una tercera subunidad (Fig. 5C-1). Este tipo  
519 de interacción lineal se ha descrito en la FtsZ homóloga de *M. jannaschii* donde los  
520 dominios N y C-terminales de dos subunidades consecutivas en el filamento se ensamblan  
521 para formar el sitio GTPasa de la proteína (Scheffers et al., 2002; Oliva et al., 2004). Otra  
522 posibilidad de formar un trímero es que el dímero formado por interacción N-C establezca  
523 interacción N-N con una tercera subunidad a través de la reacción entre la base de Schiff N-  
524 terminal formada en el dímero y las asparagina, glutaminas o argininas expuestas al

525 solvente (N136, Q47, Q148 R50, R85, R89 y R174) ubicadas en la región N-terminal de  
526 una tercera subunidad (Fig. 5C-2). En el caso de un trímero triangular, los contactos entre  
527 la base de Schiff N-terminal y los grupos amidos o guanidinio ubicados en C-terminal deben  
528 producirse entre las tres subunidades de la proteína, es decir, dos interacciones N-C y una  
529 interacción C-N o interacción N-C invertida (Fig. 5C-3). En cualquiera de los casos, es  
530 evidente la participación del dominio GTPasa N-terminal y del extremo C-terminal de la  
531 proteína en la formación de las estructuras triméricas lineal o triangular de la EcFtsZ que ha  
532 sido confirmada por nuestros resultados experimentales. Los trímeros son el motivo de  
533 estructura cuaternaria más frecuente en el Banco de Datos de Proteínas (PDB) después de  
534 los dímeros y los monómeros. En particular, los trímeros triangulares constituyen  
535 aproximadamente dos tercios de todos los trímeros del PDB, mientras que sólo un tercio de  
536 los trímeros son trímeros lineales (Levy et al., 2006). Esta abundancia de estructura  
537 trimérica en la naturaleza puede estar igualmente reflejada en la posibilidad que tiene la  
538 EcFtsZ de formar dos tipos de trímeros.

539 Se ha observado el efecto inhibitorio que tiene el extracto metanólico del chile (*Capsicum*  
540 spp) en *E. coli*, produciendo halos de inhibición de 1.6 cm en placas de cultivo de agar  
541 nutritivo (Cerón-Carrillo et al. 2014). También ha sido evaluada la actividad antibacteriana  
542 de la Capsaicina en cepas de *E. coli* y *B. subtilis* resistentes a múltiples fármacos  
543 obteniendo una Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de 256 y 128 mg/L  
544 respectivamente (Oyedemi et al., 2019). La Capsaicina es un agonista del receptor del  
545 Potencial Receptor Transitorio Vanilloide 1 (TRPV1) que reduce el umbral de activación  
546 por calor (Knotkova et al., 2008) pero es completamente desconocido el mecanismo de  
547 acción de la Capsaicina en las bacterias y cuáles son sus principales dianas moleculares.  
548 Como hemos visto, la Capsaicina a concentraciones micromolares es un buen agente de  
549 agregación de la EcFtsZ y esto pudiera tener un efecto prometedor en la disminución del  
550 crecimiento bacterial. Estos resultados nos indican que los Capsaicinoides y sus derivados  
551 pudieran ser buenos candidatos para el desarrollo de fármacos antimicrobianos.

552

553

## CONCLUSIONES

554 La EcFtsZ obtenida a través de ciclos de polimerización inducida con glutamato es una  
555 proteína multioligomérica que al reaccionar con formaldehído en ausencia de  $Mg^{+2}$  y  $K^{+}$   
556 producen trímeros entrecruzados de ~130 kDa. El análisis por cromatografía de filtración  
557 en gel y por gradiente de sedimentación indicaron que la EcFtsZ pueden formar dos tipos  
558 de estructuras triméricas (trímeros lineales y trímeros triangulares). Finalmente se observó  
559 que a concentraciones micromolares la Capsaicina funciona eficientemente como agente de  
560 agregación de la EcFtsZ.

561

## AGRADECIMIENTOS

562 Nelson A. Araujo le agradece al Proyecto de Internacionalización UCH1566 del Ministerio  
563 de Educación de Chile por la financiación del Postdoctorado con la cual se logró realizar  
564 este trabajo de investigación. Nelson A. Araujo le agradece a la Dra. Valentina Carrasco  
565 por donar la EcFtsZ recombinante, el estándar de masa molecular para geles nativos y el  
566 anticuerpo policlonal anti-EcFtsZ. Todos los autores le agradecen al Profesor Dr. Octavio  
567 Monasterio por permitir desarrollar esta investigación en el Laboratorio de Biología  
568 Estructural y Molecular (BEM) de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile y  
569 apoyar con materiales y reactivos.

570

571

## CONFLICTO DE INTERESES

572 Los autores declaran que no existen conflictos de intereses.

573

574

## CONTRIBUCIÓN DE LOS AUTORES

575 Nelson A. Araujo: Conceptualización, metodología, investigación, análisis formal, escribir,  
576 editar y revisar el texto y las figuras. Marcelo Veloso: Investigación, revisar el texto y  
577 las figuras. Luis Pouchucq: Conceptualización, metodología, revisar el texto y las figuras.

578

579

580

581

**REFERENCIAS**

582

583 Addinall SG, Holland B. The tubulin ancestor, FtsZ, draughtsman, designer and driving  
584 force for bacterial cytokinesis. *J Mol Biol.* 2002; 318:219-236. doi: 10.1016/S0022-  
585 2836(02)00024-4.

586 Ahn T, Yim SK, Choi HI, Yun CH. Polyacrylamide gel electrophoresis without a stacking  
587 gel: use of amino acids as electrolytes. *Anal Biochem.* 2001; 291(2):300-303. Doi:  
588 10.1006/abio.2001.5038.

589 Beuria TK, Krishnakumar SS, Sahar S, Singh N, Gupta K, Meshram M, Panda D.  
590 Glutamate-induced Assembly of Bacterial Cell Division Protein FtsZ. *J Biol Chem.* 2003;  
591 278(6):3735-3741. Doi: 10.1074/jbc.M205760200.

592 Beuria TK, Shah JH, Santra MK, Kumarb V, Panda D. Effects of pH and ionic strength on  
593 the assembly and bundling of FtsZ protofilaments: A possible role of electrostatic  
594 interactions in the bundling of protofilaments. *Int J Biol Macromol.* 2006; 40:30-39. Doi:  
595 10.1016/j.ijbiomac.2006.05.006.

596 Bloomfield V, Dalton WO, van Holde KE. Frictional coefficients of multisubunit  
597 structures, I. Theory. *Biopolymers.* 1967; 5:135-148. Doi: 10.1002/bip.1967.360050202.

598 Bowman GR, Perez AM, Ptacin JL, Ighodaro E, Folta-Stogniew E, Comolli LR, Shapiro L.  
599 Oligomerization and higher-order assembly contribute to sub-cellular localization of a  
600 bacterial scaffold. *Mol Microbiol.* 2013; 90(4):776-795. Doi: 10.1111/mmi.12398.

601 Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of  
602 protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem.* 1976; 72:248e254.  
603 Doi: 10.1016/0003-2697(76)90527.

604 Bramhill D. Bacterial cell division. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1997; 13:395-424. Doi:  
605 10.1146/annurev.cellbio.13.1.395.

606 Bucholz, CF. Chemische Untersuchung der trockenen reifen spanischen Pfeffers. *Almanach*  
607 *oder Taschenbuch für Scheidekünstler und Apotheker.* 1816; 37:1-30.

608 Cerón-Carrillo T, Munguía-Pérez R, García S, Santiesteban-López NA. Actividad  
609 Antimicrobiana de Extractos de Diferentes Especies de Chile (Capsicum). *Re Ib Ci.* 2014;  
610 1: 213-221. ISSN 2334-2501.

611 Chen Y, Anderson DE, Rajagopalan M., Erickson HP. Assembly Dynamics of  
612 Mycobacterium tuberculosis FtsZ. *J Biol Chem.* 2007; 282(38): 27736-27743. Doi:  
613 10.1074/jbc.M703788200.

- 614 Clark RW. Calculation of  $S_{20,w}$  values using ultracentrifuge sedimentation data from linear  
615 sucrose gradients, an improved simplified method. *Biochim Biophys Acta*. 1976; 428:269-  
616 274. Doi: 10.1016/0304-4165(76)90034-9.
- 617 den Blaauwen T, Andreu JM, Monasterio O. Bacterial cell division proteins as antibiotic  
618 targets. *Bioorg Chem*. 2014; 55:27-38. Doi: 10.1016/j.bioorg.2014.03.007.
- 619 Díaz-Espinoza R, Garcés AP, Arbildua JJ, Montecinos F, Brunet JE, Lagos R, Monasterio  
620 O. Domain folding and flexibility of *Escherichia coli* FtsZ determined by tryptophan site-  
621 directed mutagenesis. *Protein Sci*. 2007; 16:1543-1556. Doi: 10.1110/ps.072807607.
- 622 Domadia P, Swarup S, Bhunia A, Sivaraman J, Dasgupta D. Inhibition of bacterial cell  
623 division protein FtsZ by cinnamaldehyde. *Biochem Pharmacol*. 2007; 74(6):831-40. Doi:  
624 10.1016/j.bcp.2007.06.029.
- 625 Erickson HP. Size and shape of protein molecules at the nanometer level determined by  
626 sedimentation, gel filtration, and electron microscopy. *Biol Proced Online*. 2009; 11(1):32-  
627 51. Doi:10.1007/s12575-009-9008-x.
- 628 Fraenkel-Conrat H., Olcott, HS. The reaction of formaldehyde with proteins; cross-linking  
629 between amino and primary amide or guanidyl groups. *J Am Chem Soc*. 1945; 70(8): 2673-  
630 2684. Doi: 10.1021/ja01188a018.
- 631 Füchtbauer S, Mousavi S, Bereswill S, Heimesaat MM. Antibacterial properties of  
632 capsaicin and its derivatives and their potential to fight antibiotic resistance - A literature  
633 survey. *Eur J Microbiol Immunol*. 2021; 11(1):10-17. Doi: 10.1556/1886.2021.00003.
- 634 Gallagher CN, Huber RE. Monomer-Dimer Equilibrium of Uncomplemented M15  $\beta$ -  
635 Galactosidase from *Escherichia coli*. *Biochem*. 1997; 36: 1281-1286. Doi:  
636 10.1021/bi961347a.
- 637 Hermanson GT. *Bioconjugate Techniques*, Third Edition. Academic Press. 2013. Doi:  
638 10.1016/C2009-0-64240-9.
- 639 Heppard E, McLaren AD. Studies on Crystalline Trypsin, Soybean Trypsin Inhibitor and  
640 Inhibitor-Trypsin Compound with the Ultracentrifuge. *J Am Chem Soc*. 1953; 75(11):  
641 2587-2591. Doi: 10.1021/ja01107a012.
- 642 Irvine GB. Determination of Molecular Size by Size-Exclusion Chromatography (Gel  
643 Filtration). *Curr Protoc Cell Biol*. 2001; 5:5.5. Doi: 10.1002/0471143030.cb0505s06.
- 644 Knotkova H, Pappagallo M, Szallasi A. Capsaicin (TRPV1 agonist) therapy for pain relief:  
645 farewell or revival? *Clin J Pain*. 2008; 24:142-154. Doi: 10.1097/AJP.0b013e318158ed9e.

- 646 Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of  
647 bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685. Doi: 10.1038/227680a0.
- 648 Laurent TC, Killander J. A theory of gel filtration and its experimental verification, *J.*  
649 *Chromatogr A.* 1964; 14:317-330. Doi: 10.1016/S0021-9673(00)86637-6.
- 650 Levy ED, Pereira-Leal JB, Chothia C, Teichmann SA. 3D complex: a structural  
651 classification of protein complexes. *PLOS Comput Biol.* 2006; 2: e155. Doi:  
652 10.1371/journal.pcbi.0020155.
- 653 Lutkenhaus J, Addinall SG. Bacterial cell division and the Z ring. *Annu Rev Biochem.*  
654 1997; 66:93-116. Doi: 10.1146/annurev.biochem.66.1.93.
- 655 McEwen CR. Tables for Estimating Sedimentation through linear concentration gradients  
656 of sucrose solution. *Anal Biochem.* 1967; 20:114-149. Doi: 10.1016/0003-2697(67)90271-  
657 0.
- 658 Morris GA. The self-assembly and structure of caseins in solution. *Biotechnol Genet Eng*  
659 *Rev.* 2002; 19:357-76. Doi: 10.1080/02648725.2002.10648034.
- 660 Nelson EK, Dawson LE. The constitution of Capsaicin, the pungent principle of Capsicum.  
661 *J Am Chem Soc.* 1923; 45(9): 2179-2181. Doi: 10.1021/ja01662a023.
- 662 Nogales E, Downing KH, Amos LA, Lowe J. Tubulin and FtsZ form a distinct family of  
663 GTPases. *Nat Struct Biol.* 1998; 5:451-458. Doi: 10.1038/nsb0698-451.
- 664 Oliva M, Cordell S, Löwe J. Structural insights into FtsZ protofilament formation. *Nat*  
665 *Struct Mol Biol.* 2004; 11: 1243-1250. Doi: 10.1038/nsmb855.
- 666 Oyedemi BO, Maria KE, Stapleton PD, Gibbons S. Capsaicin and gingerol analogues  
667 inhibit the growth of efflux-multidrug resistant bacteria and R-plasmids conjugal transfer.  
668 *J Ethnopharm.* 2019; 245:111871. Doi: 10.1016/j.jep.2019.111871
- 669 Rai D, Singh JK, Roy N, Panda D. Curcumin inhibits FtsZ assembly: an attractive  
670 mechanism for its antibacterial activity. *Biochem J.* 2008; 410(1):147-55. Doi:  
671 10.1042/BJ20070891.
- 672 Ramírez-Aportela, E., López-Blanco, J. R., Manuel Andreu, J. M., Chacón P.  
673 Understanding Nucleotide-Regulated FtsZ Filament Dynamics and the Monomer Assembly  
674 Switch with Large-Scale Atomistic Simulations. *Biophys. J.* 2014; 107:2164-2176. Doi:  
675 10.1016/j.bpj.2014.09.033.

- 676 Rivas G, López A, Mingorancei J, Ferrandizi MJ, Zorrilla S, Minton AP, Vicente M,  
677 Andreu JM. Magnesium-induced Linear Self-association of the FtsZ Bacterial Cell  
678 Division Protein Monomer. The primary steps for FtsZ assembly. *J Biol Chem.* 2000;  
679 275(16): 11740-11749. Doi: 10.1074/jbc.275.16.11740.
- 680 Scheffers DJ, de Wit JG, den Blaauwen T, Driessen AJM. GTP Hydrolysis of Cell Division  
681 Protein FtsZ: Evidence that the active site is formed by the association of monomers.  
682 *Biochem.* 2002; 41:521-529. Doi: 10.1021/bi011370i.
- 683 Siegel LM, Monty KJ. Determination of molecular weights and frictional ratios of proteins  
684 in impure systems by use of gel filtration and density gradient centrifugation. Application  
685 to crude preparations of sulfite and hydroxylamine reductases, *Biochim Biophys Acta-*  
686 *Biophys. Incl. Photosynth.* 1966; 112:346-362. Doi: 10.1016/0926-6585(66)90333-5
- 687 Sharma SK, Vij AS, Sharma M .Mechanisms and clinical uses of capsaicin. *Eur J*  
688 *Pharmacol.* 2013; 720(1-3):55-62. Doi: 10.1016/j.ejphar.2013.10.053.
- 689 Smith AG, Johnson CB, Vitha S, Holzenburg A. Oligomerization of plant FtsZ1 and FtsZ2  
690 plastid division proteins. *Arch Biochem Biophys.* 2011; 513:94-101.  
691 Doi:10.1016/j.abb.2011.07.001
- 692 Sossong TM, Brigham-Burke MR, Hensley P, Pearce KH. Self-Activation of Guanosine  
693 Triphosphatase Activity by Oligomerization of the Bacterial Cell Division Protein FtsZ.  
694 *Biochem.* 1999; 38:14843-14850. Doi: 10.1021/bi990917e.
- 695 Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide  
696 gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA.*  
697 1979; 76:4350e4354. Doi: 10.1073/pnas.76.9.4350
- 698 Thresh JC. Isolierung von Capsaicin od. Jahresber. *Chem.* 1876; 883.
- 699 Trip EN, Scheffers DJ. A 1 MDa protein complex containing critical components of the  
700 *Escherichia coli* divisome. *Sci Rep.* 2015; 5: 18190-18200. Doi: 10.1038/srep18190
- 701 Wittig I, Schagger, H. Advantages and limitations of clear-native PAGE. *Proteomics.* 2005;  
702 5: 4338-4346. Doi: 10.1002/pmic.200500081
- 703 Wittig I, Karas M, Schagger, H. High resolution clear native electrophoresis for in-gel  
704 functional assays and fluorescence studies of membrane protein complexes. *Mol. Cell.*  
705 *Proteomics.* 2007; 6: 1215-1225. Doi: 10.1074/mcp.M700076-MCP200.
- 706

707 **FIGURAS.**

708 Figura 1. Panel A: Estructura molecular de la Capsaicina. En color azul se resalta el grupo  
709 vanilílico. En color oro se resalta el grupo amida del ácido decilénico. Panel B: Gel SDS-  
710 PAGE de la purificación de EcFtsZ. Carril 1: *E. coli* no inducida con Isopropyl- $\beta$ -D-  
711 thiogalactoside (IPTG). Carril 2: *E. coli* inducida con IPTG. Carril 3: Precipitado con  
712 sulfato de amonio. Carril 4: Primer ciclo de polimerización. Carril 5: Segundo ciclo de  
713 polimerización. Carril 6: Tercer ciclo de polimerización. S: Estándar de masa molecular  
714 26616 (Thermo Scientific). Panel C: Polimerización de EcFtsZ seguido por el cambio de la  
715 turbidez de la solución a 30 °C. La adición de GTP está indicada por la flecha. Panel D: Gel  
716 PAGE nativo sin KCl y MgCl<sub>2</sub>. Panel E: Gel PAGE nativo con KCl (50 mM) y MgCl<sub>2</sub> (5  
717 mM). Panel F: Gráfica de densidad óptica de las bandas polipeptídicas versus  
718 concentración de EcFtsZ para el Gel PAGE nativo en presencia de KCl y MgCl<sub>2</sub>. S:  
719 Estandar de proteínas nativo Novex (Life technologies) #LC0725. Los geles fueron teñidos  
720 con azul de coomassie.

721 Figura 2. Panel A: Entrecruzamiento de la EcFtsZ con formaldehído en ausencia de KCl y  
722 MgCl<sub>2</sub>. Panel B: Entrecruzamiento de la EcFtsZ con formaldehído en presencia de KCl (50  
723 mM) y MgCl<sub>2</sub> (5 mM). Carril 1: EcFtsZ sin formaldehído. Carril 2: EcFtsZ con  
724 formaldehído. EcFtsZ (Cf ~20  $\mu$ M). Formaldehído (Cf ~0.08 M). Geles SDS-PAGE 8 %  
725 teñidos con azul coomassie. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de  
726 nitrocelulosa e incubadas con Anti-FtsZ policlonal de conejo (1:1000) y luego con Anti-  
727 IgG de conejo conjugado a fosfatasa alcalina (1:10000). Revelado con BCIP y NBT en  
728 tampón para fosfatasa alcalina. E: Estándar Thermo #26616. Panel C: Cromatografía de  
729 filtración en gel de la EcFtsZ tipo silvestre. En el cromatograma se indican los estándares  
730 de proteínas usados para calibrar la columna. t<sub>r</sub>: tiempo de retención. MM: Masa  
731 Molecular. Dentro del cromatograma se muestra el inmunoblotting realizado al Pico 3 con  
732 Anti-FtsZ policlonal de conejo. S: Estandar Thermo #26616, RP: Tinción con Ponceau red,  
733 IB: Inmunoblot. Panel D: Gráfica del coeficiente de partición (K<sub>av</sub>) versus el logaritmo de

734 la masa molecular. Panel E: Gráfica del  $-(\log K_{av})^{1/2}$  versus el radio de Stokes. Panel F:  
735 Tabla de parámetros hidrodinámicos por cromatografía de filtración en gel.

736 Figura 3. Gradiente de sedimentación de sacarosa de la EcFtsZ. Panel A: Análisis por  
737 PAGE nativo a las fracciones del gradiente de sacarosa de la EcFtsZ nativa. El asterisco  
738 indica el pico de separación de la proteína. Panel B: Análisis por SDS-PAGE a las  
739 fracciones del gradiente de sacarosa de la EcFtsZ formilado. El doble asterisco indica el  
740 pico de separación del estado trimérico de la EcFtsZ formilado. Sobre el gradiente de  
741 sedimentación respectivo se muestra el inmunoblot de la fracción 9 y el inmunoblot del  
742 Grupo 8-13 reconocidos por el anticuerpo Anti-FtsZ policlonal de conejo. Panel C: Gráfica  
743 del coeficiente de sedimentación ( $S_{20,w}$ ) versus el volumen de migración de la proteína  
744 según el método de Clark RW, 1976. E: Estandar Thermo #26616, RP: Tinción con rojo  
745 Ponceau, IB: Inmunoblot. Panel D: Tabla de parámetros hidrodinámicos por  
746 sedimentación.

747 Figura 4. Agregación de EcFtsZ por Capsaicina. Panel A: Agregación de EcFtsZ 10  $\mu$ M en  
748 tampón HEPES 50 mM, KCL 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, DMSO 20 %, seguido por el cambio  
749 de turbidez de la solución a 30 °C. La adición de 4  $\mu$ L de Capsaicina 130  $\mu$ M disuelta en  
750 DMSO 20 % está indicada por la flecha. La concentración final de Capsaicina fue 1  $\mu$ M.  
751 Panel B: Análisis de la agregación de EcFtsZ 15  $\mu$ M por PAGE nativo Panel C: Análisis de  
752 la agregación de EcFtsZ 15  $\mu$ M por centrifugación. SDS-PAGE de la fracción soluble.  
753 Panel D: Análisis de la agregación de la EcFtsZ por centrifugación. SDS-PAGE de la  
754 fracción particulada.

755 Figura 5. A: Secuencia de aminoácidos de la EcFtsZ. Amarillo: Lisina (17 AA); Verde:  
756 Asparagina (16 AA); Morado: Glutamina (14 AA); Rojo: Arginina (18 AA). En negrita se  
757 muestra la EcFtsZ truncada (11-316) PDB: 6UMK. B: Estructura de cintas de la EcFtsZ  
758 truncada (11-316) (lado izquierdo). Azul oscuro: Dominio GTPasa N-terminal. Azul claro:  
759 Dominio C-terminal. Superficie molecular de la EcFtsZ truncada (11-316) con rotación de  
760 180° en eje y (lado derecho). En colores se observan las Lisinas (amarillo), Asparaginas  
761 (verde), Glutaminas (morado) y Argininas (rojo) que se encuentran más expuestas al

762 solvente en la superficie de la proteína (PDB: 6UMK). C: Representación esquemática de  
763 los trímeros de EcFtsZ utilizando la silueta de la estructura de la proteína (PDB: 6UMK). 1)  
764 Trímero lineal con dos interacciones N-C 2) Trímero lineal con una interacción N-C y una  
765 interacción N-N. 3) Trímero triangular con tres interacciones N-C. N: Dominio N-terminal  
766 (azul oscuro). C: Dominio C-terminal (azul claro). Los sitios de unión que se observan  
767 entre las subunidades son representativos para ilustrar la interacción proteína-proteína.

768

769

770

771

772

773

774

775

776

777

778

779

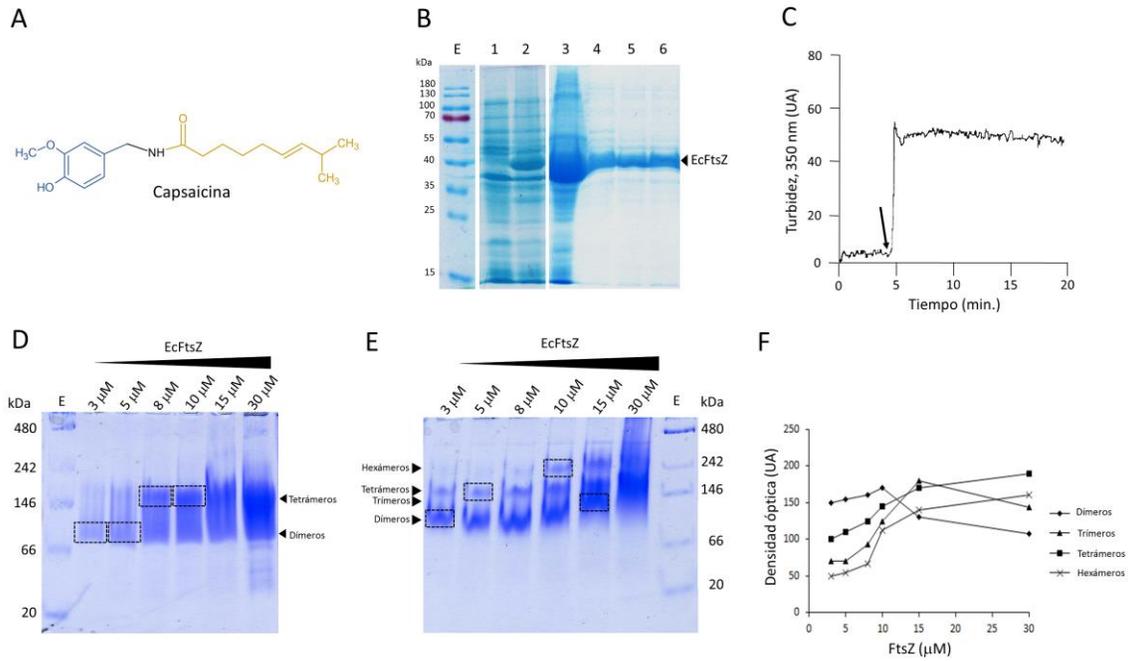
780

781

782

783

784 **Figura 1**



785

786

787

788

789

790

791

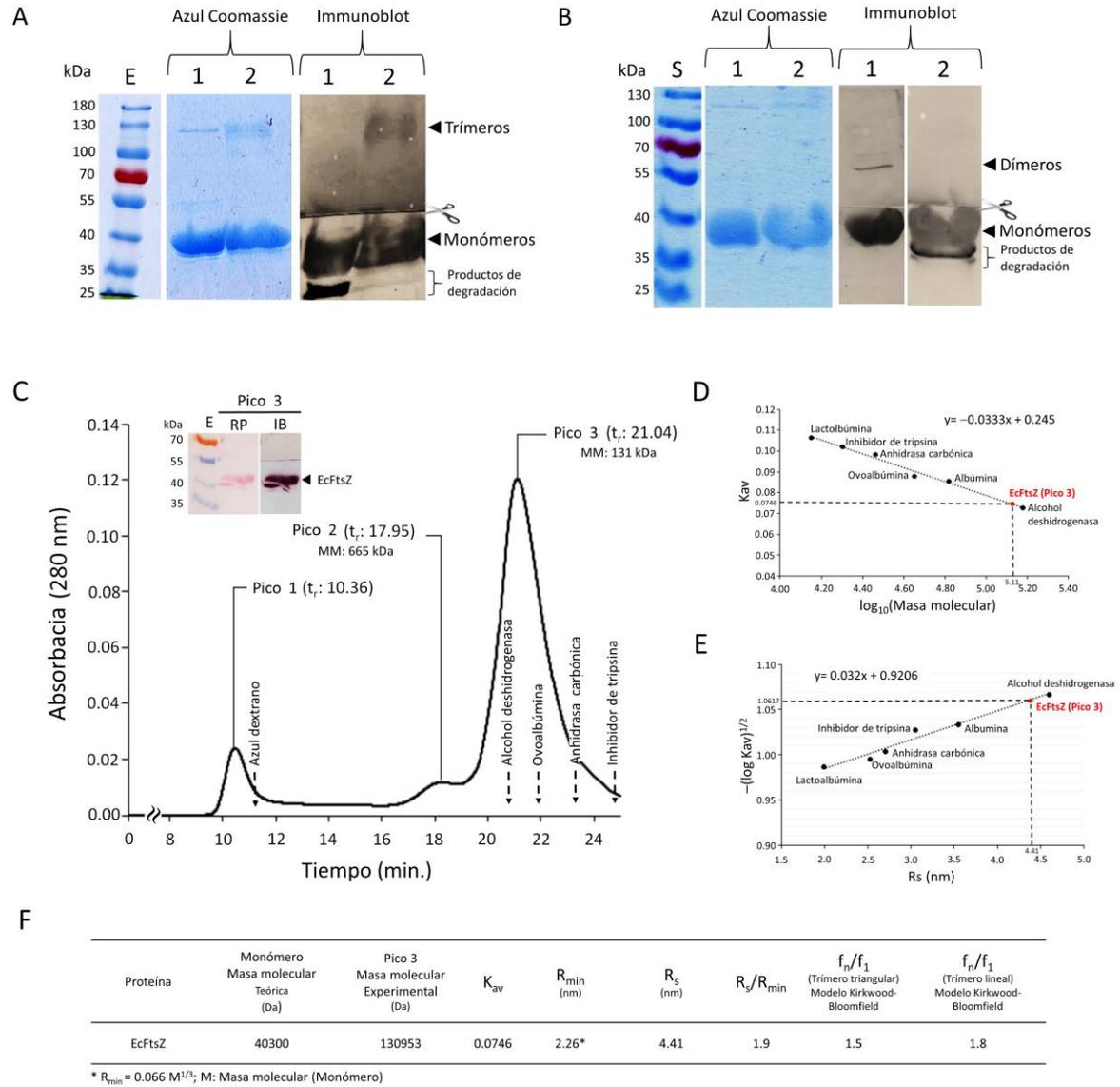
792

793

794

795

796 **Figura 2**



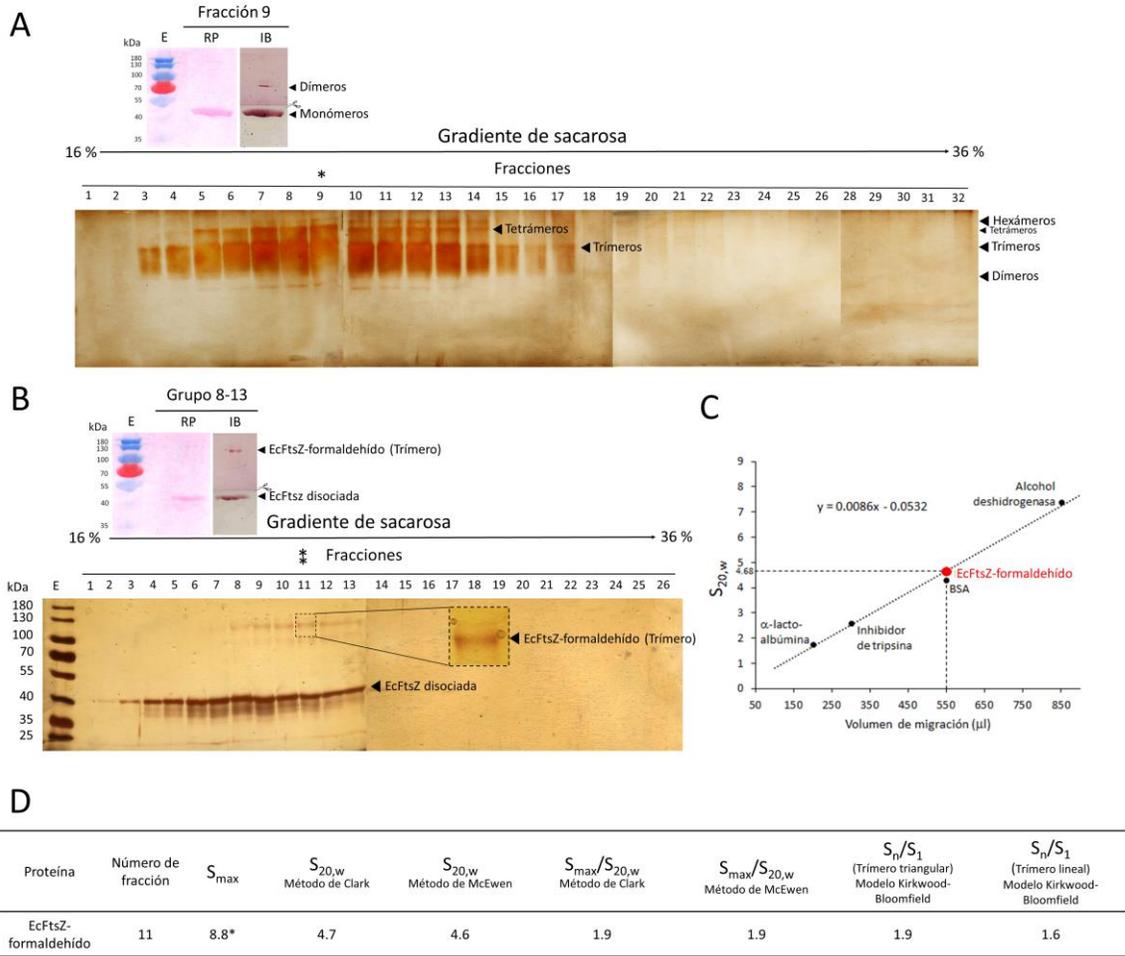
797

798

799

800

801 **Figura 3**



802

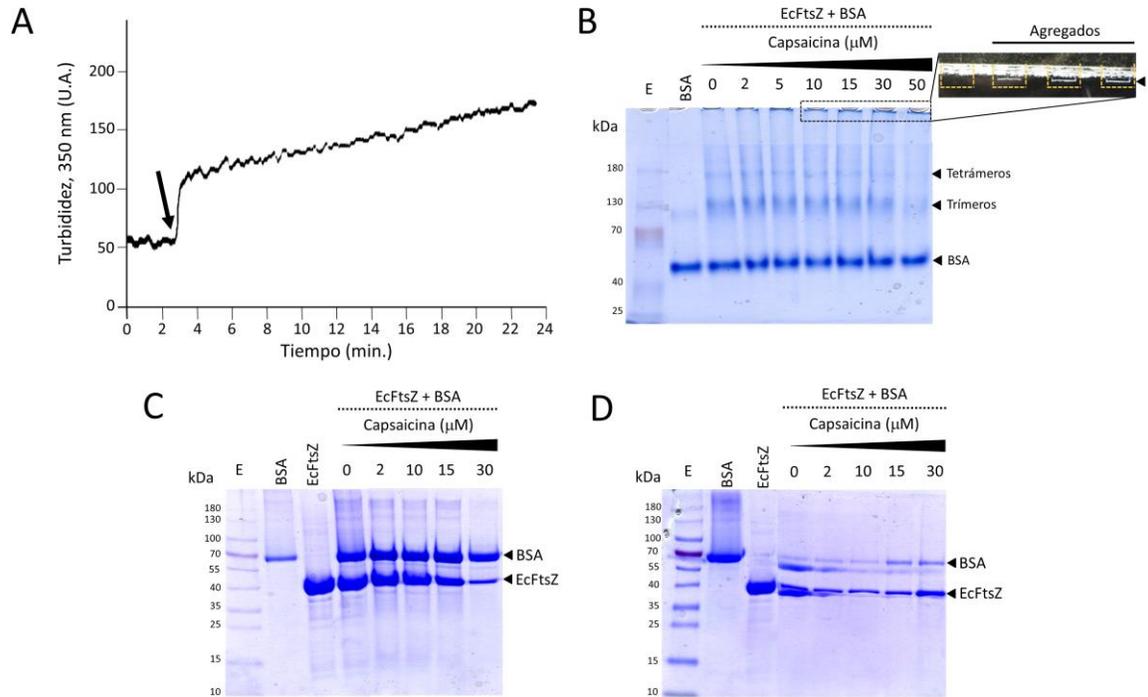
803

804

805

806

807 **Figura 4**



808

809

810

811

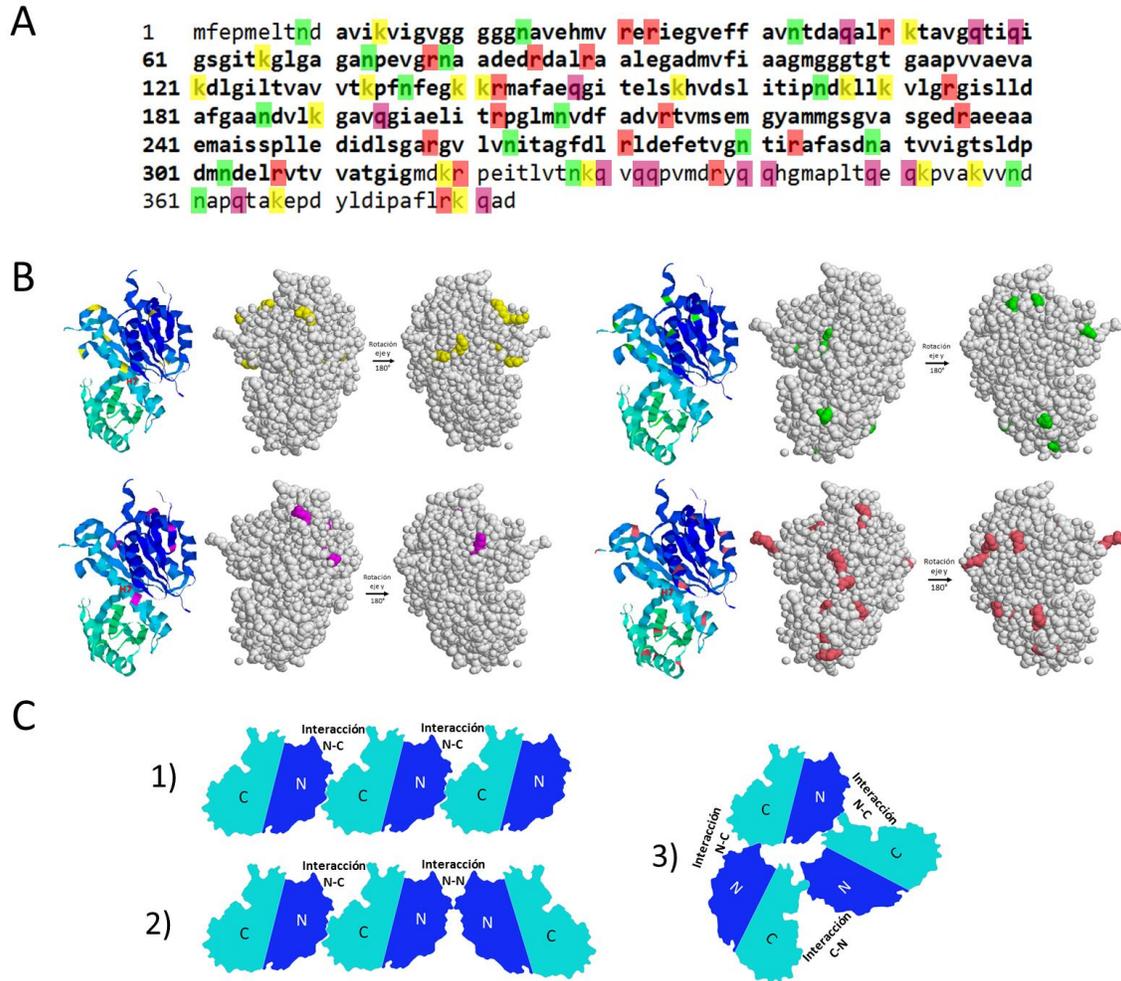
812

813

814

815

816 **Figura 5**



817

## Este preprint fue presentado bajo las siguientes condiciones:

- Los autores declaran que son conscientes de que son los únicos responsables del contenido del preprint y que el depósito en SciELO Preprints no significa ningún compromiso por parte de SciELO, excepto su preservación y difusión.
- Los autores declaran que se obtuvieron los términos necesarios del consentimiento libre e informado de los participantes o pacientes en la investigación y se describen en el manuscrito, cuando corresponde.
- Los autores declaran que la preparación del manuscrito siguió las normas éticas de comunicación científica.
- Los autores declaran que los datos, las aplicaciones y otros contenidos subyacentes al manuscrito están referenciados.
- El manuscrito depositado está en formato PDF.
- Los autores declaran que la investigación que dio origen al manuscrito siguió buenas prácticas éticas y que las aprobaciones necesarias de los comités de ética de investigación, cuando corresponda, se describen en el manuscrito.
- Los autores declaran que una vez que un manuscrito es postado en el servidor SciELO Preprints, sólo puede ser retirado mediante solicitud a la Secretaría Editorial deSciELO Preprints, que publicará un aviso de retracción en su lugar.
- Los autores aceptan que el manuscrito aprobado esté disponible bajo licencia [Creative Commons CC-BY](#).
- El autor que presenta el manuscrito declara que las contribuciones de todos los autores y la declaración de conflicto de intereses se incluyen explícitamente y en secciones específicas del manuscrito.
- Los autores declaran que el manuscrito no fue depositado y/o previamente puesto a disposición en otro servidor de preprints o publicado en una revista.
- Si el manuscrito está siendo evaluado o siendo preparando para su publicación pero aún no ha sido publicado por una revista, los autores declaran que han recibido autorización de la revista para hacer este depósito.
- El autor que envía el manuscrito declara que todos los autores del mismo están de acuerdo con el envío a SciELO Preprints.