

INTERACCIONES DE LA PROTEÍNA DE DIVISIÓN CELULAR FtsZ CON NUCLEÓTIDOS E INHIBIDORES. EN BUSCA DE NUEVOS ANTIBIÓTICOS

Tesis Doctoral presentada por **Claudia Schaffner Barbero**,
para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I

Trabajo realizado en el Centro de Investigaciones Biológicas del Consejo Superior de
Investigaciones Científicas, bajo la dirección del Dr. José Manuel Andreu Morales

Madrid, 2010



AGRADECIMIENTOS

Ante todo quería agradecer a mis padres, sin los que ni esta Tesis ni nada hubiera sido posible. Sólo tengo una página para agradecimientos, lo cual hace imposible enumerar todo lo que me habéis dado, o sea que simplemente diré que gracias por acompañarme por este camino como lo habéis hecho por todos.

Esta Tesis tampoco hubiera sido posible sin el liderazgo y apoyo de mi director de Tesis, José Manuel Andreu. Gracias por tu paciencia, por darme un espacio para aprender en tu laboratorio. Siempre estabas para discutir cualquier duda y para recordarme que la serenidad y el orden son herramientas tan imprescindibles como las pipetas.

Gracias también a aquellos con los que he colaborado y que han cogido tiempo para responder a mis interminables preguntas: Fernando Díaz, Antonio Morreale y Margarita Menéndez.

Por su ayuda tanto práctica como emocional gracias a todos los del CIB: Sonia, Laura, David, Marian, Benet, Eli, Ruth, Mon, Nacho y Chiara. Gracias por sacarme geles y contarme chistes (incluso los malos, Benet). Gracias Javi, por treehenge, the grass, la casita y el bosque, por todo.

Por último dar gracias a los amigos que me han acompañado durante estos años. Gracias chicos, por partidas y cenas, por cafés y cervezas, por hilos de email interminables y apoyo incondicional. Para Yuri, gracias hermanito, por siempre estar allí.

Índice

Resumen.....	4
Índice de figuras y tablas.....	5
Abreviaturas	8
Introducción.....	10
1. El divisoma bacteriano	11
1.1 Ensamblaje del divisoma bacteriano.....	12
1.2 Componentes individuales del divisoma bacteriano.....	13
2. Regulación de la división celular bacteriana.....	16
2.1 Regulación de la estabilidad del anillo Z.....	17
2.2 Regulación dependiente de ciclo celular.....	19
2.3 Regulación espacial.....	21
3. La proteína de división celular FtsZ.....	25
3.1 Conservación.....	25
3.2 Estructura y ensamblaje	26
3.3 Estructura y función de los polímeros de FtsZ.....	28
4. La búsqueda de inhibidores	31
4.1 Inhibidores descritos para FtsZ.....	31
4.2 La búsqueda de inhibidores con diana en el sitio de nucleótido.....	33
4.3 Sitio de PC190723.....	35
Objetivos.....	36
Materiales y Métodos.....	37
1. Reactivos	37
1.1 Ligandos.....	37
1.2 Otros reactivos	37
2. Expresión de FtsZ.....	38
2.1 Plásmidos y cepas de expresión	38
2.2 Expresión.....	39
3. Purificación de FtsZ	40
3.1 Precipitación con sulfato amónico	41
3.2 Cromatografía de intercambio aniónico.....	41

3.3	Cromatografía de adsorción hidrofóbica.....	42
3.4	Cambio de tampón o cromatografía de exclusión molecular.....	43
3.5	Extracción de nucleótido de MjFtsZ.....	43
4.	Medida de la concentración de FtsZ.....	46
4.1	Coeficientes de extinción molares empleados	46
4.2	Medición de concentración de apoFtsZ	46
4.3	Medición de la concentración de BsFtsZ, SaFtsZ y strep-SpFtsZ.....	47
5.	Medida de la unión de nucleótido de FtsZ	48
6.	Polimerización de FtsZ.....	49
6.1	Dispersión de luz a 90°.....	49
6.2	Sedimentación por ultracentrifugación	50
7.	Microscopía electrónica.....	51
8.	Preparación y control de compuestos de cribado y análogos del GTP sustituidos en C8.....	52
8.1	Preparación de compuestos	52
8.2	Control de compuestos.....	53
9.	Calorimetría isotérmica de reacción.....	55
10.	Métodos computacionales.....	56
10.1	Dinámica molecular, análisis estructural y cálculo de la energía libre de unión.....	56
10.2	Cribado Virtual	58
11.	Métodos de unión de ³ H-GTP.....	59
11.1	Métodos generales	59
11.2	Titulaciones de ³ H-GTP y apoFtsZ	60
11.3	Competición de ligando con ³ H-GTP.....	61
12.	Métodos de fluorescencia	62
12.1	Titulación de <i>mant</i> -GTP y apoFtsZ.....	62
12.2	Competición de ligandos con <i>mant</i> -GTP	66
Resultados.....		68
1.	Método de competición de ligandos por el sitio de nucleótido de FtsZ.....	68
1.1	Afinidades de unión de los ligandos de referencia.....	68
1.2	Comparación de los métodos de competición con ³ H-GTP y <i>mant</i> -GTP....	71
2.	La unión de GTP y sus partes a apoFtsZ.....	74

2.1	Medidas de las afinidades de unión	74
2.2	Energías libres totales y energías intrínsecas de la unión de ligandos a apoFtsZ.....	75
2.3	Unión del GTP y GDP a apoFtsZ medida por calorimetría isotérmica de reacción.....	77
2.4	Análisis bioinformático de las interacciones de GTP y GDP con MjFtsZ... 79	
3.	Interacción de FtsZ con inhibidores potenciales de su función.....	86
3.1	Interacción de FtsZ con derivados del GTP sustituidos en C8	86
3.2	Cribado virtual y experimental de ligandos del sitio de unión a nucleótido de FtsZ.....	88
3.3	MciZ: un inhibidor potencial de FtsZ	93
3.4	PC190723 es un estabilizador de polímeros de FtsZ	98
	Discusión.....	108
1.	Desarrollo de un método para medir la unión de ligando al sitio de nucleótido de FtsZ.....	108
2.	Contribuciones de las partes del GTP a su unión a FtsZ.....	110
3.	Análogos sustituidos en C8 del GTP como modelos de inhibidores de FtsZ ...	113
4.	Factores limitantes en el uso de compuestos de cribado virtual.....	116
5.	MciZ: ¿Inhibidor de FtsZ o artefacto experimental?.....	118
6.	Caracterización del mecanismo bioquímico de acción del inhibidor de FtsZ PC190723	120
	Conclusiones.....	126
	Apéndice.....	128
	Bibliografía.....	135

RESUMEN

FtsZ es la proteína fundamental de la división celular bacteriana. FtsZ autoensambla formando protofilamentos que se asocian en el anillo citoesquelético. Forma parte de la superfamilia de GTPasas citoesqueléticas de la tubulina, que también incluye a $\alpha\beta$ -tubulina, a γ -tubulina, tubulina bacteriana y TubZ.

FtsZ es una diana para la búsqueda de pequeñas moléculas inhibitoras que podrían constituir una nueva clase de compuestos antibacterianos con los que combatir la emergencia continua de bacterias patógenas resistentes a los antibióticos actuales. El conocimiento de las interacciones de FtsZ con nucleótidos de guanina aporta información sobre los mecanismos funcionales de esta proteína, que puede ser muy útil para el diseño de inhibidores específicos de FtsZ. Además, un ensayo que permita medir la unión de cualesquiera moléculas que reemplacen a GTP de FtsZ podría ser utilizado para buscar nuevos inhibidores de esta proteína.

En esta Tesis se ha desarrollado en primer lugar un método de competición, empleando el nucleótido fluorescente mant-GTP junto con apoFtsZ, que permite la detección y la medida de la afinidad de moléculas que se unen al sitio de nucleótido de FtsZ. Se ha comparado con un método de competición complementario, basado en el desplazamiento de ^3H -GTP, para validar las afinidades medidas.

A continuación, se ha utilizado el método fluorescente de competición para estudiar la unión de los ligandos reguladores GTP y GDP a su sitio en FtsZ. Para ello se midieron las uniones de los componentes del GTP y de otros nucleótidos. Se han realizado simulaciones de dinámica molecular para analizar el tipo y localización de las interacciones entre los nucleótidos y FtsZ. Se ha encontrado que la interacción con el fosfato- β tiene la mayor relevancia energética, contribuyendo por sí sola en casi igual medida que la guanosina. Además, se propone que la presencia del fosfato- γ provoca un reordenamiento de la proteína y el nucleótido, estableciéndose interacciones diferentes que no conllevan un cambio significativo de la afinidad observada del GTP respecto a la del GDP.

Finalmente, se investigaron los efectos de análogos del GTP y de compuestos químicamente diferentes. He observado que la capacidad de inhibición de la polimerización por análogos del GTP sustituidos en C8 se correlaciona con su afinidad por la proteína. También se ensayaron una serie de compuestos elegidos por cribado virtual, además de un péptido con supuestos efectos inhibitorios sobre FtsZ, con resultados negativos en ambos casos. Por último se estudió el mecanismo de acción de PC190723, un compuesto que protege frente a una dosis letal de *Staphylococcus aureus* en un modelo murino y que tiene como diana a FtsZ. PC190723 es un estabilizador de polímeros de FtsZ, lo que probablemente explica su efecto inhibitorio de la división celular en especies bacterianas sensibles.

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURAS

Introducción

Figura 1: Interacciones entre proteínas del divisoma	13
Figura 2: Sistema MinCDE y sistema de oclusión nuclear	23
Figura 3: Esquema de regulación espacial del anillo Z en <i>E. coli</i>	24
Figura 4: Dímero de FtsZ y de $\alpha\beta$ -tubulina	27
Figura 5: Modelo de ensamblaje nucleado de FtsZ	27
Figura 6: Modelos de funcionamiento de FtsZ <i>in vivo</i>	30
Figura 7: Filamentos de FtsZ visualizados <i>in vivo</i>	31
Figura 8: Sitios de unión de inhibidores de FtsZ	33
Figura 9: La anisotropía como medida de la movilidad rotacional	34
Figura 10: Inhibición de la división celular en presencia de PC	35

Materiales y Métodos

Figura 11: Purificación de FtsZ	45
Figura 12: Ejemplos de espectros de emisión obtenidas para distintos compuestos de cribado virtual	54

Resultados

Figura 13: Titulaciones con ^3H -GTP	68
Figura 14: Proporcionalidad de intensidad de fluorescencia sin polarizar y con polarización en ángulo mágico	70
Figura 15: Titulación de <i>mant</i> -GTP (50 nM) con apoFtsZ	71
Figura 16: Comparación de competiciones con ^3H -GTP y <i>mant</i> -GTP	72
Figura 17: Curvas de competición de GDP y componentes de diferentes afinidades	74
Figura 18: Calorimetrías isotérmicas	78
Figura 19: Superposición del sitio de nucleótido de MjFtsZ-GDP y MjFtsZ-GTP	80
Figura 20: Dinámicas moleculares con FtsZ-GDP y FtsZ GTP-Mg $^{2+}$	81
Figura 21: Interacciones de FtsZ con GDP y GTP tras las dinámicas moleculares	83
Figura 22: Efecto de los C8-derivados del GTP con FtsZ	87
Figura 23: Resultados de ensayos de cribado virtual	93
Figura 24: Secuencia aminoacídica de péptidos empleados con BsFtsZ	94
Figura 25: Estudio de competición con MciZ	94
Figura 26: Propiedades fluorescentes de MciZ	95
Figura 27: Precipitación de BsFtsZ en presencia de péptidos	97
Figura 28: Competición de péptidos con ^3H -GTP por BsFtsZ	97
Figura 29: Estructura química de PC190723	98
Figura 30: Efecto de PC (20 μM) sobre la polimerización FtsZ (10 μM)	100

Figura 31: Efecto de DFMBÁ (4 mM) sobre la polimerización de FtsZ	101
Figura 32: Ensayos de sedimentación de FtsZ con PC y DFMBÁ	103
Figura 33: Morfología de polímeros de FtsZ sin (columna izquierda) y con (columna derecha) 20 μ M PC.	105
Figura 34: Morfología de polímeros de FtsZ no susceptibles sin (columna izquierda) y con (columna derecha) 20 μ M PC.	106
Figura 35: Morfología de polímeros de FtsZ sin (columna izquierda) y con (columna derecha) 4 mM DFMBÁ.	107

Discusión

Figura 36: Conversión del grupo guanina del GTP entre la conformación <i>anti</i> y <i>syn</i>	114
Figura 37: Comparación entre el tamaño y la afinidad de los análogos de GTP	115
Figura 38: Distribución de solubilidades observadas de los compuestos de cribado virtual	118
Figura 39: Comparación de polímeros estables de FtsZ	124
Figura 40: Efecto de PC sobre FtsZ en <i>B. subtilis</i> .	125

Anexo

Figura A1: Trayectorias de MM-GBSA	128
------------------------------------	-----

TABLAS

Introducción

Tabla 1: Inhibidores descritos contra FtsZ	32
--	----

Materiales y Métodos

Tabla 2: Condiciones de las expresiones de FtsZ de diferentes especies	40
Tabla 3: Coeficientes de extinción molares de Trp, Tyr y Phe	46
Tabla 4: Coeficientes de extinción molares de las diferentes proteínas purificadas	46

Resultados

Tabla 5: Afinidades y energías libres de unión de ligandos a apoFtsZ	73
Tabla 6: Contribuciones parciales de partes del GTP a la unión a apoFtsZ	76
Tabla 7: Energética de las interacciones entre apoFtsZ y GDP o GTP	78
Tabla 8: Afinidades de análogos de GTP sustituidos en C8	87
Tabla 9: Compuestos de la primera ronda de cribado virtual y experimental	91
Tabla 10: Compuestos de la segunda ronda de cribado virtual y experimental	92

Apéndice

Tabla A1: Energías calculadas para la dinámica molecular MjFtsZ-GDP	128
Tabla A2: Energías calculadas para la dinámica molecular MjFtsZ-GTP	129

Tabla A3: Energías MM-GBSA por residuo de la dinámica molecular MjFtsZ-GDP	130
Tabla A4: Energías MM-GBSA por residuo de la dinámica molecular MjFtsZ-GTP	131
Tabla A5: Contribuciones relativas de las partes del GDP a la unión a MjFtsZ	132
Tabla A6: Contribuciones relativas de las partes del GTP a la unión a MjFtsZ	133
Tabla A7: Cálculos para aproximar la contribución parcial de la ribosa y la guanina a la unión de GTP	134

ABREVIATURAS

<u>Abreviatura</u>	<u>Significado</u>
³ H-GTP	Guanosina-5'-trifosfato tritiado
Å	Angstrom
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Adenosina-5'-difosfato
atm	atmosferas de presión
ATP	Adenosina-5'-trifosfato
BrGTP	8-bromo-GTP
BrGuanina	8-bromo-guanina
CIGTP	8-cloro-GTP
cps	cuentas por segundo
C-terminal	carboxi-terminal
CTP	Citosina-5'-trifosfato
CTPM	(6-cloro[1,3]tiazolo[5.4-b] piridina-2-il)metanol
DFMBA	Difluorometoxibenzamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	ácido etilén diamino tetraacético
GdmCl	Cloruro de guanidinio
GDP	Guanosina-5'-difosfato
GMP	Guanosina-5'-monofosfato
GMPcPP	Guanosina-5'-[(2,β)-metilen]trifosfato
GTP	Guanosina-5'-trifosfato
GXP	GTP o GDP, indistintamente
Hepes	ácido (4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico
IGTP	8-iodo-GTP
IPTG	isopropil-β-D-tiogalactósido
°K	grado Kelvin
kDa	Kilodalton
<i>mant</i> -GDP	2'(3')- <i>O</i> -(<i>N</i> -Metilantranoil)-guanosina-5'-difosfato
<i>mant</i> -GTP	2'(3')- <i>O</i> -(<i>N</i> -Metilantranoil)-guanosina-5'-trifosfato
MBA	metoxibenzamida
MeOGTP	8-metoxi-GTP
Mes	ácido 2-(<i>N</i> -morfolino)etanesulfónico
morphGTP	8-morfolino-GTP
ms	milisegundo
NAD(H)	Nicotinamida adenina dinucleótido hidrogenado
ns	nanosegundo
N-terminal	amino-terminal
NTP	nucleótido-5'-trifosfato con cualquier base nitrogenada
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
PC	PC190723

PDB	Protein Data Bank
Pipes	Ácido piperazin-N,N'-bis(ácido 2-etanosulfónico)
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
ps	picosegundo
PyrrGTP	8-pirrolidil-GTP
rpm	revoluciones por minuto
SDS	dodecilsulfato sódico
SPOR	Sporulation Related domain. Código PF05036. Ver http://pfam.sanger.ac.uk
tBuGTP	8-tertbutil-GTP
Tris	tris-hidroximetil-aminometano
UDP-Glucosa	Uridina-5'-difosfato-glucosa
UTP	Uridina-5'- trifosfato

INTRODUCCIÓN

Durante un largo periodo de la historia de las ciencias biológicas se consideró que una de las características fundamentales que diferenciaban a los organismos eucariotas de los procariotas era que estos últimos carecían del complejo sistema citoesquelético que tienen todos los eucariotas. Sin embargo, el descubrimiento hace décadas de estructuras filamentosas regulares en bacterias (Burchard *et al.*, 1977), puso en duda este hecho hasta este momento no controvertido. En la última década se ha visto que, lejos de la falta de complejidad que se les suponía, los procariotas tienen un sistema citoesquelético complejo y de regulación muy fina.

Un ejemplo de hasta dónde puede llegar la organización del citoesqueleto en bacterias se encuentra en *Caulobacter crescentus*, el cual emplea elementos del citoesqueleto para división y mantenimiento de la forma celular. *C. crescentus* se divide de manera asimétrica, lo que resulta en una célula pedunculada de mayor tamaño y una célula libre nadadora de tamaño menor, que tiene suprimida la división. Estas necesidades peculiares le llevan a la utilización de un complejo sistema de regulación donde intervienen complejos proteicos que detectan geometría celular, gradientes de proteínas reguladoras y proteasas reguladas por fosforilación (Shapiro y Losick, 2000, Shapiro *et al.*, 2009).

Se conocen homólogos bacterianos para los tres grandes elementos citoesqueléticos en eucariotas; tubulina, actina y filamentos intermedios. MreB (van den Ent *et al.*, 2001), ParM (van den Ent *et al.*, 2002), FtsA (van den Ent y Lowe, 2000) y MamK (Komeili *et al.*, 2006) han sido descritas como proteínas homólogas de la actina, aunque MamK está confirmada sólo como homóloga de secuencia, sin que se haya resuelto su estructura por ahora. De momento solo se conoce un homólogo de los filamentos intermedios, CreS (Ausmees *et al.*, 2003), aunque es posible que haya más (Bagchi *et al.*, 2008). Hay descritas tres proteínas homólogas de la tubulina en procariotas; FtsZ (Nogales *et al.*, 1998b, Löwe y Amos, 1998), BtubA/B (Jenkins *et al.*, 2002) y TubZ (Larsen *et al.*, 2007). La secuencia y estructura del dímero BtubA/B indica que estas proteínas son homólogas mucho más cercanas a la tubulina eucariota que FtsZ y TubZ, y que posiblemente procedan de la transferencia horizontal de un gen para la tubulina desde un eucariota hasta un antecesor del género *Prosthectobacter* (Schlieper *et al.*, 2005). FtsZ es una homóloga mucho más distante de la tubulina, con diferencias muy notables en su comportamiento y función, como se verá más adelante. TubZ, a pesar de

ser también una homóloga distante de la tubulina, presenta varias propiedades funcionales similares a la proteína eucariota, incluyendo el “treadmilling”, la inestabilidad dinámica e incluso la existencia de un “tapón” de GTP en polímeros con GDP (Chen y Erickson, 2008), aunque no se han detectado microtúbulos o estructuras similares.

En general, las proteínas citoesqueléticas bacterianas cumplen funciones diferentes a sus homólogas eucariotas (Löwe y Amos, 2009). Por ejemplo, mientras que la actina cumple diversas funciones de soporte mecánico, transporte vesicular, y citocinesis celular, su homóloga ParM cumple funciones de segregación de ADN, que en eucariotas son llevadas a cabo por la tubulina. FtsZ es homóloga a la tubulina pero como se verá más adelante, cumple su función en citocinesis, y no en segregación de ADN. Por otra parte, en ocasiones las proteínas bacterianas si cumplen funciones análogas a sus homólogas eucariotas, como en el caso de TubZ, homóloga de tubulina, cuya función parece ser la separación de grandes plásmidos de bajo número de copias para asegurar una distribución equitativa de material genético a células hijas.

Además de los elementos de citoesqueleto bacteriano que tienen homólogos eucariotas, hay proteínas citoesqueléticas que existen exclusivamente en bacterias. La superfamilia de proteínas MinD/ParA se caracteriza por tener un dominio ATPasa tipo Walker modificado (Koonin, 1993) y por su capacidad para formar polímeros *in vivo*. MinD forma polímeros helicoidales debajo de la membrana plasmática en *Escherichia coli* (Shih *et al.*, 2003) y forma parte del sistema Min de regulación espacial de la división celular, que se verá más adelante. ParA también forma polímeros helicoidales *in vivo* (Ebersbach y Gerdes, 2004, Adachi *et al.*, 2006) y participa en la segregación de plásmidos a células hijas (Gerdes *et al.*, 2000). También existe una serie de estructuras filamentosas aparentemente ordenadas en bacterias aún sin caracterizar en *Spiroplasma melliferum* (Townsend *et al.*, 1980), *Treponema myagodenis* (Izard *et al.*, 1999) y *Myxococcus xanthus* (Burchard *et al.*, 1977, Yang *et al.*, 2004).

1. EL DIVISOMA BACTERIANO

Al igual que en eucariotas, varios de los elementos de citoesqueleto bacteriano están implicados en diferentes procesos de la división bacteriana, los cuales también han resultado ser mucho más complejos de lo que se creía inicialmente.

1.1 Ensamblaje del divisoma bacteriano

La mayor parte de las proteínas más importantes para la división bacteriana se denomina “Fts” seguido de una letra. “Fts” representa las siglas de “Filament forming Temperature Sensitive”, que es una referencia a la forma en la que fueron descubiertos los genes *fts*, por un estudio de mutantes con letalidad condicionada a la temperatura (Hirota *et al.*, 1968). Estos mutantes sufren una interrupción en la síntesis de ADN o la división cuando se eleva la temperatura, a diferencia de la cepa silvestre de *E. coli*, que no presenta tal interrupción. Esto llevó a pensar que los genes *fts* probablemente estaban implicados en la división celular, aunque pasaron décadas hasta que la función de muchos de ellos fue descrita. Uno de los productos de estos genes *fts* es FtsZ, una proteína esencial para la división celular (Pla *et al.*, 1991) que fue descrito como el constituyente del anillo Z en división celular en *E. coli* (Bi y Lutkenhaus, 1991). Estudios posteriores han revelado que FtsZ es el primer y principal componente del divisoma, cuya estructura y función se expondrá en detalle más adelante. El divisoma completo se compone de numerosas proteínas que intervienen de una manera más o menos directa en la división y que se verán en detalle a continuación. Muchas de ellas se unen al divisoma de una manera jerarquizada, donde la unión de una proteína depende directamente de la unión de otra proteína jerárquicamente anterior (“upstream”) del proceso.

El ensamblaje del septosoma bacteriano es un proceso auto-organizativo. FtsZ ensambla formando el anillo Z en el ecuador celular, porque es excluida de las demás zonas celulares por los sistemas de regulación espaciales. FtsZ recluta a FtsA y ZipA. Aunque se sabe que muchas proteínas más tardías en el proceso interactúan directamente con FtsA, no se conocen interacciones parecidas con ZipA. Sin embargo, ZipA es esencial para el establecimiento de interacciones posteriores, lo cual constituye un fenómeno no comprendido del todo. FtsK se localiza en el ecuador celular gracias a FtsA y ZipA. FtsQ se localiza en el ecuador gracias a FtsK y recluta a su vez a FtsB y FtsL, que son interdependientes para su estabilidad y localización. El complejo FtsQLB recluta a FtsI, que a su vez recluta a FtsN con la ayuda de otros estímulos (Figura 1A).

Cabe destacar que este orden de reclutamiento es dinámico y que no necesariamente corresponde a un orden temporal (Figura 1B). Existen evidencias de que no siempre es necesaria la presencia de todas las proteínas consideradas “anteriores” para el

reclutamiento de una proteína “tardía”. Se demostró que cuando se localizan algunos componentes “tardíos” al anillo Z a través de fusión con la proteína ZapA (que se une a FtsZ) éstas eran capaces de reclutar componentes que se consideran “anteriores” en el proceso de división celular (Goehring *et al.*, 2006). Además de las interacciones principales descritas, estudios hechos utilizando sistemas de dobles híbridos han mostrado diferentes interacciones entre las proteínas principales del divisoma (Figura 1C).

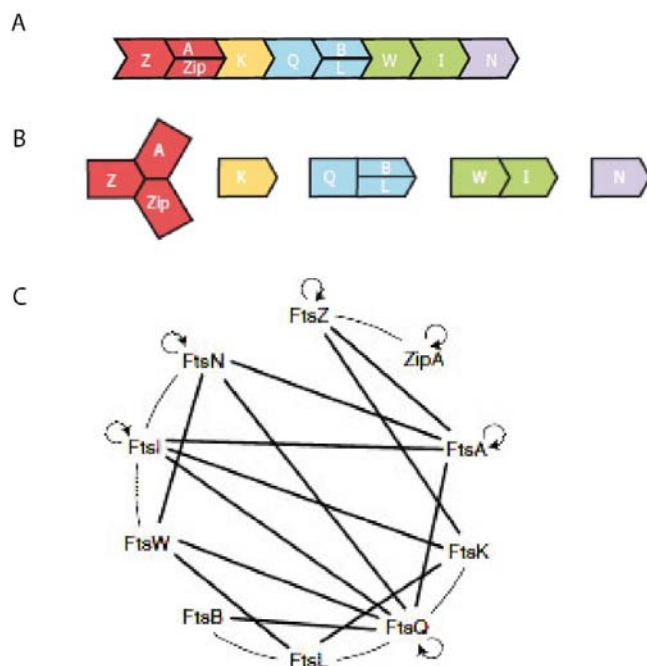


Figura 1: Interacciones entre proteínas del divisoma. A - Esquema lineal de la jerarquía de ensamblaje del divisoma. Se omite “Fts” de los nombres de las proteínas (Vicente y Rico, 2006). B - Esquema de ensamblaje por complejos del divisoma (Vicente y Rico, 2006). C - Interacciones descritas entre proteínas del divisoma en estudios de dobles híbridos. Las líneas representan interacción entre dos proteínas, y las flechas circulares auto-asociación (Goehring y Beckwith, 2005).

1.2 Componentes individuales del divisoma bacteriano

Las proteínas del divisoma bacteriano son diversas y no siempre están presentes en todas las especies bacterianas. A continuación se detallan las características de algunos de los componentes principales del divisoma en bacterias, antes de centrarnos en FtsZ.

➤ *FtsA*

FtsA es una proteína altamente conservada en bacterias y cuyo gen se encuentra frecuentemente “upstream” del gen *ftsZ* y se localiza en el septo de una manera dependiente de FtsZ (Addinall y Lutkenhaus, 1996). Está relacionada estructuralmente con la actina y consta de 2 dominios que a su vez se dividen en dos subdominios cada uno (van den Ent y Lowe, 2000). Une ATP y se ha demostrado que tiene actividad ATPasa (Feucht *et al.*, 2001). Utilizando FtsA de *Streptococcus pneumoniae* se ha visto

que forma polímeros helicoidales estables en presencia de ATP y polímeros menos estables en presencia de ADP (Lara *et al.*, 2005). Esta FtsA tiene preferencia por nucleótidos con un número mayor de fosfatos, con independencia de la base del nucleótido. Así, GTP y ATP se unen con mayor afinidad que GDP y ADP y éstos con mayor afinidad que GMP y AMP. FtsA interacciona con el extremo C-terminal de FtsZ (Ma y Margolin, 1999), probablemente a través del subdominio 2B (Pichoff y Lutkenhaus, 2007) y ancla FtsZ a la membrana a través de una hélice anfipática en su extremo C-terminal (Pichoff y Lutkenhaus, 2005). Recluta a FtsK al ecuador celular (Pichoff y Lutkenhaus, 2002, Rico *et al.*, 2004). Es una proteína esencial para la división, que estabiliza el anillo Z (Pichoff y Lutkenhaus, 2002).

➤ *ZipA*

ZipA es una proteína esencial para la división en *E. coli* (Hale y de Boer, 1997) que consta de un dominio transmembrana, un brazo largo rico en prolina y glutamina, y un dominio globular C-terminal (Mosyak *et al.*, 2000). Se encuentra normalmente dispersa por la célula, pero es reclutada al ecuador celular durante la división por FtsZ, con la que interacciona directamente (Hale y de Boer, 1997, Hale y de Boer, 1999, Liu *et al.*, 1999). Ambas proteínas interaccionan entre sí a través de sus respectivos dominios C-terminales (Liu *et al.*, 1999, Hale *et al.*, 2000, Mosyak *et al.*, 2000). Se ha comprobado que ZipA promueve la formación de haces gruesos y láminas de protofilamentos de FtsZ *in vitro* que se asocian lateralmente (RayChaudhuri, 1999, Hale *et al.*, 2000). Aunque en los organismos donde se expresa es esencial para la división (Pichoff y Lutkenhaus, 2002), no se han encontrado interacciones de ZipA con proteínas diferentes de FtsZ y además es una proteína que hasta el momento sólo se ha encontrado en enterobacterias.

➤ *FtsK*

FtsK es una proteína implicada en la segregación cromosómica en *E. coli*, y es esencial para la división celular (Wang y Lutkenhaus, 1998). Consta de un dominio N-terminal con varios segmentos transmembrana y un dominio C-terminal implicado en la translocación de ADN en presencia de ATP (Aussel *et al.*, 2002, Saleh *et al.*, 2004). FtsK tiene la capacidad de interaccionar con el ADN y “leer” la secuencia, de manera que es capaz de distinguir la direccionalidad correcta necesaria para resolver

cromosomas dimerizados (Löwe *et al.*, 2008). Los dominios de FtsK parecen estar implicados en funciones diferentes, ya que la eliminación del dominio C-terminal, a pesar de afectar a la segregación cromosómica, no afecta a la división celular, que sí requiere de la presencia del dominio N-terminal (Draper *et al.*, 1998). Requiere la presencia previa de FtsZ, FtsA y ZipA para su localización en el sitio de división (Hale y de Boer, 2002). La proteína homóloga de FtsK en *Bacillus subtilis* es SpoIIIE, pero ésta parece tener una función diferente a FtsK. SpoIIIE no participa en la septación celular sino que participa en los procesos de fusión de membranas necesarios para la separación final de una espora de su célula madre (Sharp y Pogliano, 1999).

➤ *Complejo FtsQLB*

FtsQ puede llegar al ecuador celular en ausencia de FtsB y FtsL, pero éstas necesitan a FtsQ para su localización. Estas tres proteínas son necesarias para el reclutamiento de las proteínas posteriores en el divisoma: FtsW y FtsI (Buddelmeijer *et al.*, 2002), (Mercer y Weiss, 2002). Además se sabe que FtsB y FtsL son interdependientes para su estabilidad y localización (Buddelmeijer *et al.*, 2002). Se han encontrado proteínas homólogas en *B. subtilis* de características similares (Daniel y Errington, 2000). No se conocen por el momento las funciones de estas proteínas en la división celular, pero se sabe que son esenciales (Chen *et al.*, 1999).

➤ *FtsW*

Es una proteína perteneciente a la familia de proteínas SEDS (Shape Division & Sporulation) (Henriques *et al.*, 1998). Una característica de estas proteínas es que sus genes están siempre próximos a genes que codifican para transpeptidasas de clase B y que mutaciones a cualquiera de los dos genes producen un fenotipo similar. En el caso de FtsW su transpeptidasa “emparejada” es FtsI. Se conoce poco de la función de FtsW pero se ha observado que está implicada en la estabilización del anillo Z durante la esporulación de *Streptomyces coelicolor* (Mistry *et al.*, 2008), aunque es probable que este efecto sea indirecto.

➤ *FtsI*

Una parte importante de la división celular es la remodelación y síntesis de la pared celular implícita en el proceso. De las muchas proteínas que participan destacan las

proteínas de unión a penicilina (PBP). Sólo hay una que es esencial para la división celular: FtsI. Se ha visto que FtsI se localiza en el sitio de división celular y que su actividad depende del ciclo celular (Nguyen-Disteche *et al.*, 1998, Eberhardt *et al.*, 2003).

➤ *FtsN*

Se trata de la última proteína esencial que se recluta al sitio de división celular (Addinall *et al.*, 1997). Establece interacciones con FtsA, FtsI, FtsQ y FtsW, además de con proteínas de síntesis de peptidoglicano como PBP1b y MgtA (Karimova *et al.*, 2005, Muller *et al.*, 2007, Derouaux *et al.*, 2008). La secuencia de FtsN está poco conservada salvo por su dominio SPOR (Kuroda *et al.*, 1993), que se ha demostrado que no es esencial para la función pero sí para la localización al septo (Gerding *et al.*, 2009). La región esencial de FtsN también es necesaria para la localización, y se cree que posiblemente actúa sobre FtsI estimulando el proceso de constricción. También parece aportar estabilidad, ya que se ha visto que su ausencia provoca desensamblaje de otros componentes del divisoma (Rico *et al.*, 2010). Hasta el momento sólo se ha encontrado en enterobacterias.

2. REGULACIÓN DE LA DIVISIÓN CELULAR BACTERIANA

La división es un proceso altamente regulado. La diana principal de los procesos regulatorios de división bacteriana es FtsZ, de la que dependen los demás componentes del divisoma. Existen proteínas activadoras o inhibidoras de FtsZ que contribuyen a mantener la naturaleza dinámica del anillo Z, esencial para su función. Además hay sistemas regulatorios que aseguran que la división se produzca en el momento y el lugar adecuados. Existe regulación a nivel de ciclo celular, de manera que la división se puede impedir o aplazar en circunstancias desfavorables. Además, existen sistemas de regulación que limitan espacialmente dónde puede tener lugar la división celular, de manera que las células hijas tengan un tamaño celular similar y una carga genética correcta (Adams y Errington, 2009).

2.1 Regulación de la estabilidad del anillo Z

Se ha encontrado una serie de proteínas que actúan directamente sobre FtsZ, estimulando o inhibiendo su polimerización o la estabilidad de los polímeros ensamblados. El conjunto de la regulación hace que FtsZ mantenga su comportamiento dinámico de ensamblaje y desensamblaje que se requiere para la correcta función del anillo Z en citocinesis.

➤ ZapA

ZapA se localiza en el sitio de división, probablemente a través de una interacción directa con FtsZ, y contribuye a la estabilidad del anillo Z (Gueiros y Losick, 2002). No se observa fenotipo visible en cepas mutantes carentes de ZapA (Gueiros y Losick, 2002, Johnson *et al.*, 2004) pero es un “sintético letal”. Esto significa que su pérdida es letal cuando se combina con otras condiciones subóptimas para la división (Levin *et al.*, 1999, Gueiros y Losick, 2002). Es un tetrámero (Low *et al.*, 2004) que interacciona con FtsZ *in vitro* estimulando su polimerización, aumentando la estabilidad de los polímeros, y reduciendo la actividad GTPasa de FtsZ (Low *et al.*, 2004, Small *et al.*, 2007). El mecanismo exacto de este efecto no se conoce, aunque un modelo propone que ZapA modifica la conformación de GTP unido a FtsZ, mientras que otro sugiere que el carácter tetramérico de ZapA contribuye a una mayor interacción lateral entre protofilamentos.

➤ ZapB

ZapB es una pequeña proteína dimérica descrita recientemente como un modulador de FtsZ en *E. coli* (Ebersbach *et al.*, 2008), el único organismo donde ha sido identificado hasta el momento. Se sabe que ZapB necesita a FtsZ, pero no FtsA ni ZipA, para su reclutamiento al sitio de división celular. Se ha observado un ligero alargamiento celular y una mayor frecuencia de células filamentosas con la división bloqueada en cepas que carecen de ZapB. ZapB es abundante en la célula y puede interactuar consigo misma para generar grandes haces, por lo que los autores propusieron que ZapB podría estar creando “puentes” entre polímeros cortos de FtsZ, pero esto no ha sido confirmado y aún no se ha observado la interacción entre FtsZ y ZapB *in vitro*, por lo que la acción exacta de ZapB no está clara a día de hoy.

➤ *EzrA*

EzrA es una proteína integral de membrana que se expresa de manera constitutiva y abundante en *B. subtilis* (Levin *et al.*, 1999, Chung *et al.*, 2004, Haeusser *et al.*, 2004). Se identificó en una búsqueda de inhibidores extragénicos de un mutante *ftsZ* sensible a temperatura. Es reclutada al sitio de división celular gracias a una agrupación de 7 aminoácidos en su región C-terminal (Levin *et al.*, 1999, Haeusser *et al.*, 2007). Se ha comprobado *in vitro* que *EzrA* inhibe la polimerización de FtsZ, incrementando la concentración crítica de polimerización y además aumentando la actividad GTPasa del polímero, lo que conduce al desensamblaje (Haeusser *et al.*, 2004, Chung *et al.*, 2007, Singh *et al.*, 2007). *In vivo*, en ausencia de *EzrA*, disminuye la concentración de FtsZ que se requiere para la formación del anillo Z, y también disminuye la capacidad inhibitoria de la sobre-expresión de MinC y MinD, que son otros reguladores negativos de FtsZ que se detallarán más adelante (Levin *et al.*, 1999, Levin *et al.*, 2001, Haeusser *et al.*, 2007). Otro efecto de la ausencia de *EzrA* es el alargamiento de las células, lo que hace pensar que la división celular puede estar afectada negativamente. *EzrA* puede ser necesaria para asegurar una correcta actividad dinámica de FtsZ, cuyos polímeros no deben ser ni demasiado estables ni en exceso inestables para su función.

➤ *ClpX*

La chaperona ClpX fue identificada en un estudio similar al que se empleó en la detección de *EzrA*. Al igual que *EzrA*, se ha observado que ClpX regula la formación del anillo Z negativamente, y que su ausencia compensa el efecto inhibitorio de la sobreproducción de MinC y MinD (Weart *et al.*, 2005). Aunque la acción de chaperona de ClpX requiere ATP, es capaz de inhibir FtsZ *in vitro* en ausencia de ATP (Weart *et al.*, 2005, Haeusser *et al.*, 2009). Se han encontrado resultados similares en *E. coli* (Sugimoto *et al.*, 2010) y *Mycobacterium tuberculosis* (Dziedzic *et al.*, 2010). Aunque no necesite ATP para actuar, un estudio reciente demostró que en presencia de GTP y ATP, ClpX podía degradar FtsZ (Camberg *et al.*, 2009).

➤ *SepF*

SepF se ha identificado en *B. subtilis* como un regulador positivo de FtsZ. Interacciona con el divisoma de manera dependiente de FtsZ (Hamoen *et al.*, 2006, Ishikawa *et al.*, 2006). La ausencia de *SepF* no es letal por sí sola, aunque causa un notable

engrosamiento en el septo (Hamoen *et al.*, 2006). Sin embargo, la ausencia de FtsA (Ishikawa *et al.*, 2006) o EzrA (Hamoen *et al.*, 2006) junto con SepF sí es letal. Fue descrita independientemente por dos grupos, los cuales especulan funciones diferentes en la división. Uno de los grupos, al observar la letalidad de SepF en ausencia de FtsA, y ver además que la sobreexpresión de SepF compensaba el efecto de la ausencia de FtsA, ha propuesto que SepF puede tener funciones solapantes con FtsA (Ishikawa *et al.*, 2006). El otro grupo, al observar el ensamblaje de divisoma correcto en ausencia de SepF, pero también un engrosamiento del septo, ha propuesto que la acción principal de SepF se produce en un momento tardío de la división, durante la formación del septo (Hamoen *et al.*, 2006). Un estudio *in vitro* mostró que SepF interacciona con FtsZ, estimulando su polimerización, y que además SepF copolimeriza con FtsZ (Singh *et al.*, 2008).

2.2 Regulación dependiente de ciclo celular

Las bacterias disponen de una serie de sistemas que regulan la división de acuerdo con las circunstancias del ciclo celular. La división celular puede detenerse o posponerse cuando las condiciones no son las óptimas. FtsZ es el componente principal del divisoma y del que dependen, directa o indirectamente, el resto de proteínas del divisoma para ensamblar, por lo cual es la diana de algunos de estos mecanismos reguladores.

➤ *SulA*

SulA es una de las proteínas activadas durante la respuesta SOS de *E. coli* (Huisman y D'Ari, 1981), que a su vez se activa principalmente en respuesta a daños en el ADN (Janion, 2008). SulA bloquea la formación del anillo Z, evitando así la septación (Bi y Lutkenhaus, 1993). Es un inhibidor inespecífico de lugar, que inhibe la septación en toda la bacteria. La estructura cristalográfica de SulA unida a FtsZ mostró que SulA interacciona con el bucle T7 de FtsZ de manera que impide la unión de otro monómero. Esto requiere que el bucle T7 esté expuesto, cosa que no ocurre en FtsZ polimerizada, lo cual explica el hecho de que SulA requiera de actividad GTPasa de FtsZ para su función, dado que sin esta actividad se reduce el comportamiento dinámico de FtsZ y no se liberan monómeros capaces de interactuar con SulA (Cordell *et al.*, 2003). En *B.*

subtilis, YneA cumple la misma función que SulA, a pesar de no tener relación filogenética o estructural con ella (Kawai *et al.*, 2003).

➤ **UgtP**

En *B. subtilis* el tamaño celular y la división celular se coordinan con la disponibilidad de nutrientes (Weart y Levin, 2003). En medios ricos en nutrientes las células tienen un tamaño mayor que en medios pobres. El mantenimiento de esta relación tamaño-nutrientes en *B. subtilis* la lleva a cabo UgtP (Weart *et al.*, 2007). UgtP es una glucosiltransferasa que forma parte de una ruta de biosíntesis de glucolípidos. Su sustrato natural es la UDP-glucosa, y la disponibilidad de ésta es un sensor metabólico. En presencia de UDP-glucosa, UgtP se reparte por toda la célula y se concentra en el ecuador celular de una manera dependiente de FtsZ, con la cual interacciona. UgtP es capaz de inhibir la polimerización de FtsZ *in vitro*. Puede retrasar la división de la célula en situaciones de alta disponibilidad de nutrientes, permitiendo a la célula alcanzar un tamaño mayor antes de la división. En condiciones de escasez de nutrientes, donde no es necesario retrasar la división para que las células alcancen un tamaño mayor, la presencia de UDP-glucosa es menor, y UgtP se localiza en foci no funcionales y distribuidos aparentemente al azar en toda la célula. Aunque no se conocen homólogos para UgtP en *E. coli* hay indicaciones de que un mecanismo similar podría existir también en esta especie (Weart *et al.*, 2007).

➤ **MciZ**

Otro regulador negativo de FtsZ en *B. subtilis* que se ha descrito es MciZ, un péptido de 40 aminoácidos (Handler *et al.*, 2008). La acción de MciZ consiste en impedir la formación de anillos Z en la célula madre durante el proceso de esporulación. Los autores indicaron que MciZ tenía la capacidad de inhibir la polimerización de FtsZ *in vitro* y tenía como sitio probable de unión uno cercano al sitio de nucleótido de FtsZ. Ambos hechos lo hacen de interés para esta Tesis, como se describirá posteriormente.

➤ **KidO**

Recientemente, un estudio ha encontrado un regulador de FtsZ dependiente de ciclo en *C. crescentus* (Radhakrishnan *et al.*, 2010), que como ya se ha visto es un organismo especial en cuanto a la complejidad de su citoesqueleto y regulación de su ciclo celular.

KidO es una proteína homóloga a oxidoreductas dependientes de NAD(H) la cual se ha demostrado que está íntimamente implicada en la regulación del ciclo celular. Es un regulador bifuncional; por un lado actuando en el paso de fase G1 a S y por otro lado actuando a nivel de FtsZ. Se ha visto que KidO es reclutada al sitio de división celular, donde actúa estimulando el desensamblaje del anillo Z. Pruebas *in vitro* han mostrado que KidO interacciona específicamente con FtsZ. Mutaciones en FtsZ que disminuyen su actividad GTPasa confieren resistencia a KidO, de manera análoga a lo que ocurre en SulA, lo cual hace pensar que KidO podría actuar a nivel de monómero. Parece que KidO, cuya expresión y degradación están muy ligados al ciclo celular, podría actuar para coordinar la división celular con el resto del ciclo. Por otra parte el estudio demostró que la acción de KidO sobre FtsZ requiere la retención de su capacidad para unir NAD(H), lo que deja abierta la posibilidad de que KidO sea un sensor metabólico como UgtP.

➤ *KaiC*

Otro estudio reciente ha encontrado que *Synechococcus elongatus*, una cianobacteria, coordina su división celular con los ritmos circadianos (Dong *et al.*, 2010). Una propiedad de las cianobacterias, que son bacterias fotosintéticas, es que mantienen ritmos circadianos de día y noche, propiedad que comparten con multitud de organismos unicelulares y pluricelulares (Bell-Pedersen *et al.*, 2005). En *S. elongatus*, los ritmos circadianos se mantienen por un sistema de tres proteínas, KaiA, KaiB y KaiC, a través de ciclos periódicos de fosforilación y desfosforilación. En este estudio se demostró que la división celular se coordina con los ritmos circadianos a través de KaiC. Concretamente, se observó que un aumento de la actividad ATPasa de KaiC, normalmente ligado a su fosforilación, provoca el bloqueo de la división. Se visualizó el anillo Z en distintas circunstancias, y se vio que el bloqueo de división dependiente de KaiC tenía el efecto de inhibir la formación del anillo Z. Los autores concluyeron que FtsZ podría ser la diana de esta regulación, aunque aún está por comprobarse si KaiC actúa sobre FtsZ directamente o si la inhibición es un efecto indirecto.

2.3 Regulación espacial

Existe una serie de sistemas proteínicos que aseguran que la división celular se lleve a cabo en el lugar adecuado. Si la división ocurre en los polos de la célula bacteriana el

resultado es la formación de mini-células, carentes de material genético. Por otra parte si la división ocurre donde hay ADN cromosómico de la bacteria, se pueden producir fragmentaciones del material genético.

➤ *El Sistema MinCD*

MinC y MinD son proteínas altamente conservadas en bacterias y constituyen un sistema de regulación negativa de la polimerización de FtsZ. Se sabe que la sobreexpresión de las proteínas MinC y MinD da lugar a un bloqueo de división celular (Bi y Lutkenhaus, 1993) y que la supresión del regulador negativo MinE da el mismo resultado (de Boer *et al.*, 1989). MinC es la proteína efectora. Su sobreexpresión por sí sola puede suprimir la división (de Boer *et al.*, 1992b). Actúa como un dímero uniéndose a los polímeros de FtsZ y desestabilizándolos (Hu *et al.*, 1999, Hu *et al.*, 2002, Shen y Lutkenhaus, 2010). MinD es una proteína con una cadena alifática carboxi-terminal que le permite unirse a la membrana en un proceso cooperativo y dependiente de ATP (Hu *et al.*, 1999, Hu *et al.*, 2002, Suefuji *et al.*, 2002, Lackner *et al.*, 2003). MinD une a MinC a la membrana, lo cual es esencial para su función, ya que en ausencia de MinD, MinC es incapaz de actuar (de Boer *et al.*, 1990, de Boer *et al.*, 1992a).

Aunque MinC y MinD se expresan en bacterias modelo como *E. coli* y *B. subtilis* y sus funciones son las mismas, la dinámica es algo diferente en ambas especies debido a la tercera proteína del sistema, que es MinE en *E. coli* y DivIVA en *B. subtilis*. En *E. coli* se observa cómo MinD oscila de polo a polo celular con una periodicidad de aproximadamente 40 segundos (Raskin y de Boer, 1999) y exhibe un ensamblaje en espiral (Shih *et al.*, 2003). La regulación espacial de MinD en *E. coli* la lleva a cabo la proteína MinE, que es un regulador negativo de MinCD. MinE compite con MinC por MinD, y así puede desplazar su unión y por tanto su función (Suefuji *et al.*, 2002, Ma *et al.*, 2004). Una vez unido, MinE estimula la actividad ATPasa de MinD, lo que tiene como resultado su separación de la membrana (Lackner *et al.*, 2003, Zhou *et al.*, 2005). MinD vuelve a ensamblar en el polo opuesto, uniendo a MinC. El resultado final es que la oscilación de polo a polo de MinCD finalmente ocasiona una concentración media mayor en los polos y menor en el ecuador celular (Raskin y de Boer, 1999) (Fig 2A). Por el contrario en *B. subtilis* no se observa esta oscilación de MinCD sino que el

complejo MinCD se ancla a los polos celulares por medio de la proteína DivIVA (Edwards y Errington, 1997, Marston *et al.*, 1998).

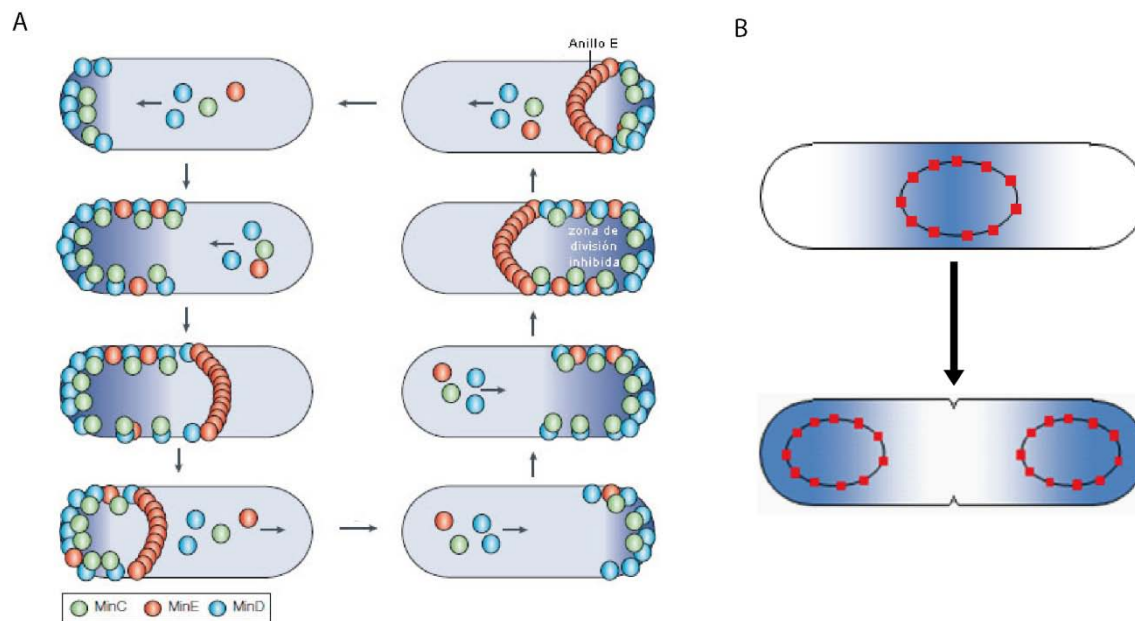


Figura 2: Sistema MinCDE y sistema de oclusión nuclear. A-Sistema MinCDE. Se representa el ciclo de oscilación de polo a polo (Rothfield *et al.*, 2005). B- Sistema de oclusión nuclear con un solo cromosoma bacteriano (arriba), y tras la replicación y segregación de ADN, con las proteínas de inhibición (SlmA o Noc) representadas como cuadrados rojos. En todas las imágenes las zonas de color azul representan zonas de inhibición de la polimerización de FtsZ

➤ **Oclusión Nuclear**

Además de un sistema que regula la ubicación del divisoma al ecuador celular, existe un segundo sistema de regulación espacial que evita la formación del anillo Z en lugares donde se encuentra el ADN cromosómico. Este sistema es el de oclusión nuclear (Woldringh *et al.*, 1991), y lo lleva a cabo la proteína SlmA en *E. coli* (Bernhardt y de Boer, 2005) y la proteína Noc en *B. subtilis* (Wu y Errington, 2004). Ambas proteínas interactúan con el ADN cromosómico (Bernhardt y de Boer, 2005, Wu *et al.*, 2009) e inhiben la formación del anillo Z (Figura 2B), aunque sus secuencias no muestran similitud significativa. En condiciones normales, el sistema de oclusión nuclear no es esencial, ya que tras la replicación del ADN, las dos copias son segregadas a polos opuestos de la bacteria, donde el sistema MinCD evita la formación de anillos Z, como ya se ha visto. Sin embargo, en bacterias con SlmA o Noc inactivados y a los que se les interrumpe la replicación de ADN, lo que deja ADN en el ecuador celular, se observa la formación de divisomas aun en presencia de nucleoides (Wu y Errington, 2004,

Bernhardt y de Boer, 2005), lo que indica que SlmA y Noc normalmente evitan estos problemas.

La combinación de la oclusión nuclear con el sistema MinCD hace que, una vez duplicado el ADN de la bacteria, la formación del anillo Z se restrinja a la zona del ecuador celular (Figura 3). En casos donde se inhabilite uno u otro sistema se puede dar la formación de anillos Z adicionales.

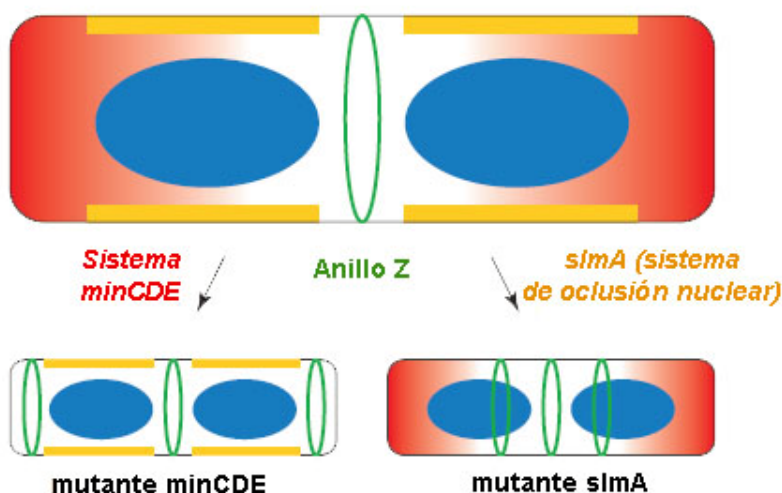


Figura 3: Esquema de regulación espacial del anillo Z en *E. coli*. En rojo la zona de inhibición por el sistema MinCDE, líneas naranjas; zona de inhibición por oclusión nuclear, verde; anillos Z (Goehring y Beckwith, 2005).

➤ *MipZ*

MipZ es una ATPasa que ha sido descrita como un regulador espacial de la división celular (Thanbichler y Shapiro, 2006). Hasta el momento sólo se ha encontrado en *C. crescentus*. Interacciona específicamente con la proteína ParB, que a su vez se localiza junto al origen de replicación del ADN por interacción con sitios *parS*, cercanos al origen. MipZ forma un gradiente en la célula, con la zona de mayor concentración localizada en el origen de replicación. Se ha observado *in vivo* e *in vitro* que MipZ desestabiliza a los polímeros de FtsZ, lo cual constituye un mecanismo para coordinar la replicación y segregación de ADN con la formación del anillo Z y división.

3. LA PROTEÍNA DE DIVISIÓN CELULAR FTSZ

3.1 Conservación

FtsZ, el componente principal del septosoma, es una proteína de alrededor de 40 KDa presente en la gran mayoría de organismos procariotas, además de encontrarse en cloroplastos y algunas mitocondrias. Sin embargo, hay algunos grupos y especies aisladas que carecen de FtsZ. Un ejemplo de grupo de procariotas que viven sin FtsZ es el phylum de arqueobacterias *Crenarchaeota*. En estos organismos, han sido descritas las proteínas Cdv, dos de las cuales son homólogas a miembros del sistema ESCRT-III eucariota, que sustituyen la función de FtsZ (Lindas *et al.*, 2008). Existen bacterias que también carecen de FtsZ y que son de origen filogenético diverso pero que tienen en común haber sufrido procesos de biología reductiva, como parásitos o simbioses intracelulares (Vaughan *et al.*, 2004). Es posible que estos organismos empleen mecanismos codificados por el hospedador para dividirse. Algunas bacterias del género *Mycoplasma* carecen de FtsZ y se ha demostrado en *Mycoplasma genitalium* que ésta no es esencial para la división de este microorganismo (Lluch-Senar *et al.*, 2010). También se conoce una pequeña bacteria de vida libre, *Ureaplasma urealyticum*, que carece de FtsZ (Vaughan *et al.*, 2004), sin que se haya descubierto hasta el momento cómo se divide. Por último se ha demostrado que las formas L, que son formas bacterianas sin pared celular (Klieneberger, 1935), pueden dividirse sin FtsZ (Leaver *et al.*, 2009).

Existen diferentes subtipos de FtsZ, siendo FtsZ1 la única que es universal (conocido como “FtsZ” por defecto). Es la que típicamente está implicada en la formación del anillo Z. Los restantes subtipos están mucho más restringidos taxonómicamente. En el phylum *Euryarchaeota* de arqueobacterias existe el homólogo FtsZ2 además de FtsZ1 (Vaughan *et al.*, 2004). FtsZ1 y FtsZ2 comparten más de un 40% de identidad, pero la identidad de diferentes FtsZ2 (y FtsZ1) entre sí es aún mayor. Este hecho indica que la duplicación desde un ancestro común fue relativamente temprana en el desarrollo de este filo y apunta a la existencia de una fuerte presión selectiva en ambas subfamilias. Sin embargo la función precisa de FtsZ2 es desconocida. Entre uno y tres miembros de una tercera subfamilia (FtsZ3) están presentes en algunas especies de halobacterias dentro de este mismo filo. FtsZ3 es un homólogo más remoto de FtsZ1 (y FtsZ2) con los que comparte identidades de secuencia por debajo del 30%. Estos homólogos

también divergen mucho entre sí, con gran variabilidad en las zonas no esenciales de la proteína (Vaughan *et al.*, 2004). FtsZ3 se encuentra en organismos con grandes replicones de ADN, y se considera que su función podría estar relacionada con mediar la segregación de las copias de estos replicones a las células hijas. En plástidos de eucariotas también existen distintos subtipos de FtsZ pero éstos parecen copias mucho más recientes de FtsZ1, con una identidad muy alta (por encima del 90%), lo que indica que son parálogos.

3.2 Estructura y ensamblaje

FtsZ es una proteína citoplasmática compuesta de dos dominios globulares separados por una hélice central. A pesar de tener una baja similitud de secuencia, la estructura terciaria de FtsZ es muy similar a la de la tubulina, y se considera que son homólogas (Erickson, 1995, de Pereda *et al.*, 1996, Nogales *et al.*, 1998b, Löwe y Amos, 1998, Nogales *et al.*, 1998a), aunque la unidad funcional de FtsZ es el monómero y la de tubulina un heterodímero. FtsZ tiene otras características en común con la tubulina. Ensambla formando protofilamentos parecidos a los de tubulina a través de la asociación cabeza-cola de sus subunidades (Mukherjee y Lutkenhaus, 1994, Erickson *et al.*, 1996, Löwe y Amos, 1999, Oliva *et al.*, 2003, Oliva *et al.*, 2004) (Figura 4). Además, ambas son GTPasas auto-activadas (de Boer *et al.*, 1992a, Raychaudhuri y Park, 1992, Mukherjee *et al.*, 1993). La inserción del bucle T7 de la base de una subunidad en el sitio de unión a nucleótido de la siguiente coloca a los aminoácidos catalíticos próximos al fosfato- γ del nucleótido, lo que lleva a la hidrólisis del GTP (Scheffers *et al.*, 2001, Oliva *et al.*, 2004). La actividad GTPasa de FtsZ depende de su polimerización (Scheffers *et al.*, 2002, Oliva *et al.*, 2003).

Cuando se polimeriza *in vitro*, FtsZ forma una multitud de estructuras; protofilamentos sencillos, haces gruesos, láminas y toroides (Mukherjee y Lutkenhaus, 1994, Erickson *et al.*, 1996, Popp *et al.*, 2009), aunque nunca se ha observado ninguna estructura análoga a un microtúbulo.

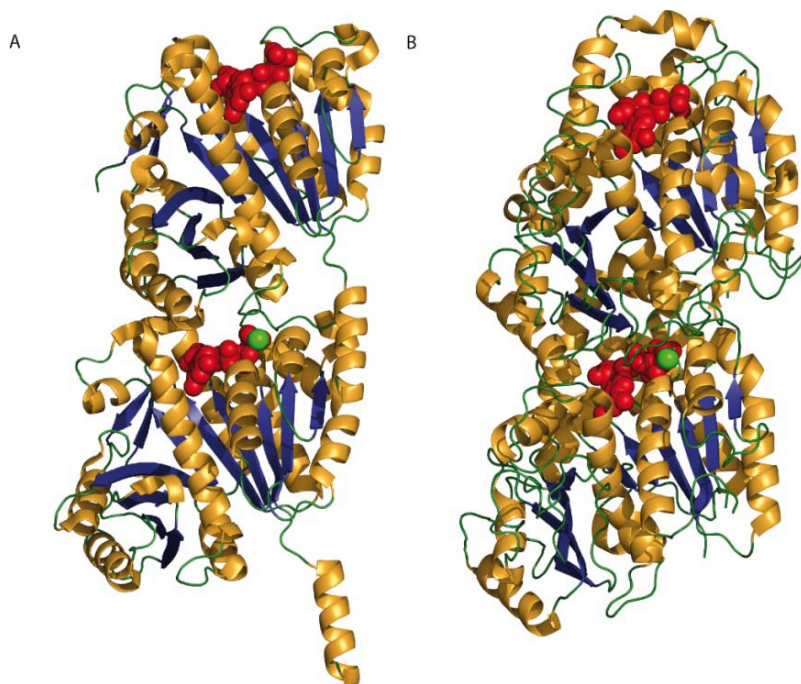


Figura 4: Dímero de FtsZ y de α -tubulina. A- Dímero de FtsZ de *Methanococcus jannaschii* con GTP y Mg^{2+} (PDB: 1W5A). B- Dímero de α tubulina con GTP/GDP (en rojo) y Mg^{2+} (PDB:1JFF). Los nucleótidos están en rojo y el Mg^{2+} en forma de esferas verdes.

A pesar de que los protofilamentos de FtsZ son de una sola subunidad de ancho, su ensamblaje es cooperativo (Romberg *et al.*, 2001, Huecas y Andreu, 2003, Huecas *et al.*, 2008). Se han propuesto varios modelos para explicar estos hechos (Huecas *et al.*, 2008, Dajkovic *et al.*, 2008, Miraldi *et al.*, 2008). La cooperatividad en estos modelos se basa en una isomerización de los monómeros desde una estructura “curva” menos favorable para polimerización (C) a una “recta” favorable para la polimerización (S, Figura 5). La polimerización requeriría de dos fases, una primera limitante en la que ocurre nucleación y otra, determinado por la concentración crítica de proteína, en la que ocurre la elongación favorable.

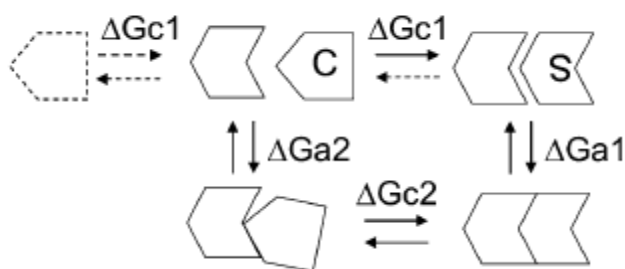


Figura 5: Modelo de ensamblaje nucleado de FtsZ. C representa el estado basal curvo y S el estado “activado” de asociación. Hay dos caminos posibles: Un camino (1) donde la activación ocurre antes de la asociación, y otro (2) donde la asociación precede a la activación (Huecas *et al.*, 2008).

La polimerización de FtsZ depende de la unión de GTP y la despolimerización de su hidrólisis (Mukherjee y Lutkenhaus, 1994, Huecas y Andreu, 2004). Así, GTP favorece la formación de polímeros de FtsZ, mientras que GDP favorece el desensamblaje por

pérdida de la estabilidad del polímero (Huecas y Andreu, 2003, Huecas y Andreu, 2004). Una de las diferencias más notables entre FtsZ y tubulina es que, mientras que en la tubulina el sitio de unión a nucleótido está ocluido en el protofilamento, en FtsZ está más expuesto (Nogales *et al.*, 1998a, Oliva *et al.*, 2004). Esto hace que en FtsZ los polímeros puedan tener un contenido alto en GTP (Mingorance *et al.*, 2001, Romberg y Mitchison, 2003), lo que les diferencia de la tubulina, cuyos polímeros hidrolizan GTP a GDP, pero éste no se intercambia en el polímero, de manera que gran mayoría del polímero contiene GDP. En principio, al tener el sitio de nucleótido expuesto, FtsZ podrá intercambiar GDP por GTP sin desensamblar del polímero. Sin embargo, se ha visto que la velocidad de este intercambio es comparable a la velocidad de intercambio de monómeros del polímero, lo que hace pensar que los monómeros de FtsZ podrían ciclar con la actividad GTPasa de una manera análoga a la tubulina (Huecas *et al.*, 2007).

Ensayos de FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) y otros estudios han demostrado que el anillo Z no es una estructura estática sino que se está remodelando continuamente *in vivo*, con una alta velocidad de intercambio (alrededor de 8 segundos) que depende de la actividad GTPasa del polímero (Stricker *et al.*, 2002, Anderson *et al.*, 2004). Mutaciones que afectan a la actividad GTPasa pero no a la unión de nucleótido resulta en polímeros más estables y con un intercambio de monómeros menor (Anderson *et al.*, 2004). La actividad GTPasa promueve el desensamblaje de los protofilamentos y es la clave de la naturaleza dinámica de los polímeros de FtsZ, que se observa tanto *in vitro* como *in vivo* (Mukherjee y Lutkenhaus, 1998, Stricker *et al.*, 2002, Anderson *et al.*, 2004, Chen y Erickson, 2005).

3.3 Estructura y función de los polímeros de FtsZ

Una cuestión importante es cómo se produce la constricción de las membranas durante la división celular y qué papel juega FtsZ en este proceso. Existen básicamente tres modelos diferentes para explicar la función de FtsZ en la división celular.

Existe un “modelo andamio” donde los polímeros de FtsZ en sí mismos no contribuyen a la constricción, sino que sirven de “andamio” para el ensamblaje de otros componentes del divisoma, como las proteínas de síntesis de peptidoglicano (Varma *et al.*, 2007), que serían las responsables de la constricción (Li *et al.*, 2007). Este modelo

tiene varios problemas: por una parte no explica la división en *Mycoplasma pulmonis*, que carece de pared celular pero que sí expresa FtsZ como elemento esencial para su división (Wang y Lutkenhaus, 1996). Por otra parte, se ha visto que FtsZ anclada a membrana es capaz de producir fuerza constrictora por sí misma en liposomas (Osawa *et al.*, 2008, Osawa *et al.*, 2009), por lo que parece improbable que FtsZ sea únicamente un elemento de anclaje, aunque obviamente también presenta esta función.

Los otros dos modelos asumen que FtsZ es capaz por sí misma de producir una fuerza constrictora, pero se diferencian en cómo lo hace. En el modelo “deslizante” (Lan *et al.*, 2009) (Figura 6A) se postula que la fuerza constrictora procede de interacciones laterales entre protofilamentos adyacentes. En este modelo, el establecimiento de un número mayor de interacciones entre los protofilamentos hace energéticamente favorable este deslizamiento. Como FtsZ está anclada a la membrana plasmática por FtsA y ZipA, este deslizamiento tiene como resultado una constricción progresiva de la membrana. Como apoyo de este modelo existe un estudio que muestra que una mutación causante de defectos en la formación del anillo Z *in vivo* probablemente cause defectos en la asociación lateral de protofilamentos de FtsZ (Monahan *et al.*, 2009). El otro modelo puede llamarse de “pinzamiento iterativo” (Lu *et al.*, 2000, Li *et al.*, 2007, Erickson, 2009) (Figura 6B). En dicho modelo, la fuerza constrictora la aporta el cambio desde la conformación “recta” a la conformación “curva” que se da cuando FtsZ intercambia GTP por GDP. De nuevo se postula que como FtsZ está anclado a la membrana, este cambio se transmitirá como fuerza mecánica a la membrana. Los polímeros con GDP, siendo meta-estables, se desensamblarán y reensamblarán con GTP en conformación recta para volver a empezar el ciclo. En contra de este modelo de funcionamiento está el hecho de que cepas bacterianas con FtsZ mutada para tener muy baja actividad GTPasa aún son capaces de dividirse (Mukherjee *et al.*, 2001).

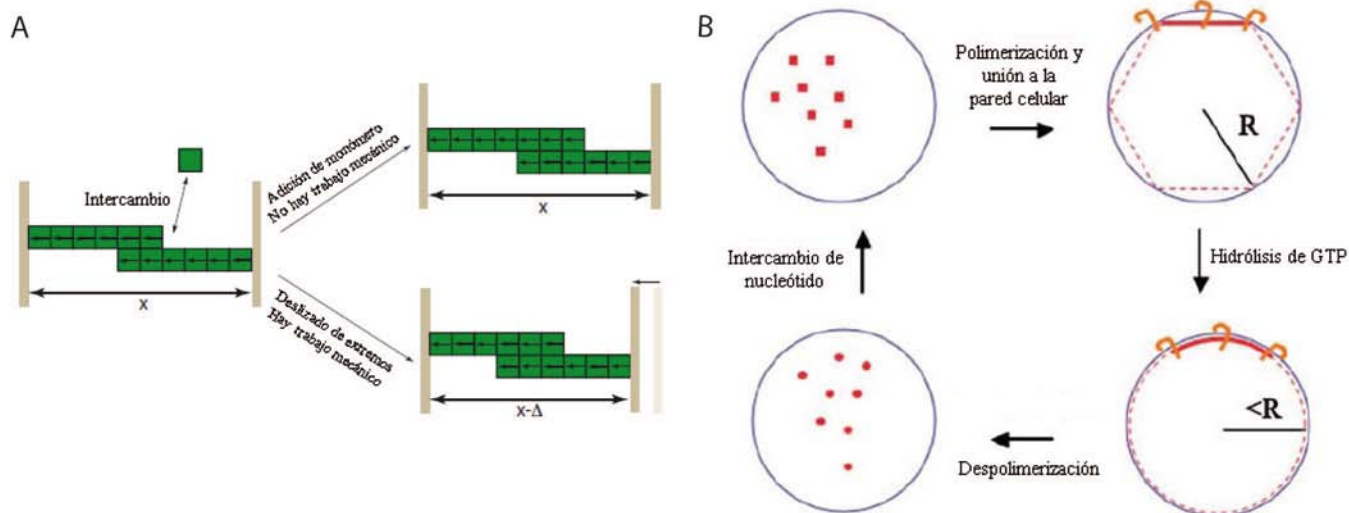


Figura 6: Modelos de funcionamiento de FtsZ *in vivo*. A- Modelo deslizador. La energía del sistema se puede minimizar a través de la adición de un monómero, que no tiene como resultado trabajo mecánico, o a través del deslizamiento de un filamento sobre otro, que sí hace trabajo mecánico (Lan *et al.*, 2009). B- Modelo de cambio conformacional. La hidrólisis de GTP a GDP pasa los polímeros de rectos a curvos, lo que redundará en fuerza mecánica. El polímero posteriormente desensambla y reensambla recto en presencia de GTP (Li *et al.*, 2007).

Aunque se ha demostrado que *in vitro* los polímeros de FtsZ adoptan una gran variedad de morfologías, se sabe menos sobre la morfología de los polímeros *in vivo*, una información que podría ayudar a esclarecer el funcionamiento del anillo Z. Se ha logrado visualizar polímeros de FtsZ *in vivo* utilizando crio-tomografía electrónica en *C. crescentus* (Li *et al.*, 2007) y por la técnica fluorescente PALM (Photoactivated Localization Microscopy) en *E. coli* (Fu *et al.*, 2010) (Figura 7). Los resultados en *C. crescentus* revelaron que FtsZ polimeriza debajo de la membrana plasmática en polímeros moderadamente curvos (aunque también se observan rectos) que son inicialmente dispersos y van agrupándose a medida que avanza la división. No se pudo observar espaciamiento lateral regular indicativo de interacciones laterales entre protofilamentos en la cepa silvestre, aunque sí se observaban estos espaciados en células que sobreexpresaban FtsZ. Por otro lado, en células que expresaban el mutante FtsZG109S, con una unión e hidrólisis de GTP más lenta, se observaron grandes constricciones y una mayor asociación lateral aparente de protofilamentos. Utilizando *E. coli* se pudo observar una morfología aparentemente helicoidal del anillo Z, aunque aún es imposible observar protofilamentos individuales *in vivo*.

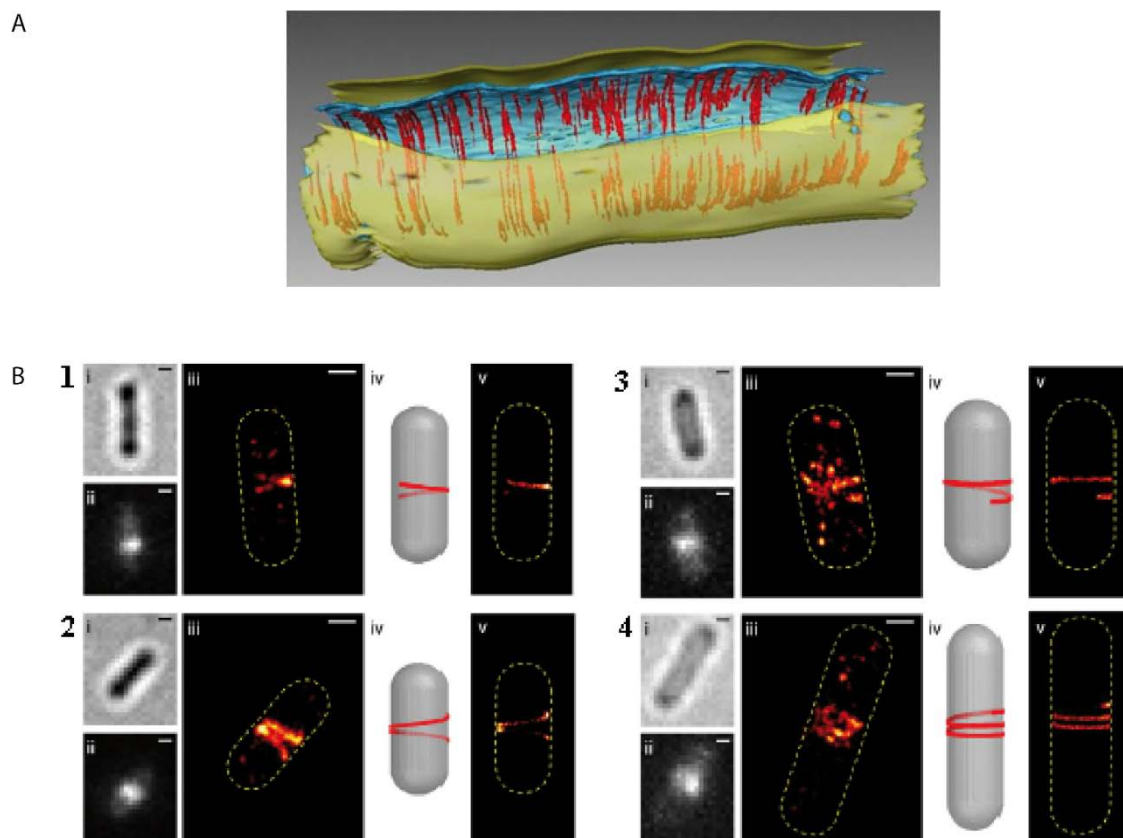


Figura 7: Filamentos de FtsZ visualizados *in vivo*. A - Reconstrucción 3D de imágenes de criomicroscopía electrónica de *C. crescentus* tratado con A22 (un inhibidor de MreB, de manera que se descarta la posibilidad de que los filamentos sean de MreB) y que expresa FtsZG109S (en rojo). La membrana plasmática está en azul y la pared celular en amarillo (Li *et al.*, 2007). B – Imágenes obtenidas con PALM de células BL21(DE3)pLysS que expresan la proteína fluorescente FtsZ-mEos2. Todas las imágenes muestran células fijadas en campo claro (i), fluorescencia verde previa a la toma de imagen PALM (ii) imagen PALM (iii) y el modelo tridimensional obtenido a partir de la imagen PALM (iv). Para la construcción de las imágenes se emplearon 999 (1), 2843 (2), 804 (3), y 627 (4) moléculas de FtsZ-mEos2 (Fu *et al.*, 2010).

4. LA BÚSQUEDA DE INHIBIDORES

4.1 Inhibidores descritos para FtsZ

La importancia de FtsZ para la división celular, combinada con su expresión casi universal en bacterias, hace que sea una buena candidata para la búsqueda de nuevos antibióticos que podrían combatir el fenómeno creciente de resistencia bacteriana. En los últimos años se han publicado diversos trabajos con diferentes compuestos que inhiben la actividad de FtsZ o la división celular (Tabla 1). A la mayoría de estos compuestos se les atribuye un efecto desestabilizador de polímeros de FtsZ, aunque dado que la función adecuada de FtsZ depende también de su dinámica, en principio

también se puede considerar inhibidor funcional un compuesto que estabilice los polímeros de FtsZ de manera que elimine sus propiedades dinámicas.

Tabla 1: Inhibidores descritos contra FtsZ

Nombre	Referencia
5,5'-Bis-(8-anilino-1-naftalenosulfonato)	(Yu y Margolin, 1998)
3-methoxibenzamida (3-MBA)	(Ohashi <i>et al.</i> , 1999)
SRI-3072 y SRI-7614	(White <i>et al.</i> , 2002)
Viriditoxina	(Wang <i>et al.</i> , 2003)
Zantrinas Z1-Z5	(Margalit <i>et al.</i> , 2004)
Rojo de Rutenio	(Santra <i>et al.</i> , 2004)
Péptidos FtsZp1-3	(Paradis-Bleau <i>et al.</i> , 2004)
Análogos de GTP sustituidos en C8	(Lappchen <i>et al.</i> , 2005, Lappchen <i>et al.</i> , 2008)
Sanguinarina	(Beuria <i>et al.</i> , 2005)
PC170942 y PC58538	(Stokes <i>et al.</i> , 2005)
Dichamanetina	(Urgaonkar <i>et al.</i> , 2005)
2''-hidroxi-5''-benzilouvarinol-B	(Urgaonkar <i>et al.</i> , 2005)
Derivado de 4-Aminofurazano - A189	(Ito <i>et al.</i> , 2006)
Derivado de taxano	(Huang <i>et al.</i> , 2006)
Varios análogos de GTP	(Paradis-Bleau <i>et al.</i> , 2007)
Totarol	(Jaiswal <i>et al.</i> , 2007)
Cinamaldehido	(Domadia <i>et al.</i> , 2007)
DAPI	(Nova <i>et al.</i> , 2007)
N-bencil-3-sulfonamidopirolidinas	(Mukherjee <i>et al.</i> , 2007)
Sulfato de Berberina	(Domadia <i>et al.</i> , 2008)
Curcumina	(Rai <i>et al.</i> , 2008)
MciZ (péptido)	(Handler <i>et al.</i> , 2008)
PC190723	(Haydon <i>et al.</i> , 2008, Haydon <i>et al.</i> , 2010, Andreu <i>et al.</i> , 2010)
3-alkoxibenzamida y análogos	(Czaplewski <i>et al.</i> , 2009)
OTBA	(Beuria <i>et al.</i> , 2009)
Edeina B	(Shimotohno <i>et al.</i> , 2010)
Crisofaentinas	(Plaza <i>et al.</i> , 2010)

El mecanismo de acción de muchos de estos compuestos aún está por descubrir, y en muchos casos no está determinado el sitio de unión a FtsZ. Las zonas de interacción longitudinal entre monómeros de FtsZ pueden constituir dianas para potenciales inhibidores, pero cavidades en la proteína son dianas más atractivas, porque compuestos que unan estos sitios lo estarán haciendo con mayor probabilidad de manera

específica. Hay dos cavidades claras en FtsZ, el sitio de unión a nucleótido y la hendidura formada entre la hélice H7 y el dominio C-terminal, donde se ve que se une PC190723 (Figura 8).

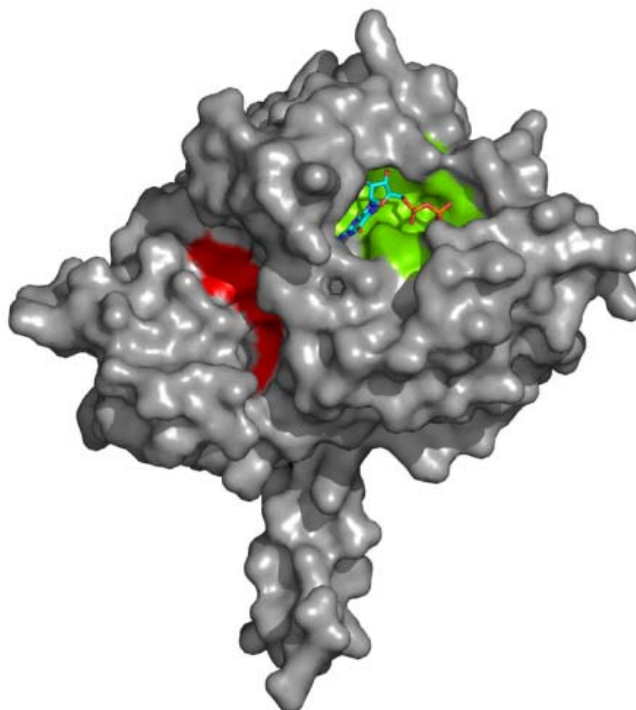


Figura 8: Sitios de unión de inhibidores de FtsZ. Estructura de MjFtsZ-GDP (PDB: 2VAP) con el sitio probable de unión de PC190723 (rojo) y el sitio de unión a nucleótido (verde)

4.2 La búsqueda de inhibidores con diana en el sitio de nucleótido

Como ya se ha descrito, la unión a nucleótido es esencial para la función de FtsZ. FtsZ tiende a ensamblarse en presencia de GTP y desensamblarse en presencia de GDP. Condiciones que eliminen o reduzcan la actividad GTPasa, como mutaciones o el uso de nucleótidos no hidrolizables, eliminan el comportamiento dinámico de la proteína. El sitio de nucleótido de FtsZ es por tanto atractivo para la búsqueda de inhibidores específicos. En esta Tesis he desarrollado un método que permite la identificación de compuestos que compiten con GTP por la unión a FtsZ. El uso de esta técnica tiene una finalidad doble. Por una parte, permite cribar diversos compuestos que posiblemente se unan al sitio de unión a nucleótido de FtsZ y determinar con qué afinidad lo hacen. Por otro lado, es una herramienta con la que se puede explorar el propio sitio de nucleótido, aportando información sobre la unión de los ligandos naturales GTP y GDP.

La base del método que he desarrollado es el uso de un análogo fluorescente del GTP llamado 2'(3')-O-(N-Metilantraniloil)-GTP (*mant*-GTP) y la medida de su anisotropía de fluorescencia (Huecas *et al.*, 2007). La anisotropía es una medida de la libertad rotacional de una molécula. Cuanto más alta es la libertad rotacional, más baja es la anisotropía, y viceversa (Figura 9). Así, cuando *mant*-GTP se une a FtsZ, su libertad rotacional bajará, lo cual resultará en un aumento cuantificable de su anisotropía. De la misma manera, cuando un compuesto compita con *mant*-GTP por el sitio de nucleótido, desplazará a *mant*-GTP, lo que se reflejará en una disminución de anisotropía. Este sencillo proceso da lugar a una técnica potente que ha permitido explorar el sitio de unión a nucleótido de FtsZ y que previsiblemente se podrá emplear para la detección de posibles inhibidores de FtsZ en el futuro. El método se ha empleado para la descripción de análogos de GTP sustituidos en C8. Uno de estos compuestos, 8Br-GTP, fue señalado como inhibidor de FtsZ (Lappchen *et al.*, 2005). En esta Tesis se han empleado varios de estos análogos para estudiar, mediante el uso de la técnica de competición con *mant*-GTP y otras pruebas bioquímicas, la relación entre la unión al sitio de nucleótido y el posible efecto inhibitor de estos análogos.

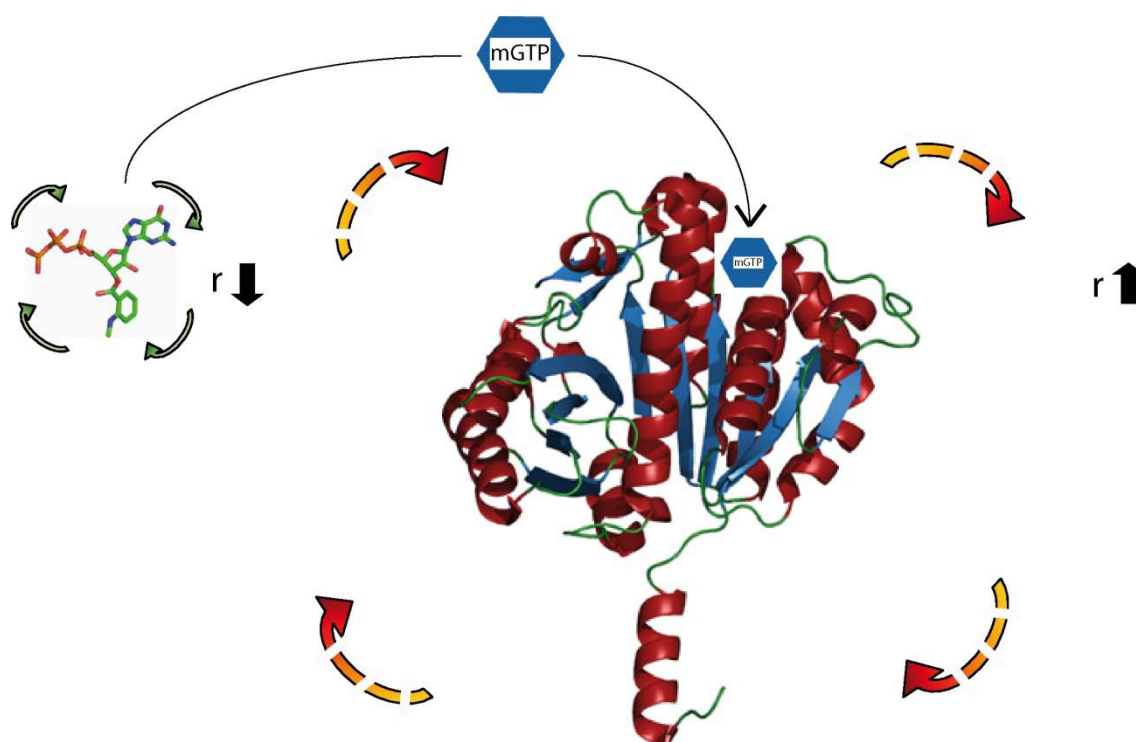


Figura 9: La anisotropía como medida de movilidad rotacional. Representación de una molécula de *mant*-GTP libre (izquierda), con alta libertad rotacional y por tanto baja anisotropía que, al unirse a un monómero de FtsZ, reduce su libertad rotacional, aumentando la anisotropía detectada. r – anisotropía.

4.3 Sitio de PC190723

PC190723 (en adelante PC) es uno de los inhibidores de FtsZ más prometedores como compuesto cabeza de línea para el desarrollo de un antibiótico que utilice FtsZ como diana (Haydon *et al.*, 2008). Tiene como sitio probable de unión la cavidad entre la hélice H7 y el dominio C-terminal de FtsZ. PC confirió una protección efectiva contra una dosis letal de *Staphylococcus aureus* en un modelo murino. Además, provoca un fenotipo de filamentación en *B. subtilis*, característico de inhibición de la división celular (Figura 10). En ese trabajo, la descripción del efecto de PC sobre FtsZ se limitó a la comprobación de que inhibe la actividad GTPasa de FtsZ de *S. aureus in vitro*. Una descripción más completa sería interesante tanto desde el punto de vista biomédico como teórico, ya que puede revelar información importante para el desarrollo de compuestos similares y también ayudar a describir el comportamiento de FtsZ. En esta Tesis se muestran los resultados obtenidos respecto del mecanismo bioquímico de acción de a través de diferentes técnicas y empleando FtsZ purificada de varias especies diferentes.

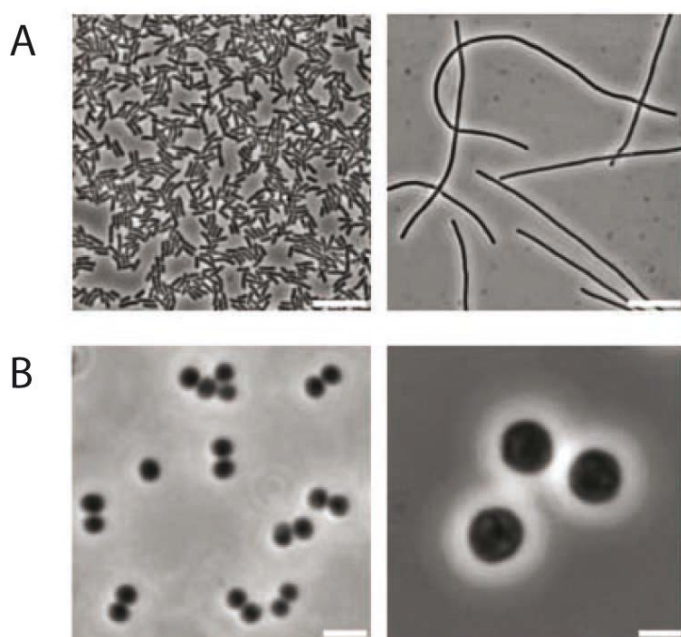


Figura 10: Inhibición de la división celular en presencia de PC. A- Cultivo *B. subtilis* 168 en ausencia (izquierda) y presencia (derecha) de 2 μg/ml de PC. B- Cultivo de células de *S. aureus* ATCC 29213 en la ausencia (izquierda) y presencia (derecha) de 2 μg/ml de PC. Barra de escala de 2 μm. (Haydon *et al.*, 2008)

OBJETIVOS

El objetivo general de esta Tesis es la exploración de los sitios de unión de ligando a la proteína de división celular FtsZ y la investigación de los mecanismos de acción de los ligandos inhibidores. Para ello se van a estudiar dos sitios; el de unión a nucleótido y la hendidura entre el dominio GTPasa y el dominio C-terminal de FtsZ. Los objetivos concretos son:

- A.** El desarrollo de un método que permita detectar compuestos que compiten con GTP por el sitio de unión a nucleótido y determinar su afinidad. Para ello se va a:
1. Medir la afinidad de un nucleótido fluorescente (*mant*-GTP) y de un nucleótido radiactivo (^3H -GTP) por FtsZ libre de nucleótido (apoFtsZ).
 2. Comparar dos métodos de competición independientes empleando *mant*-GTP y ^3H -GTP para la detección de compuestos que se unan al sitio de nucleótido de FtsZ y la medición de su afinidad.
- B.** Explorar el sitio de unión a nucleótido con el fin de obtener información sobre las interacciones de FtsZ con sus ligandos naturales, GTP y GDP. Se utilizarán dos estrategias principales:
1. Competición con *mant*-GTP para medir las afinidades de los ligandos naturales y sus principales componentes.
 2. El análisis de las interacciones por métodos computacionales (dinámica molecular y cálculos de energía libre de unión) utilizando como base las estructuras cristalográficas conocidas de FtsZ unido a GDP o GTP.
- C.** La búsqueda de compuestos diferentes del nucleótido natural que puedan reemplazarlo y posiblemente inhibir el ensamblaje de FtsZ. Con este fin se ensayarán derivados de GTP sustituidos en C8, un péptido publicado como un inhibidor de FtsZ (MciZ) y una serie de compuestos elegidos por cribado virtual como candidatos a unirse al sitio de nucleótido.
- D.** La investigación del mecanismo de acción y especificidad de especie del inhibidor PC190723 (PC), cuyo sitio de unión probablemente sea la hendidura entre los dominios N- y C-terminales de FtsZ. Para ello se va a:
1. Investigar el efecto de PC sobre la polimerización de FtsZ *in vitro* a través de diferentes técnicas.
 2. Estudiar la especificidad de PC empleando FtsZ de cinco especies diferentes; *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Methanococcus jannaschii* y *Streptococcus pneumoniae*.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. REACTIVOS

1.1 Ligandos

El *mant*-GTP, el *mant*-GDP y el 8-BrGTP proceden de Jena Bioscience. El GTP, el GDP, el GMP, la guanosina, el ATP, el CTP y el UTP proceden de Sigma. El [8-³H]GTP (5.1 Ci/mmol) procede de Amersham Biosciences. El tripirofosfato (PPPi) es de Fluka, el pirofosfato (PPi) de Riedel de Haën y el fosfato inorgánico (Pi) de Merck. El 8-methoxiGTP (MeOGTP), el 8-pyrrolidilGTP (PyrrGTP), el 8-morfolino-GTP (MorphGTP), el 8Cl-GTP, el 8I-GTP y el 8-tertbutil-GTP (tBuGTP) se sintetizaron en el laboratorio de Tanneke den Blaawen (Lappchen *et al.*, 2008) Los compuestos elegidos a partir de las rondas de cribado virtual fueron adquiridos de ChemBridge y IBScreen, para la primera y segunda ronda, respectivamente. El PC190723 procede de Prolysis y la difluorometozibenzamida (DFMBA) se sintetizó como se describe (Andreu *et al.*, 2010). Los péptidos MciZ, CRAMP Melitina y C(1-8)M(1-18) se hicieron por síntesis en fase sólida en el laboratorio del Dr. David Andreu (Universitat Pompeu Fabra). Las polilisinas (PolyLys) P0879 y P6515 proceden de Sigma-Aldrich.

1.2 Otros reactivos

El KCl, el NaCl, el IPTG, el KOH, el acetato de uranilo, el ácido perclórico, el sulfato amónico, el ácido acético, el Tris, el Glicerol y el HCl proceden de Merck. El EDTA, la kanamicina, la ovoalbumina, la acetato quinasa, el Pipes, el Mes, el Hepes, el SDS, y el azul de Commassie proceden de Sigma-Aldrich. La ampicilina procede de Roche. Las columnas HiTrapQ HP (5 mL), phenyl HP (1 mL), desalting (5 mL) y las resinas sephadex G-25 y sephacryl S-300 proceden de GE Healthcare. El acetil-fosfato procede de Fluka. Las unidades de concentración de proteína centriprep y centricore (15K) proceden de Milipore. El metanol procede de Panreac. El extracto de levadura y la bactotriptona proceden de Becton Dickinson & Co. El cloranfenicol procede de Boehringer. El cloruro de guanidinio (GdmCl) y el dimetilsulfóxido (DMSO) proceden de Calbiochem. La acrilamida, la bisacrilamida, la tetramethyletilenediamina (TEMED), el persulfato amónico (APS) y el marcador de proteínas de bajo peso molecular (LWMM) proceden de BioRad.

2. EXPRESIÓN DE FTSZ

Se expresó FtsZ de 4 especies; *B. subtilis* (BsFtsZ), *S. aureus* (SaFtsZ), *S. pneumoniae* y *M. jannaschii* (MjFtsZ). Además se expresó un mutante de FtsZ de *M. jannaschii* (MjFtsZ-R332V) utilizando las mismas condiciones que para FtsZ de *M. jannaschii* silvestre. Las condiciones empleadas se resumen en la Tabla 2.

2.1 Plásmidos y cepas de expresión

Debido a su origen diverso, se emplearon plásmidos diferentes para cada proteína. Se utilizó el plásmido pHis17 (Löwe y Amos, 1998) para MjFtsZ (Oliva *et al.*, 2003) y para BsFtsZ (Oliva *et al.*, 2007). Aunque el plásmido original lleva codificada una cola de 6 histidinas para facilitar la purificación, en este caso la cola ha sido suprimida de los plásmidos. Este plásmido pHis17 incluye el gen de la β -lactamasa, que confiere resistencia a ampicilina. Para SaFtsZ (Andreu *et al.*, 2010) y FtsZ de *S. pneumoniae* se empleó el plásmido pET29. Este plásmido incluye el gen fosfotransferasa II (NPT II), que da resistencia a la kanamicina (Reiss *et al.*, 1984). Además tiene codificada una cola de 8 aminoácidos de estreptavidina (strep-tag) para su fusión con la proteína a expresar, lo que facilita su purificación. En el caso de SaFtsZ esta cola fue eliminada del vector previo a la inserción de su ORF (Open Reading Frame) y en el caso de FtsZ *S. pneumoniae* (strep-SpFtsZ) se mantuvo.

Los vectores fueron introducidos en células competentes de *E. coli* de las cepas CD41(DE3) (para BsFtsZ), BL21(DE3) (para SaFtsZ) o BL21(DE3)-pLysS (para MjFtsZ y strep-SpFtsZ). Estas cepas tienen deleccionadas las proteasas *OmpT* y *lon*, evitándose así la degradación de la proteína expresada. Además con MjFtsZ y SpFtsZ, se utilizó plásmido pLysS. Este plásmido contiene un gen que codifica para la lisozima del fago T7, que inhibe la RNA polimerasa de T7, lo que contribuye a evitar “escape” de expresión en ausencia de IPTG (Huisman y D'Ari, 1981). Cuando se añade IPTG, la expresión de la RNA polimerasa de T7 supera la capacidad inhibitoria de la lisozima y la expresión procede con normalidad.

2.2 Expresión

Todas las expresiones partieron de cultivos fuente conservados con 33% de glicerol a -75°C . Los cultivos fuente se utilizaron siempre en condiciones de esterilidad y manteniendo los tubos en nieve carbónica para evitar descongelación.

Para la preparación de los pre-inoculos se sembraron 20 mL de medio (con su correspondiente concentración de antibiótico, ver Tabla 2) a partir de alícuotas fuente, tomándose algunas células con un palillo estéril que se pasó al medio estéril. El medio elegido en la mayor parte de los casos es Luria-Bertani (10 g/L triptona, 10 g/L NaCl, 5 g/L extracto de levadura, pH 7.0). En el caso de BsFtsZ se eligió el medio 2xYT (16 g/L triptona, 5 g/L NaCl, 10 g/L extracto de levadura, pH 7.0) como un medio enriquecido para mejorar la expresión de la proteína.

El inóculo inicial se cultivó a 200 rpm y 37°C en un baño de agitación Innova 3000 durante toda la noche. Posteriormente se diluyó en proporción 1:100, mediante la inoculación de 10 mL de cultivo en 1L total de medio, dividido en 2 matraces con 500 mL cada uno en los casos de MjFtsZ, EcFtsZ, y SaFtsZ y uno sólo de 1 L de medio en el caso de BsFtsZ. Se creció el cultivo hasta la fase exponencial (0.4-0.6 unidades de densidad óptica [D.O] a longitud de onda 600 nm) y se inició la expresión con IPTG. Tras 3 horas de crecimiento se enfrió el cultivo en hielo y se centrifugó a $8000 \times g$ y 4°C . También se anotó la D.O obtenida tras la expresión. Las células se resuspendieron en 20 mL de su tampón específico (Tabla 2) y se congelaron a -80°C hasta el momento de la purificación. Se recogieron muestras de 500 μl de cultivo antes del inicio de la expresión y tras su finalización y se sedimentaron las células centrifugando a 13.000 rpm en una centrífuga Mikroliter (Hettich) durante 5 minutos. Las células fueron resuspendidas en tampón de muestra de electroforesis. Para igualar la carga de proteína entre las muestras antes y después de la expresión, las células se resuspendieron en un volumen en microlitros equivalente a 100 veces la medida de D.O a 600nm en el momento de la toma de muestra. Aun así, las muestras tomadas tras la finalización de la expresión tuvieron una carga de proteína sistemáticamente mayor que las muestras pre-expresión. Se cargaron volúmenes iguales de las muestras en un gel 12% de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) para la visualización de la expresión de FtsZ.

Tabla 2: Condiciones de las expresiones de FtsZ de diferentes especies

Especie	<i>B. subtilis</i>	<i>M. jannaschii</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. pneumoniae</i>
Origen	(Oliva <i>et al.</i> , 2007)	(Löwe, 1998, Löwe y Amos, 1998, Oliva <i>et al.</i> , 2003)	(Andreu <i>et al.</i> , 2010)	Producida en el laboratorio (Dr. Martín-Galiano)
Plásmido	pHis17-ATCC23857D	pHis17-ftsZ	pET29-Mu50/ATCC 700699	pET29
Antibiótico empleado	100 µg/ml ampicilina	50 µg/ml cloranfenicol 50 µg/ml ampicilina	50 µg/ml cloranfenicol 50 µg/ml kanamicina	50 µg/ml kanamicina
Medio	2xYT	LB	LB	LB
D.O _{ind} - conc. IPTG	0.5	0.4 a 0.6	0.5	0.5
D.O final	≈ 1.5 - 2	≈ 0.8 - 1.1	≈ 1.5 - 2	≈ 1.5 - 2
Tampón resusp.	TKM	50 mM Tris-HCl, pH 8	TKM	TKM

D.O_{ind}- conc. IPTG – la D.O a la que se indujo expresión (con IPTG 1 mM); D.O final – la D.O típica tras la finalización de la expresión; Tampón resusp. – el tampón en el que se resuspendieron las células, con un volumen de 20 mL en todos los casos; TKM: 50mM Tris-HCl, 50mM KCl 5mM MgCl₂, pH 8

3. PURIFICACION DE FTSZ

Se purificaron BsFtsZ, SaFtsZ, strep-SpFtsZ y MjFtsZ. La FtsZ de *E. coli* (EcFtsZ) fue purificada por Marta Cabezas en el laboratorio, mediante precipitación con calcio y cromatografía por intercambio aniónico (Rivas *et al.*, 2000). FtsZ mutante de *M. jannaschii* R332V fue preparada por el Dr. Martín Galiano siguiendo el mismo protocolo que se detalla a continuación para MjFtsZ pero sin extracción de nucleótido. BsFtsZ, SaFtsZ, strep-SpFtsZ y MjFtsZ se purificaron utilizando métodos similares (Huecas y Andreu, 2003, Andreu *et al.*, 2010). En todos los casos se realizó la precipitación por sulfato amónico, cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía de fase reversa, aunque en el caso de MjFtsZ los tampones empleados en la cromatografía de intercambio aniónico fueron diferentes. Después de estos tres pasos a BsFtsZ, strep-SpFtsZ y SaFtsZ se les sometió a una cromatografía de exclusión molecular, mientras que MjFtsZ fue sometida a una cromatografía de cambio de tampón (desalting). Además, a MjFtsZ se le extrajo el nucleótido para dejarlo en forma de apo-

proteína. Se detallan a continuación los protocolos en común, señalando dónde hay diferencias.

3.1 Precipitación con sulfato amónico

Tras su descongelación, a las células con BsFtsZ, strep-SpFtsZ y SaFtsZ se les añadió 200µg/mL de PMSF y 2 µg/mL de leupeptina para inhibir proteasas celulares. A las células que expresaban MjFtsZ no se les añadieron inhibidores. Las células se lisaron utilizando un sonicador *Sonoplus* HD200 (Brandelin) por medio de una sonda de 1 cm de diámetro. Se utilizaron 5 pulsos de 20 segundos con pausas de 1 minuto, a 20% de potencia (output 6) a 4°C. El lisado se clarificó a 100.000 x g durante una hora (38.000 rpm en un rotor Beckman 70.1Ti) a 4°C. El sobrenadante se pasó a un vaso de cristal y se añadió sulfato amónico lentamente hasta un 40% (para BsFtsZ, strep-SpFtsZ y SaFtsZ) o 33% (para MjFtsZ) de saturación, con agitación y sobre hielo. Se volvió a centrifugar a 5000 x g durante 30 minutos a 4°C en un rotor SS-34 empleando una centrífuga RC-5C Plus (Sorvall). Se retiró el sobrenadante y la proteína sedimentada se resuspendió en un mínimo de 10 mL de tampón. Para las purificaciones de BsFtsZ, strep-SpFtsZ o SaFtsZ se resuspendió en tampón A (50 mM Mes-KOH, 5 mM MgCl₂, 10% glicerol, pH 6.5). En el caso de MjFtsZ, se resuspendió en tampón A2 (50 mM Tris.HCl, 1 mM EDTA, pH 8) y se ajustó a 150mM KCl utilizando tampón B2 (50 mM Tris.HCl, 1 mM EDTA, 1 M KCl, pH 8). Una vez resuspendido, se clarificó, centrifugando a 5.000 x g durante 10 minutos, para eliminar cualquier agregado que pudiera quedar y que podría obstruir la cromatografía posterior.

3.2 Cromatografía de intercambio aniónico

La proteína resuspendida en el paso anterior se cargó en una columna HiTrap Q-HP de 5 mL (GE Healthcare). La resina de la columna es Q-Sepharosa de alto rendimiento y el grupo cargado unido es $-\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$. La elución se hizo con un gradiente de fuerza iónica. En el caso de BsFtsZ y SaFtsZ, el gradiente fue de 0-1 M KCl durante 40 minutos a 1 mL/min y en el caso de MjFtsZ el gradiente fue de 150 mM – 500 mM KCl durante 50 minutos a 1 mL/min. Se recogieron alícuotas de 2mL. La cromatografía se ejecutó empleando un FPLC LCC-501 (Amersham Biosciences). La monitorización

para BsFtsZ y MjFtsZ se hizo a 280 nm pero para SaFtsZ se monitorizó a 253 nm, ya que SaFtsZ no contiene triptófanos ni tirosinas y por tanto absorbe menos luz a 280 nm. Se observaba la presencia de proteína en un perfil de cromatografía (Figura 11A). MjFtsZ eluyó a una concentración de KCl entre 350-450 mM, BsFtsZ eluyó a una concentración de KCl entre 150 – 400 mM y SaFtsZ entre 300-600 mM. La cromatografía se hizo a temperatura ambiente y las alícuotas se guardaron en hielo según fueron recogidas. Se recogieron muestras (10 µL) de los sedimentos y sobrenadantes de la precipitación con sulfato amónico y de las alícuotas de la cromatografía. A estas muestras se les añadió un volumen de tampón de carga de proteínas y se cargaron en un gel SDS-PAGE del 12%. El gel se tiñó con azul de Coomassie. De la observación del gel se confirmó la localización de la proteína en la cromatografía y se eligieron las alícuotas mejores (por su concentración de FtsZ y/o ausencia de contaminantes) con las que continuar la purificación. Con este gel se controlaron también los pasos del lisado de células y precipitación con sulfato amónico, indicando si había habido pérdidas inusuales de proteína en algún paso.

3.3 Cromatografía de adsorción hidrofóbica

Esta cromatografía se hizo de la misma manera en todas las purificaciones. Las alícuotas que en el gel SDS-PAGE del apartado anterior mostraran una mayor cantidad de proteína se concentraron utilizando una unidad de concentración de proteína Centriprep 10K o Amicon Ultra 15 (Milipore) hasta alcanzar un volumen máximo de 2 mL. Se emplearon los mismos filtros para todos los pasos de la purificación, lavándose entre uso y uso con agua destilada y utilizando filtros diferentes para proteínas de especies diferentes. La solución concentrada de proteína se diluyó en proporción 1:5 en tampón A3 (50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4\text{-KOH}$, 0.8 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 mM EDTA, pH 7.5). Se cargó en una columna de fenil-agarosa HiTrap Phenyl HP (GE Healthcare) de 5 mL. Se eluyó con tampón B3 (50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4\text{-KOH}$, 1 mM EDTA, pH 7.5) en un gradiente lineal de 0.8-0 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 1 mL/min durante 20 minutos, recogándose alícuotas de 500 µL, que se guardaron a 4°C. La salida de proteína se monitorizó de la misma manera que para la cromatografía de intercambio aniónico (Figura 11B). FtsZ eluyó a una concentración de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ entre 200—700 mM. Se cargaron muestras de las alícuotas en un gel SDS-PAGE, igual que en el apartado anterior.

3.4 Cambio de tampón o cromatografía de exclusión molecular

MjFtsZ fue concentrada hasta un volumen final de 500 μ L y se cargó en una columna HP Desalting (GE Healthcare) de 5 mL para cambiar desde el tampón con alta concentración de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al tampón de almacenaje. Se eluyó MjFtsZ con tampón C (20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) a 2 mL/min, recogándose alícuotas de 500 μ L. Las alícuotas con proteína se mezclaron y la preparación se concentró a un volumen de 400-600 μ L. Finalmente se guardó a 4°C antes de la extracción de su nucleótido.

BsFtsZ, strep-SpFtsZ y SaFtsZ se concentraron hasta un volumen final máximo de 2 mL y fueron cargadas en una columna de exclusión molecular Sephacryl S300 26/60 (GE Healthcare), que separa proteínas en el rango de 10-1000 KDa. La cromatografía se ejecutó utilizando tampón 50 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1 mM EDTA, 10% glicerol, pH 7.5. La cromatografía se hizo a 1 mL/min empleándose un baño RC5 (Lauda) para mantener la columna a 4°C. Se recogieron alícuotas de 5 mL y se cargaron muestras en un gel SDS-PAGE. Las alícuotas elegidas se mezclaron y concentraron hasta un volumen de 400-600 μ L. Se separó la preparación de proteína en alícuotas de 10, 20, 50 y 100 μ L y se guardaron a -80°C.

Para evaluar la pureza de las purificaciones se cargaron alícuotas de proteína pura en gel de electroforesis desnaturizante (ejemplo en Figura 11D), se densitómetró el gel y cuantificó el porcentaje de proteínas contaminantes empleando el programa Quantity One (BioRad). La pureza fue de 98% (BsFtsZ), 93% (SaFtsZ), 98% (EcFtsZ), 99% (strep-SpFtsZ) y 97% (MjFtsZ).

3.5 Extracción de nucleótido de MjFtsZ

A diferencia de otras FtsZ, a MjFtsZ purificada se le puede extraer el nucleótido sin que ello suponga una pérdida de la estabilidad ni funcionalidad de la proteína (Huecas y Andreu, 2004). La preparación de MjFtsZ libre de nucleótido (desde ahora apoFtsZ) nos permitirá el estudio preciso de la relación de FtsZ con ligandos que unen el sitio de nucleótido.

La preparación de MjFtsZ se ajustó a 2.5 M de cloruro de guanidinio (GdmHCl) añadiendo un volumen adecuado de GdmHCl 6 M. La mezcla fue incubada durante 30 minutos a temperatura ambiente. Esta concentración de GdmHCl provoca la liberación

del nucleótido unido pero no llega a desnaturalizar la proteína (Andreu *et al.*, 2002, Huecas y Andreu, 2004).

Tras la incubación, la preparación se pasó por una columna de Sephadex G-25 de 0.9 x 25 cm en 50 mM Mes-KOH, 2.5 M GdmHCl, pH 6.5. Se recogieron alícuotas de 1 mL. Se tomaron espectros de cada alícuota en un rango de 240-350 nm. Se detectaron así las alícuotas que llevaban proteína pero que aparentemente carecían de nucleótido por su perfil característico de absorbancia (Figura 11C). Se evitaron alícuotas que pudieran llevar una mezcla de proteína y nucleótido (Figura 11C-asterisco rojo), que habitualmente son las últimas alícuotas con contenido de proteína, que salen justo antes de la salida del nucleótido libre, que se descartó.

La columna se lavó con 5 volúmenes de 50 mM Mes-KOH, 50 mM KCl, 1 mM EDTA, pH 6.5. Las alícuotas con apoFtsZ parcialmente desplegada de la columna anterior se mezclaron y la mezcla se concentró a un volumen menor de 1 mL. Esto se cargó en la columna ya equilibrada para dejar la proteína en el tampón final. Se recogieron alícuotas de 500 μ l y se localizó la proteína de la misma manera que en la columna de extracción de nucleótido. En este caso se evitó incluir en la mezcla final alícuotas del final de la filtración con concentraciones bajas de proteína, por contener potencialmente GdmHCl. La preparación final se concentró a un volumen de 400-600 μ l, se midió su concentración (ver más abajo), se separó en alícuotas de 10, 20, 50 y 100 μ l y éstos se congelaron a -170°C (en nitrógeno líquido).

En el caso concreto de las preparaciones que posteriormente se utilizaron para calorimetría isotérmica (ITC) no se hizo la separación en alícuotas, sino que la proteína se guardó en una sola alícuota o se pasó directamente a su preparación para ITC (ver más adelante). La descongelación de apoFtsZ se hizo en hielo en todos los ensayos.

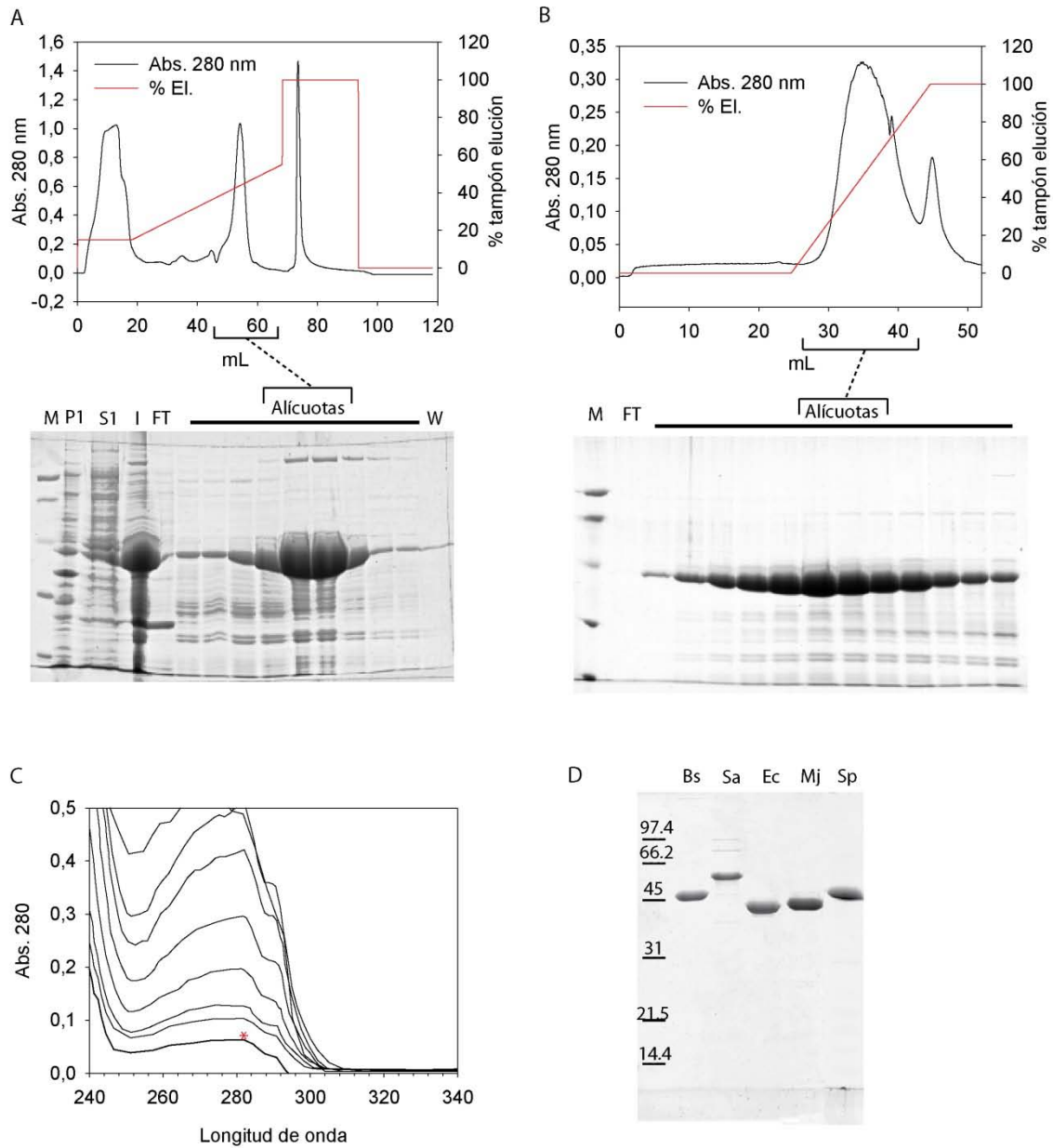


Figura 11: Pasos principales de una purificación de MjFtsZ. A: arriba-Cromatografía de intercambio aniónico. La línea negra es absorción a 280 nm y la línea roja el porcentaje de tampón de elución. abajo: gel de comprobación de precipitación con sulfato amónico y cromatografía de intercambio aniónico. M, marcadores de peso molecular, P1 y S1, sedimento y sobrenadante de sonicación, I, inyectado a cromatografía. FT volumen no unido a la columna, W lavado. B- Cromatografía hidrofóbica. Mismas codificaciones y abreviaturas que A. C – Espectros de absorción de alícuotas de la columna de extracción de nucleótido. Se marca con un asterisco rojo una alícuota descartada por aplanamiento en la zona de 260-250 nm, indicativo de contaminación con nucleótido. D – Gel desnaturante para evaluar la pureza de las purificaciones de BsFtsZ (Bs), SaFtsZ (Sa), EcFtsZ (Ec), apoFtsZ (Mj) y strep-SpFtsZ (Sp). En la primera columna se representa el patrón de peso molecular en unidades de kDa.

4. Medida de la concentración de FtsZ

4.1 Coefficientes de extinción molares empleados

Se emplearon los coeficientes de extinción molares (ϵ) apropiados en cada caso. Se tomaron los coeficientes de extinción molar conocidos para Trp, Tyr y Phe (Tabla 3)

Tabla 3: Coeficientes de extinción molares de Trp, Tyr y Phe

Aminoácido	$\epsilon_{280\text{nm}} (\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$	$\epsilon_{254\text{nm}} (\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$
Trp	5690	2795
Tyr	1280	309
Phe	0	140

Coefficientes de extinción molares de aminoácidos en GdmHCl utilizados para la medida de la concentración de proteína (Gill y von Hippel, 1989). $\epsilon_{280\text{nm}}$ y $\epsilon_{254\text{nm}}$ son los coeficientes de extinción molares a 280 y 254 nm, respectivamente.

Empleando las secuencias aminoacídicas de las diferentes FtsZ se obtienen los ϵ_{280} y ϵ_{254} de las tres proteínas (Tabla 4).

Tabla 4: Coeficientes de extinción molares de las diferentes proteínas purificadas

Proteína	n° Trp	n° Tyr	n° Phe	$\epsilon_{280\text{nm}} (\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$	$\epsilon_{254\text{nm}} (\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$
BsFtsZ	0	2	9	2560	1878
SaFtsZ	0	0	14	0	1960
MjFtsZ/apoFtsZ	1	1	8	6970	4224
strep-SpFtsZ	3	2	15	20910	1110

Cálculo de los coeficientes de extinción molares de las proteínas utilizadas de acuerdo con su contenido en Trp, Tyr y Phe.

Estos coeficientes de extinción molares se emplearon para los cálculos de concentración de proteína, después de descontar la contribución del nucleótido unido, en su caso (ver más abajo).

4.2 Medición de concentración de apoFtsZ

Debido al hecho de que MjFtsZ está en su forma de apoproteína, la medición de la concentración es muy sencilla, ya que no hay que tener en cuenta la absorbancia de

nucleótido. Para valorar la concentración de apoFtsZ recién preparada se diluyeron 10 μ l de la preparación en 400 μ l finales de tampón (25 mM Pipes-KOH, 50 mM KCl, 1 mM EDTA, pH 7.5) y se adquirió el espectro de absorción de la muestra entre 240-350nm. Se calculó la concentración de la muestra a partir de su absorción a 280 nm. La concentración de la preparación pura normalmente oscilaba entre los 300-600 μ M. Cuando se empleó apoFtsZ a una concentración suficiente como para medirse espectrofotométricamente con precisión, se midió sistemáticamente la concentración de proteína previa a su uso, de manera que estuviera siempre controlada la concentración empleada.

4.3 Medición de la concentración de BsFtsZ, SaFtsZ y strep-SpFtsZ

Para medir la concentración de las preparaciones puras de BsFtsZ y SaFtsZ es necesario obtener la concentración de nucleótido que está unido a la proteína purificada, para lo cual se preparó una muestra donde se extrajo el nucleótido de la proteína. La extracción se hizo de la misma manera para todas las preparaciones, pero el cálculo de la concentración se hizo empleando longitudes de onda diferentes en el caso de SaFtsZ.

➤ *Extracción de nucleótido*

Se diluyeron 20 μ l de proteína purificada en GdmHCl 6 M, y otros 20 μ l de proteína purificada en 25mM Pipes-KOH, 50mM KCl, 1mM EDTA, pH 7.5, ambas en un volumen final de 400 μ L. Tras tres minutos de incubación, se adquirieron sus espectros de absorción de 240-350 nm y se registraron las absorciones a 280 (BsFtsZ y strep-SpFtsZ), 254 y 330 nm (BsFtsZ, strep-SpFtsZ y SaFtsZ). Los espectros resultantes de GdmHCl y tampón son prácticamente idénticos.

La muestra de FtsZ preparada en tampón se ajustó a 0.5 N HClO₄ (causando la precipitación de la proteína) y se incubó 10 minutos a 4°C. Posteriormente fue centrifugado a 15.000 x g a 4°C durante 10 minutos. El sobrenadante se retiró y se volvió a medir su espectro de absorción, registrándose las absorciones a 280, 254 y 330 nm, igual que antes. Este espectro de absorción es el del nucleótido aislado.

➤ **Cálculo de la concentración**

Para obtener el valor de la concentración de proteína primero se obtuvo el valor de la concentración de nucleótido (C_{GXP}) a partir de las absorbancias obtenidas en el paso anterior. Para ello se usó el coeficiente de extinción molar de GXP (GTP o GDP) a 254 nm en $HClO_4$ ($\epsilon_{GXP-280\ HClO_4}=12400\ M^{-1}\ cm^{-1}$) (Croom *et al.*, 1985).

Sabiendo la concentración de nucleótido presente en la muestra es posible calcular la concentración de proteína. Esto se hace restando la absorbancia que se obtiene a 280 nm para la concentración conocida de GXP, sabiendo que el coeficiente de extinción molar de GXP a 280 nm en tampón o GdmHCl ($\epsilon_{GXP-280}$) es $8100\ M^{-1}\ cm^{-1}$.

$$C_{prot} = [A_{280} - (\epsilon_{GXP-280} \cdot C_{GXP})] / \epsilon_{prot-280}$$

donde A_{280} es la absorbancia de la muestra de proteína en GdmHCl (ver más arriba), $\epsilon_{prot-280}$ es el coeficiente de extinción molar de la proteína a 280 nm (ver Tabla 4), para un paso óptico de 1. La concentración de proteína en cada caso se calculó a partir de los valores de A_{280} , C_{GXP} y los coeficientes de extinción molar específicos de cada proteína. Se multiplicó por los factores de dilución empleados para calcular la concentración de la preparación inicial. Para SaFtsZ se empleó la misma ecuación pero empleando absorciones y coeficientes de extinción molares a 254 nm, dado que SaFtsZ, al no contener tirosinas ni triptófanos, absorbe poca luz a 280 nm.

Como método complementario para confirmar la concentración de las proteínas, se realizó una cuantificación en gel desnaturalizante. Se prepararon muestras de 2, 4 y 6 μg de varias purificaciones. Las muestras se cargaron en gel SDS-PAGE, se tiñeron con azul de Coomassie y se cuantificaron empleando un densitómetro BS-800 (BioRad) el programa Quantity One (BioRad).

5. Medida de la unión de nucleótido de FtsZ

Para poder hacer cálculos precisos de la capacidad de unión de nucleótido de apoFtsZ se requiere saber el número de sitios de nucleótido por molécula de FtsZ (n). Aunque teóricamente este valor es 1, puede reducirse si una fracción de la proteína es inactiva.

Si $n < 1$ y ésto no se tiene en cuenta, se estará sobrevalorando la concentración de sitios de nucleótido en los ensayos al tomarlo como equivalente a la concentración de proteína total, lo que llevará a imprecisiones en los cálculos posteriores, muy dependientes de una medida precisa de la concentración de proteína.

Se prepararon muestras con o sin apoFtsZ (5 μM) de diferentes concentraciones de *mant*-GTP (3-15 μM) en un volumen final de 0.8 mL en tubos de ultracentrífuga de policarbonato. Se confirmó la concentración de *mant*-GTP en las muestras sin apoFtsZ midiéndola espectrofotométricamente ($\epsilon_{254} = 23,300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Tras la medida de concentración inicial se centrifugaron las muestras a 355,000 x g (100,000 rpm) durante 2.5 horas a 25°C en un rotor TLA 120.2 empleando una ultracentrífuga Optima TLX (Beckman). Esto hace que la proteína en la mitad superior del tubo se desplace a la mitad inferior. Después, se retiraron con cuidado las mitades superiores de las muestras, determinándose su concentración de *mant*-GTP. A partir de la diferencia de concentración de *mant*-GTP entre los tubos sin y con apoFtsZ se determinó el número de *mant*-GTPs unidos por apoFtsZ (n) como 0.75 ± 0.04 . En el resto del texto, cuando se cite la concentración de apoFtsZ, se estará hablando de concentración de sitios de unión a nucleótido, salvo en el caso de la calorimetría isotérmica (ITC) y en la titulación de apoFtsZ con ^3H -GTP, donde se emplearon concentraciones totales de apoFtsZ, porque se trata de técnicas que dan sus propias medidas de n . Ambas técnicas confirmaron el resultado de estas medidas, dando $n = 0.8$ y $n=0.77$ para ITC y titulación de apoFtsZ con ^3H -GTP, respectivamente.

6. Polimerización de FtsZ

Se emplearon dos tipos de técnicas para estudiar la polimerización de FtsZ bajo distintas condiciones; dispersión de luz a 90° y sedimentación por ultracentrifugación.

6.1 Dispersión de luz a 90°

Se empleó esta técnica para comprobar la funcionalidad de las purificaciones de FtsZ de diferentes especies, para comprobar el efecto general de compuestos sobre la polimerización de FtsZ, simultáneamente con la preparación de muestras para

microscopía electrónica (ver apartado 6 de Materiales y Métodos). Para las proteínas ensayadas las condiciones fueron las siguientes:

➤ *MjFtsZ* y *apoFtsZ*

En ensayos para comprobar la funcionalidad de proteína purificada se diluyó apoFtsZ a 12.5 μM en 25 mM Pipes-KOH, 50 mM KCl, 1 mM EDTA, pH 7.5. Cuando se ensayaron los efectos de PC, se diluyó MjFtsZ (en este caso cedida por la Dra. Sonia Huecas) a 12.5 μM en 50mM Mes-KOH, 50 mM KCl, 1 mM EDTA, pH 6.5. Los ensayos se hicieron a 55°C, midiéndose dispersión a 350nm utilizando un espectrofluorímetro Shimadzu RF 540 con anchura de banda de 2 nm con la sensibilidad alta, o un espectrofluorímetro Horiba-Jovin-Yvon Fluoromax-4 con anchura de banda de 0.25 nm y tiempo de integración de 1 segundo. La proteína en tampón se incubó hasta alcanzar 55°C, después de lo cual se le añadió 10 mM MgCl₂, lo que inicia una modesta dispersión de luz. Cinco minutos después se inició la polimerización añadiendo 1 mM GTP (para comprobación de funcionalidad) o 2 mM GTP (para ensayos con PC).

➤ *BsFtsZ*, *EcFtsZ* y *SaFtsZ*

Se diluyó la proteína a 10 μM en 50 mM Mes-KOH, 50 mM KCl, 1 mM EDTA, pH 6.5. Se midió dispersión de luz 350 nm, a 25°C con una anchura de banda de 0.5 nm y un tiempo de integración de 1 segundo en un espectrofluorímetro Horiba-Jovin-Yvon Fluoromax-4. El ensayo se comenzaba con FtsZ en tampón. Después (en casos aplicables) se añadía el compuesto a ensayar y se incubaba durante 2 minutos, tras los cuales se añadía 10 mM MgCl₂, y 5 minutos después se añadía la cantidad deseada de GTP, que varió según la especie de FtsZ empleada y la naturaleza del ensayo.

6.2 Sedimentación por ultracentrifugación

Se prepararon muestras (volumen final 100 μL) en tubos de policarbonato para ultracentrifugación en un bloque de termostato a 25°C. FtsZ se preparó en el tampón adecuado para cada caso y la polimerización se inició añadiendo GTP. La concentración de GTP empleada era de 1 mM si además se empleaba un sistema de regeneración de

GTP (15 mM acetil-fosfato, 1 U/mL acetato quinasa) o 2 mM si no se utilizaba. Cuando se usó BsFtsZ, EcFtsZ y SaFtsZ tras el inicio de la polimerización se incubó la mezcla durante 15 minutos (para permitir el avance de la polimerización) y posteriormente se centrifugó a 386.000 x g (100.000 rpm) durante 20 minutos. Cuando se usó apoFtsZ o MjFtsZ, las muestras se centrifugaron inmediatamente después del inicio de la polimerización durante 11 minutos a 55°C a 386.000 x g. En ambos casos se empleó un rotor TLA-100 y una ultracentrífuga TLX (Beckman). En todos los ensayos se incluyeron controles donde se sustituyó GTP con GDP o donde no se añadió MgCl₂, condiciones que deberían evitar cualquier polimerización.

Tras la finalización de la centrifugación, los sobrenadantes fueron retirados y la proteína sedimentada se resuspendió en un volumen (100 µL) de tampón. Posteriormente, a sobrenadantes y sedimentos se les añadió otro volumen (para BsFtsZ, EcFtsZ y SaFtsZ) o 32.6 µL (para apoFtsZ) de tampón de carga de proteína. Se cargaron muestras de sedimentos y sobrenadantes en geles SDS-PAGE con un intervalo de 15 minutos entre las cargas, de manera que cada carril contenía el sedimento (abajo) y el sobrenadante (arriba) de una misma muestra. Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie y, en casos aplicables, escaneados empleando un densitómetro calibrado CS-800 (BioRad) y cuantificados empleando el programa Quantity One (BioRad).

7. Microscopía electrónica

Con el fin de estudiar los polímeros de FtsZ de diferentes especies bajo diferentes condiciones se tomaron muestras para su visualización por microscopía electrónica.

Se emplearon rejillas de cobre (400 mesh) recubiertas de Formvar y carbón procedentes del Servicio de Microscopía Electrónica del Centro de Investigaciones Biológicas. Las muestras de FtsZ se tomaron de ensayos de dispersión de luz a 90° o bien, en los casos donde el perfil de polimerización era conocido, de volúmenes menores (50 µL) preparados a la temperatura adecuada en un termobloque Termostat Plus (Eppendorf).

Se tomó una muestra de 20µL de FtsZ y se colocó sobre una placa atemperada a la misma temperatura que la muestra. Sobre la gota de muestra se colocó la rejilla con el recubrimiento de carbón tocando la muestra y se incubó durante 2 minutos.

Posteriormente se tiñó la muestra empleando una solución de acetato de uranilo 2% a temperatura ambiente. Esto se hizo pasando la rejilla por 4 gotas de 20 μL de acetato de uranilo (para eliminar restos no adsorbidos a la rejilla) y dejándolo reposar sobre una quinta gota durante 2 minutos. Posteriormente se eliminó el exceso de acetato de uranilo sobre un papel de filtro, se dejó secar a la rejilla y se visualizaron los polímeros a un aumento de $\times 40.000$ utilizando un microscopio electrónico Jeol 1230 a 100 kV. Las fotografías resultantes se digitalizaron empleando un escáner Minolta Dimage Scan Multi Pro a 2400 dpi.

8. Preparación y control de compuestos de cribado y análogos del GTP sustituidos en C8

8.1 Preparación de compuestos

➤ *Análogos del GTP sustituidos en C8*

Los compuestos fueron sintetizados como se describe (Lappchen *et al.*, 2008) en el laboratorio de la Dra. Tanneke den Blaauwen (Van't Hoff Institute for Molecular Sciences, Ámsterdam, Países Bajos), salvo el Br-GTP, que es de origen comercial. Los nucleótidos de síntesis química se recibieron liofilizados en botellas de cristal. Se resuspendieron los compuestos con 5 lavados sucesivos de 0.4 mL de etanol de calidad espectroscópica. Se retiró el etanol por vacío empleando un Speed-Vac SC100 (Savant). Posteriormente los nucleótidos se resuspendieron en 25 mM Pipes-KOH, pH 7.5 hasta alcanzar concentraciones de 5-10 mM, aproximadamente.

➤ *Compuestos elegidos por cribado virtual*

Los compuestos elegidos por cribado virtual se adquirieron de casas comerciales. Una vez recibidos se etiquetaron individualmente con un código numérico que identificara cada compuesto para todos los ensayos posteriores. Se pesaron 2 mg de cada compuesto recibido de Chembridge en una balanza AG135 (Mettler Toledo). Los compuestos de IBScreen se recibieron en botellas con 2 mg, por lo que se disolvieron directamente en los viales para posteriormente pasarlos a tubos eppendorf de 1.5 mL individuales.

Se disolvieron los compuestos en DMSO calidad espectroscopía hasta una concentración inicial deseada (100 mM o 10 mM). Las preparaciones se sometieron a una centrifugación de 5 minutos a 13.000 rpm en una centrífuga Mikroliter (Hettich). Aquellas preparaciones que mostraron sedimentación debida a precipitación de compuesto se diluyeron sucesivamente en DMSO hasta que no se observara precipitado tras la centrifugación.

Cuando se utilizaron los compuestos en ensayos, debido a la necesidad de no superar el máximo de 1-2% de DMSO en la preparación final, se prepararon diluciones seriadas de los compuestos para permitir un manejo más preciso de los volúmenes de compuesto. Todos los compuestos se almacenaron a -75°C .

8.2 Control de compuestos

Se determinaron las solubilidades de los compuestos elegidos por cribado virtual además de los espectros de emisión de fluorescencia que presentaban para anticiparse a características que pudieran interferir con los ensayos. En el caso de los análogos del GTP sustituidos en C8 se controló su pureza por HPLC.

➤ Determinación de la solubilidad de compuestos elegidos por cribado virtual

Cada compuesto se preparó a 10 μM en tampón de competición (25 mM Pipes-KOH, 50 mM KCl, 1 mM EDTA, 10 mM MgCl_2 , pH 7.5). Se midió el espectro de absorción entre 240-700 nm empleando un espectrofotómetro U-2000 (Hitachi), anotándose los máximos de absorción. Cada muestra de compuesto se pasó a un tubo de policarbonato y se centrifugó a $89.000 \times g$ (50.000 rpm) durante 15 minutos en un rotor TLA 120.2 utilizando una ultracentrífuga TLX (Beckman). Los sobrenadantes se retiraron y se les midió el espectro de absorción, anotándose de nuevo los máximos de absorción. La concentración de compuesto en el sobrenadante se calcula a partir de su máximo de absorción asumiendo que 10 μM equivale al máximo de absorción previo a la centrifugación. La solubilidad se expresa como el logaritmo de la concentración encontrada en el sobrenadante (LogS).

En aquellos casos donde no se registraron pérdidas significativas tras las centrifugación debido a que el compuesto tuviera una solubilidad mayor de $\text{LogS} = -5$ (mayor de 10

μM), se repitió el ensayo aumentando la concentración inicial a $50 \mu\text{M}$ y posteriormente a $100 \mu\text{M}$.

Se anotaron además aquellos compuestos que mostraron absorción significativa (respecto a una muestra 500 nM de *mant*-GTP) a 375 nm y 445 nm , que son las longitudes de onda de excitación y emisión, respectivamente, empleadas para la adquisición de medidas en el contexto de los ensayos de competición con *mant*-GTP (ver 10.2 de Materiales y Métodos). Pocos compuestos mostraron absorción a estas longitudes de onda. El número reducido que sí mostró absorción a esta longitud de onda no causó interferencias en la señal durante los ensayos de competición realizados, lo cual se comprobó con controles internos en los propios ensayos de competición.

➤ ***Espectros de emisión de compuestos elegidos por cribado virtual***

Dado que los compuestos de cribado virtual se ensayaron empleando un método de competición con un ligando de referencia fluorescente, se consideró necesario adquirir los espectros de emisión de fluorescencia de los compuestos (ejemplos en la Figura 12). Los compuestos se prepararon sistemáticamente a $10 \mu\text{M}$ en tampón de competición con un volumen final de $400 \mu\text{L}$ y se compararon con una muestra en las mismas condiciones de *mant*-GTP 500 nM y 1% DMSO. Se midieron los espectros de emisión en un espectrofluorímetro Fluorolog 3-221 (Jobin Yvon-Spex, Longjumeau, Francia) con excitación a 350 nm , recogiendo emisión entre $250\text{-}600 \text{ nm}$ con tiempo de integración de 1 segundo y anchura de banda de 2 nm para la excitación y 5 nm para la emisión.

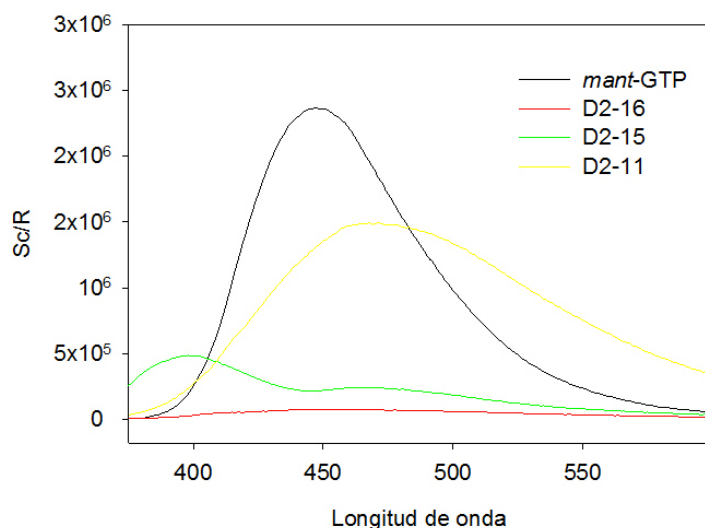


Figura 12: Ejemplos de espectros de emisión obtenidos para distintos compuestos de cribado virtual Los compuestos ($10 \mu\text{M}$) se comparan con el espectro de emisión de *mant*-GTP (500 nM). D2-16 no muestra emisión de fluorescencia en estas condiciones, D2-15 presenta fluorescencia insignificante y D2-11 presenta una fluorescencia notable que requiere de un control adicional en el momento de hacer los ensayos de competición correspondientes.

➤ **Determinación de la pureza de los análogos del GTP sustituidos en C8**

Además de los controles realizados tras la síntesis de los compuestos (Lappchen *et al.*, 2008 material suplementario) se realizó un control adicional en el laboratorio para determinar la pureza de los análogos del GTP sustituidos en C8.

Se prepararon muestras con el análogo del GTP a una concentración aproximada de 10 μM y un control interno de ATP a 10 μM en tampón de equilibrado (25 mM NaH_2PO_4 ajustado a pH 2.2 con ácido acético). Las muestras se inyectaron en una columna de cambio de ion Vydac 302IC4.6 y se sometieron a un gradiente de 25-300 M de NaH_2PO_4 ajustado a pH 2.2 con ácido acético, monitorizando la absorbancia a 260 nm. CIGTP, IGTP, BrGTP, PyrrGTP, y MeOGTP son cromatográficamente homogéneos, mientras que morphGTP tiene una pureza de 91.7%, y tBuGTP tiene una pureza de 92.3%.

9. Calorimetría isotérmica de reacción

Los ensayos de calorimetría isotérmica se realizaron por la Dra. Margarita Menéndez en el Instituto de Química-Física Rocasolano (C.S.I.C., Madrid). Las titulaciones por calorimetría isotérmica se hicieron a 25°C, empleando un calorímetro de titulación isotérmica MCS (MicroCal). Las medidas se hicieron en 25 mM Pipes-KOH, 50 mM KCl, 10 mM MgCl_2 , pH 7.5 para ensayos con magnesio o en 25 mM Pipes-KOH, 50 mM KCl, 1 mM EDTA, pH 7.5 para ensayos sin magnesio. ApoFtsZ se descongeló en hielo en el laboratorio y se diluyó a 10-25 μM , según el ensayo. Se dializó dos veces contra 0.5 L del mismo tampón de dilución, durante 3-4 horas y después durante toda la noche. Los nucleótidos y el Mg^{2+} se prepararon (a 150 μM y 50 mM, respectivamente) en tampón de diálisis. La preparación de apoFtsZ se tituló con ligando, habitualmente añadiendo 1 x 1 μl mas 16-22 inyecciones (10-12 μl) de una solución concentrada de ligando. El calor de dilución de ligando se determinó en ensayos separados y fue restado donde era necesario para obtener el calor de unión. Las isotermas de unión se analizaron por regresión no lineal a un modelo de un solo sitio de unión, empleando el programa de

Microcal. Se obtuvieron así el número de sitios de unión (n), la constante de afinidad (K_b) y la entalpía de unión (ΔH).

10. Métodos computacionales

10.1 Dinámica molecular, análisis estructural y cálculo de la energía libre de unión

El modelado molecular fue llevado a cabo por el Dr. Antonio Morreale, del CBM CSIC-UAM. Los modelos iniciales de MjFtsZ unido a GDP o GTP se tomaron del Protein Data Bank (<http://www.pdb.org/>). Para MjFtsZ unido a GTP y Mg^{2+} se utilizó la estructura 1W5A (cadena A) y para MjFtsZ unido a GDP se utilizó la estructura 2VAP. Las posiciones de los hidrógenos se asignaron empleando el servidor web H++ (Gordon *et al.*, 2005). Se utilizó el método Poisson-Boltzmann (Honig y Nicholls, 1995) a pH 7.4, con una concentración salina de 0.15 M, y con constantes dieléctricas interna y externa de 4 y 80, respectivamente. De acuerdo con los resultados de H++, se protonaron los residuos H183, H288 y E293 en 2VAP y H288 en 1W5A. Las cargas y radios atómicos se asignaron de acuerdo con el campo de fuerzas ff99b (Wang *et al.*, 2000). Los dos modelos se sumergieron en cajas de moléculas de agua TIP3P (Jorgensen *et al.*, 1983) lo suficientemente grandes como para garantizar que la distancia mínima entre cada modelo y el borde de la caja fuera mayor de 15 Å. Se añadieron contra-iones para mantener neutralidad eléctrica. Se realizaron tres minimizaciones sucesivas; una solamente de los átomos de hidrógeno, otra de las moléculas de agua e iones y otra empleando el sistema completo. Las estructuras iniciales se simularon usando el colectivo NPT (Número de átomos, Presión, Temperatura) con condiciones periódicas de contorno (PBC) y el método Particle Mesh Ewald (PME) para tratar las interacciones electrostáticas de largo alcance. Posteriormente, los sistemas se calentaron y equilibraron en dos pasos sucesivos: 20 picosegundos (ps) de calentamiento del sistema completo de 100 K a 300 K y posteriormente un equilibrado de 100 ps a 300 K.

Las estructuras equilibradas presentaron valores de desviación cuadrática media (RMSD) con respecto a las cristalográficas de solo 0.4-0.5 Å y se usaron para las

simulaciones de dinámica molecular de 50 nanosegundos (ns) a temperatura (300 K) y presión (1 atm.) constantes. Se empleó el algoritmo SHAKE para mantener la longitud de equilibrio de los enlaces en los que intervienen átomos hidrógenos, permitiendo así pasos de 2 femto-segundos (fs) para la integración de las ecuaciones del movimiento de Newton. Se utilizaron los campos de fuerza ff99 y TIP3P, integrados en el programa AMBER 10 (Case, 2008) para describir las proteínas y moléculas de agua, respectivamente. Durante las trayectorias se tomaron los últimos 0.5 ns de las fracciones de 10 ns y los últimos 0.5 ns de las trayectorias completas, y éstos se muestrearon a intervalos de 10 ps para análisis estructural y energético.

Se calcularon las estructuras promedio, las RMSDs ponderados por la masa (tanto con y sin ajuste previo a la estructura cristalográfica de referencia) y las entropías con el módulo ptraj incluido en el programa AMBER 10. Las estructuras promedio se minimizaron con el campo de fuerzas ff99 en vacío y sin condiciones periódicas de contorno durante 1000 pasos, de los cuales los primeros 500 fueron con el método del descenso más pronunciado y los siguientes 500 con uno basado en gradientes conjugados, con el único fin de resolver los posibles choques estéricos que hubieran podido tener lugar al crear las coordenadas promediadas.

Se calcularon los enlaces por puente de hidrógeno empleando la extensión HBonds 1.1 del programa de visualización molecular VMD (Humphrey *et al.*, 1996). Como criterio se consideró que un enlace por puente de hidrógeno se forma cuando el donador y el aceptor están a una distancia menor de 3 Å y el ángulo que forman dador-hidrógeno-aceptor es menor de 20°. Se define el parámetro de porcentaje de retención del puente de hidrógeno como la proporción de tiempo de la trayectoria durante la cual éste es detectado.

Las energías libres de unión (la contribución entálpica) se calcularon utilizando el método MM-GBSA (Kollman *et al.*, 2000). Este método calcula la energía libre de unión a partir de la suma de un término de interacción de mecánica molecular (MM), una contribución por solvatación a través del método Generalizado de Born (GB) y una contribución de superficie (SA) que tiene en cuenta la parte no polar de la solvatación. Se realizaron estos cálculos para cada muestra tomada de las simulaciones (ver más arriba) utilizando el programa AMBER 10 y se calcularon los valores promedios. Los

valores totales fueron desglosados en contribuciones individuales de cada residuo para permitir un análisis más fino. Se asignaron las interacciones a cada parte del nucleótido (guanina, ribosa y fosfatos α , β , y γ) tras una inspección visual (los cálculos empíricos se pueden encontrar en el Apéndice).

El programa ptraj también se empleó para los cálculos de entropía a través de la diagonalización de la matriz de covarianza obtenida a partir de cada trayectoria de dinámica molecular. Los valores propios resultantes se convirtieron en frecuencias tras aplicar un análisis cuasiharmónico (Karplus y Kushick, 1981, Schlitter, 1993). Finalmente, los valores de entropía se calcularon a partir de las fórmulas estándar de mecánica estadística.

10.2 Cribado Virtual

Los cálculos de cribado virtual se realizaron utilizando la plataforma VSDMIP (Gil-Redondo *et al.*, 2009) siguiendo un protocolo (Ruiz *et al.*, 2008) de filtrado (programa DOCK, (Kuntz *et al.*, 1982) docking (programa CDOCK, (Perez y Ortiz, 2001) y clasificación (dinámica molecular con AMBER 10 y análisis MM-GBSA, ver más arriba). Se empleó la cadena A de FtsZ de la estructura cristalográfica de SulA:FtsZ (PDB: 1OFU) del patógeno *Pseudomonas aeruginosa*. Se quitó el GDP unido, además de las moléculas de agua e iones, para formar el receptor inicial. Se utilizó el campo de fuerzas ff99 de AMBER 10 para asignar a cada átomo su tipo y carga. Los átomos de hidrógeno se añadieron suponiendo estados estándar de protonación. Se realizaron dos cribados, primero de la quimioteca de ChemBridge (454886 compuestos) y luego de la quimioteca de IBScreen (355138 compuestos), obtenidos de la base de datos ZINC 6 (Irwin y Shoichet, 2005) en formato SMILES y procesadas utilizando VSDMIP. El sitio de unión se construyó alrededor de la posición del GDP, añadiéndose 5.0 Å a sus dimensiones máximas para el paso de filtro ó 7.5 Å para el paso de docking. Los “sitios calientes” de unión utilizados por DOCK fueron generados con el programa GAGA (Wang *et al.*, 2004). Se hizo docking con DOCK y se aplicó un límite (ZScore) de 4.5 para la función de puntuación por contactos, dejando 2055 moléculas para el paso siguiente, en el caso de la quimioteca ChemBridge. La quimioteca IBScreen se cribó sin utilizar el filtro DOCK. Las moléculas se cribaron de nuevo utilizando CDOCK, con un espaciado de malla de 0.5 Å, seleccionando los 100 mejores compuestos para la

realización de dinámica molecular. El objetivo aquí es tener en cuenta toda la flexibilidad de unión y efectos de solvente. Finalmente se estimaron los valores de la energía libre de unión por el método MM-GBSA. Los cálculos se hicieron como se ha descrito anteriormente, pero al ser las trayectorias de 1 ns, el análisis MM-GBSA se limitó a los últimos 200 ps. Cuando fue necesario, se buscaron compuestos análogos a través del servidor ZINC (<http://zinc.docking.org/>) y dichos compuestos se procesaron como se acaba de describir. Se hizo una predicción de solubilidad (expresado, igual que en la sección 8.2.1, como LogS) de los compuestos elegidos utilizando el programa QikProp (Jorgensen y Duffy, 2002).

11. Métodos de unión de ^3H -GTP

11.1 Métodos generales

Todos los ensayos en los que se empleó ^3H -GTP siguieron un mismo proceso general. Se prepararon las muestras a las concentraciones deseadas en tampón de competición (0.2 mL) en un termobloque Termostat Plus (Eppendorf) a 25°C. Las mezclas se centrifugaron durante 1.5 horas a 386.000 x g (100.000 rpm) y 25°C en un rotor TLA-100 empleando una ultracentrífuga TLX (Beckman). Tras la centrifugación las muestras se dividieron en la mitad superior del tubo, deplecionada de proteína, y la mitad inferior. Se añadió a cada mitad un volumen (0.1 mL) de tampón. La concentración de ^3H -GTP libre ($[\text{}^3\text{H-GTP}]_f$) se determinó a partir de la mitad superior de los tubos, diluyéndolas en 3.8 ml de solución ReadySafe Beckman y empleando un contador de centelleo líquido Rackbeta 1219 (LKB Wallac) que funciona con una eficiencia del 55%. La concentración de ^3H -GTP es proporcional a la actividad detectada en cuentas por minuto (cpm). Se calculó un factor (F_s) para corregir la cantidad de ^3H -GTP sedimentado en la ausencia de apoFtsZ.

$$F_s = \text{cpm}_{\text{bt-0}} / \text{cpm}_{\text{tp-0}} \quad (1)$$

donde $\text{cpm}_{\text{bt-0}}$ y $\text{cpm}_{\text{tp-0}}$ son las actividades en la mitad inferior y la mitad superior de los tubos de centrifugados en ausencia de apoFtsZ, respectivamente. En cada ensayo se incluyeron controles sin apoFtsZ para medir este factor de corrección, con valores típicos de 1.4 ± 0.1 . La concentración de $^3\text{H-GTP}$ unida se calculó como:

$$[^3\text{H-GTP}]_b = [(\text{cpm}_T - \text{cpm}_{\text{top}} \cdot (1+F_s)) / \text{cpm}_T] \cdot [^3\text{H-GTP}]_T \quad (2)$$

donde cpm_T y cpm_{top} son la actividad total ($\text{cpm}_{\text{bt-0}} + \text{cpm}_{\text{tp-0}}$) y la actividad en la parte superior de muestras centrifugados con apoFtsZ, respectivamente, donde $[^3\text{H-GTP}]_T$ y $[^3\text{H-GTP}]_b$ son la concentración total y unida de $^3\text{H-GTP}$, respectivamente.

11.2 Titulaciones de $^3\text{H-GTP}$ y apoFtsZ

$^3\text{H-GTP}$ (50 nM, 33.8 nCi) se tituló con concentraciones crecientes de apoFtsZ. Las concentraciones de $^3\text{H-GTP}$ libre y unido se determinaron como se describe en el apartado anterior. Suponiendo una unión uno a uno, se pueden aplicar las siguientes ecuaciones:

$$[P]_f = [P]_T - [^3\text{H-GTP}]_b \quad (3)$$

$$[^3\text{H-GTP}]_b / [^3\text{H-GTP}]_T = (K_{3\text{H-GTP}} \cdot [P]_f) / (1 + K_{3\text{H-GTP}} \cdot [P]_f) \quad (4)$$

donde $[P]_T$ y $[P]_f$ son la concentración total y libre apoFtsZ, y $K_{3\text{H-GTP}}$ es la constante de afinidad de unión de $^3\text{H-GTP}$ a apoFtsZ. Se empleó la ecuación 4 para ajustar iterativamente los datos $[^3\text{H-GTP}]_b / [^3\text{H-GTP}]_T$ vs. $[P]_f$ y obtener el mejor valor de $K_{3\text{H-GTP}}$, empleando el programa SigmaPlot (Systat Software).

Después, apoFtsZ (75 nM) fue titulada con concentraciones crecientes de $^3\text{H-GTP}$. Se utilizaron mezclas de $^3\text{H-GTP}$ y GTP de manera que la radiactividad estuviera en un rango 8 nCi a 0.5 μCi por muestra. La concentración de $^3\text{H-GTP}$ libre y unido se calculó igual que antes. La ecuación para la unión a sitios independientes:

$$[^3\text{H-GTP}]_b / [P]_T = (n \cdot K_{3\text{H-GTP}} \cdot [^3\text{H-GTP}]) / (1 + K_{3\text{H-GTP}} \cdot [^3\text{H-GTP}]) \quad (5)$$

se aplicó iterativamente para ajustar los datos $[^3\text{H-GTP}]_b / [\text{P}]_T$ vs. $[^3\text{H-GTP}]_f$ y obtener el mejor valor de n (número de sitios de $^3\text{H-GTP}$ por apoFtsZ total) y $K_{3\text{H-GTP}}$.

11.3 Competición de ligando con $^3\text{H-GTP}$

Se prepararon muestras con 75 nM apoFtsZ y 100 nM $^3\text{H-GTP}$ con concentraciones crecientes de ligando problema en tampón de competición y se procesaron como se describe en la sección 11.1. Para medir la afinidad de un ligando (L) que desplaza el ligando de referencia $^3\text{H-GTP}$ del sitio de nucleótido de apoFtsZ se asumió una estequiometría unitaria, se calculó la fracción de $^3\text{H-GTP}$ unido como se describió anteriormente y se aplicaron las siguientes ecuaciones:

$$K_{3\text{H-GTP}} = [\text{P}\cdot^3\text{H-GTP}] / ([\text{P}]_f \cdot [^3\text{H-GTP}]_f) \quad (6)$$

$$K_{(L)} = [\text{P}\cdot\text{L}] / ([\text{P}]_f \cdot [\text{L}]_f) \quad (7)$$

$$[^3\text{H-GTP}]_f = [^3\text{H-GTP}]_T - [\text{P}\cdot^3\text{H-GTP}] \quad (8)$$

$$[\text{L}]_f = [\text{L}]_T - [\text{P}\cdot\text{L}] \quad (9)$$

$$[\text{P}]_f = [\text{P}]_T - [\text{P}\cdot\text{L}] - [\text{P}\cdot^3\text{H-GTP}] \quad (10)$$

donde $[\text{P}\cdot^3\text{H-GTP}]$ es la concentración de $^3\text{H-GTP}$ unido, y $[\text{L}]_T$, $[\text{L}\cdot\text{P}]$ y $[\text{L}]_f$ son las concentraciones totales, unidas y libres de ligando, respectivamente. Un programa del laboratorio Equigra5 (Diaz y Buey, 2007) se empleó para encontrar por ajuste por mínimos cuadrados el mejor valor de la afinidad del ligando competidor ($K_{(L)}$) para los datos $[^3\text{H-GTP}]_b / [^3\text{H-GTP}]_T$ versus $[\text{L}]_T$, empleando los valores conocidos de $[\text{P}]_T$, $[\text{L}]_T$, $[^3\text{H-GTP}]_T$, y $K_{3\text{H-GTP}}$ a partir de la resolución de la ecuación de tercer grado que resulta de las ecuaciones 6 a 10.

12. Métodos de fluorescencia

Se adquirieron los datos empleando un espectrofluorímetro Horiba-Jobin-Yvon Fluorolog 3-221. Las medidas de anisotropía (r) se adquirieron empleando luz de excitación polarizada verticalmente. Se corrigió la diferencia de sensibilidad entre los canales utilizando luz de excitación horizontal empleando la configuración en T (Lakowicz, 1999 pgs 298-300). Las medidas de anisotropía y ángulo mágico (I_M) se adquirieron utilizando luz de excitación de 375 nm con un ancho de banda de 5 nm y recogiendo luz a 445 nm con un ancho de banda de 10 nm. Las medidas de intensidad de fluorescencia con luz no polarizada se hicieron con excitación a 375 nm y ancho de banda de 2 nm, y se adquirieron espectros de emisión de 420-460 nm, con un ancho de banda de 4 nm. Todos los ensayos se hicieron a 25°C, y en todos los casos se incluyeron blancos carentes de *mant*-GTP cuyas medidas se restaron de todas las muestras.

12.1 Titulación de *mant*-GTP y apoFtsZ

➤ *Cálculos para medidas de intensidad*

La unión de un ligando fluorescente a una proteína puede dar lugar a un cambio de la intensidad de la fluorescencia emitida por el fluoróforo. Normalmente, las medidas de la intensidad de fluorescencia se recogen sin filtros de polarización. Sin embargo, dada la necesidad de medir simultáneamente los valores de anisotropía (ver más abajo) y la intensidad de fluorescencia, se optó por utilizar los ajustes de "ángulo mágico" (luz vertical polarizada para la excitación y un ángulo de 54,7 ° para la emisión), que da medidas proporcionales a la luz no polarizada (Lakowicz, 1999 , pg. 301, Resultados). La fracción de sonda unida (v_b) es

$$v_b = [mant-GTP]_b/[mant-GTP]_T = (I_M - I_{Mf}) / (I_{Mb} - I_{Mf}) \quad (11)$$

donde $[mant-GTP]_T$ y $[mant-GTP]_b$ son la concentración total y unida de *mant*-GTP, I_M es la medida de intensidad de fluorescencia en ángulo mágico de la muestra, I_{Mf} es la medida en ángulo mágico de *mant*-GTP libre, e I_{Mb} es la medida en ángulo mágico de

mant-GTP unido. Dada la ecuación 11 y utilizando ecuaciones equivalentes a 3 y 4 para este ligando:

$$I_M = (K_{mGTP} \cdot [P]_f \cdot I_{Mb} + I_{Mf}) / (1 + K_{mGTP} \cdot [P]_f) \quad (12)$$

donde K_{mGTP} es la constante de afinidad de unión de *mant*-GTP a apoFtsZ. La ecuación 12 se aplicó iterativamente para ajustar los datos I_M vs. $[P]_f$, obteniéndose los valores mejor ajustados para K_{mGTP} , I_{Mf} (que coincide con el valor medido) e I_{Mb} . Se puede además definir un factor de intensidad de fluorescencia que representa el cambio de intensidad de fluorescencia entre la forma libre y unida de *mant*-GTP:

$$R = I_{Mb}/I_{Mf} \quad (13)$$

Este factor se empleó durante las medidas con anisotropía (ver más abajo).

➤ ***Cálculos para medidas de anisotropía***

La unión de *mant*-GTP a apoFtsZ puede realizarse a través de la medida de cambios en su anisotropía, ya que cuando un ligando fluorescente se une a una proteína se reduce su libertad rotacional, lo que se refleja en un aumento de su anisotropía. Definimos primero un valor ($I_{||\perp}$) que representa el coeficiente de la fluorescencia emitida paralela al plano de excitación dividido entre la fluorescencia emitida perpendicular al plano de excitación

$$I_{||\perp} = (I_{VV} \cdot I_{HH}) / (I_{VH} \cdot I_{HV}) \quad (14)$$

donde I_{XY} es la intensidad de fluorescencia emitida en el plano Y (V = vertical, H = horizontal) con luz de excitación en el plano X. El coeficiente de intensidad lumínica emitida en el plano horizontal y vertical tras excitación vertical (I_{VV} / I_{VH}) cambia de acuerdo con la libertad rotacional de *mant*-GTP. El coeficiente de intensidad lumínica emitida en el plano horizontal y vertical tras excitación horizontal (I_{HV} / I_{HH}) se emplea únicamente para compensar cualquier diferencia de sensibilidad entre los sistemas de

detección de luz vertical u horizontal (Lakowicz, 1999 , pg: 298-299). Empleando $I_{\parallel/\perp}$, se calcula la anisotropía como:

$$r = (I_{\parallel/\perp} - 1) / (I_{\parallel/\perp} + 2) \quad (15)$$

La anisotropía de una muestra vendrá definida por el valor de la anisotropía de la sonda fluorescente libre (r_f) y la anisotropía de la sonda unida (r_b) multiplicados por sus respectivas proporciones fraccionales:

$$r = F_b \cdot r_b + F_f \cdot r_f \quad (16)$$

donde F_f y F_b son las fracciones de fluorescencia de fluoróforo libre y unido, respectivamente. El caso más sencillo para una sonda fluorescente es aquel donde no hay diferencia de rendimiento cuántico entre el fluoróforo en estado libre o unido. En este caso las fracciones de fluoróforo unido (v_b) y libre (v_f) coinciden con las fracciones de fluorescencia correspondientes. Si se emplea la ecuación 16 sabiendo que la suma de las fracciones de fluorescencia es por definición igual a 1, se obtiene lo siguiente:

$$v_b = (r - r_f) / (r_b - r_f) \quad (17)$$

Sin embargo, *mant*-GTP no presenta este comportamiento, dado que sí hay una diferencia en la intensidad de fluorescencia entre la forma libre y unida de *mant*-GTP. En este caso la fracción de fluorescencia es:

$$F_b = v_b \cdot (I_b / I_T) \quad (18)$$

donde I_b es la intensidad de fluorescencia de *mant*-GTP unido e I_T es la intensidad de fluorescencia total. Debido a la proporcionalidad que ya se ha mencionado, I_b es proporcional a I_{Mb} . Dadas las ecuaciones 16 y 18:

$$r = (I_f/I_T \cdot v_f \cdot r_f) + (I_b/I_T \cdot v_b \cdot r_b) \quad (19)$$

donde I_f es la intensidad de fluorescencia de *mant*-GTP libre (proporcional a I_{Mf}). Dado que:

$$I_T = I_f \cdot v_f + I_b \cdot v_b \quad (20)$$

y sabiendo que

$$v_b + v_f = 1 \quad (21)$$

y que, gracias a la proporcionalidad, $I_b/I_f = I_{Mb}/I_{Mf}$, se puede emplear la ec. 13, además de las ecuaciones 19-21 para obtener:

$$v_b = (r - r_f) / [(r - r_f) + R \cdot (r_b - r)] \quad (22)$$

(ver también Lakowicz, 1999 , pgs 308-309). Esta ecuación se puede reducir a la ecuación 17 cuando no hay un cambio en el rendimiento cuántico del fluoróforo ($R = 1$). Si suponemos una reacción de unión 1 a 1 y se aplica la ec. 22 junto con una ecuación equivalente a ec. 4 (cambiando el ligando), la unión se ajusta a la siguiente ecuación general:

$$r = (r_f + K_{mGTP} \cdot [P]_f \cdot R \cdot r_b) / (1 + K_{mGTP} \cdot [P]_f \cdot R) \quad (23)$$

La ecuación 23 se empleó, junto con el valor obtenido previamente para R y un equivalente de la ecuación 3 para realizar un ajuste iterativo de los datos r vs. $[P]_f$, partiendo de valores iniciales diferentes de r_b y r_f , obteniéndose los valores mejor ajustados de K_{mGTP} , r_b y r_f (éste último coincidió con el valor medido).

Después apoFtsZ (375 nM) se tituló con concentraciones crecientes de *mant*-GTP. La saturación fraccional se obtuvo empleando la ecuación 22 y se multiplicó por la concentración de *mant*-GTP en la muestra. Sabiendo que la concentración de *mant*-GTP libre ($[mant\text{-GTP}]_f$) se calcula con una ecuación equivalente a ec. 8 (simplemente

cambiando el ligando), se aplicó una ecuación equivalente a la ec. 5 para ajustar iterativamente los datos $[mant-GTP]_b/[P]_T$ vs. $[mant-GTP]_f$ con el fin de obtener los valores mejor ajustados de n y K_{mGTP} .

12.2 Competición de ligandos con *mant*-GTP

➤ *Consideraciones experimentales*

Se prepararon muestras (0.4 mL) con una mezcla de *mant*-GTP (concentración final 500 nM), apoFtsZ (concentración final 375 nM) y diferentes concentraciones de un ligando competidor en tampón de competición. ApoFtsZ y *mant*-GTP se prepararon en una solución madre 2X, poniendo 0.2 mL por muestra, para asegurar la uniformidad de concentraciones de *mant*-GTP y apoFtsZ en cada muestra.

Se incluyeron muestras control sin ligando competidor, sin apoFtsZ y con tampón solo en cada ensayo. Cuando se ensayaron compuestos de química diferente a un nucleótido o un componente de nucleótido, como cuando se ensayó PC o los compuestos de cribado virtual, se incluyó habitualmente un control adicional con *mant*-GTP y compuesto competidor, para asegurar que el compuesto ensayado no estuviera interaccionando inespecíficamente con la sonda fluorescente.

Por último, en el caso de los compuestos de cribado virtual que mostraran una fluorescencia significativa en el rango de emisión de *mant*-GTP (como D2-11, en la figura 12), se incluyó para cada punto de concentración de ligando un blanco equivalente de ligando en tampón. En estos casos, el valor blanco de tampón sólo se restó de las medidas del primer punto sin ligando competidor, mientras que a cada punto de competición se le restó su equivalente blanco a esa concentración de ligando. Así se pudo restar el efecto de fluorescencia de ligandos que emiten a 445 nm, aunque hubo un reducido número cuya emisión de fluorescencia era demasiado elevada para esto y que por tanto tuvo que ser descartado para su ensayo con *mant*-GTP.

➤ *Cálculos*

La saturación fraccional de *mant*-GTP se determinó como se describe en el apartado anterior. Las afinidades de los ligandos se determinaron empleando el mismo sistema de ecuaciones que empleamos en las competiciones con ^3H -GTP (ecs. 6-10), sustituyendo

K_{HGTP}^3 por la K_{mGTP} y todas las concentraciones de 3H -GTP por concentraciones de *mant*-GTP.

RESULTADOS

1. MÉTODO DE COMPETICIÓN DE LIGANDOS POR EL SITIO DE NUCLEÓTIDO DE FTSZ

Un objetivo de esta tesis es el desarrollo de un método de competición que permita la detección de compuestos que se unan específicamente al sitio de nucleótido de FtsZ, así como la medida de su afinidad de unión. Para ello se midieron las afinidades de unión de dos ligandos de referencia, *mant*-GTP y ^3H -GTP, con el objetivo de disponer de dos métodos independientes de evaluación de ligandos de FtsZ. Posteriormente, se pusieron a prueba los dos métodos frente a un grupo común de ligandos, de manera que se pudo validar la calidad de los resultados del método de competición con ligando fluorescente con los resultados del método de competición con ligando radiactivo.

1.1 Afinidades de unión de los ligandos de referencia

Se ha medido la afinidad de unión por titulación de dos ligandos diferentes, *mant*-GTP y ^3H -GTP, que se emplearán como ligandos de referencia en dos métodos de competición por el sitio de nucleótido de FtsZ.

Se tituló ^3H -GTP con concentraciones crecientes de apoFtsZ y posteriormente se hizo la titulación recíproca, titulando apoFtsZ con concentraciones crecientes de ^3H -GTP (Figura 13).

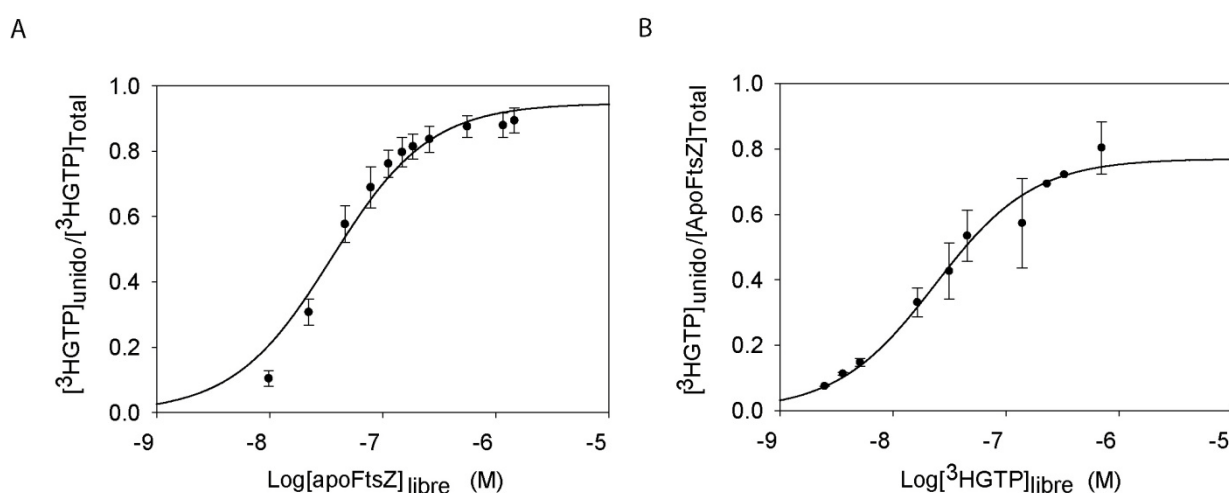


Figura 13: Titulaciones con ^3H -GTP. A - Titulación de ^3H -GTP (50 nM) con concentraciones crecientes de apoFtsZ. B - Titulación de apoFtsZ (75 nM) con concentraciones crecientes de ^3H -GTP. En este caso la concentración de apoFtsZ empleada es la de proteína total, para visualizar el ajuste del número de sitios de nucleótido (n) por proteína. Las líneas son los mejores ajustes para cada curva.

Los resultados fueron valores de constantes de afinidad de $(2.84 \pm 0.36) \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ y $(4.25 \pm 1.53) \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ para la titulación de $^3\text{H-GTP}$ con apoFtsZ y la titulación recíproca, respectivamente. Además, la titulación de apoFtsZ con $^3\text{H-GTP}$ dio un número de sitios de nucleótido por apoFtsZ de $n = 0.77 \pm 0.07$, que está muy cerca del valor obtenido anteriormente (0.75 ± 0.04 , ver Materiales y Métodos, apartado 5). Finalmente se eligió como afinidad del ligando de referencia el obtenido de la titulación de $^3\text{H-GTP}$ con concentraciones crecientes de apoFtsZ, dado que las titulaciones hechas con concentraciones crecientes de $^3\text{H-GTP}$ padecen de una menor reproducibilidad y mayor error. Esto se debe a que, al aumentar la concentración de ligando, en zonas de la curva cercanas a la saturación, la proporción de ligando unido ($[\text{}^3\text{H-GTP}]_{\text{b}}/[\text{}^3\text{H-GTP}]_{\text{T}}$) es muy baja y por tanto difícil de medir con precisión.

Se hicieron titulaciones de apoFtsZ con *mant*-GTP y las recíprocas. La intensidad de fluorescencia emitida por *mant*-GTP aumenta de manera considerable cuando se une a apoFtsZ. Por ello se necesita un factor de corrección (R) que lo tenga en cuenta para no sobrevalorar la cantidad de *mant*-GTP unido debido a su mayor emisión de fluorescencia en las medidas de anisotropía. El cambio de intensidad de fluorescencia se puede detectar empleando luz de excitación y emisión no polarizada. Sin embargo, es deseable obtener el factor de corrección en el mismo ensayo de titulación de *mant*-GTP con apoFtsZ sin tener que alternar entre medidas sin y con polarización en cada punto del ensayo. Para evitar este inconveniente se emplea la luz polarizada en ángulo mágico (I_{M} , en ángulo 54.7°), que es directamente proporcional a la luz sin polarizar (Lakowicz, 1999, pg. 301). Esto fue comprobado experimentalmente (Figura 14), observándose una buena proporcionalidad entre la intensidad de fluorescencia sin polarización y con polarización en ángulo mágico.

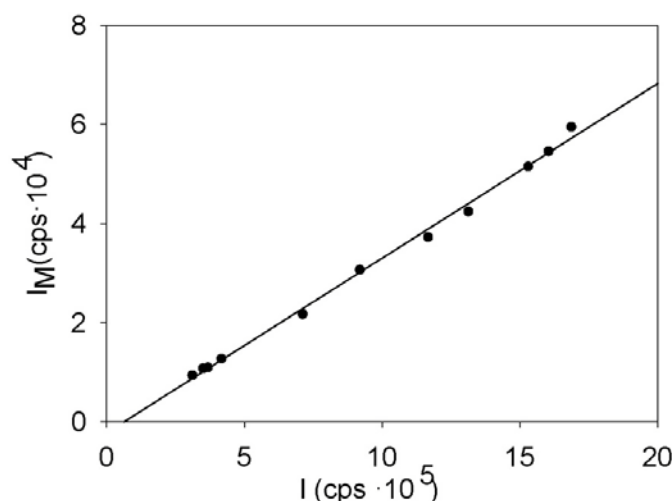


Figura 14: Proporcionalidad de intensidad de fluorescencia sin polarizar y con polarización en ángulo mágico. La emisión de fluorescencia *mant*-GTP (50 nM) se midió a concentraciones crecientes de apoFtsZ, recogiendo medidas de intensidad de fluorescencia sin polarizar (I) e intensidad de fluorescencia en ángulo mágico (I_M). Se ajustaron los puntos a una regresión lineal con ecuación $I_M = 3,526 \cdot 10^2 \cdot I - 2,266 \cdot 10^3$ con $R^2=0.99$.

Habiéndose confirmado que I_M es una medida precisa del cambio de intensidad de fluorescencia se hizo la titulación de *mant*-GTP (50 nM) con concentraciones crecientes de apoFtsZ, recogiendo medidas de r e I_M . A partir de la titulación empleando medidas de ángulo mágico (Figura 15A) se obtuvo el factor de cambio de intensidad ($R = 6.1 \pm 0.6$), que se empleó para corregir todas las titulaciones y competiciones posteriores hechas empleando anisotropía. También se obtuvo un valor de la afinidad de *mant*-GTP por apoFtsZ, $K_{mGTP} = (1.30 \pm 0.3) \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$. La titulación hecha con medidas de anisotropía (Figura 15B) dio unas anisotropías para *mant*-GTP libre y unido de 0.027 ± 0.001 y 0.23 ± 0.01 , respectivamente. Se obtuvo una afinidad de unión de $K_{mGTP} = (9.40 \pm 3.9) \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$. Si se observa la representación gráfica de la titulación de *mant*-GTP con apoFtsZ se ve que, a diferencia de la titulación hecha con I_M y en contra de lo esperado habitualmente, $1/K_b$ en el caso de la titulación con anisotropía no coincide con el valor en el eje de abscisas de la mitad de la curva. Esto es debido al factor de corrección R que se emplea para corregir los datos de anisotropía de manera que no se sobrevalore la fluorescencia de *mant*-GTP unido frente a *mant*-GTP libre.

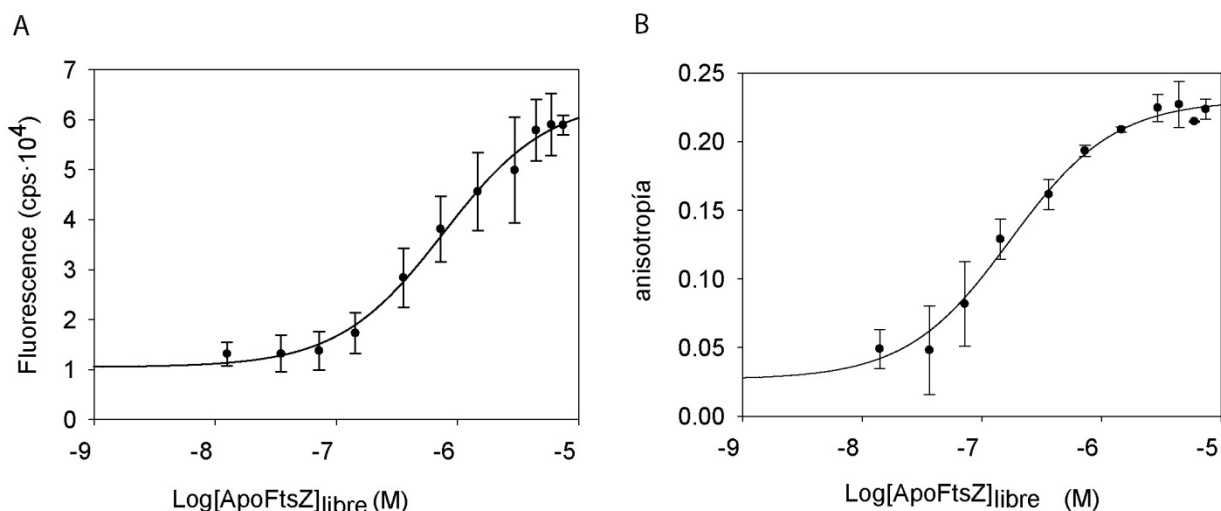


Figura 15: Titulación de *mant*-GTP (50 nM) con apoFtsZ. A – Titulación medida con emisión de fluorescencia en ángulo mágico. B – Titulación medida por anisotropía. Las líneas sólidas corresponden al mejor ajuste en cada caso.

También se intentó la titulación de apoFtsZ (375 nM) con concentraciones crecientes de *mant*-GTP, pero este ensayo obtuvo una reproducibilidad muy baja, debido al gran error que se obtuvo en las zonas de saturación de apoFtsZ, donde la proporción de *mant*-GTP unido ($[mant-GTP]_b/[mant-GTP]_T$) es muy baja. Debido a esta dificultad se eligió, al igual que en el caso del ³H-GTP, la afinidad de la titulación del ligando de referencia (en este caso *mant*-GTP) con concentraciones crecientes de apoFtsZ como la afinidad de referencia para los ensayos de competición.

Finalmente, con el propósito de comparar sus afinidades, se hizo la titulación de *mant*-GDP con concentraciones crecientes de apoFtsZ en las mismas condiciones, obteniéndose unas anisotropías para *mant*-GDP libre y unido de ~0.05 y ~0.29, respectivamente, y una $K_{mGDP} = (8.3 \pm 1.4) \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$, lo que resulta en un cociente K_{mGTP}/K_{mGDP} de 1.13 ± 0.47 .

1.2 Comparación de los métodos de competición con ³H-GTP y *mant*-GTP

Para comprobar que el método de competición con *mant*-GTP daba medidas precisas de afinidad de ligando se ensayó un grupo de seis ligandos diferentes empleando tanto el método de competición con ³H-GTP como el método de competición con *mant*-GTP (Figura 16, Tabla 5). La competición con *mant*-GTP dio medidas precisas para ligandos con afinidades comprendidas entre 10^3 y 10^8 M^{-1} . Las afinidades medidas por

competición con *mant*-GTP fueron sistemáticamente algo más altas que las obtenidas por competición con ^3H -GTP (media de 2.7 ± 1.1 veces mayor). Se trata una diferencia de poca importancia para la comparación de afinidades relativas de ligandos.

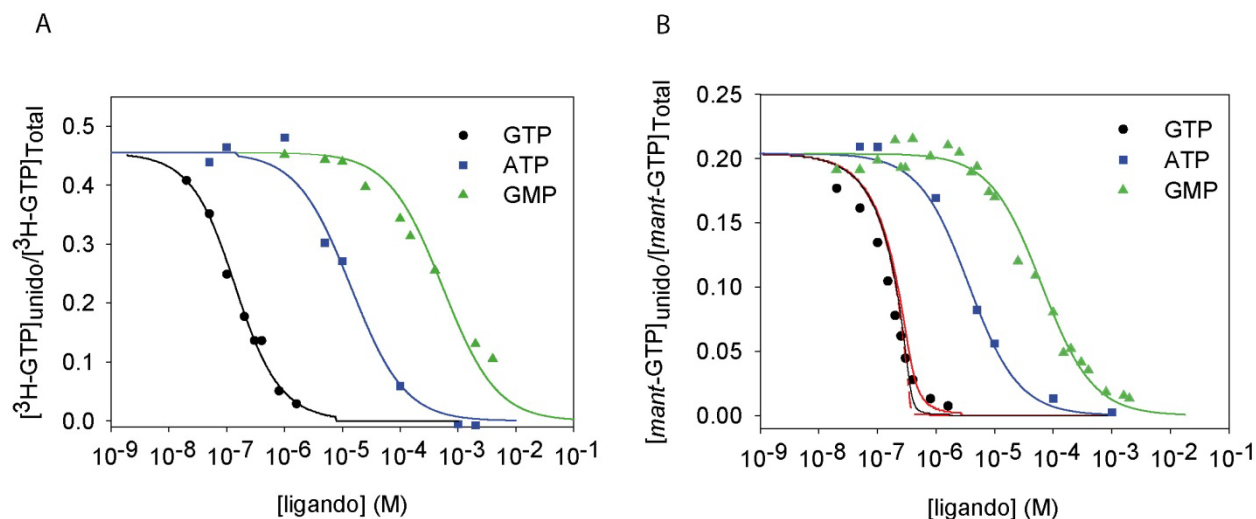


Figura 16: Comparación de competiciones con ^3H -GTP y *mant*-GTP. Comparación entre GTP (negro), ATP (azul) y GMP (verde) hechas usando el A – Método de competición con ^3H -GTP (100 nM) por apoFtsZ (75 nM). B – Método de competición con *mant*-GTP (500 nM) por apoFtsZ (375 nM). Se representan datos medios de al menos dos réplicas en cada caso. Los trazos rojos corresponden a ajustes teóricos hechos suponiendo $K_{b\text{-GTP}} = 10^8$ (línea continua) o 10^{11} (línea discontinua).

La competición con *mant*-GTP aporta medidas con una precisión mucho menor cuando la afinidad del ligando es mucho mayor que la del *mant*-GTP ($>10^2 \cdot K_{m\text{GTP}}$). Esto incluye el ligando natural GTP. Aunque el ajuste de la competición es aparentemente buena, si se trazan curvas de ajuste imponiendo afinidades órdenes de magnitud mayores que la obtenida (10^8 y 10^{11} M^{-1} , Figura 16B, trazos rojos) apenas se ve una diferencia en el ajuste aparente (Figura 16, trazos rojos). Esto significa que el método de competición con *mant*-GTP, aunque podrá detectar ligandos cuya K_b sea cercana o mayor que la del GTP, dará medidas poco cuantitativas de su afinidad. Se calculó una aproximación a la afinidad que daría la competición de *mant*-GTP para el GTP si se pudiera alcanzar ese rango. Para ello se multiplicó la afinidad del GTP obtenida por competición con ^3H -GTP ($K_{\text{GTP-}^3\text{H-GTP}} = (4.13 \pm 0.27) \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$) por el factor entre las afinidades obtenidas empleando los dos métodos. Esto da una $K_{\text{GTP-mGTP}} \approx 1.12 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$, que servirá para poder comparar la afinidad del GTP frente a la afinidad de otros ligandos obtenidos por competición con *mant*-GTP.

Resultados

Dentro del grupo de los ligandos probados empleando ambos métodos de competición hubo tres nucleótidos trifosfato diferentes de GTP: ATP, CTP y UTP. El cambio de la base del nucleótido de Guanina a Adenina causa una bajada considerable de la afinidad del ligando, desde $\sim 1.12 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$ a $(4.93 \pm 0.60) \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$. Sorprendentemente, el cambio de la base desde una purina a una pirimidina (CTP o UTP) causa un efecto adicional insignificante en la constante de afinidad. CTP tiene una afinidad de $(7.58 \pm 2.9) \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ y UTP tiene una K_b de $(7.13 \pm 1.4) \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$. Se hizo también un ensayo de competición de ADP con *mant*-GTP obteniéndose una K_b de $2.84 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$. Esto da una $K_{\text{ATP}}/K_{\text{ADP}} = 1.74$. Parece que el fosfato- γ tiene un efecto limitado sobre la unión a FtsZ, lo cual está de acuerdo con lo anterior para *mant*-GTP y *mant*-GDP.

Tabla 5: Afinidades y energías libres de unión de ligandos a apoFtsZ

Ligando	$K_{3\text{HGTP}} (\text{M}^{-1})$	$K_{\text{mGTP}} (\text{M}^{-1})$	$\Delta G_{\text{mGTP}} (\text{kcal M}^{-1})$
<i>Partes del GTP</i>			
GTP	$(4.13 \pm 0.27) \cdot 10^7$	$\sim 1.12 \cdot 10^8$	~ -10.97
GDP	—	$\sim 3.8 \cdot 10^7$	~ -10.34
GMP	$(8.09 \pm 0.11) \cdot 10^3$	$(2.62 \pm 0.57) \cdot 10^4$	-6.02 ± 0.14
Guanosina	—	$(3.42 \pm 0.37) \cdot 10^3$	-4.81 ± 0.07
PPPi	—	$(4.16 \pm 0.01) \cdot 10^4$	-6.29 ± 0.01
PPi	$(2.93 \pm 0.71) \cdot 10^4$	$(5.71 \pm 0.13) \cdot 10^4$	-6.48 ± 0.01
Pi	—	$(1.53 \pm 0.15) \cdot 10^3$	-4.34 ± 0.06
<i>Otros nucleótidos</i>			
ATP	$(3.44 \pm 0.03) \cdot 10^5$	$(4.93 \pm 0.60) \cdot 10^5$	-7.76 ± 0.10
ADP	—	$2.84 \cdot 10^5$	-7.43
CTP	$(1.78 \pm 0.25) \cdot 10^5$	$(7.58 \pm 2.9) \cdot 10^5$	-8.01 ± 0.30
UTP	$(2.67 \pm 0.39) \cdot 10^5$	$(7.13 \pm 1.4) \cdot 10^5$	-7.98 ± 0.20

Constantes de afinidad de ligandos que unen el sitio de nucleótido de apoFtsZ. $K_{3\text{HGTP}}$: constante de afinidad obtenida de competición con ^3H -GTP. K_{mGTP} : constante de afinidad obtenida de competición con *mant*-GTP. ΔG_{mGTP} , energía libre de unión calculada a partir de K_{mGTP} . Los datos marcados con “~” son aproximativos (ver texto principal).

2. LA UNIÓN DE GTP Y SUS PARTES A apoFtsZ

Con el fin de entender mejor la interacción de FtsZ con su ligando natural, GTP, se empleó el método de competición con *mant*-GTP para estudiar la unión de GTP y sus partes (GDP, GMP, guanosina, PPPi, PPi y Pi) a apoFtsZ.

2.1 Medidas de las afinidades de unión

Se determinaron las afinidades de unión de las partes del GTP al sitio de unión de nucleótido de apoFtsZ (Figura 17, Tabla 5). Todas las partes ensayadas del GTP compiten con *mant*-GTP por el sitio de nucleótido, con afinidades comprendidas entre nanomolar (GTP) y milimolar (Pi). Del GDP se obtuvo un ajuste que queda justo en el borde del rango de ajustes precisos para el método de *mant*-GTP. Esto no es inesperado, dado que al comparar ATP con ADP y *mant*-GTP con *mant*-GDP, se ha visto que la presencia del fosfato- γ tiene una influencia pequeña sobre la afinidad total, de manera que el GDP lógicamente tendrá una afinidad similar a la del GTP. Utilizando técnicas de HPLC (Huecas *et al.*, 2007) y calorimetría isotérmica (*cf. infra*) se encontró que GTP tiene una afinidad 2.9 ± 0.5 veces mayor que el GDP, por lo que se puede aproximar el valor de la afinidad del GDP como $K_{\text{GTP-mGTP}} \div 2.9 \approx 3.8 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$.

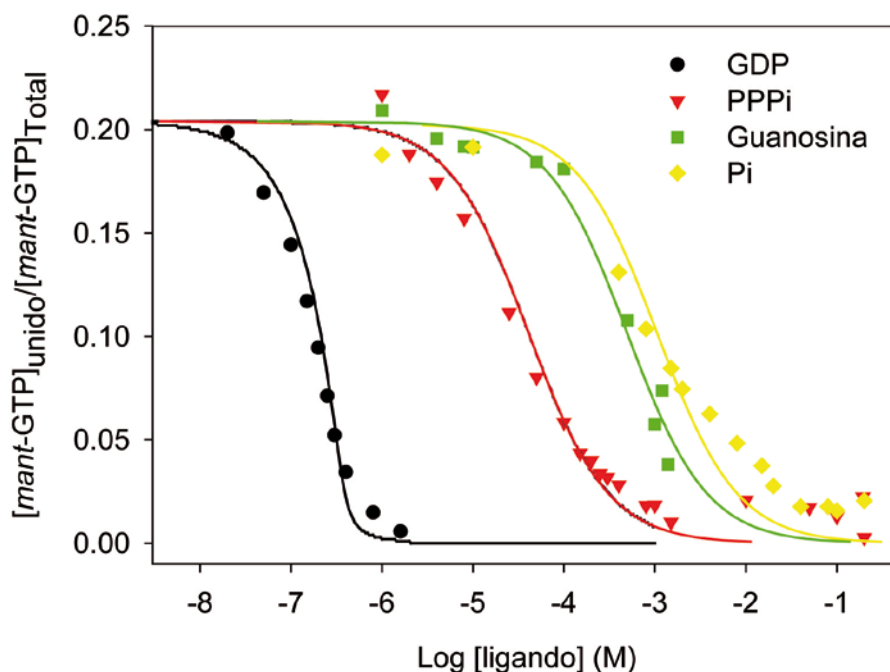


Figura 17: Curvas de competición de GDP y componentes de diferentes afinidades. Competiciones de GDP (negro), PPPi (rojo), guanosina (verde) y Pi (amarillo) con *mant*-GTP (500 nM) por apoFtsZ (375 nM). Las líneas sólidas corresponden al mejor ajuste en cada caso.

Aunque se ha observado que el fosfato- γ tiene una influencia pequeña sobre la unión, el fosfato- β tiene una influencia mucho mayor, ya que quitarlo baja la afinidad dos órdenes de magnitud, desde $3.8 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ (para el GDP) hasta $(2.62 \pm 0.62) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ (para el GMP). El fosfato- α tiene una influencia sobre la unión algo menor que el fosfato- β . Quitarlo baja la afinidad un orden de magnitud, a $(3.42 \pm 0.37) \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ para la guanosina. Una manera complementaria de estimar la contribución de los fosfatos sobre la unión del nucleótido es medir su afinidad por sí solos. Los tres componentes de fosfato ensayados, PPPi, PPI, y Pi, compiten con *mant*-GTP por el sitio de nucleótido de apoFtsZ, con afinidades de $(4.16 \pm 0.01) \cdot 10^4$, $(5.71 \pm 0.13) \cdot 10^4$ y $(1.53 \pm 0.15) \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$, respectivamente.

2.2 Energías libres totales y energías intrínsecas de la unión de ligandos a apoFtsZ

La conversión de las afinidades de unión a cambio de energía libre estándar (ΔG^0), empleando la ecuación $\Delta G^0 = -RT \cdot \ln K_b$ (R = constante de los gases ideales; $1.985 \text{ cal} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$, T = temperatura en grados Kelvin), facilita la comparación entre ligandos y permite cálculos cuantitativos de las contribuciones parciales de cada parte de la molécula del GTP a la unión total. Una vez se tienen las ΔG^0 (Tabla 5), se pueden hacer cálculos adicionales para entender la contribución parcial de cada grupo del GTP a la unión (Tabla 6). El incremento parcial de energía libre ($\Delta \Delta G^0$) es una primera aproximación a la contribución intrínseca de cada parte de una molécula a la unión, suponiendo que no hubiera más cambios en el sistema (Andreu y Timasheff, 1982, Buey *et al.*, 2004). Así por ejemplo, se puede aproximar la contribución del fosfato- γ como:

$$\Delta \Delta G^0_{(\text{GDP} \rightarrow \text{GTP})} = \Delta G^0_{\text{GTP}} - \Delta G^0_{\text{GDP}} = (-10.97) - (-10.34) = -0.63 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$$

Usando el mismo tipo de cálculo vemos que el fosfato- β contribuye con $-4.32 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ y el fosfato- α contribuye $-1.21 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$. La guanosina contribuye con $-4.68 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$, que es un valor muy cercano a la energía libre de unión medida para la guanosina, de $-4.81 \pm 0.07 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$.

Tabla 6: Contribuciones parciales de partes del GTP a la unión a apoFtsZ

Grupo	Modificación de ligando	$\Delta\Delta G^\circ$ (kcal/mol)	% ΔG° (GDP) experimental	% G° (GDP) computacional	% ΔG° (GTP) experimental	% G° (GTP) computacional cadena a, b
Guanosina	PPPi \rightarrow GTP	-4.68	46	32	43	36, 47
Guanina	NTP \rightarrow GTP	$\sim -3.05^*$	~ 30	15	~ 28	21, 12
Ribosa	PPPi \rightarrow NTP	$\sim -1.63^*$	~ 16	17	~ 15	15, 35
Trifosfato	guanosina \rightarrow GTP	-6.16	54	68	57	64, 53
α -fosfato	guanosina \rightarrow GMP	-1.21	12	20	11	9, 4
	<i>Pi \rightarrow P<i>Pi</i></i>	<i>-2.15</i>	<i>(21)</i>	-	<i>(20)</i>	-
β -fosfato	GMP \rightarrow GDP	-4.32	42	48	40	34, 26
γ -fosfato	GDP \rightarrow GTP	-0.63	-	-	6	21, 23
	<i>PPi \rightarrow PPPi</i>	<i>0.19</i>	-	-	<i>(-2)</i>	-
Σ grupos	-	-10.84	100	100	100	100, 100

Contribuciones intrínsecas ($\Delta\Delta G^\circ$) de los componentes principales (en negrita) y subcomponentes a la unión del GTP. La modificación de ligando indica las energías libres de unión empleadas en el cálculo (ver texto). “% Experimental” es el porcentaje de la unión total que aporta el grupo y “% Computacional” los correspondientes porcentajes calculados computacionalmente. Entre paréntesis y en cursiva, porcentajes empleados usando las $\Delta\Delta G^\circ$ de los fosfatos que no se emplean en la suma. Los valores marcados con “*” están calculados en la Tabla A7 (Apéndice).

La guanina presenta dificultades experimentales para la medida directa de su afinidad, debido a su baja solubilidad (Devoe y Wasik, 1984). Aun suponiendo que la ribosa no contribuyera a la unión y por tanto que la guanina tuviera la misma afinidad que la guanosina, la baja solubilidad de la guanina hace imposible realizar una curva completa de competición en las condiciones de medida. La similitud de las afinidades de los nucleótidos no de guanina hacen posible una estimación grosera de la contribución de la guanina y la ribosa por separado (Tabla 6, Apéndice Tabla A7) pero se debe tener en cuenta que esta estimación se hace suponiendo que una base diferente de la guanina no estableciera interacción alguna con FtsZ, lo que parece poco probable.

Las energías libres de unión para PPPi, P*Pi* y Pi fueron -6.29 ± 0.001 kcal·mol⁻¹, -6.48 ± 0.013 kcal·mol⁻¹, y -4.34 ± 0.06 kcal·mol⁻¹, respectivamente. Se pueden comparar estas energías libres de unión medidas con las energías intrínsecas calculadas para ellas en el contexto de la molécula total del GTP (Tabla 6). $\Delta\Delta G_{\text{guanosina} \rightarrow \text{GTP}}$ nos da la contribución intrínseca del grupo trifosfato del GTP, de -6.16 kcal·mol⁻¹, un valor muy

cercano a la energía libre de unión medida para el PPPi. En el caso de PPI y Pi podría considerarse inicialmente un problema más complejo, ya que estos ligandos tienen la capacidad potencial de unirse en más de una posición en el sitio de nucleótido. En teoría, PPI podría situarse en posición α - β o β - γ , mientras que Pi podría situarse en posición α , β , o γ . Sin embargo, suponiendo una distribución de Boltzmann (Schoonmaker, 1972, página 13) para la unión de los fosfatos en las tres posiciones, se puede calcular la proporción de Pi que se unirá en α , β o γ :

$$\frac{n_i}{n_1} = \frac{1}{e^{\frac{\Delta\Delta G_i - \Delta\Delta G_1}{RT}}}$$

siendo n_i/n_1 la proporción de fosfato en posición “i” frente a la posición de mínima energía, $\Delta\Delta G_i$ la energía intrínseca de la posición “i” y $\Delta\Delta G_1$ la energía intrínseca de la posición de mínima energía. En este caso el estado de mínima energía corresponde a la posición β , que es la que tiene una energía intrínseca más favorable ($-4.44 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$) que se puede comparar con los fosfatos en posición “i” (α o γ). Empleando este cálculo se ve que un 0.5% del Pi irá a la posición α frente a la β , y menos de un 0.2% irá a la posición γ . El Pi se unirá casi en su totalidad en la posición β , lo que significa se puede comparar ΔG_{Pi}^0 con $\Delta\Delta G_{\text{GMP} \rightarrow \text{GDP}}$, viéndose que son muy similares entre sí. Utilizando el mismo cálculo se ve que el PPI puede unirse tanto en la posición α - β como en la posición β - γ . Se observa que tanto la contribución intrínseca para la posición α - β ($\Delta\Delta G_{\text{guanosina} \rightarrow \text{GDP}} = -5.53 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$) como la de la posición β - γ ($\Delta\Delta G_{\text{GMP} \rightarrow \text{GTP}} = -4.95 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$) son similares al valor de ΔG_{PPI} .

2.3 Unión del GTP y GDP a apoFtsZ medida por calorimetría isotérmica de reacción

Los resultados de los ensayos de competición de GTP y GDP con *mant*-GTP y ^3H -GTP indican que el fosfato- γ tiene una contribución energética mínima a la unión de GTP a apoFtsZ. Para confirmar esto midió la unión de GTP y GDP empleando una técnica diferente a la competición. La titulación por calorimetría isotérmica de reacción (ITC) aporta medidas de entalpía de unión (ΔH) de ligandos. Tiene la ventaja adicional de poder obtenerse la energía libre de unión y la contribución entrópica ($-T\Delta S$) de la misma. Además aporta una medida del número de sitios de ligando por proteína. La desventaja de esta técnica es que requiere una gran cantidad de proteína para cada

ensayo (1 mg, en este caso). La purificación y preparación previa de proteína y ligandos (ver Materiales y Métodos) se realizó en nuestro laboratorio y las medidas ITC en el laboratorio de la Dra. Margarita Menéndez del Instituto de Química Física Rocasolano, CSIC, Madrid. Se determinaron las energías libres de unión del GTP y GDP tanto en presencia como en ausencia de Mg^{2+} , además de medirse la unión de Mg^{2+} por sí solo. También se obtuvo la estequiometría de unión de GXP ($n = 0.83 \pm 0.08$). Se pueden comparar las titulaciones del GDP y $GTP-Mg^{2+}$ en la Figura 19 y los resultados completos están en la Tabla 7.

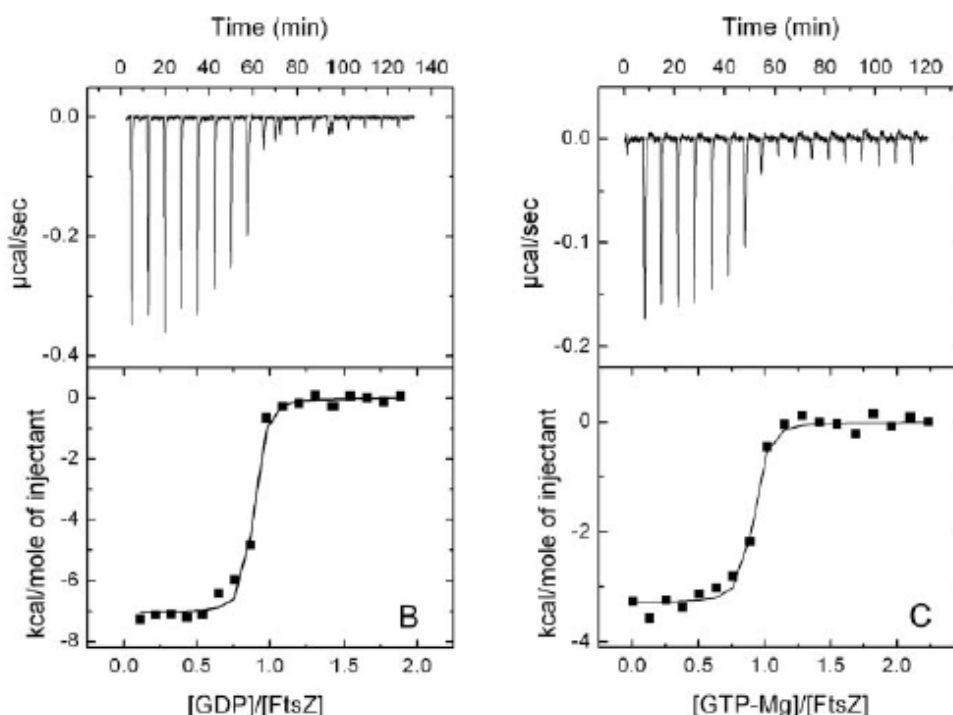


Figura 18: Calorimetrías isotérmicas. ITC de GDP (A) y $GTP-Mg^{2+}$ (B). Ambos ensayos se realizaron a 25°C. El área bajo los picos (paneles superiores) representa liberación de calor tras la inyección de ligando a la solución de apoFtsZ. Los puntos en los paneles inferiores representan a los mismos calores, tras restarles el calor de dilución y dividir entre los moles de ligando inyectados. Las líneas sólidas son los mejores ajustes en cada caso de ΔH , ΔG (Tabla 8) y n (Huecas *et al.*, 2007).

Tabla 7: Energética de las interacciones entre apoFtsZ y GDP o GTP

Ligando	K_b (M^{-1})	ΔG ($kcal \cdot mol^{-1}$)	ΔH ($kcal \cdot mol^{-1}$)	ΔS ($cal \cdot K^{-1} \cdot mol^{-1}$)
GDP	$(5 \pm 1) \cdot 10^7$	-10.5 ± 0.1	-6.80 ± 0.2	12.4 ± 0.3
$GDP-Mg^{2+}$	$(2 \pm 0.8) \cdot 10^7$	-10.0 ± 0.2	-3.78 ± 0.09	20.9 ± 0.4
GTP	$(3 \pm 1) \cdot 10^8$	-11.6 ± 0.2	-5.88 ± 0.08	19.1 ± 0.4
$GTP-Mg^{2+}$	$(3 \pm 1) \cdot 10^7$	-10.2 ± 0.2	-3.31 ± 0.03	23.1 ± 0.6
Mg^{2+}	$(3 \pm 0.3) \cdot 10^2$	-2.7 ± 0.2	4.2 ± 0.7	23 ± 2

Los experimentos de ITC se hicieron en ausencia o presencia de $MgCl_2$ (10 mM) tanto en la solución de proteína como en la solución de nucleótido. Los ensayos en presencia de $MgCl_2$ se hicieron en ausencia de EDTA. Dada la baja afinidad de Mg^{2+} no es posible estimar la estequiometría de la reacción de unión, por lo que la entalpía fue calculada por mol de proteína, en vez de por mol de sitio de unión.

De los resultados de los experimentos de ITC se puede observar que las reacciones de unión de GTP o GDP a apoFtsZ son moderadamente exotérmicas. La presencia de Mg^{2+} afecta negativamente a la afinidad de los nucleótidos. La presencia del fosfato- γ tiene un efecto positivo pero modesto sobre la afinidad. La afinidad de GTP- Mg^{2+} es solo 1.5 veces mayor que la afinidad de GDP- Mg^{2+} , lo cual es compatible con los resultados obtenidos por competición. Es esperable una cierta variabilidad respecto a los resultados por competición, dado que se tratan de técnicas muy diferentes y especialmente porque la concentración de apoFtsZ empleada para ITC es suficiente para la formación espontánea de dímeros y trímeros de proteína (aun en ausencia de magnesio o nucleótidos) mientras que las concentraciones utilizadas en ensayos de competición aseguran la presencia únicamente de monómeros de apoFtsZ (Huecas y Andreu, 2003).

2.4 Análisis bioinformático de las interacciones de GTP y GDP con MjFtsZ

El dímero MjFtsZ-GTP (con estructura cristalográfica conocida y código PDB 1W5A) consta de dos cadenas de FtsZ; la cadena A y la cadena B. Aunque ambas cadenas tienen al GTP unido en el sitio del nucleótido, sólo GTP-cadena A incluye un ión Mg^{2+} . Los sitios de unión de GTP de ambas cadenas son muy similares entre sí y al sitio con GDP (con estructura también conocida y código PDB 2VAP). De hecho GTP y GDP tal y como aparecen unidos en sus respectivas estructuras cristalográficas, se ve que son prácticamente superponibles (Figura 19). Esto, a priori, puede resultar sorprendente si además se considera el hecho de que las afinidades para GDP y GTP obtenidas por técnicas de competición e ITC son similares, lo que significaría que el fosfato- γ no establece interacciones importantes dentro del sitio del nucleótido. Esto parece poco probable si se observa la estructura cristalográfica, dado que el fosfato- γ se encuentra a una distancia favorable para establecer interacciones con la proteína (Oliva *et al.*, 2004). Además, el fosfato- γ tiene una función regulatoria clave en FtsZ, dado que determina si la proteína ensamblará (con GTP) o desensamblará (con GDP) lo que es difícil de explicar dada la poca diferencia entre las estructuras cristalográficas y la similitud de las afinidades de unión de ambos nucleótidos.

Para intentar resolver estas contradicciones aparentes, se realizaron simulaciones de dinámica molecular por el Dr. Antonio Morreale, Unidad de Bioinformática del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, con el fin de analizar las interacciones FtsZ-

nucleótido e identificar posibles cambios conformacionales que se darían en solución pero que no serían visibles en la estructura cristalográfica de FtsZ unida a GTP o GDP. Para ello se utilizaron las estructuras anteriormente conocidas de MjFtsZ-GDP y MjFtsZ-GTP (tanto en la cadena A como en la cadena B).

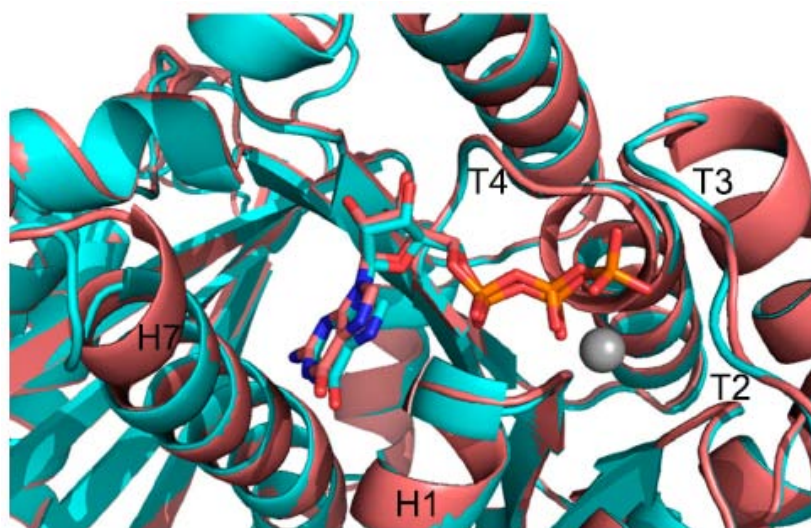


Figura 19: Superposición del sitio de nucleótido de MjFtsZ-GDP y MjFtsZ-GTP. Superposición del sitio de nucleótido de la estructura cristalográfica de MjFtsZ-GDP (PDB: 2VAP, en rosa) con la de MjFtsZ-GTP-Mg²⁺ (PDB: 1W5A, en cian). GTP y GDP están coloreados por tipo de átomo y Mg²⁺ como esfera gris.

➤ *Estabilidad de los complejos FtsZ-nucleótido analizados*

Se realizaron primero unas simulaciones de dinámica molecular empleando las estructuras de FtsZ-GDP y FtsZ-GTP-Mg²⁺ con el fin de analizar la estabilidad de las estructuras. En ambos casos, la proteína se mantuvo estable estructuralmente (Figura 20 A-GTP y B-GDP). Se hicieron dos cálculos en el caso de los ligandos (GDP/GTP). En un caso se superpuso cada paso a su respectiva estructura cristalográfica antes de realizar los cálculos de RMSD, dando como resultado para el GDP 1.28 ± 0.28 Å y para GTP 1.30 ± 0.2 Å, lo que indica que los ligandos no sufrieron grandes cambios conformacionales debido a sus grados de libertad internos (enlaces rotables). En el otro caso no se hizo un ajuste previo, monitorizándose así el movimiento del ligando en el sitio de unión. En este caso los resultados fueron de 2.28 ± 0.43 Å para el GDP y 0.86 ± 0.12 Å para el GTP. Se observa un movimiento mayor del GDP que, siendo más pequeño que el GTP, fluctúa más antes de encontrar su posición en el sitio de unión.

También se calcularon las fluctuaciones de las posiciones atómicas promediadas por la masa de cada residuo (Figura 20 C-GTP y D-GDP). El elemento más móvil es la hélice

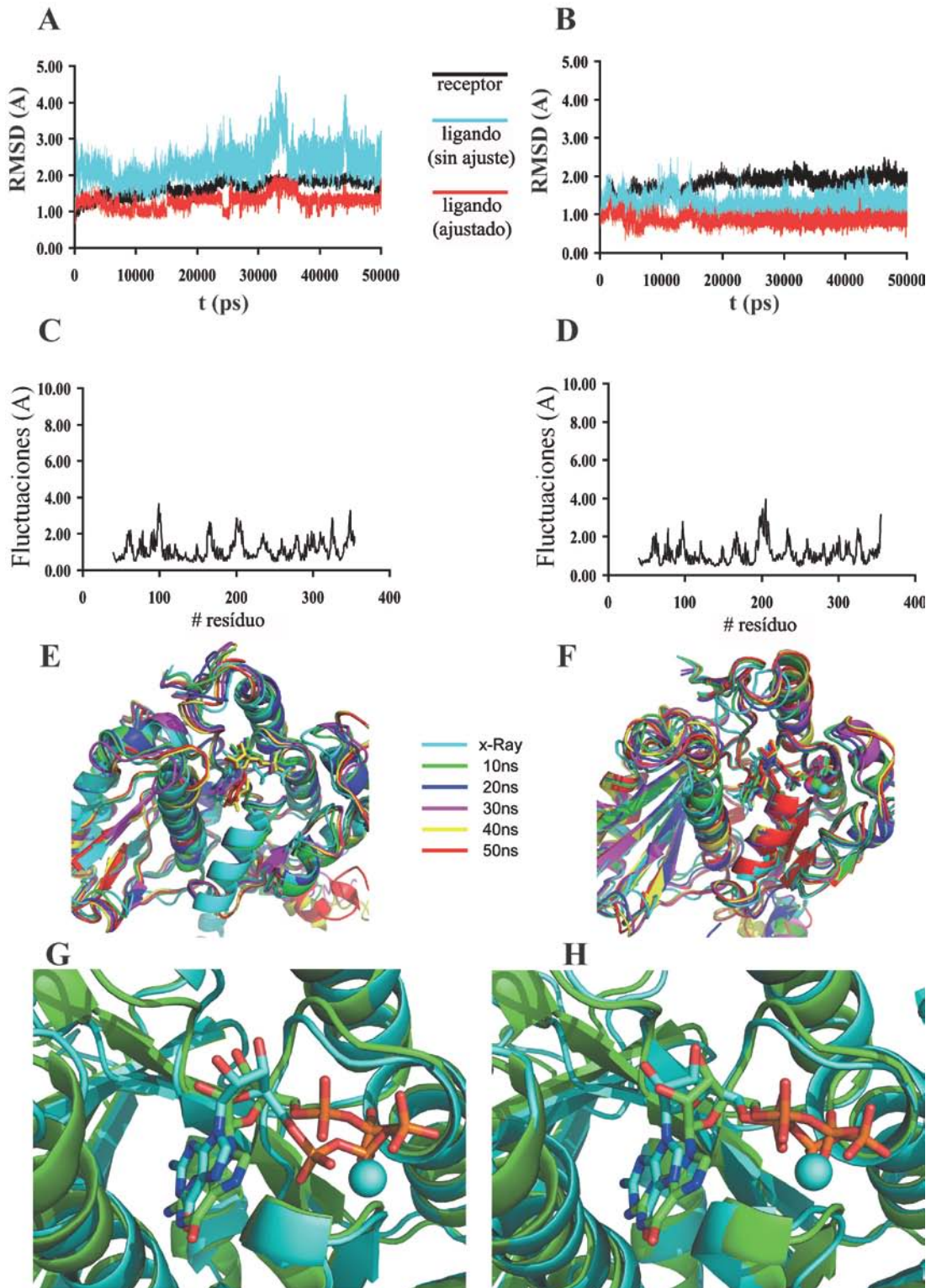


Figura 20: Dinámicas moleculares con FtsZ-GDP y FtsZ GTP-Mg²⁺. A - RMSD (en Å) durante las dinámicas moleculares para FtsZ (negro) y GDP (con ajuste previo en azul y sin ajustar previamente en rojo) comparados a la estructura cristalográfica inicial (PDB: 2VAP). B - RMSD (en Å) como en A para GTP (PDB: 1W5A). C - Fluctuaciones de las posiciones atómicas promediadas por la masa por cada residuo a lo largo de la dinámica molecular para GDP. D - Como en D con GTP. E - Superposición de la estructura cristalográfica sobre las estructuras minimizadas promedio de los últimos 500 ps de la dinámica tomadas en periodos de 10 ns para GDP. F - Como en E con GTP. G - Diferencias entre MjFtsZ-GDP (verde) y MjFtsZ-GTP-Mg²⁺ (cian, cadena A) en el sitio de unión de nucleótido tras 50 ns de dinámica molecular. El ión Mg²⁺ se representa como una esfera color cian. H - Como en G empleando la cadena B de MjFtsZ-GTP-Mg²⁺

N-terminal H0. Otras fluctuaciones importantes (por encima de 2 Å) corresponden al bucle T3 (residuos 98-103 con GDP y 97-100 con GTP), el bucle T5 (residuos 164-169 con GDP), el bucle H6-H7 (residuos 199-209 con GDP y 197-212 con GTP, incluyendo en ambos casos la parte superior de H7), el bucle S9-S10 (residuos 325-328 con GDP y 325-331 con GTP) y el bucle S11-S12 (residuos 347-352 con GDP).

➤ *Movimientos de FtsZ y nucleótido a lo largo de la dinámica molecular*

Los movimientos de FtsZ a lo largo de la dinámica molecular se pueden apreciar al superponer las estructuras cristalográficas sobre las estructuras promediadas de los últimos 500 ps de la dinámica tomadas en periodos de 10 ns (Figura 20 E-GTP y F-GDP). El bucle T3 y la parte superior de H7, que forman los bordes de sitio de unión de nucleótido, son los que experimentan la mayor variabilidad. Los resultados fueron similares cuando se empleó una FtsZ-GTP-Mg²⁺ que se construyó añadiendo un ión de Mg²⁺ a la cadena B de la estructura 1W5A (datos no mostrados). Si se compara la estructura con GDP con la estructura con GTP (Figura 20 G-GDP vs. GTP-Mg²⁺ cadena A, H - GDP vs. GTP-Mg²⁺ cadena B) tras los 50 ns de dinámica molecular se ve que ya no son superponibles, como lo eran en las estructuras cristalográficas.

➤ *Interacciones establecidas entre GDP y GTP y FtsZ*

A partir de las dinámicas moleculares se analizaron las principales interacciones de las diferentes partes de los nucleótidos GTP y GDP con FtsZ (Figura 21 A-GDP, B-GTP cadena A, C-GTP cadena B).

El anillo de guanina se encuentra apilado entre las cadenas laterales de F208 y A48, tanto en FtsZ con GDP y con GTP (aunque la interacción es más débil en GTP-cadena B). A lo largo de la dinámica K209 reemplaza a F208 en GTP-cadena A pero no en GTP-cadena B. En la estructura con GDP la interacción con A48 es compartida con el fosfato- α y en la estructura con GTP es compartida además con el anillo de ribosa. El grupo carboxilo de D212 establece una interacción electrostática con el GTP unido a la cadena A. Esta interacción se debilita cuando el GTP está unido a la cadena B o cuando el nucleótido unido en el sitio es el GDP. Además, GTP-cadena A forma un puente de hidrogeno entre el grupo carboxilo de D212 y un átomo de hidrógeno en posición N1 en el GTP o posiblemente con los átomos de hidrógeno del grupo amino en posición N2 (la proporción de tiempo en el que el puente de hidrógeno está formado es del 19%).

El sitio de nucleótido de GTP-cadena B se vuelve más estrecho que el sitio en GTP-cadena A, con el acercamiento del extremo N-terminal de la hélice H7 y la formación de un puente hidrógeno entre D212 y la posición N51 del GTP. Tanto la estructura GDP como GTP presentan una interacción hidrofóbica débil entre la guanina y F162. En la estructura con GDP se establecen dos interacciones electrostáticas transitorias (a los 10 ns de la dinámica molecular) con A211 y T159, mientras que en la estructura con GTP la interacción con T159 es permanente y se establece otra del mismo tipo con C129.

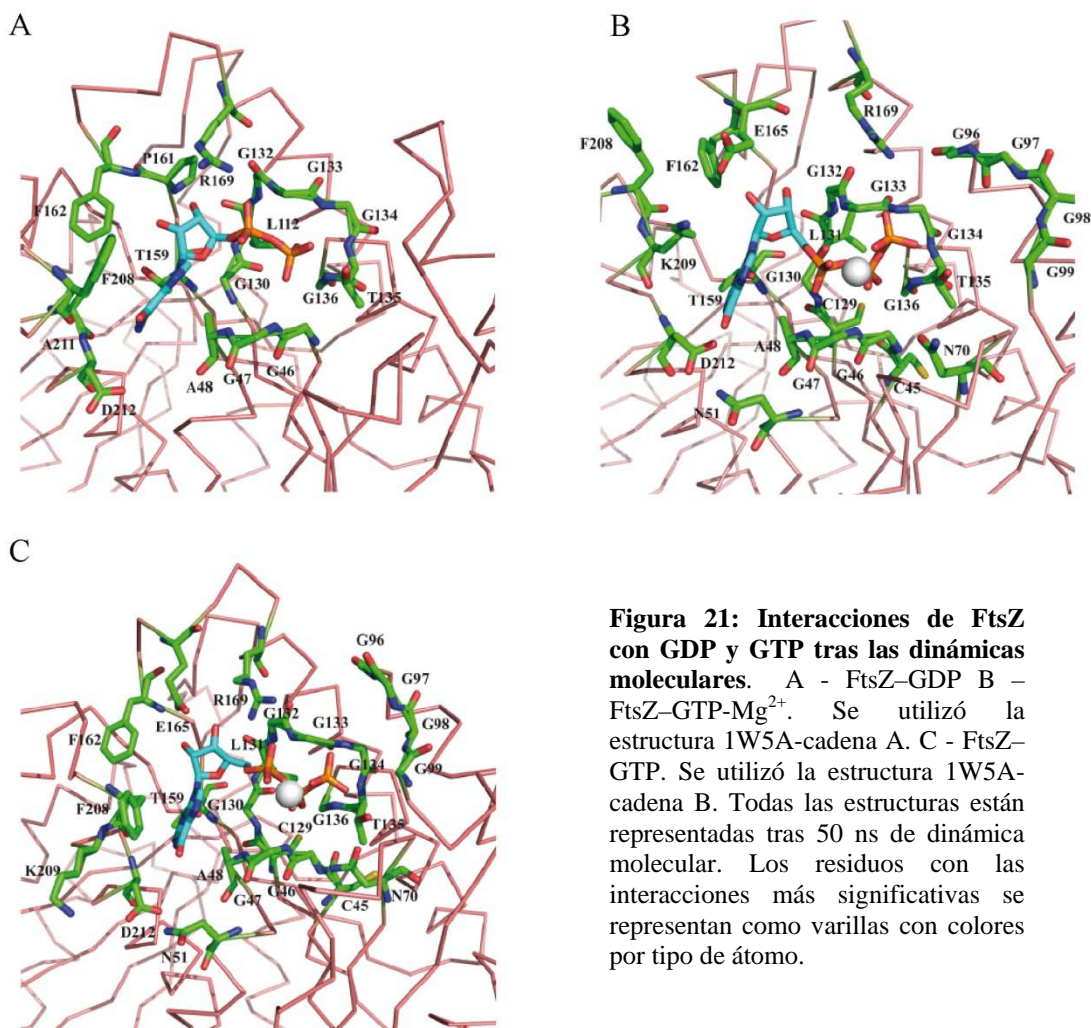


Figura 21: Interacciones de FtsZ con GDP y GTP tras las dinámicas moleculares. A - FtsZ-GDP B - FtsZ-GTP-Mg²⁺. Se utilizó la estructura 1W5A-cadena A. C - FtsZ-GTP. Se utilizó la estructura 1W5A-cadena B. Todas las estructuras están representadas tras 50 ns de dinámica molecular. Los residuos con las interacciones más significativas se representan como varillas con colores por tipo de átomo.

El anillo de ribosa de la estructura con GDP establece interacciones hidrofóbicas estables con P161, G130, L131, G132 y R169 (compartida con los dos grupos fosfato). En la estructura con GTP la ribosa comparte interacciones hidrofóbicas con A48 y

electrostáticas con F208, compartida con el anillo de guanina. Además tiene interacciones hidrofóbicas estables con G130, L131, G132 y F162. Por otro lado, se forma un puente de hidrógeno entre E165 (porcentaje de retención 68%) y el grupo hidroxilo en posición 2' en el nucleótido, y una interacción electrostática con R169. Aunque generalmente similares, las interacciones son más cercanas en GTP-cadena B que el GTP unido a la cadena A.

El fosfato- α de la estructura con GDP forma inicialmente un puente de hidrógeno con A48, pero éste se pierde al final de la dinámica molecular y la interacción se convierte en hidrofóbica. Se forman dos puentes de hidrógeno estables entre R169 y el átomo de oxígeno O2 del GDP (porcentaje de retención 48.58%). Además, hay interacciones electrostáticas entre el GDP y G133, compartidas con el fosfato- β (ver más abajo). La interacción del fosfato- α con GTP se produce a través de interacciones hidrofóbicas con G47 e interacciones electrostáticas con A48 y G133, siendo éstas compartidas con los fosfatos β y γ .

El fosfato- β establece interacciones similares en las estructuras con GTP y GDP. Las interacciones dominantes son por puente de hidrógeno, que en la estructura con GDP son con G134 (porcentaje de retención 27%), T135 (cadena principal y lateral, porcentaje de retención 21 y 67% respectivamente), G136 (porcentaje de retención 33%) y G47 (porcentaje de retención de solo 2%, con interacciones van der Waals compartidas con el fosfato- α). Se establecen también interacciones menores con G46 (electrostáticas) y G90 (hidrofóbicas débiles). En la estructura con GTP se establecen puentes de hidrógeno con G134 (porcentaje de retención 21%) y G136 (porcentaje de retención 29%), interacciones electrostáticas con G46 y G47, interacciones hidrofóbicas con T135 y la interacción con G133 que comparten los tres grupos fosfato. Además se establecen interacciones menos importantes con los residuos C45 y N70.

El fosfato- γ en la estructura GTP interacciona con FtsZ a través de dos puentes de hidrógeno con la cadena principal (porcentaje de retención 29%) y lateral (porcentaje de retención 84%) de T135, además de la interacción compartida con G133. La estructura de rayos X predice un número mucho mayor de puentes de hidrógeno con residuos del bucle T3 (G96, A97, G98 y G99) pero éstos se pierden (GTP-cadena A) o se reducen significativamente (GTP-cadena B) a lo largo de la dinámica molecular.

➤ *Energías libres de unión de GDP y GTP a FtsZ*

Las energías libres de unión de GDP y GTP se calcularon empleando el método MM-GBSA (para la parte entálpica) y análisis cuasiharmónico (para la parte entrópica). Se puede observar como las energías MM-GBSA se estabilizaron poco a poco sin mostrar fluctuaciones importantes al final de las trayectorias de dinámica molecular (Apéndice, Figura A1).

Se calcularon los valores promedio (y sus respectivas desviaciones estándar) para los últimos 500 ps de cada periodo de 10 ns para GDP (Apéndice, Tabla A1) y GTP (Apéndice, Tabla A2). Estas energías se desglosaron en interacciones por residuo de la proteína a lo largo de la dinámica molecular (Apéndice, GDP-Tabla A3, GTP-Tabla A4). Aunque se esté hablando en términos de “energía libre”, se debe tener en cuenta que las energías MM-GBSA de cada residuo que se calculan siguiendo el método implementado en AMBER 10 no son verdaderas energías libres de unión en el caso de la descomposición por residuo. Para esto sería necesario restar las energías individuales del nucleótido y la proteína de la energía total del complejo nucleótido-FtsZ. El programa AMBER sólo calcula la energía en el complejo, sin tener en cuenta el ligando o proteína libres. Esto hace que las energías obtenidas sean, en términos numéricos, poco útiles. Sin embargo este tipo de cálculos sí puede aportar información acerca de la importancia relativa de las diferentes partes del ligando para la interacción con la proteína. Estas contribuciones relativas de las diferentes partes del GDP y GTP se estimaron tras una inspección visual de los resultados de las dinámicas moleculares (Apéndice GDP-Tabla A5, GTP-Tabla A6, con ecuaciones explicativas de la división de contribuciones).

El análisis de la unión del GDP a FtsZ indicó que las interacciones de los fosfatos α y β con la proteína (residuos G132, G133, G134 en el bucle T4 y R169 en el bucle T5) constituyen por sí solos más de la mitad de la energía libre de unión del ligando. El anillo de guanina contribuye un 15% de la energía total en GDP y un 12-21% en GTP (según se mire la cadena A o cadena B). El anillo de ribosa contribuye un 18% para GDP y un 15-35% para GTP. El fosfato- α contribuye un 20% con GDP pero sólo un 4-9% con GTP. En ambos casos la interacción del fosfato- β es dominante, con una contribución del 48% con GDP y una de 26-34% con GTP (o del 34-44% en la

estructura con GTP sin el fosfato- γ). En general, se observa una correlación entre las contribuciones calculadas por dinámica molecular y las contribuciones en $\Delta\Delta G$ calculadas a partir de los datos experimentales (Tabla 6). La excepción está en el caso del fosfato- γ , que contribuye con un 21-23% de la energía total de acuerdo con el cálculo MM-GBSA, pero sólo un 6% del $\Delta\Delta G$ experimental. Los resultados de dinámica molecular indican que la explicación a esta contradicción puede estar en las diferentes interacciones que se establecen con la proteína debido a la presencia del fosfato- γ que en este caso invalidan $\Delta\Delta G$ como aproximación de la contribución de energía libre intrínseca del grupo fosfato (ver Discusión).

3. INTERACCIÓN DE FTSZ CON INHIBIDORES POTENCIALES DE SU FUNCIÓN

3.1 Interacción de FtsZ con derivados del GTP sustituidos en C8

Se empleó el método de competición con *mant*-GTP para medir la unión de una serie de derivados del GTP sustituidos en C8 a apoFtsZ (Figura 22A). Un estudio previo encontró que uno de estos derivados, el 8-bromoGTP (BrGTP), inhibía la polimerización de FtsZ (Lappchen *et al.*, 2005). Se estudiaron 7 derivados del GTP con sustituyentes en el carbono C8 y la 8-bromo-guanina (BrGuanina). Todos los derivados del GTP compitieron con *mant*-GTP por el sitio de unión a nucleótido de apoFtsZ (Tabla 8, Figura 22B). Uno de los compuestos, el 8-metoxi-GTP (MeOGTP), tiene una afinidad cercana a la del GTP, por lo que no se pudo obtener una medida precisa de la afinidad de este compuesto, aproximándose la K_b a $1.61 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$. El 8-pirrolidil-GTP (PyrrGTP) tuvo la segunda mejor afinidad, con una K_b de $(5.24 \pm 1.4) \cdot 10^7$. Cuatro compuestos, 8-cloro-GTP (ClGTP), BrGTP, 8-iodo-GTP (IGTP) y 8-tertbutil-GTP (tBuGTP) presentaron K_b s intermedias, comprendidas entre 1 y $1.8 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$, aproximadamente. En este grupo se encuentra la mayoría de los compuestos con sustituyentes pequeños. El 8-morfolino-GTP (MorphGTP) tuvo la afinidad de unión menor de todos los compuestos medidos, con una K_b de $(2.31 \pm 0.04) \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$. Parece que, en general, la existencia de sustituyentes de mayor tamaño influye negativamente en la afinidad por el sitio de nucleótido, con la excepción del pyrrGTP. Se observó un

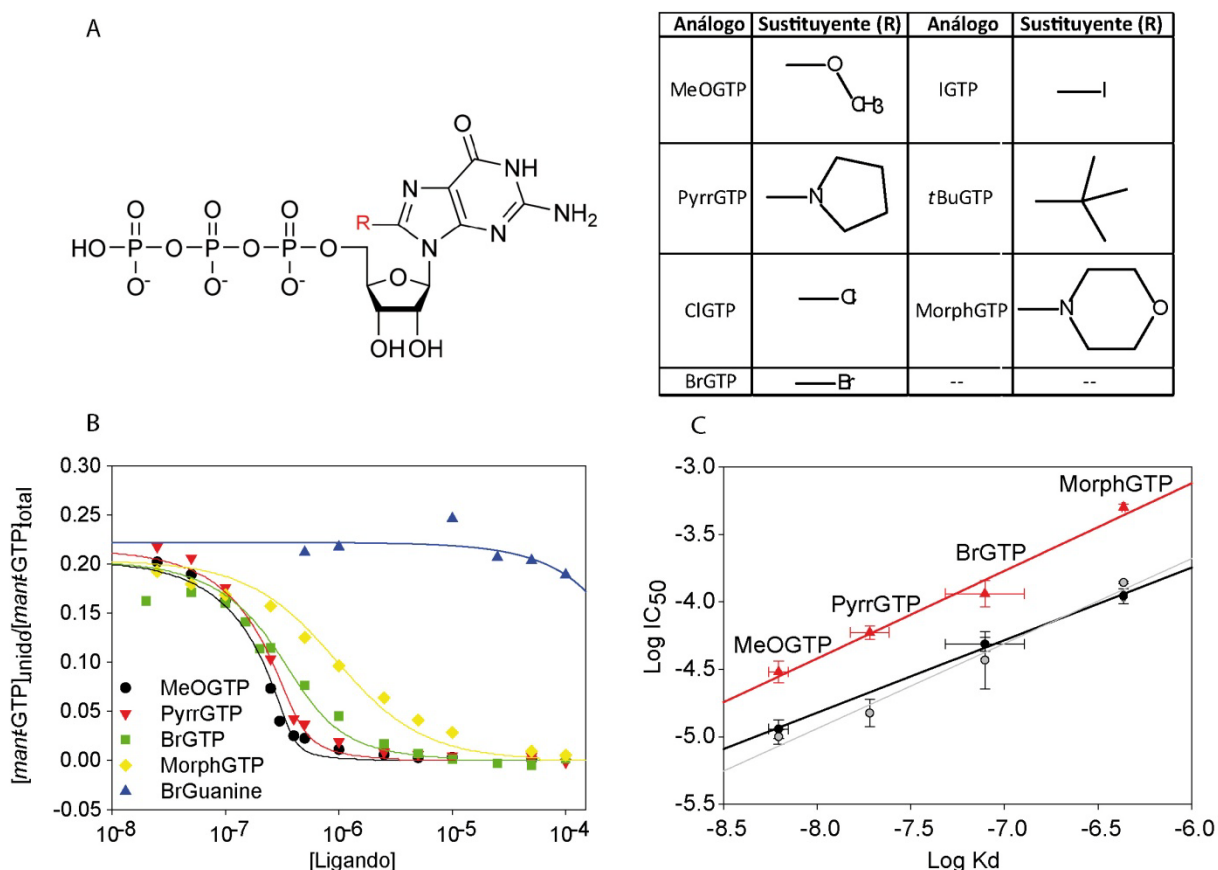


Figura 22: Interacciones de C8-derivados del GTP con FtsZ. A – Estructura química de los compuestos ensayados, con los sustituyentes (R) localizados en posición C8 sobre la molécula del GTP (izquierda). B – Curvas de desplazamiento de *mant*-GTP (500 nM) de apoFtsZ (375 nM) empleando análogos del GTP y BrGuanina. Las líneas corresponden al mejor ajuste a la curva de desplazamiento en cada caso. C – Correlación del Log K_d de los análogos del GTP ($K_d = K_b^{-1}$) con el Log IC_{50} de polimerización de EcFtsZ medido por sedimentación (negro) o dispersión de luz a 90° (símbolos vacíos) y con Log IC_{50} de polimerización de BsFtsZ medido por sedimentación (rojo). Las líneas corresponden a la regresión lineal en cada caso.

Tabla 8: Afinidades de unión a FtsZ de análogos de GTP sustituidos en C8

Ligando	K_b (M^{-1})	ΔG^0 kcal·mol $^{-1}$
MeOGTP	$\sim 1.61 \cdot 10^8$	~ -11.18
PyrrGTP	$(5.24 \pm 1.4) \cdot 10^7$	-10.52 ± 0.19
CIGTP	$(1.01 \pm 0.05) \cdot 10^7$	-9.55 ± 0.03
BrGTP	$(1.27 \pm 0.80) \cdot 10^7$	-9.68 ± 0.58
IGTP	$(1.81 \pm 0.48) \cdot 10^7$	-9.89 ± 0.18
tBuGTP	$(1.01 \pm 0.08) \cdot 10^7$	-9.54 ± 0.05
MorphGTP	$(2.31 \pm 0.04) \cdot 10^6$	-8.67 ± 0.01
BrGuanina	$< 1 \cdot 10^4$	> -5.45

ligero desplazamiento de *mant*-GTP a concentraciones elevadas de BrGuanina, pero no se pudieron ensayar muestras a concentraciones más altas por problemas de solubilidad.

Ensayos hechos por el laboratorio de Tanneke den Blaauwen mostraron correlación entre la afinidad del compuesto por el sitio de unión a nucleótido y la IC₅₀ de polimerización de EcFtsZ medida por dispersión de luz a 90° (Lappchen *et al.*, 2008), siendo IC₅₀ la concentración a la que un 50% de la polimerización de FtsZ se inhibe. Esta correlación se confirmó en nuestro laboratorio por Laura Ruiz empleando la técnica de sedimentación por ultracentrifugación, que da medidas más cuantitativas del grado de polimerización de FtsZ. Se midieron las IC₅₀ de polimerización con un compuesto de cada grupo de afinidad (MeOGTP, PyrrGTP, BrGTP y MorphGTP) empleando EcFtsZ y también BsFtsZ. Estos ensayos confirmaron que Log IC₅₀ tiene una correlación lineal con Log K_d de los compuestos (Figura 22C) en FtsZ de las dos especies bacterianas ensayadas.

3.2 Cribado virtual y experimental de ligandos del sitio de unión a nucleótido de FtsZ

Con el fin de obtener compuestos de composición química novedosa que pudieran unirse de manera específica al sitio de nucleótido de FtsZ, se llevó a cabo un estudio de cribado virtual seguido de comprobación experimental.

➤ Cribado Virtual

El cribado virtual fue llevado a cabo por los Dres. A. Morreale, R. Gil-Redondo y A.R. Ortiz († 5-5-2008) (Unidad de Bioinformática del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, U.A.M.-C.S.I.C., Madrid). Partiendo de grandes quimiotecas virtuales se fueron cribando compuestos para acabar con un número limitado de ligandos potenciales para caracterización experimental. El proceso general consiste en la interacción virtual proteína-ligando (conocida como “docking”) seguido de dinámica molecular y cálculo de energías de unión MM-GBSA (Gil-Redondo *et al.*, 2009, Materiales y Métodos). Esto resulta en la obtención de una lista de alrededor de 100 compuestos. De los 100 compuestos con mejor afinidad virtual se seleccionan un pequeño número (unos 20) para ensayos experimentales tras inspección visual.

La primera ronda de cribado virtual se realizó empleando la quimioteca virtual Chembridge, de 454886 compuestos, de los que fueron finalmente seleccionados 17 para ensayo en el laboratorio (Tabla 9). La segunda ronda se realizó empleando la quimioteca de compuestos sintéticos de InterBioScreen, de 355138 compuestos, de los que fueron seleccionados 19 para ensayo en el laboratorio (Tabla 10, ejemplo en figura 23A).

➤ *Resultados experimentales*

Primera ronda

Se ensayaron 17 compuestos por competición con *mant*-GTP. De estos, quince no mostraron efecto competitivo con *mant*-GTP y dos, D2 y D5, tuvieron una emisión de fluorescencia propia demasiado alta para su ensayo por competición fluorescente. Estos dos compuestos fueron empleados en un ensayo de competición con ^3H -GTP sin que se observara competición. En todos los ensayos de competición las concentraciones empleadas fueron las máximas admitidas por la solubilidad del compuesto y que no supusieran una concentración de DMSO en la mezcla final de mayor del 2%.

También se ensayaron los compuestos en ensayos de sedimentación por ultracentrifugación con 6.25 μM EcFtsZ y 2 mM GTP. Ningún compuesto tuvo efectos inhibidores evidentes a su límite de solubilidad en la polimerización de EcFtsZ. Por otra parte se realizaron ensayos de concentración mínima inhibitoria (MIC) sobre cultivos de *S. pneumoniae* por el Dr. Martín-Galiano en nuestro laboratorio, siguiendo condiciones estándar del “Clinical and Laboratory Standards Institute” (www.clsi.org). Estos ensayos mostraron que D8 inhibía el crecimiento de las bacterias a bajas concentraciones (3.8 μM) sin que ninguno de los otros compuestos tuviera efecto aparente sobre crecimiento bacteriano. Por otra parte D5, aunque no inhibió el crecimiento bacteriano, había dado resultados de baja reproducibilidad en los ensayos FtsZ de *E. coli*. En consecuencia se sometieron D5 y D8 a ensayos de sedimentación por ultracentrifugación con apoFtsZ y strep-SpFtsZ, sin que finalmente se pudiera confirmar efecto alguno sobre la polimerización.

Segunda Ronda

Se ensayaron 19 compuestos, dos de los cuales (D2-8 y D2-5) están en una mezcla racémica de los enantiómeros. Al igual que en la primera ronda, ningún compuesto compitió con *mant*-GTP por el sitio de unión a nucleótido de apoFtsZ (ejemplo en Figura 23B), aunque un compuesto, D2-17, tuvo emisión de fluorescencia propia excesiva para su ensayo por competición con *mant*-GTP. A diferencia de la primera ronda de compuestos procedentes de cribado virtual, en este caso se sometieron todos los compuestos a competición con ^3H -GTP. Dos compuestos, D2-2 y D2-17, parecían tener un posible efecto sobre la unión de ^3H -GTP a apoFtsZ. D2-2 parecía tener un efecto positivo sobre la unión de ^3H -GTP, y D2-17 un efecto competidor. Cabe destacar que estos efectos son reproducibles pero limitados y dentro del error de la medida.

Todos los compuestos se probaron para su posible efecto en la sedimentación de EcFtsZ en condiciones de polimerización, sin que se pudiera observar efecto inhibitor en ningún caso. D2-2 y D2-17, además, fueron probados en ensayos de sedimentación empleando apoFtsZ debido a los resultados en las competiciones con ^3H -GTP, sin que ninguno de los dos mostrara efecto inhibitor aparente.

Además, se realizaron ensayos de microscopía electrónica para comprobar el posible efecto de D2-2 o D2-17 sobre la morfología de los polímeros de apoFtsZ, sin que se apreciara variación en ninguno de los dos casos (ejemplo en Figura 23C).

Uno de los elementos más limitadores de los ensayos con los compuestos elegidos por cribado virtual fue su solubilidad, que no se ajustó en la mayoría de los casos a la solubilidad predicha (Figura 23D).

Tabla 9: Compuestos de la primera ronda de cribado virtual y experimental

ID	PM (g/mol)	ΔG	$\text{LogS}_{\text{teor}}$	LogS_{obs}	código ZINC	código SMILES
D1	521,952	-41,137	-7,02	-5,81	ZINC01013671	<chem>COc1cccc1N2CCN(CC2)C(=O)c3c(c4nc(cc(n4n3)C(F)F)c5cccc5)Cl</chem>
D2	474,463	-39,867	-7,02	<-7	ZINC02835510	<chem>c1ccc(c(c1)C(=O)Nc2ccc(cc2O)C)c3ccc(c(c3)NC(=O)c4cccc4F)O)F</chem>
D3	369,381	-37,793	-4,46	-5,62	ZINC04754551	<chem>Cc1ccc(c(c1)C)Nc2cc(c3c(c2[N+](=O)[O-])non3)N4CCOCC4</chem>
D4	402,45	-37,366	-2,78	-4,21	ZINC01123094	<chem>c1ccc2c(c1)C3c4cccc4C2[C@H]5[C@H]3C(=O)N(C5=O)CC(=O)N6CCOCC6</chem>
D5	469,541	-36,728	-8,06	-6,2	ZINC02877880	<chem>CCc1c2c3cc(c(cc3c(nc2n(n1)c4cccc4)c5cc(ccc5OC)OC)OC)OC</chem>
D6	516,6	-36,259	-9,04	-6,03	ZINC02896368	<chem>c1ccc(cc1)C2=C(c3cccc3C2=O)Nc4ccc(cc4)NC5=C(C(=O)c6c5cccc6)c7cccc7</chem>
D7	376,462	-34,287	-5,21	-5,9	ZINC01210791	<chem>c1ccc(cc1)Sc2ccc(o2)C=c\3\c(=O)n4c5cccc5nc4s3</chem>
D8	456,479	-32,393	-4,33	-5,53	ZINC02905790	<chem>c1cc2ccnc2c(c1)OC(=O)c3cccc(c3)S(=O)(=O)Oc4cccc5c4ncccc5</chem>
D9	410,882	-32,325	-6,1	-5,57	ZINC04361168	<chem>c1ccc2c(c1)[C@@H]3CC(=NN3[C@@H](O2)c4cc5c(cc4Cl)OCO5)c6cccc6</chem>
D10	366,49	-31,582	-6,22	-5,9	ZINC02325357	<chem>CC(C)C)c1ccc(cc1)c2nnc(n2)N=C/c3cccc(c3)OC)S</chem>
D11	394,431	-30,387	-5,32	-5,18	ZINC04498679	<chem>COc1cccc1N2CC[NH+](CC2)C3cc(c(c4c3cccn4)[O-])[N+](=O)[O-]</chem>
D12	450,232	-29,963	-6,07	>-5	ZINC01202593	<chem>CC(C)c1ccc(cc1)N2C(=O)C(=Cc3ccc(o3)I)C(=O)NC2=O</chem>
D13	500,62	-28,439	-5,34	-5,97	ZINC01206280	<chem>CCc1cccc1NC(=O)c2cccc2N(Cc3cccc3)S(=O)(=O)c4ccc(cc4)OC</chem>
D14	383,408	-27,991	-5,27	-5,99	ZINC04622072	<chem>COc1cccc1Nc2cc(c3c(c2[N+](=O)[O-])non3)N4CCCCC4</chem>
D15	369,381	-23,510	-4,73	-5,18	ZINC04707049	<chem>Cc1ccc(c(c1)Nc2cc(c3c(c2[N+](=O)[O-])non3)N4CCOCC4)C</chem>
D16	412,379	-21,637	-3	-5,32	ZINC02952617	<chem>c1cc(cc(c1)[N+](=O)[O-])C(=O)c2cccc(c2)S(=O)(=O)c3cccc(c3)[N+](=O)[O-]</chem>
D17	516,619	-19,860	-6,76	<-6,7	ZINC01187206	<chem>CCOc1cccc1NC(=O)c2cccc2N(Cc3cccc3)S(=O)(=O)c4ccc(cc4)OC</chem>

Compuestos elegidos a partir de cribado virtual (ronda 1) para ensayo experimental. ID: identificador numérico del compuesto. PM: peso molecular, energía libre de unión en MM-GBSA, $\text{LogS}_{\text{teor}}$: solubilidad predicha computacionalmente, LogS_{obs} : solubilidad medida experimentalmente. Código ZINC: identificador del compuesto de la base de datos ZINC (<http://zinc.docking.org/>), código SMILES; compuestos descritos en código SMILES (Simplified Molecular Input Line Entry Specification), que son transformables a estructuras químicas (<http://cactus.nci.nih.gov/translate/>).

Tabla 10: Compuestos de la segunda ronda de cribado virtual y experimental

ID	PM (g/mol)	ΔG	$\log S_{\text{teor}}$	$\log S_{\text{obs}}$	código ZINC	código SMILES
D2-1	453.532	-56.01	-5.33	-4,36	ZINC01862699	<chem>Cn1c2c(c(=O)[nH]c1=O)m(c(n2)N3CCCC3)CCCS4c4nmm4c5cccc5</chem>
D2-2	410.497	-51.17	--	-4,08	ZINC02222202	<chem>c1ccc(cc1)c2c[n+](c3n2CCC3)CC(=O)Nc4ccc(cc4)Oc5cccc5</chem>
D2-3	417.494	-48.41	-5.30	-6,41	ZINC02205956	<chem>C[C@@H](c1nc2c3c4c(sc3nc2n1)CCCC4)N5C(=O)c6cccc6C5=O</chem>
D2-4	355.354	-48.34	-5.05	-4,6	ZINC04135366	<chem>c1ccnc(c1)[C@@H]2CCCC2=NNc3ccc(cc3[N+](=O)[O-])[N+](=O)[O-]</chem>
D2-5	404.448	-47.61	-5.29	-4,36	ZINC02345916	<chem>CCOc1cc(cc(c1[O-])[N+](=O)[O-])[C@H]2Nc3c(c4c(s3)C[NH+](CC4)C(=O)N2</chem>
D2-6	338.387	-45.59	--	-4,31	ZINC02196523	<chem>COC(=O)c1ccc(cc1)OCCN2c3cccc3N4C2=[NH+]CC4</chem>
D2-7	403.467	-44.04	-4.76	-6,2	ZINC05350455	<chem>C[C@@H]1CCc2c(sc3c2c4nc(mn4cn3)CN5C(=O)c6cccc6C5=O)C1</chem>
D2-8	404.448	-43.82	-5.20	-4,36	ZINC02345919	<chem>CCOc1cc(cc(c1[O-])[N+](=O)[O-])[C@@H]2Nc3c(c4c(s3)C[NH+](CC4)C(=O)N2</chem>
D2-9	335.367	-43.24	-4.78	-4,35	ZINC04414377	<chem>Cn1c2ccc(cc2m(c1=O)C)NC(=O)Cn3cnc4c3cccc4</chem>
D2-10	351.366	-43.12	-2.83	-4,3	ZINC01117923	<chem>c1ccc(cc1)n2c(mn2)Oc3cccc3C(=O)N4CCOCC4</chem>
D2-11	387.533	-43.05	--	-4,33	ZINC02206216	<chem>CC[NH+](CC)CCCNC(=O)c1nc2c3c4c(sc3nc2n1)CCCC4</chem>
D2-12	368.422	-42.48	-4.43	-4,52	ZINC05461887	<chem>COc1cccc(c1c2nn3c(mnc3s2)c4c5c([nH]n4)CCC5)OC</chem>
D2-13	389.44	-42.37	-4.64	-6,03	ZINC02355147	<chem>c1ccc2c(c1)C(=O)N(C2=O)Cc3nc4c5c6c(sc5ncn4n3)CCCC6</chem>
D2-14	374.429	-40.34	-5.55	-6,04	ZINC01270429	<chem>COc1cccc(c1)c2nn3c(mnc3s2)c4cc([nH]n4)c5cccc5</chem>
D2-15	402.483	-40.10	-5.47	-5,47	ZINC04772681	<chem>c1ccc2c(c1)cnn(c2=O)Cc3nc4c5c6c(sc5ncn4n3)CCCC6</chem>
D2-16	418.541	-40.01	-4.40	-4,41	ZINC00856854	<chem>CC1(C[C@H](CCO1)n2c(=O)c3c(n4c2nnc4)-c5cccc5CC36CCCC6)C</chem>
D2-17	415.502	-39.87	--	-4,43	ZINC04844048	<chem>c1ccc(cc1)C[NH+]2CCc3c(sc4c3c(=O)m(c5n4mnn5)c6cccc6)C2</chem>
D2-18	357.157	-39.53	--	-4,35	ZINC04017739	<chem>CCCCO[P@](=O)(c1c(cc(c1[N+](=O)[O-])C(F)(F)[N+](=O)[O-])[O-]</chem>

Compuestos elegidos a partir de cribado virtual (ronda 2) para ensayo experimental. Términos idénticos a la Tabla 9

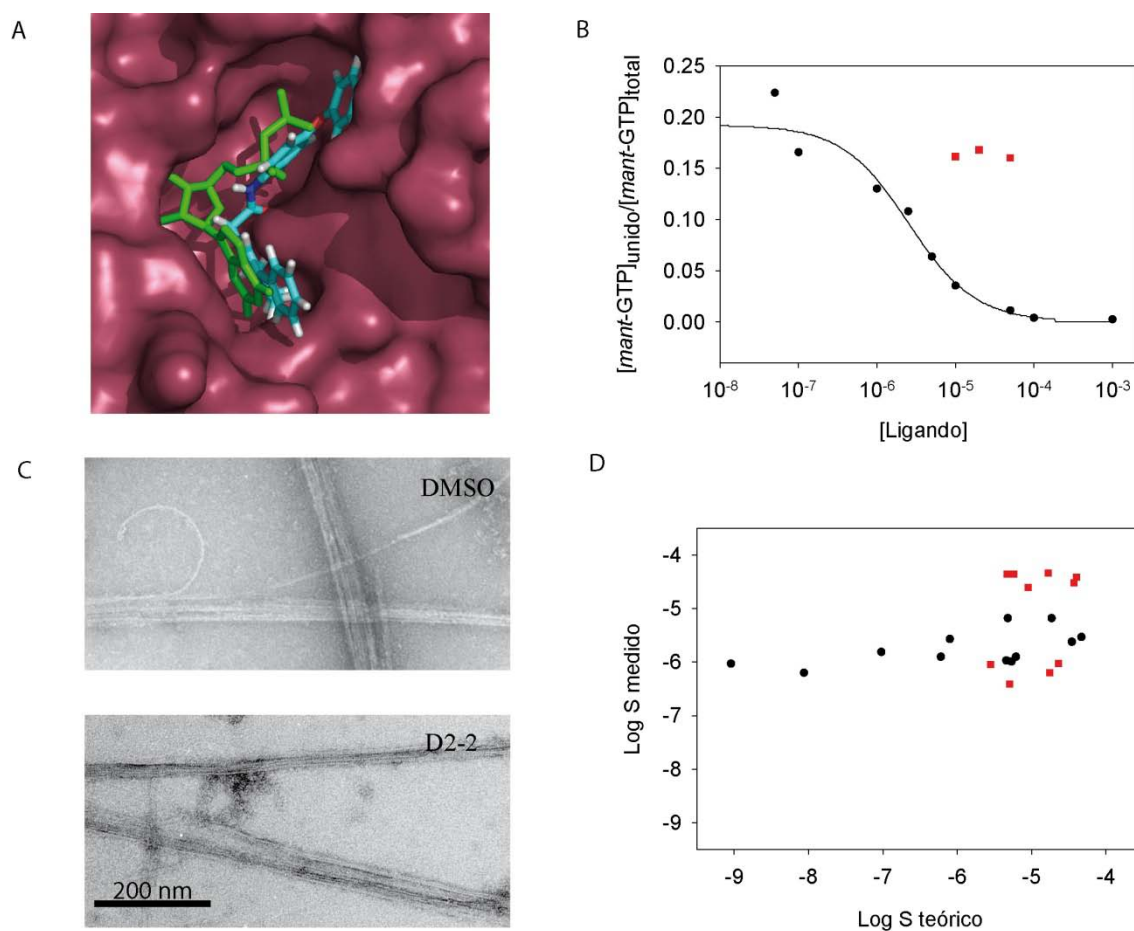


Figura 23: Resultados de ensayos de cribado virtual. A – Ejemplo de compuesto elegido para ensayo. En rojo la vista en superficie del sitio de unión a nucleótido de MjFtsZ (PDB: 2VAP), con GDP (verde) y D2-2. B – Curva de competición de UTP con *mant*-GTP (negro) comparado con ensayo de competición con D2-2 (rojo). La línea sólida es el mejor ajuste para la competición de UTP. C – Microfotografía de polímeros de apoFtsZ (12.5 μ M) en ausencia (arriba) o presencia (abajo) de D2-2 (100 μ M). D – Comparación de solubilidad teórica (en abscisas) comparada con solubilidad medida experimentalmente (en ordenadas) expresado en Log S. Negro; compuestos de primera ronda. Rojo; compuestos de segunda ronda. No se representan compuestos para los que no existe solubilidad teórica.

3.3 MciZ: un inhibidor potencial de FtsZ

MciZ es un péptido de 40 aminoácidos (Figura 24) que fue caracterizado como un inhibidor de BsFtsZ en ensayos de doble híbrido orientados a encontrar proteínas que interaccionaran con FtsZ (Handler *et al.*, 2008, Introducción). Los autores encontraron que una cepa de *B. subtilis* resistente a MciZ presentaba la mutación R143K en su FtsZ. Dado que el residuo mutado se encuentra muy cercano al sitio de nucleótido, los autores sugirieron que éste podría ser el sitio de unión de MciZ. Esta posibilidad fue ensayada empleando método de competición con *mant*-GTP y ^3H -GTP, y además se intentaron confirmar los efectos descritos en el trabajo publicado anteriormente.

Resultados

MciZ	H ₂ N- MKVHRMPKGVVLVVGKAWQIRAKLKQYGRTFQYVKDWISKP - COOH
CRAMP	H ₂ N- GLLRKGGEKIGEKLLKIGQKIKNFFQKLVQPQEQ - COOH
Melitina	H ₂ N- GIGAVLKVLTGTPALISWIKRKRQQ - COOH
CA(1-8)M(1-18)	H ₂ N- KWKLFKKIGIGAVLKVLTGTPALIS - COOH

Figura 24: Secuencia aminoacídica de péptidos empleados con BsFtsZ.

Los resultados iniciales por competición con *mant*-GTP mostraron que, sorprendentemente, en presencia de concentraciones crecientes de MciZ, la anisotropía de *mant*-GTP aumenta (Figura 25A). Controles hechos en ausencia de apoFtsZ muestran que MciZ por sí sola causa un aumento en la anisotropía aparente de *mant*-GTP. Además, se observó un aumento de la intensidad de fluorescencia emitida por *mant*-GTP en presencia de concentraciones crecientes de MciZ (datos no mostrados). Ambos hechos hacen pensar que MciZ puede estar interaccionando con *mant*-GTP, y por tanto no es posible el uso de este ligando para detectar la unión al sitio de nucleótido de FtsZ con el método de *mant*-GTP. Por otra parte, en el transcurso de los ensayos con MciZ se observó que la emisión fluorescente del péptido no aumenta de forma lineal con la concentración, como se esperaría, sino que, a mayores concentraciones de MciZ, el aumento de emisión de fluorescencia es progresivamente menor (Figura 26A). Además, se observa un desplazamiento a longitudes de onda más cortas en el máximo de emisión de MciZ a concentraciones mayores (Figura 26B). Estos dos cambios, que ocurren en ausencia de ningún otro ligando, hacen pensar que MciZ podría estar sufriendo procesos de autoasociación, pero también podría ser debido a efectos de filtro interno a altas concentraciones del péptido.

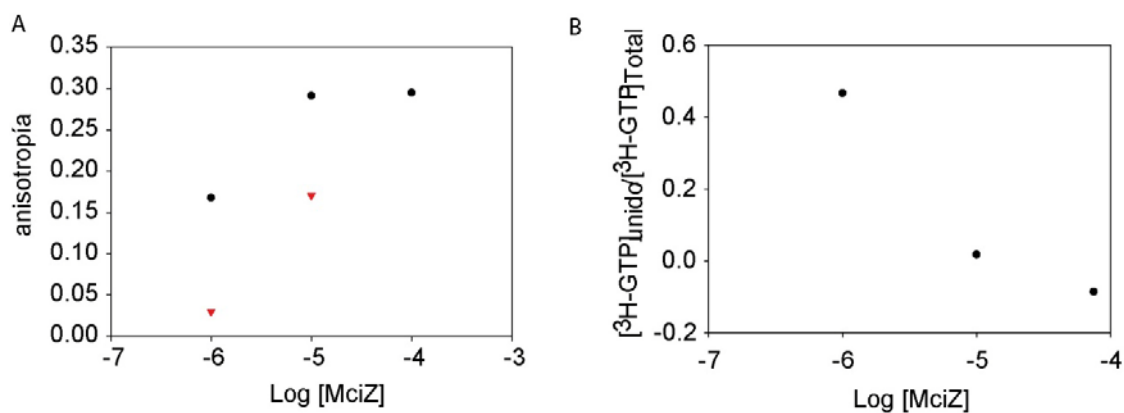


Figura 25: Ensayos de competición con MciZ. A- Competición de *mant*-GTP con concentraciones crecientes MciZ (negro) y controles hechos en ausencia de apoFtsZ (rojo). B- Competición de $^3\text{H-GTP}$ con concentraciones crecientes de MciZ empleando BsFtsZ.

Para descartar la posibilidad de efectos de filtro interno, se midió la absorción de MciZ a concentraciones crecientes (Figura 26A – rojo). Con un paso óptico de la cubeta de 1 cm la densidad óptica a la concentración máxima medida por emisión (5 μM) es 0.055. Cuando se mide emisión de fluorescencia, el paso óptico es de 2 mm, por lo que la D.O observada sería 5 veces menor, de 0.011. Esta D.O es lo suficientemente baja como para que se puedan descartar efectos de filtro interno. Además, los rangos de excitación y emisión de fluorescencia de MciZ son tales que no interferirán con la fluorescencia propia del *mant*-GTP, de manera que también se pueden descartar interferencias por fluorescencia inespecífica del ligando (Lakowicz, 1999).

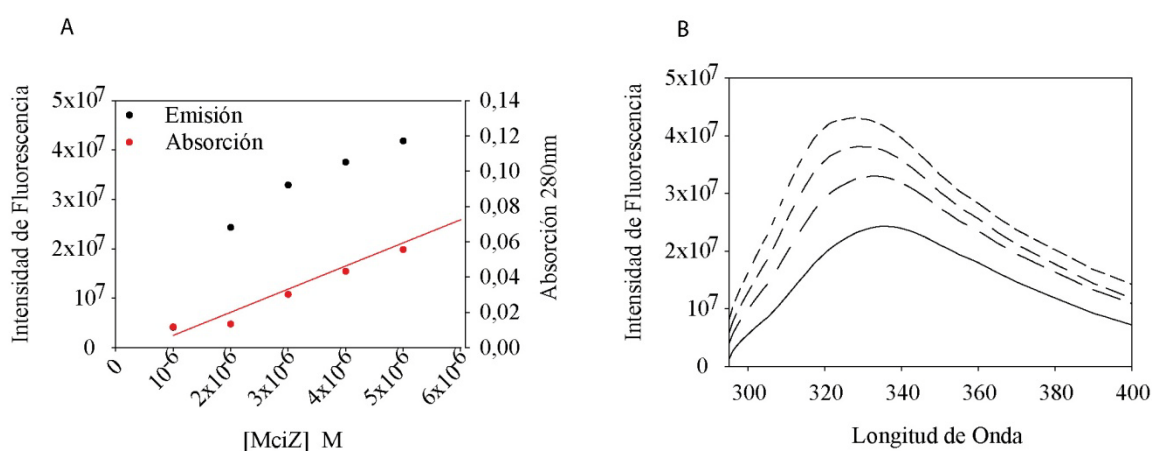


Figura 26: Propiedades fluorescentes de MciZ. A- Máximo de emisión de fluorescencia a concentraciones crecientes (2-5 μM , en negro) y la absorbancia a concentraciones crecientes (1-5 μM , en rojo) de MciZ. B- Espectros de emisión fluorescente de concentraciones crecientes (2-5 μM) de MciZ.

Se intentó detectar la unión de MciZ al sitio de nucleótido de BsFtsZ por competición con ³H-GTP. Para replicar en lo posible las condiciones del estudio anterior (Handler *et al.*, 2008), el ensayo se hizo con 100 nM de BsFtsZ con el mismo tampón y temperatura utilizados anteriormente (50 mM Pipes-KOH, 50 mM KCl, 1 mM EDTA, pH 6.5 a 30°C). El resultado de este ensayo fue inicialmente positivo, dado que se aprecia una disminución de la unión de ³H-GTP a medida que se aumenta la concentración de MciZ (Figura 25B).

También se intentó confirmar el efecto inhibitor de polimerización de BsFtsZ anteriormente publicado mediante dispersión de luz a 90°, lo que dio resultados aberrantes. La observación de la muestra tras la adición de 10 μM MciZ a 10 μM BsFtsZ en las mismas condiciones descritas arriba mostró una turbidez indicativa de una posible precipitación de proteína, lo que fue confirmado tras observar el precipitado en un gel SDS-PAGE.

La razón del efecto de precipitación de MciZ podría ser la presencia de carga positiva en el péptido. Se decidió comparar el efecto de MciZ frente a otros péptidos (Figura 24). Se empleó melitina, un péptido derivado del veneno de la abeja *Apis mellifera*, con conocidos efectos citolíticos. También se empleó CA(1-8)M(1-18)), un híbrido de los primeros 8 aminoácidos de cecropina A (un péptido bactericida) y los últimos 18 aminoácidos de la melitina, que también ha sido descrito como un péptido efectivo contra bacterias (Andreu *et al.*, 1992). Se empleó además CRAMP, que es un péptido antibacteriano caracterizado en un modelo murino (Rosenberger *et al.*, 2004), por ser el único péptido anteriormente conocido con una similitud significativa con MciZ (Handler *et al.*, 2008). Además, se empleó poli-lisina (PolyLys) de 27 a 103 aminoácidos para estudiar la posibilidad de que un péptido con carga positiva pudiera provocar la precipitación de FtsZ, de carga más negativa. El control negativo en todos los ensayos en los que se emplearon péptidos fue la Ovoalbúmina (OAA). Se ensayó la posible precipitación de BsFtsZ con los diferentes péptidos. En todos los casos se incubaron 10 μM BsFtsZ en ausencia o presencia de 10 μM de péptido y se separaron por ultracentrifugación la fracción superior, inferior y sedimento, cargándose muestras de cada fracción en un gel SDS-PAGE. Bajo estas condiciones no se observó precipitación de BsFtsZ en presencia de PolyLys, ni siquiera cuando se subió la concentración hasta 200 μM , por lo que aparentemente la capacidad de precipitación de BsFtsZ que tiene MciZ no se debe sólo a su carga positiva. CA(1-8)M(1-18) provocó una precipitación de BsFtsZ incluso mayor que la propia MciZ (Figura 27). La melitina también provocó precipitación de BsFtsZ, mientras que CRAMP no provocó precipitación visible (datos no mostrados).

Se ensayó la posible competición de los péptidos con ^3H -GTP por unión a BsFtsZ (Figura 28). Se observó una disminución considerable de la ^3H -GTP unida a BsFtsZ en presencia de 10 μM de MciZ y una bajada menor, pero significativa, en presencia de 10 μM de melitina. Curiosamente, CA(1-8)M(1-18), a pesar de provocar la precipitación de MciZ, no provoca una disminución de la unión de ^3H -GTP a BsFtsZ. Esto podría ser debido a un efecto específico de competición por parte de MciZ y melitina. Por otra parte, es posible que la precipitación de BsFtsZ por parte de MciZ y melitina provoque la desnaturalización del sitio de unión a nucleótido de la proteína, lo que causaría la liberación de ^3H -GTP, mientras que CA(1-8)M(1-18) podría provocar la precipitación sin dañar el sitio de unión a nucleótido.

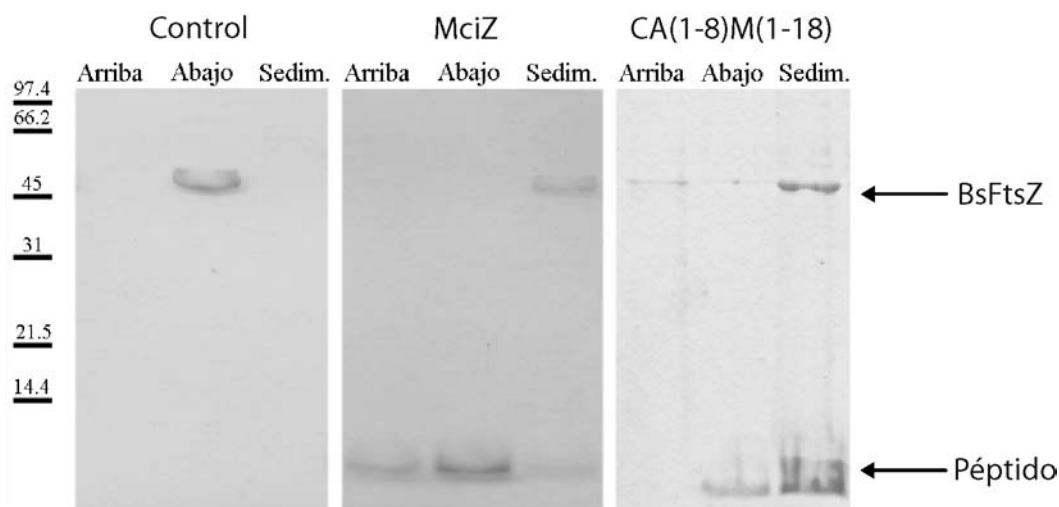


Figura 27: Precipitación de BsFtsZ en presencia de péptidos. Las líneas de la izquierda representan el patrón de peso molecular con el peso en kilodaltons. Arriba – fracción superior de la muestra tras la ultracentrifugación. Abajo – fracción inferior de la muestra tras la ultracentrifugación. Sedim – sedimento encontrado en la muestra tras la ultracentrifugación. Control – sin péptido añadido. MciZ – con 10 μ M MciZ añadido. CA(1-8)M(1-18) – con 10 μ M CA(1-8)M(1-18) añadido.

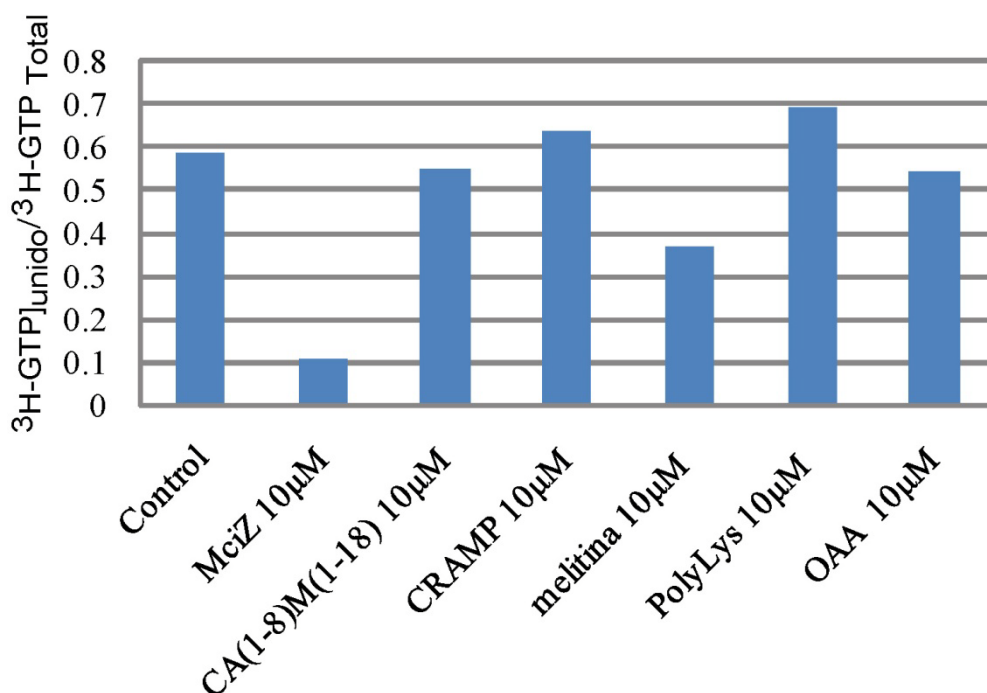


Figura 28: Competición de péptidos con $^3\text{H-GTP}$ por BsFtsZ. BsFtsZ (100 nM) con $^3\text{H-GTP}$ (100 nM) en la ausencia o presencia de 10 μ M de diferentes péptidos. OAA – Ovoalbúmina, control negativo de competición. $^3\text{H-GTP}$ incubado en presencia de MciZ (10 μ M) no muestra un desplazamiento diferente a $^3\text{H-GTP}$ sólo (no mostrado).

3.4 PC190723 es un estabilizador de polímeros de FtsZ

Durante la elaboración de esta Tesis, apareció un trabajo donde se describió PC190723 (Figura 29), un derivado de la 3-metoxibenzamida, con un efecto inhibitor sobre FtsZ *in vivo* (Haydon *et al.*, 2008 , Introducción). Con el fin de obtener información acerca del mecanismo de acción de PC, se probaron sus efectos con diversas técnicas *in vitro* empleando FtsZ de varias especies. Además, se ensayó el efecto de la difluorometoxibenzamida (DFMBA), que constituye un fragmento de la molécula de PC. Se utilizaron concentraciones de PC (20 μM) y DFMBA (4 mM) cercanos a sus respectivos límites de solubilidad medidos en tampón con 2% de DMSO, con la excepción de las pruebas de sedimentación, donde se empleó un rango de concentraciones.

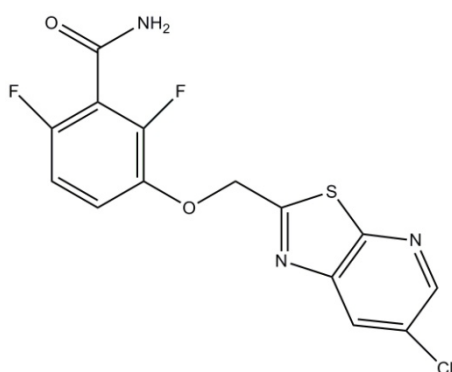


Figura 29: Estructura química de PC190723

➤ *Dispersión de luz a 90°*

Una primera aproximación de los efectos de compuestos con posibles efectos sobre la polimerización de FtsZ es la observación de cambios en la dispersión de luz a 90°, dependiente de la polimerización de FtsZ. Se ensayaron los efectos de PC (20 μM) con FtsZ de *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, *S. pneumoniae* y *M. jannaschii*. Posteriormente, se continuaron los ensayos con pruebas en que se empleó DFMBA usando FtsZ de *B. subtilis*, *S. aureus*, y *E. coli*.

En BsFtsZ, PC provocó un aumento notable (de aproximadamente cuatro veces) en la dispersión de luz observada (Fig 30A). DFMBA 4 mM también provocó un aumento en la dispersión de luz (Fig 31A), aunque fue menor (de aproximadamente dos veces).

También se ensayó PC y DFMBA utilizando SaFtsZ (Figuras 30B y 31B). No se observó dispersión de luz en presencia de 2 mM de GTP. La presencia de PC provocó una

dispersión de luz patente aproximadamente cuatro minutos después de la adición de 2 mM de GTP. Se repitió el ensayo sustituyendo GTP por el análogo lentamente hidrolizable GMPcPP, pero no se observó una diferencia apreciable de dispersión de luz en ausencia de PC. La pre-incubación con PC y el comienzo de la polimerización con 100 μ M de GMPcPP causaron un gran aumento en la dispersión de luz, observándose dispersión inmediatamente después de la adición del nucleótido. El aumento de dispersión en este caso fue aproximadamente diez veces mayor que el observado con SaFtsZ en presencia de GTP y PC. Cuando se empleó DFMBA sólo se observó un leve aumento de dispersión de luz (de aproximadamente el doble) en respuesta a la adición de 10 mM $MgCl_2$, sin que se observara un cambio de dispersión por la adición de GTP. De nuevo los cambios fueron mucho más patentes cuando se empleó GMPcPP, observándose un aumento de dispersión de seis veces, aproximadamente. El aumento de dispersión no es inmediato, sino que comienza unos catorce minutos tras la adición del GMPcPP. Al igual que ocurre con BsFtsZ, se ve que el DFMBA provoca un efecto similar a PC, pero lo hace en menor medida incluso a una concentración mucho mayor.

Resultados preliminares de strep-SpFtsZ incubada con PC mostraron un aumento en la dispersión a 90° de aproximadamente 1.8 veces (Figura 30C). Además se eliminó el retraso en el inicio de la polimerización, de aproximadamente veinticinco minutos en ausencia de PC.

Cuando se empleó EcFtsZ se observó que, sorprendentemente, dado que *E. coli* se había clasificado como no sensible (Haydon *et al.*, 2008), la presencia de PC provocó una disminución de la dispersión de luz de aproximadamente el 25%, y acortó el tiempo de despolimerización (30A). Para estudiar si esta diferencia de dispersión se debía a un efecto inhibitorio de polimerización o a un efecto sobre el consumo de GTP, se repitió el ensayo en presencia de un sistema regenerador de GTP. Aquí el aparente efecto de PC queda eliminado, lo que apunta a la posibilidad de que PC actúe sobre EcFtsZ modulando su actividad GTPasa. Ensayos realizados por el Dr. Martín-Galiano mostraron que PC provoca un aumento de la actividad GTPasa de EcFtsZ de aproximadamente dos veces (Andreu *et al.*, 2010). Cuando se ensayó EcFtsZ con DFMBA no se observó el mismo comportamiento que con PC (Figura 31C y D). Aunque se apreció un mínimo aumento de dispersión en la muestra pre-incubada con DFMBA, este aumento estaba presente desde el inicio del ensayo, antes incluso de la adición de magnesio, por lo que se tomó como

inespecífico. En presencia un de sistema de regeneración de GTP no se observó ninguna variación en las muestras con y sin DFMBA.

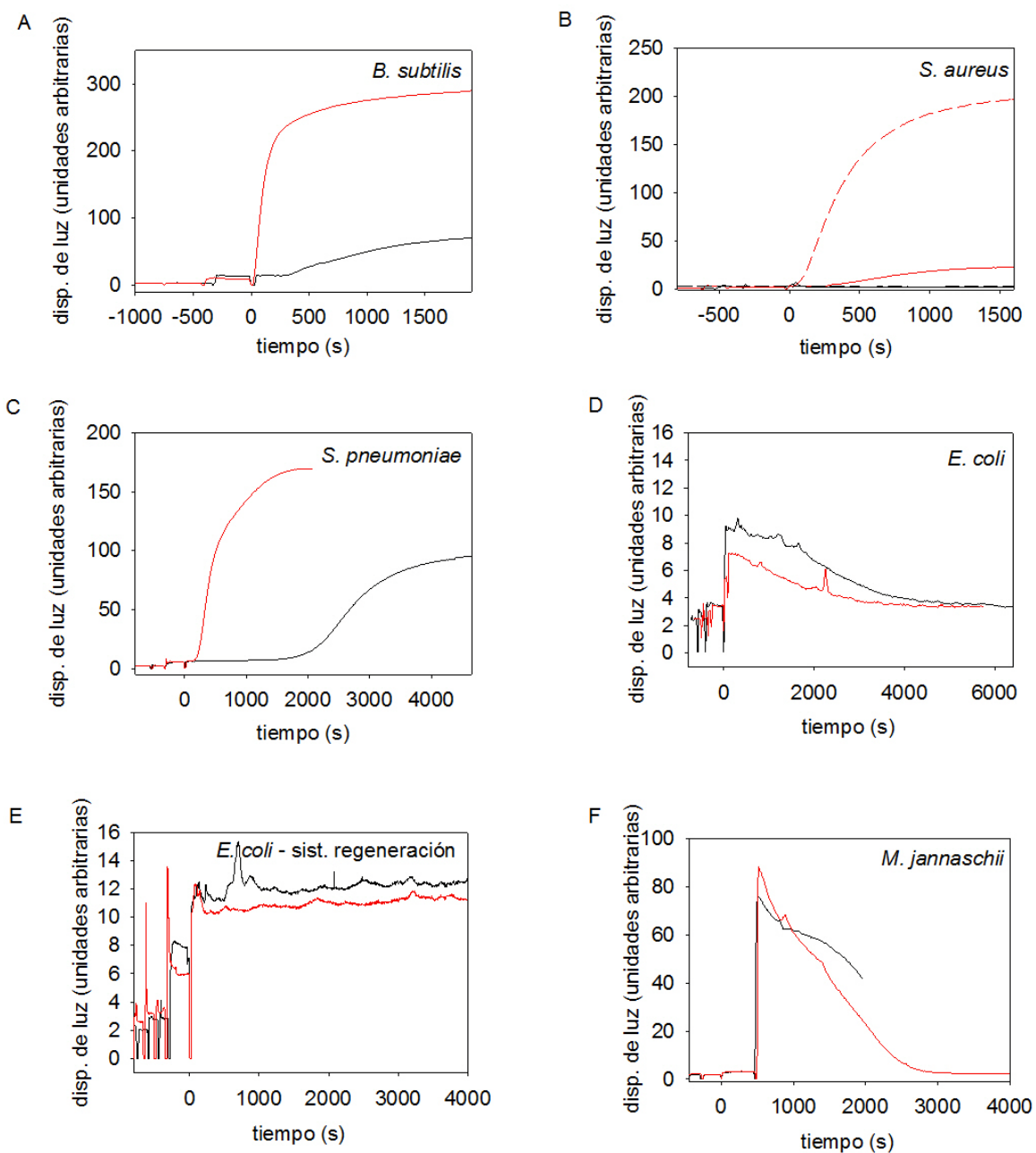


Figura 30: Efecto de PC (20 μM) sobre la polimerización FtsZ (10 μM) de *B. subtilis* (A) *S. aureus* (B), *S. pneumoniae* (C), *E. coli* (D), *E. coli* con sistema de regeneración de GTP (E) y *M. jannaschii* (F). Las reacciones de iniciaron por adición de 2 mM de GTP (líneas continuas) o 100 μM de GMPCPP (líneas discontinuas). Se representan en rojo las muestras ensayadas en presencia de 20 μM de PC, y en negro las muestras ensayadas con un volumen equivalente de DMSO.

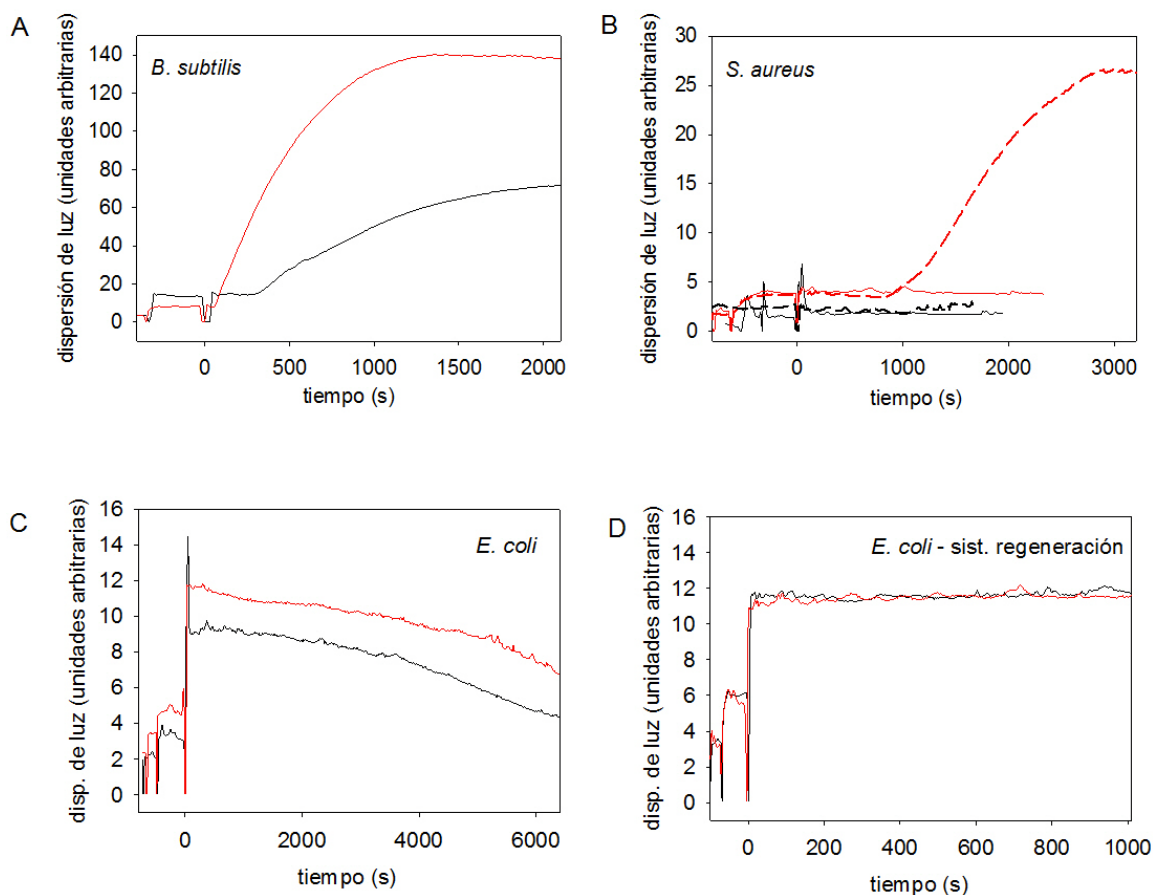


Figura 31: Efecto de DFMBBA (4 mM) sobre la polimerización de FtsZ. A – BsFtsZ (10 μM) ensayado sin y con DFMBBA, en presencia de 2 mM GTP. B - SaFtsZ (10 μM) ensayado sin y con DFMBBA, en presencia de 2 mM GTP (líneas continuas) o 100 μM GMPCPP (líneas discontinuas), C— EcFtsZ (10 μM) ensayado sin y con DFMBBA en presencia de 2 mM GTP. D – EcFtsZ (10 μM) ensayado sin y con DFMBBA en presencia de 1 mM GTP y sistema regenerador de GTP. Se representan en rojo las muestras ensayadas en presencia de 4 mM DFMBBA y en negro las muestras ensayadas con un volumen equivalente de DMSO.

Se ensayó MjFtsZ con PC sin que se observara una diferencia apreciable en la dispersión de luz en ausencia y en presencia de 20 μM de PC. El estudio anterior de PC indicó que la presencia de una valina en posición 307 en los FtsZ de organismos sensibles podía constituir una clave de la susceptibilidad, al situarse en un lugar que se predijo como el sitio de unión a PC (Haydon *et al.*, 2008). Con esto en mente se creó una forma mutante de MjFtsZ, MjFtsZ-R332V con el fin de ver si la mutación del residuo equivalente en FtsZ de *M. jannaschii* podía provocar la sensibilización de la proteína a PC. Sin embargo, este mutante es aparentemente inactivo, sin que se haya podido observar polimerización en ningún caso, por lo que fue descartado.

➤ *Sedimentación*

Con el fin de cuantificar el efecto de PC y de DFMBBA sobre la polimerización de FtsZ de diferentes especies, se realizaron ensayos de sedimentación por ultracentrifugación empleando BsFtsZ, SaFtsZ y EcFtsZ (Figura 32). Como se había observado con EcFtsZ que PC podía afectar a la actividad GTPasa de FtsZ, los ensayos se realizaron en ausencia (Figura 32A y C) y presencia (Figura 32B y D) de un sistema regenerador de GTP.

PC provocó un aumento en BsFtsZ sedimentado que se saturó a una proporción de PC a FtsZ de entre 0.5 y 1.0, consistente con la existencia de un solo sitio de PC en FtsZ. El resultado no varió al emplearse sistema de regeneración de GTP. Se encontraron resultados análogos al emplear DFMBBA aunque, igual que en los ensayos de dispersión de luz, la concentración requerida para un efecto equivalente al de PC fue cien veces mayor.

En el caso de SaFtsZ, también se observó un aumento de proteína sedimentada, sin que se apreciaran diferencias por la presencia o ausencia de un sistema de regeneración de GTP. El efecto fue más atenuado cuando se usó DFMBBA, y en ningún caso se logró una polimerización de todo el SaFtsZ de la muestra.

Los resultados al emplear EcFtsZ fueron similares a los ya observados por dispersión de luz. En ausencia de sistema de regeneración de GTP, la presencia de PC provocó una disminución de la cantidad de EcFtsZ sedimentado, efecto que fue anulado en presencia de un sistema de regeneración de GTP. Esto confirma lo ya observado en los ensayos de dispersión de luz a 90°. No se observó efecto en presencia de DFMBBA, con independencia de la presencia o ausencia de un sistema de regeneración de GTP.

➤ *Microscopía electrónica*

Se recogieron muestras para microscopía electrónica durante los ensayos de dispersión de luz a 90°, o bien en ensayos realizados en un volumen replicando las condiciones de dispersión de luz (ver Materiales y Métodos). Así, se ensayaron BsFtsZ, SaFtsZ, strep-SpFtsZ, EcFtsZ, y MjFtsZ con PC (Figuras 33 y 34), mientras que el estudio de los efectos de DFMBBA se limitó a BsFtsZ, SaFtsZ y EcFtsZ (Figura 35).

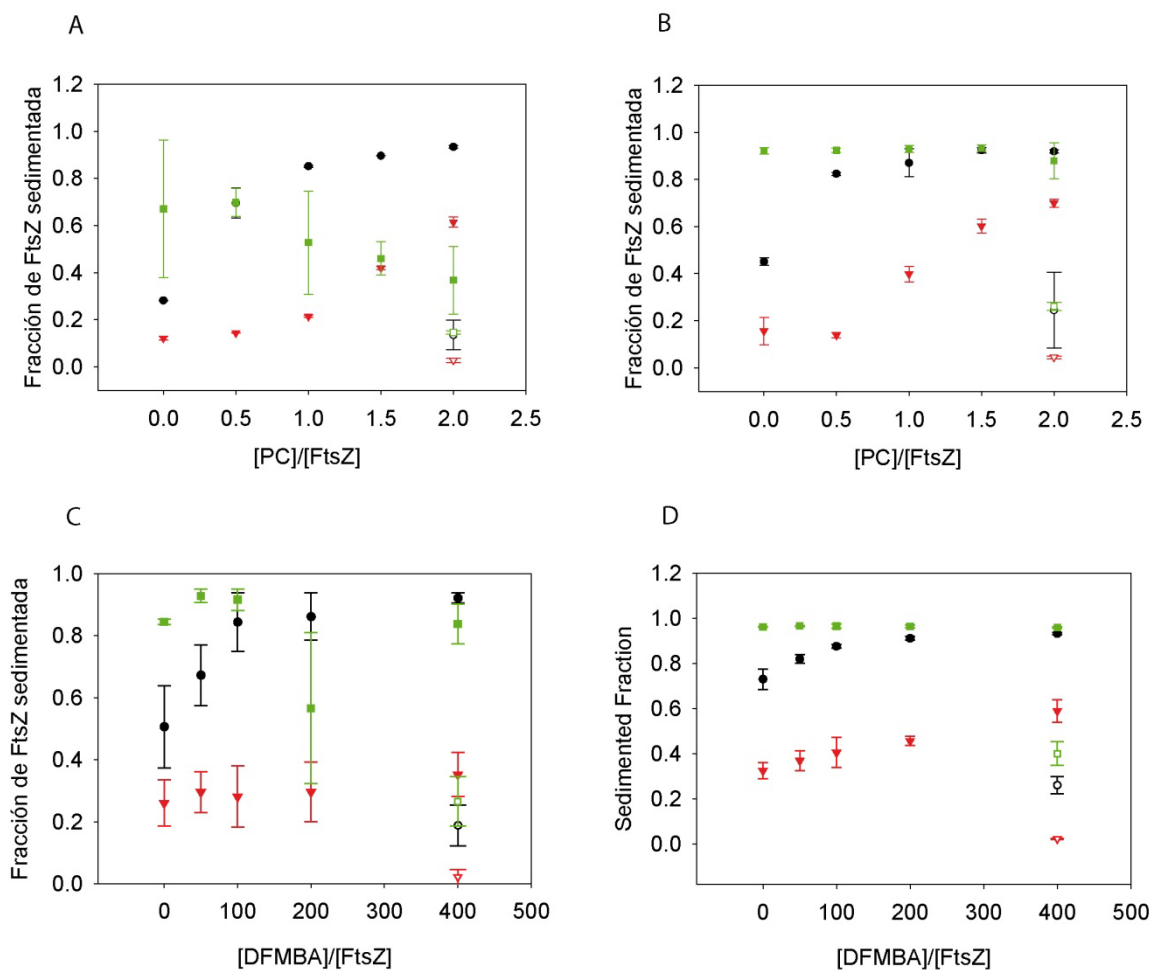


Figura 32: Ensayos de sedimentación de FtsZ con PC y DFMB. Se ensayó BsFtsZ (negro), SaFtsZ (rojo) y EcFtsZ (verde). Los símbolos vacíos son controles en ausencia de magnesio. A – Titulación de FtsZ (10 μ M) con concentraciones crecientes de PC en presencia de 2 mM GTP. B – Titulación de FtsZ (10 μ M) con concentraciones crecientes de PC en presencia de 1 mM GTP y sistema regenerador de GTP. C – Titulación de FtsZ (10 μ M) con concentraciones crecientes de DFMB en presencia de 2 mM GTP. D – Titulación de FtsZ (10 μ M) con concentraciones crecientes de DFMB en presencia de 1 mM GTP y sistema regenerador de GTP.

La presencia de PC y DFMB provocó un efecto similar en BsFtsZ. Se observó la formación de haces gruesos de BsFtsZ polimerizado aproximadamente 50 nm de ancho y con longitudes de hasta micrómetros. En presencia de DFMB se observaron además aparentes roturas en los haces cada 100-400 nm.

En el caso de SaFtsZ no se observaron polímeros cuando se ensayó en presencia de GTP y ausencia de PC o DFMB, aunque en presencia de GMPcPP sí se observa la formación de parches de polímeros cortos, por lo que la proteína retiene alguna capacidad de polimerización. La adición de PC provocó la formación de abundantes polímeros curvos y

toroides en presencia de GTP. Con GMPcPP, la frecuencia de formación de toroides aumentó, y además se observaron haces gruesos y rectos, a veces aparentemente conectados a los toroides. Cuando se empleó DFMBA y GTP, se observaron protofilamentos sencillos curvos pero no estructuras mayores. Con DFMBA y GMPcPP se observaron los mismos polímeros curvos y también toroides, un resultado muy similar a lo encontrado en presencia de PC y GTP.

Resultados preliminares con strep-SpFtsZ (fusionada a estreptavidina) mostraron una formación aparente de haces largos y rectos de strep-SpFtsZ en presencia de PC, aunque no se continuó ensayando con esta proteína porque el trabajo con una proteína fusionada a streptavidina conlleva el riesgo de observar efectos inespecíficos de condensación. De acuerdo con lo ya observado con dispersión de luz y sedimentación, PC provocó una disminución cualitativa de los polímeros de EcFtsZ observados por microscopía, aunque no se apreció ningún cambio en la morfología de los polímeros, aparentemente de protofilamentos sencillos y más o menos rectos. La incubación con DFMBA no provocó efectos sobre la abundancia ni la morfología de los polímeros de EcFtsZ. De acuerdo con los resultados observados por dispersión de luz a 90°, no se observó ningún efecto de PC sobre los polímeros de MjFtsZ.

En conjunto, los resultados con las diferentes técnicas indican que PC es un estabilizador de polímeros de FtsZ de organismos susceptibles, y que su parte DFMBA funciona de la misma manera, si bien con una afinidad mucho menor.

Resultados

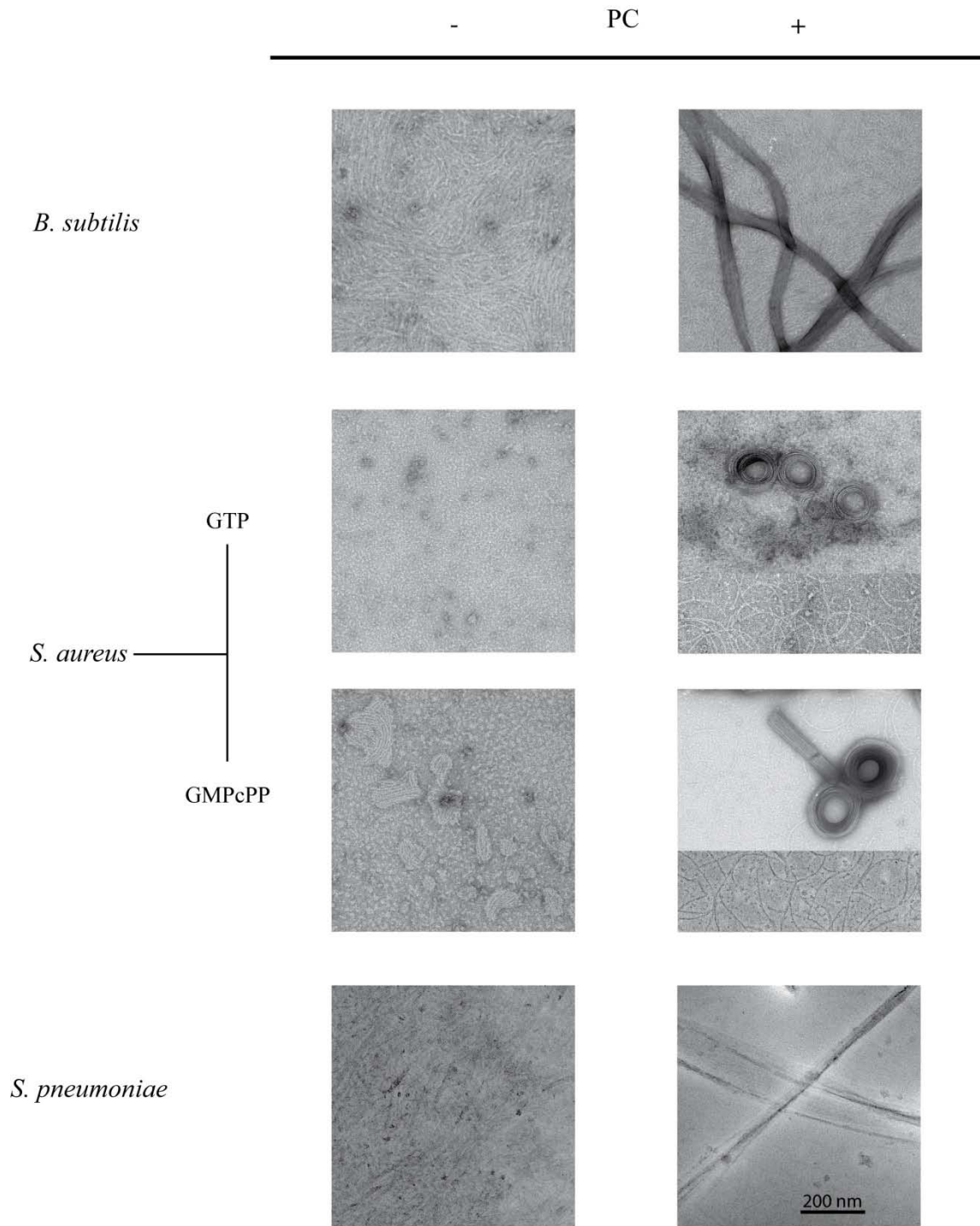


Figura 33: Morfología de polímeros de FtsZ sin (columna izquierda) y con (columna derecha) 20 μ M PC. Primera fila – BsFtsZ con 2 mM GTP. Segunda fila – SaFtsZ con 2 mM GTP. Imagen con PC contiene dos campos de la misma rejilla. Tercera fila – SaFtsZ con 100 μ M GMPcPP. Imagen con PC contiene dos campos de la misma rejilla. Cuarta fila – strep-SpFtsZ con 2 mM GTP. Barra de escala inferior derecha de 200 nm.

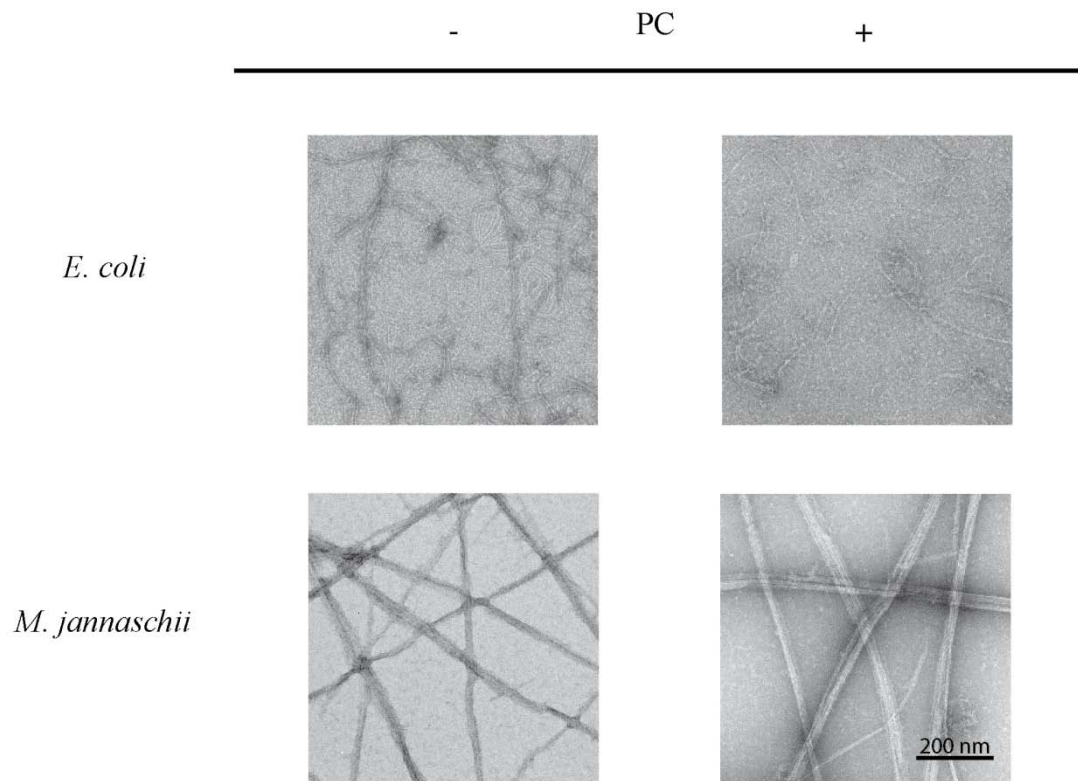


Figura 34: Morfología de polímeros de FtsZ no susceptibles sin (columna izquierda) y con (columna derecha) 20 μ M PC. Primera fila – EcFtsZ con 2 mM GTP. Segunda fila – MjFtsZ con 2 mM GTP. Barra de escala inferior derecha de 200 nm.

Resultados

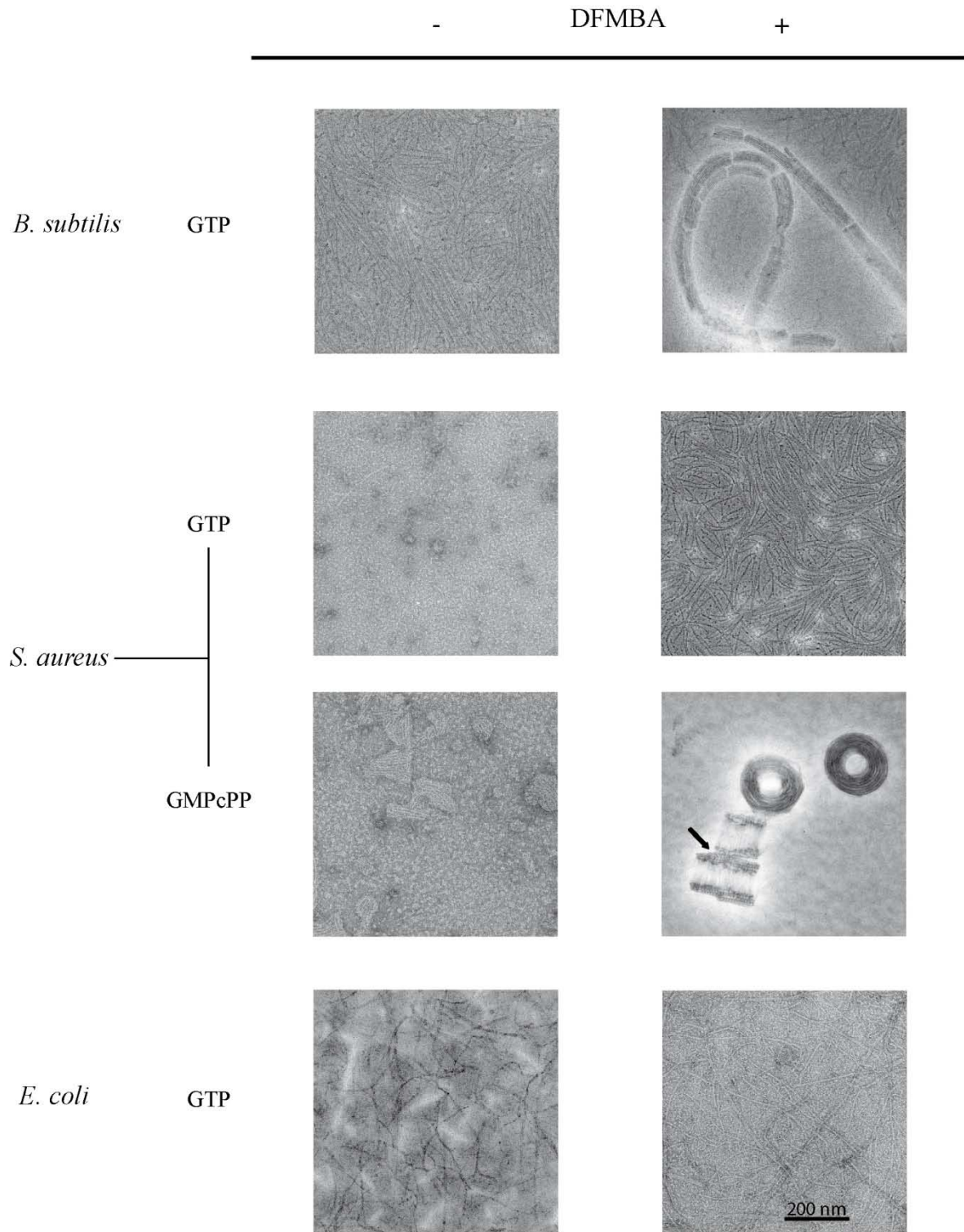


Figura 35: Morfología de polímeros de FtsZ sin (columna izquierda) y con (columna derecha) 4 mM DFMBA. Primera fila – BsFtsZ con 2 mM GTP. Segunda fila – SaFtsZ con 2 mM GTP. Tercera fila – SaFtsZ con 100 μ M GMPcPP. Flecha negra: toroide en vista lateral. Cuarta fila – EcFtsZ con 2 mM GTP. Barra de escala inferior derecha de 200 nm.

DISCUSIÓN

FtsZ es una proteína esencial de división bacteriana, el primer componente que se ensambla en el sitio de división celular y posiblemente el motor de constricción. Se encuentra en la gran mayoría de procariotas estudiados hasta el momento. Un mejor conocimiento de FtsZ puede aportar información importante sobre los procesos fundamentales de la división celular. Además, FtsZ es una diana atractiva para el desarrollo de nuevos antibióticos que puedan combatir la aparición de patógenos bacterianos multi-resistentes a drogas (Vollmer, 2006). El estudio de las interacciones de proteínas con ligandos naturales y artificiales puede contribuir tanto al desarrollo de nuevos medicamentos como a aportar conocimientos sobre las propiedades de las propias proteínas. Un ejemplo son los agentes estabilizadores de microtúbulos, que se emplean como agentes anti-tumorales y como herramientas experimentales para investigar la proteína diana de estos compuestos, la tubulina (Jordan y Wilson, 2004, Barasoain *et al.*, 2010). FtsZ presenta dos cavidades atractivas para su exploración con ligandos; el sitio de unión de nucleótido y la hendidura entre la hélice H7 y el dominio C-terminal. En esta Tesis se han estudiado ambos sitios.

1. DESARROLLO DE UN MÉTODO PARA MEDIR LA UNIÓN DE LIGANDO AL SITIO DE NUCLEÓTIDO DE FTSZ

Se ha desarrollado un método de competición con nucleótido fluorescente (*mant*-GTP) que permite la evaluación de la afinidad de compuestos que se unen al sitio de nucleótido de FtsZ. La precisión del método se ha comprobado mediante un método complementario de competición empleando como ligando de referencia GTP marcado radiactivamente (^3H -GTP). Se midió la afinidad de ambos ligandos de referencia mediante titulaciones del ligando con concentraciones crecientes de apoFtsZ. En ambos casos es necesario utilizar factores de corrección para la obtención de medidas precisas de unión a la proteína; el factor de cambio de intensidad (R) con *mant*-GTP o el factor de sedimentación (F_s) con ^3H -GTP. Aunque las afinidades obtenidas con método de competición con *mant*-GTP son sistemáticamente 2.7 ± 1.1 veces mayores que las obtenidas empleando el método de competición con ^3H -GTP, la diferencia no es importante para la comparación de unos ligandos con otros.

El método de competición con *mant*-GTP puede medir ligandos que se unen al sitio de nucleótido de apoFtsZ con afinidades menores de 10^8 M^{-1} . El uso de un ligando de referencia fluorescente conlleva el riesgo de medidas erróneas en casos donde su rango de excitación o emisión fluorescente coincida con los del compuesto problema. El uso de ^3H -GTP como ligando de referencia elimina este problema y permite la medida de afinidades por encima de 10^8 M^{-1} . Sin embargo, el método de competición con *mant*-GTP tiene una serie de ventajas sobre el método de competición con ^3H -GTP que lo hacen preferible. En el método de competición con ^3H -GTP hay un paso de ultracentrifugación. Es un método más trabajoso, los ensayos requieren un número mayor de pasos y una cantidad mayor de tiempo para su ejecución. Existe un límite al número de muestras que se pueden medir en cada ensayo, debido a las limitaciones de espacio en los rotores y al hecho de que, una vez finalizada la centrifugación, la separación de la mitad superior de cada muestra de la parte inferior se tiene que hacer rápidamente para evitar que la difusión en la muestra empeore los resultados. El uso de ^3H -GTP requiere un manejo cuidadoso en zonas especialmente designadas para su uso, un trato especial de los residuos generados y la comprobación regular de ausencia de contaminación. El ensayo de competición con *mant*-GTP no tiene ninguna limitación especial en cuanto a su manejo. Los experimentos son de preparación y medida sencilla, sin limitación del número de muestras. El método da medidas muy estables, sin que se detecten diferencias significativas entre muestras medidas inmediatamente tras su preparación y las mismas muestras medidas tras 7 horas a 25°C (datos no mostrados). Además, el método de competición con *mant*-GTP puede escalarse para la medición de muchas muestras simultáneamente empleando lectores de placas.

La unión de *mant*-GTP a apoFtsZ causa un aumento de la intensidad de fluorescencia emitida por el fluoróforo de aproximadamente seis veces. Este cambio de rendimiento cuántico se debe tener en cuenta cuando se calcula la concentración de *mant*-GTP unido. Por otra parte, el cambio es lo suficientemente grande como para hacer posible ensayos que utilicen la intensidad de fluorescencia emitida como medida de la unión de *mant*-GTP. Esto simplificaría los cálculos, eliminaría la necesidad de usar filtros de luz polarizada y permitiría el uso de espectrofluorímetros configurados en “L” (Lakowicz, 1999, pag. 298) sin que esto supusiera un alargamiento en el tiempo del ensayo. Sin embargo, dos factores hacen más recomendable el uso de anisotropía como medida de la unión de *mant*-GTP. Por una parte, las concentraciones de apoFtsZ (375 nM) y *mant*-

GTP (500 nM) que se usan en los ensayos de competición son bajas, con el fin de permitir el desplazamiento de *mant*-GTP a concentraciones de ligando competidor relativamente bajas. La intensidad de fluorescencia emitida por *mant*-GTP con la proteína en estas condiciones es sólo dos veces mayor que la emitida por el ligando libre. Bajo estas mismas condiciones, la anisotropía del *mant*-GTP es aproximadamente seis veces mayor que la anisotropía del ligando libre, lo cual da un rango mayor de medida. Además, la utilización de la anisotropía como medida del grado de unión a apoFtsZ aporta medidas mucho más reproducibles que el uso de intensidad de fluorescencia despolarizada. Las anisotropías de *mant*-GTP libre y unido son constantes, por referirse a un cociente de intensidades de fluorescencia polarizada dependiente de la movilidad del fluoróforo. Esto contrasta con la intensidad de fluorescencia, que puede ser afectada por cambios de lámpara (que varían a lo largo de su vida útil), cambios en la naturaleza del solvente, etc.

2. CONTRIBUCIONES DE LAS PARTES DEL GTP A SU UNIÓN A FTSZ

Si consideramos las contribuciones relativas de cada parte de la molécula del GDP ($\Delta G^0 = 10.34 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$) al total vemos que la guanina contribuye un 30%, mientras que la ribosa contribuye sólo un 16% de la unión total. El fosfato β tiene la contribución dominante, con un 42%, mientras que el fosfato α contribuye un 12%. Las medidas hechas con los componentes de fosfato (PPPi, PPi y Pi) parecen confirmar el carácter dominante de la interacción del fosfato β . Se supone que el Pi se unirá mayoritariamente a la posición del fosfato β en el sitio de nucleótido y, aunque la energía libre de unión del fosfato inorgánico es muy cercana al $\Delta\Delta G^0_{\text{GMP}\rightarrow\text{GDP}}$, no se puede descartar la posibilidad de que el Pi pueda unirse a más de un lugar en el sitio de nucleótido simultáneamente.

Si comparamos los ΔG de los diferentes ligandos medidos (Resultados, Tabla 5), con los $\Delta\Delta G^0$ correspondientes (Resultados, Tabla 6) vemos que las energías libres medidas son bastante cercanas a las contribuciones intrínsecas de los grupos equivalentes en el contexto del GDP. Vemos incluso que la suma de los $\Delta\Delta G^0$ ($-10.21 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$) es un

valor similar al ΔG^0 calculado para el GDP (-10.46 kcal·mol⁻¹). Normalmente, si consideramos $\Delta\Delta G^0$ como la contribución en energía libre de contacto, se esperaría una diferencia mínima de $\Delta\Delta G^0_{\text{obs}} - \Delta\Delta G \approx 2.4$ kcal·mol⁻¹. Este valor es la diferencia de energía mínima esperada debido al cambio de entropía de mezcla en una reacción bimolecular, que no existe cuando se une una parte adicional del ligando (Andreu y Timasheff, 1982). No se observa esta diferencia cuando se comparan los ΔG^0_{obs} de los componentes del GDP y sus equivalentes en $\Delta\Delta G^0$. Es posible que esta energía desfavorable esté compensada por efectos de la solvatación de los ligandos o diferencias de movilidad entre el componente intrínseco en el contexto de la molécula del GDP y el mismo componente libre en una reacción de unión real.

Las simulaciones de dinámica molecular empleando las estructuras cristalográficas de MjFtsZ-GDP (código PDB: 2VAP) confirmaron la importancia dominante del fosfato- β para la unión a GDP, y también coinciden en la contribución relativamente modesta del fosfato- α . Aunque el fosfato- α tenga una importancia energética menor en el conjunto de la interacción de GDP, establece la interacción individual de mayor valor energético, a través de un doble puente de hidrógeno estable con el residuo R169 (Apéndice: Tabla A4). Sin embargo esta interacción individual es mucho menor que el conjunto de interacciones (por puentes de hidrógeno) que se establecen entre el fosfato- β y los residuos G134, T135 (por sí sola del mismo orden que la interacción con R169), G136 y G47.

El fosfato- γ contribuye de una manera más compleja a la unión GTP a FtsZ. Desde el punto de vista puramente experimental, la influencia energética aparente es mínima. Si la contribución del fosfato- γ fuera aditiva, como el resto de los componentes de la molécula, su contribución intrínseca ($\Delta\Delta G_{\text{GDP} \rightarrow \text{GTP}} = -0.64$ kcal·mol⁻¹) constituiría sólo un 6% de la energía total de unión, con contribuciones del fosfato- β , fosfato- α , ribosa y guanina de 40, 11, 15 y 28%, respectivamente. La importancia observada menor, en términos energéticos, del fosfato- γ viene apoyada también por las diferencias pequeñas encontradas en las energías de unión de ATP y ADP o *mant*-GTP y *mant*-GDP. Esto contrasta con la gran importancia de las señales fosfato γ/β en el comportamiento dinámico de FtsZ. Mientras que el GTP favorece el ensamblaje de FtsZ, el GDP causa desensamblaje. Se piensa que la unión de GTP permite una conformación “recta” de

FtsZ que favorece ensamblaje mientras que la unión de GDP favorece una conformación “curva” lo que resulta en la inestabilidad del polímero de FtsZ (Huecas y Andreu, 2004). El análisis bioinformático ofrece una explicación a esta aparente contradicción. El fosfato- γ establece interacciones fuertes con el sitio de unión de nucleótido. Aunque las estructuras cristalográficas de FtsZ-GDP y FtsZ-GTP son muy similares, tras las dinámicas moleculares se ve que las interacciones en el resto del GTP (la parte que no es fosfato- γ) son diferentes a las establecidas con GDP. El GDP ha perdido un puente de hidrógeno con la cadena lateral de D212 y forma un puente de hidrógeno doble con N51. Además, se observa un ligero reajuste del anillo de guanina lo que debilita las interacciones con los residuos A48 y F208. Estos reajustes optimizan la interacción fosfato- α – R169. Por el contrario con GTP se ve que, aunque existe un cierto reajuste, las interacciones de las diferentes partes del nucleótido se mantienen estables a lo largo de la dinámica molecular, incluyendo las del fosfato- γ , que establece interacciones fuertes por puentes de hidrógeno con los residuos G133 y T135 y contribuye un 21-23% de la energía de unión a FtsZ.

Para que el incremento de energía libre de unión ($\Delta\Delta G$) se considere equivalente a la contribución intrínseca de una parte de un ligando a la unión se tienen que cumplir una serie de requisitos, uno de los cuales es que “Los cambios en movilidad externa e interna (rotacional, translacional y vibracional), conformación y solvatación de los ligandos y la proteína no difieran significativamente para la unión de α y α — β a la proteína” (Andreu y Timasheff, 1982). Los resultados de dinámica molecular indican que este requisito no se cumple para el caso de GDP y GTP, por lo que en este caso el valor numérico de $\Delta\Delta G_{\text{GDP} \rightarrow \text{GTP}}$ ya no puede utilizarse como una estimación de la contribución intrínseca del fosfato- γ a la unión, de manera que el porcentaje de contribución a la unión que se puede calcular a partir de este número se desvía de las estimaciones computacionales. FtsZ no es la única GTPasa que presenta afinidades similares para el GTP y GDP; la tubulina, homólogo de FtsZ, también presenta una afinidad similar por el GTP y GDP (Correia *et al.*, 1987) aunque otras GTPasas presentan otras relaciones de afinidades (Sprang, 1997, Kong *et al.*, 2004).

Las diferentes conformaciones que se encuentran tras la dinámica molecular en comparación a las encontradas en las estructuras cristalográficas pueden ser indicativas de una diferencia de conformación de los nucleótidos en solución o simplemente

indicativas de los movimientos potenciales diferentes de FtsZ con GTP o GDP unidos. Así, cuando GTP se hidroliza a GDP, liberando Pi, tras el ensamblaje de FtsZ, no sólo se pierden las interacciones con el fosfato- γ y el Mg^{2+} , sino que además el GDP se reacomoda en el sitio de unión, estableciendo interacciones distintas, lo cual podría provocar el cambio a una conformación favorable para el desensamblaje (Martín-Galiano *et al.*, 2010). Sin embargo tampoco se puede descartar que el efecto diferente de GTP y GDP sobre el comportamiento dinámico de FtsZ se deba a interacciones adicionales entre el fosfato- γ y el sitio de nucleótido completo que se forma al ensamblar el polímero (ver Introducción), lo cual podría cambiar la energía libre de unión, dado que en este trabajo solo se ha analizado la unión del nucleótido a monómeros de FtsZ.

3. ANÁLOGOS SUSTITUÍDOS EN C8 DEL GTP COMO MODELOS DE INHIBIDORES DE FTSZ

El BrGTP interfiere con la polimerización de FtsZ (Lappchen *et al.*, 2005), lo que muestra que es posible inhibir FtsZ con compuestos que se unan específicamente al sitio de nucleótido. El estudio de diferentes análogos del GTP sustituidos en C8 facilita la exploración del sitio de nucleótido, lo cual puede aportar información para el diseño racional de compuestos inhibidores con una química diferente al GTP.

Los análogos del GTP ensayados compiten con *mant*-GTP por el sitio de nucleótido de FtsZ con un rango de afinidades entre 10^8 y 10^6 , aproximadamente. Además, se observó que la afinidad de un análogo por FtsZ correlaciona positivamente con su capacidad de inhibir la polimerización (medido como IC_{50} de polimerización) de BsFtsZ y EcFtsZ. Así, la búsqueda de compuestos que se unen al sitio de nucleótido de FtsZ con afinidades altas puede dar como resultado inhibidores efectivos de ensamblaje. Una estrategia de este tipo se ha empleado para la optimización de agentes estabilizadores de microtúbulos (Buey *et al.*, 2004, Dietrich *et al.*, 2009).

Una pregunta importante es el origen de las diferencias de afinidad entre los diferentes análogos. Se pueden proponer algunas explicaciones a través de la conformación adoptada por el nucleótido en el sitio de unión de FtsZ. El grupo guanina del GTP puede

existir en posición *anti*, que deja a la base alejada del grupo ribosa, o en posición *sin*, donde la base está girada hacia la ribosa (Figura 36).

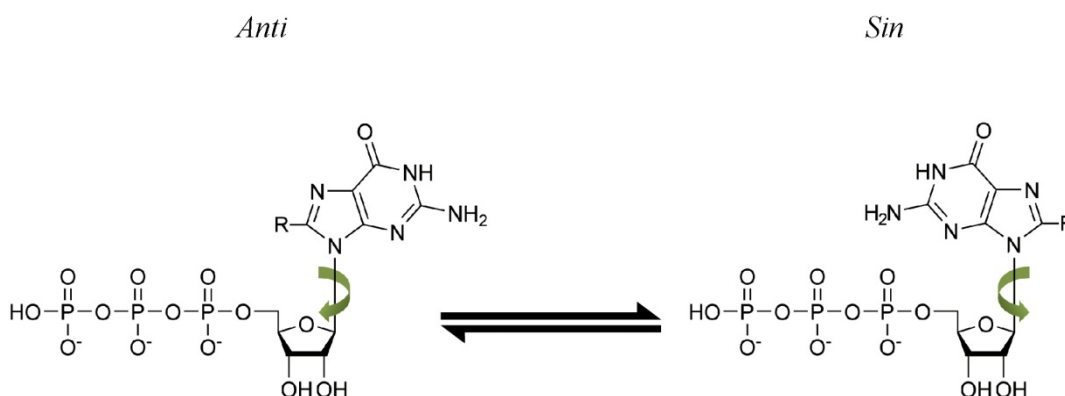


Figura 36: Conversión del grupo guanina del GTP entre la conformación *anti* y *sin*

Normalmente el equilibrio estará desplazado hacia la posición *anti*, ya que éste provoca el número menor de choques estéricos con el azúcar. La presencia de un grupo voluminoso en posición C8 podría provocar un desplazamiento del equilibrio entre estas dos posiciones hacia el estado *sin*. Todas las estructuras cristalográficas de FtsZ resueltas hasta el momento en presencia de nucleótido lo muestran en posición *anti*, incluyendo la estructura cristalográfica de FtsZ de *Aquifex aeolicus* con MorphGTP (Lappchen *et al.*, 2008). Es posible que la presencia del grupo morfolino sustituyente desplace el equilibrio de MorphGTP en solución hacia el estado *sin*. Dado que MorphGTP se une a FtsZ en posición *anti*, esto obligaría a FtsZ a tomar ligandos para unión en *anti* de una fuente de MorphGTP dominada por la conformación *sin*, lo que podría contribuir a su menor afinidad. En un estudio reciente se han predicho unas relaciones de energías libres de unión entre el BrGTP, ClGTP y GTP compatibles con las encontradas en esta Tesis (Hritz *et al.*, 2010). Dichos cálculos predicen una conformación *anti* para los análogos unidos a FtsZ de *A. aquifex* pero una mezcla de conformaciones *anti* y *sin* en solución, con diferentes proporciones de las conformaciones para diferentes análogos, siendo esto un factor determinante para las diferencias de energía libre de unión de los análogos de GTP.

Otro factor que podría afectar la afinidad es la interferencia estérica adicional de los grupos sustituyentes. Los análogos con sustituyentes más pequeños generalmente presentan una afinidad mayor, pero esta relación no es del todo precisa, ya que PyrrGTP, a pesar de tener un sustituyente voluminoso, tiene una afinidad mayor que

CIGTP, BrGTP e IGTP. Una manera de representar los requerimientos estéricos mínimos de un sustituyente es a través del parámetro Sterimol B1, que es la medida de la anchura mínima del sustituyente (Fauchere *et al.*, 1988). Se calcularon los parámetros sterimol B1 de cada ligando (Lappchen *et al.*, 2008) y se compararon con las constantes de disociación (K_d) de cada ligando de apoFtsZ de *M. jannaschii* (Figura 37). Aunque hay una cierta tendencia a mayores afinidades (menores K_d) a menores parámetros Sterimol B1, el MorphGTP destaca por desviarse de la tendencia general, teniendo una afinidad menor de lo que se predice por su parámetro Sterimol B1.

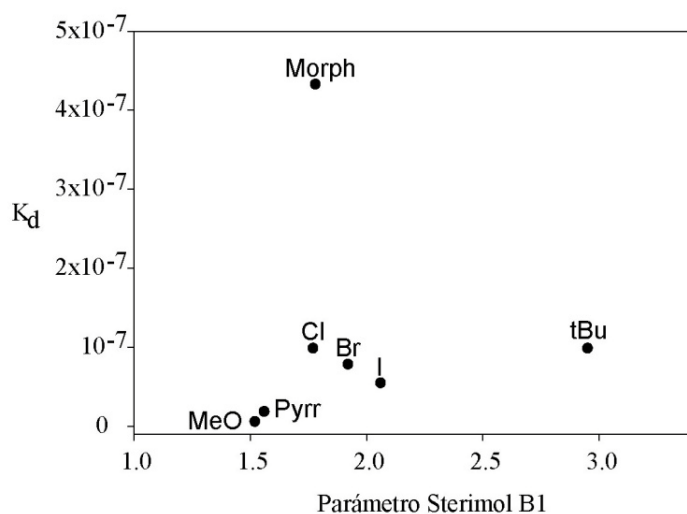


Figura 37: Comparación entre el tamaño y la afinidad de los análogos de GTP. Comparación del parámetro Sterimol B1 con la constante de disociación (K_d).

La estructura cristalográfica FtsZ de *A. aquifex* con MorphGTP no presenta ningún cambio conformacional significativo respecto a la misma proteína unida a GDP (Lappchen *et al.*, 2008). La parte no-morfolino de MorphGTP muestra una conformación muy similar a la observada en la estructura con GDP (Oliva *et al.*, 2007). El grupo morfolino está a un ángulo de 55° respecto al plano de la guanina. Además, la densidad electrónica en esta zona de la estructura es menor al resto de la molécula, indicando que el grupo tiene una cierta libertad. Este posicionamiento en teoría tampoco causaría perturbaciones importantes dentro de la estructura conocida del dímero de FtsZ de *Methanococcus jannaschii* (Oliva *et al.*, 2004, Lappchen *et al.*, 2008). En función de esto es difícil explicar por qué MorphGTP inhibe la polimerización de EcFtsZ y BsFtsZ. Una posibilidad es que el análogo se una a estas proteínas de manera diferente a como lo hace a FtsZ de *Aqueolux aquifex*. Esto parece en principio poco probable, dado que se han resuelto más de 20 estructuras de FtsZ, de diferentes especies bacterianas y diferentes nucleótidos unidos, sin que se hayan detectado hasta el momento diferencias importantes entre ellas. Por otra parte, algunas diferencias deben

de existir en la unión de los ligandos a la proteína, dado que las afinidades varían entre sí. Estos pequeños reordenamientos en las interacciones del nucleótido con la proteína podrían provocar la pérdida de interacciones longitudinales esenciales para la formación del polímero. De momento no se conoce la verdadera estructura del polímero de FtsZ. Una posibilidad es que la estructura del dímero (Oliva *et al.*, 2004, Oliva *et al.*, 2007) represente un estado pre-hidrólisis del protofilamento, y que tras la hidrólisis los monómeros de FtsZ se acerquen más entre sí (Oliva *et al.*, 2004), lo que aumentaría la posibilidad de interferencias directas o indirectas con el sustituyente en C8. La resolución del mecanismo molecular de los efectos inhibitorios de estos análogos, facilitará el diseño de compuestos que se unan específicamente al sitio de unión de nucleótido de FtsZ con grupos unidos dirigidos a interferir en las interacciones entre monómeros durante el ensamblaje.

4. FACTORES LIMITANTES EN EL USO DE COMPUESTOS DE CRIBADO VIRTUAL

Se empleó el método de competición con *mant*-GTP para evaluar la posible unión al sitio de nucleótido de un total de 36 compuestos elegidos en dos rondas sucesivas de cribado virtual. Finalmente, no se observó la unión de ningún compuesto ensayado al sitio de nucleótido de FtsZ. También se ensayaron los posibles efectos de los compuestos sobre el ensamblaje de FtsZ, sin que se pudieran observar diferencias significativas entre muestras ensambladas en presencia o ausencia de compuesto.

Distintos factores han podido contribuir a los resultados negativos. Una posibilidad es que hubiera errores en el proceso de cribado virtual que dieron lugar a una selección de compuestos errónea. La estructura cristalográfica elegida para el cribado fue FtsZ de *P. aeruginosa* complejada con SulA (PDB: 1OFU). Fue elegida por ser de un patógeno y por tener una elevada identidad de secuencia con FtsZ del microorganismo modelo *E. coli*. Además, los resultados de inhibición de la polimerización con los análogos del GTP sustituidos en C8 (ver sección anterior) con FtsZ de *E. coli* correlacionan con las afinidades de unión de los mismos ligandos a FtsZ de *M. jannaschii*, por lo que es razonable suponer que estos análogos se unirían de manera similar a ambas proteínas. Por otra parte, podría haber diferencias sutiles pero significativas entre FtsZ de *P.*

aeruginosa y *M. jannaschii* que resulte en compuestos válidos para uno pero inválidos para el otro, pero esto también parece poco probable, dado que el sitio de unión a nucleótido es una de las zonas más conservadas de FtsZ de diferentes especies (Martín-Galiano *et al.*, 2010).

Desde el punto de vista experimental, también hay factores que dificultan el ensayo de compuestos de cribado virtual. En principio existía la posibilidad de interferencias fluorescentes en la señal emitida por *mant*-GTP, esto sólo resultó ser un factor significativo en siete de los 36 compuestos, de los cuales sólo tres tuvieron una emisión de fluorescencia demasiado alta para su ensayo con *mant*-GTP. El método de competición con *mant*-GTP es por tanto un método eficaz para la evaluación de compuestos elegidos por cribado virtual. El método de competición con ^3H -GTP puede emplearse si se desea para la evaluación de ligandos cuya emisión de fluorescencia propia los hacen inviables para su ensayo por competición con *mant*-GTP.

Uno de los parámetros más limitantes para los ensayos realizados fue la solubilidad acuosa de los compuestos (Resultados Figura 23D, Figura 38). No existe una correlación clara entre las solubilidades predichas y las solubilidades observadas. Tener un cálculo aproximado más fiable de la solubilidad acuosa de un compuesto previo a su adquisición es importante, dado que así se podrían evitar compuestos que por su reducida solubilidad no serán viables como ligandos de FtsZ. Un número elevado de los compuestos ensayados tiene una solubilidad acuosa limitada, aunque hubo una mejora en la solubilidad de los compuestos de la segunda ronda de cribado. Aun así, del total de compuestos ensayados, sólo un 6% tuvieron una solubilidad por encima de 50 μM , con un 36% de compuestos con una solubilidad entre 10-50 μM y otro 36% con una solubilidad entre 1-10 μM . Un 22% de los compuestos tienen una solubilidad acuosa por debajo de 1 μM .

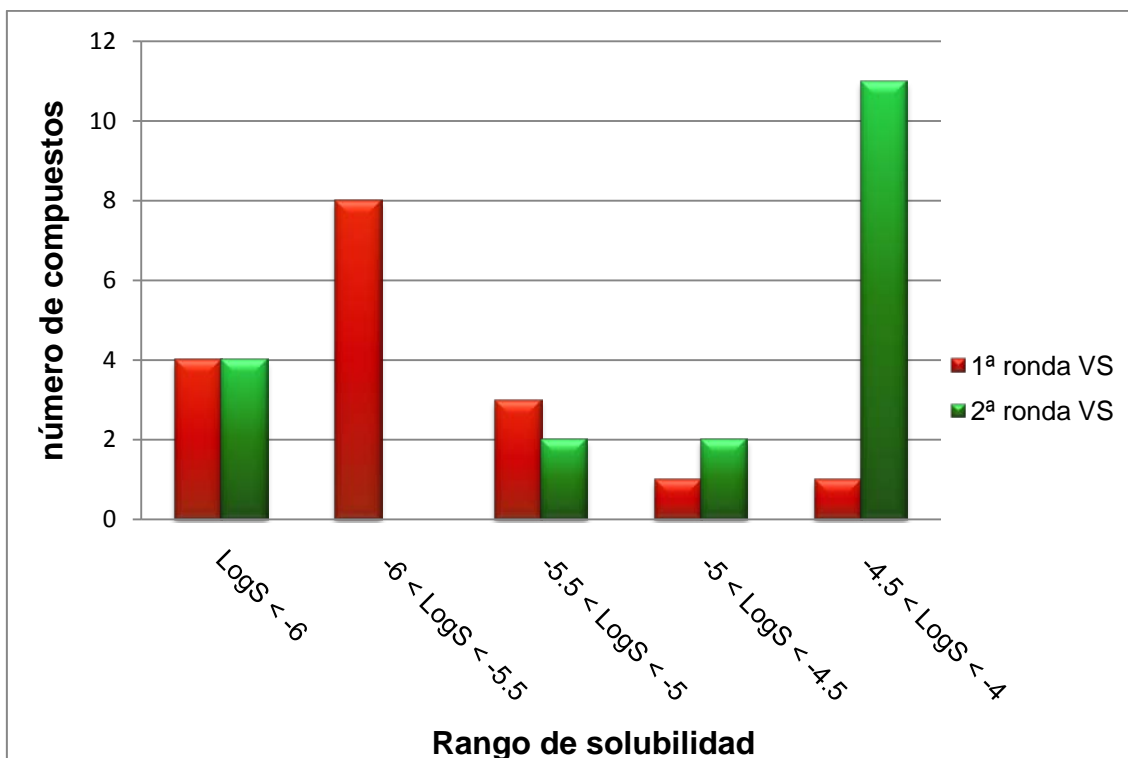


Figura 38: Distribución de solubilidades observadas de los compuestos de cribado virtual. Los valores de las solubilidades están en las Tablas 9 (compuestos de la primera ronda) y 10 (compuestos de la segunda ronda).

Para que fuera detectable la unión al sitio de nucleótido de FtsZ, los compuestos tendrían que tener afinidades relativamente elevadas (10^5 - 10^6 M⁻¹ para el 72.2% de los compuestos). Si consideramos que, por ejemplo, la 3-metoxibenzamida, compuesto que finalmente dio lugar a PC190723 (Haydon *et al.*, 2008), que es activo contra FtsZ a concentraciones milimolares (Ohashi *et al.*, 1999), podemos ver que la baja solubilidad es un problema de necesaria resolución para que se pueda continuar empleando el método de cribado virtual con el fin de encontrar compuestos que unan el sitio de nucleótido de FtsZ.

5. MciZ: ¿INHIBIDOR DE FTSZ O ARTEFACTO EXPERIMENTAL?

MciZ es un péptido de *B. subtilis* que ha sido descrito como un posible inhibidor de FtsZ (Handler *et al.*, 2008). El estudio propuso como sitio de unión de MciZ un lugar cercano al sitio de nucleótido de FtsZ, por lo que la posible unión dicho sitio fue ensayada en esta Tesis. MciZ mostró una emisión de fluorescencia propia y una posible

interacción directa con *mant*-GTP que lo hizo inviable para su evaluación con esta sonda. La competición con ^3H -GTP dio resultados iniciales positivos, pero no se puede confirmar que este desplazamiento sea debido a una competición real, debido a que la presencia de MciZ causa la precipitación de BsFtsZ. No se conoce la causa exacta de la precipitación de FtsZ por parte de MciZ. No se puede atribuir meramente a la presencia de aminoácidos de carga positiva del péptido interaccionando con FtsZ (de carga neta negativa) dado que FtsZ no precipita en presencia de poli-Lisina. No se puede descartar la posibilidad de que MciZ compita con ^3H -GTP por el sitio de nucleótido de FtsZ incluso cuando éste está precipitado. Si se comparan los efectos de la melitina con el péptido híbrido CA(1-8)M(1-18) se ve que aunque los dos causan precipitación de FtsZ, sólo la melitina causa además un desplazamiento de ^3H -GTP del sitio de nucleótido de BsFtsZ. Esto es interesante, puesto que CA(1-8)M(1-18) contiene dieciocho aminoácidos en común con la melitina, por lo que no es sorprendente que ambas causen precipitación de FtsZ, pero CA(1-8)M(1-18) ha perdido la capacidad de desplazar la unión de ^3H -GTP de FtsZ. Es posible que la melitina esté compitiendo con ^3H -GTP por el sitio de nucleótido en la proteína precipitada, como quizá también podría hacerlo MciZ. Por otra parte, también es posible que la precipitación no sea igual para los tres péptidos, y que CA(1-8)M(1-18) provoque una precipitación que mantenga intacto el sitio de nucleótido, mientras que la precipitación causada por MciZ y melitina provoque la desnaturalización del sitio de nucleótido y por tanto una pérdida de unión de ^3H -GTP no debida a competición específica. En las condiciones actuales no es posible distinguir entre estas dos posibilidades.

Se plantea aquí la cuestión interesante de cuál puede ser la razón por la que se ha observado esta precipitación en los ensayos realizados en el laboratorio sin que estos fueran mencionados en el estudio que describió a MciZ como un inhibidor de FtsZ. Un análisis de los métodos *in vitro* empleados en el estudio anterior (Handler *et al.*, 2008) para caracterizar la unión de MciZ a BsFtsZ y su efecto inhibidor de la polimerización revelan la posibilidad de que hubiera una precipitación no detectada. Para comprobar la unión de MciZ a la proteína, se utilizó FtsZ con cola de histidinas (FtsZ-His6). Se incubaron péptido y proteína con resina de agarosa Ni-NTA, lo que provocaría la unión de FtsZ-His6. Se comprobó la unión de MciZ a FtsZ-His6 por medio de co-sedimentación por centrifugación y electroforesis desnaturizante. Si MciZ causa la precipitación de FtsZ, es posible que este método diera resultados aparentemente

positivos, ya que aún en ausencia de unión específica, al formarse precipitados, MciZ y FtsZ co-sedimentarían a bajas velocidades. Esta posibilidad podría haberse controlado por medio del ensayo de un control en ausencia de resina, para ver la especificidad de la sedimentación. Por otra parte, se mostró la inhibición aparente de la polimerización de BsFtsZ por MciZ a través de dispersión de luz a 90°. Este ensayo también presenta problemas metodológicos. Cuando se añadió GTP (25 μ M) a BsFtsZ (5 μ M), se detectó dispersión de luz, efecto que fue inhibido en presencia de MciZ (5 μ M). La concentración de GTP empleada sería consumida con demasiada rapidez para observar una verdadera curva de polimerización de FtsZ (comprobado durante la optimización de condiciones para BsFtsZ en el laboratorio). Además, la presentación de los datos como histograma y no como curvas de dispersión de luz, hace imposible una verdadera evaluación del efecto de MciZ.

A pesar de estos problemas, otros resultados del mismo estudio apuntan a que sí puede existir una interacción de algún tipo entre MciZ y BsFtsZ. Será necesario abordar el problema de la interacción en condiciones que eviten el problema de la precipitación. Una posibilidad sería la inmovilización de MciZ sobre una placa de plástico, y la posterior detección de la unión de FtsZ (o viceversa). La comprobación de la posible unión de MciZ al sitio de nucleótido de BsFtsZ sería algo más compleja. La inmovilización de FtsZ sobre una placa debería ir seguida de incubación en ligando de referencia (*mant*-GTP o ^3H -GTP), seguido de una segunda incubación con MciZ, detectándose el desplazamiento del ligando de referencia de la placa (por intensidad de fluorescencia o radioactividad).

6. CARACTERIZACIÓN DEL MECANISMO BIOQUÍMICO DE ACCIÓN DEL INHIBIDOR DE FTSZ PC190723

Otro sitio de FtsZ que puede unir ligando es la hendidura entre la hélice H7 y el dominio C-terminal. Esta hendidura fue identificada como el sitio de unión probable para PC190723, un compuesto sintético letal para *B. subtilis* y *S. aureus* que aparentemente tiene como diana a FtsZ (Haydon *et al.*, 2008). En esta Tesis se ha investigado el mecanismo de la inhibición de FtsZ por PC.

Cuando se incubaba PC con FtsZ procedente de organismos sensibles (BsFtsZ y SaFtsZ), se observa un aumento notable en la cantidad de polímero formado en respuesta a GTP o GMPcPP. Además, la presencia de PC favorece la asociación lateral de protofilamentos de FtsZ para formar haces y toroides. *In vivo*, el funcionamiento del anillo Z depende de su naturaleza dinámica y continua remodelación (Stricker *et al.*, 2002, Anderson *et al.*, 2004, Chen y Erickson, 2005). PC desplaza el equilibrio de ensamblaje de FtsZ *in vitro*, estabilizando el estado polimerizado y por tanto impidiendo el comportamiento dinámico de FtsZ. Esto podría explicar la interrupción de división celular y formación de *foci* de FtsZ observado *in vivo* en células tratadas con PC (Haydon *et al.*, 2008). El ensamblaje de FtsZ depende de la unión del GTP y el desensamblaje de la actividad GTPasa (Mukherjee y Lutkenhaus, 1994, Huecas y Andreu, 2004). A concentraciones altas, PC inhibe la actividad GTPasa de BsFtsZ (Andreu *et al.*, 2010) y de SaFtsZ (Haydon *et al.*, 2008, Andreu *et al.*, 2010). No se puede atribuir este efecto a la condensación de los polímeros de FtsZ en haces y toroides, dado que la inhibición en el caso de BsFtsZ es similar bajo condiciones favorables y desfavorables para la formación de haces. Es posible que el efecto de reducción de la actividad GTPasa sea simplemente producto de un intercambio menor de monómeros desde los polímeros estabilizados (Huecas *et al.*, 2007) o un efecto alostérico (Haydon *et al.*, 2008).

S. pneumoniae fue clasificado como no sensible a la acción de PC (Haydon *et al.*, 2008), pero los resultados iniciales de polimerización de strep-SpFtsZ en presencia de PC observado por dispersión de luz a 90° y microscopía parecen indicar que strep-SpFtsZ sí es susceptible a la acción de PC. Sin embargo, dada la existencia de una cola de estreptavidina fusionada al extremo N-terminal de la proteína, es prematuro concluir que los efectos aparentes de PC sobre strep-SpFtsZ representen una interacción real. En caso de que los resultados encontrados con SpFtsZ sean indicativos de un efecto real de PC, habría una aparente contradicción entre la resistencia de *S. pneumoniae* al compuesto y la susceptibilidad de strep-SpFtsZ. Es posible que existan condiciones *in vivo* que hagan *S. pneumoniae* resistente a la acción de PC; impermeabilidad de la membrana, capacidad para expulsar o degradar el compuesto, etc. Antes de considerar estas posibilidades, es conveniente estudiar el efecto de PC sobre SpFtsZ sin cola de estreptavidina.

E. coli también fue clasificada como organismo resistente a la acción de PC (Haydon *et al.*, 2008), y se esperaba que EcFtsZ no respondiera a incubación con PC. Sorprendentemente, se ha visto que EcFtsZ muestra cierta sensibilidad a PC, pero los efectos son muy diferentes a los encontrados con BsFtsZ y SaFtsZ. PC actúa sobre EcFtsZ estimulando su actividad GTPasa, lo que lleva a una despolimerización acelerada de FtsZ. Este efecto no se debe a un desplazamiento de GTP del sitio de nucleótido ni a una alteración en la afinidad de EcFtsZ monomérica por GTP (datos no mostrados). No afecta la cantidad de polímero encontrado en estado estacionario, observable en presencia de sistema de regeneración de GTP. Esto contrasta con el efecto de PC en BsFtsZ y SaFtsZ, donde la cantidad de FtsZ en estado estacionario aumenta con concentraciones crecientes de PC. Se ha comprobado la unión de PC a polímeros de EcFtsZ por HPLC (Andreu *et al.*, 2010). Es posible que PC se una a EcFtsZ en un sitio diferente o de manera diferente en el mismo sitio a como lo hace en BsFtsZ y SaFtsZ. Se predijo que la presencia de valina en posición 307 (o una posición equivalente) es esencial para la sensibilidad a PC (Haydon *et al.*, 2008). Sin embargo, EcFtsZ sí muestra algún tipo de interacción con el compuesto a pesar de tener una arginina en esa posición, por lo que la posición 307 es insuficiente para predecir sensibilidad a PC.

DFMBA funciona de una manera aparentemente igual a PC, pero requiere concentraciones mucho más elevadas, lo que indica que tiene una afinidad mucho menor que PC. Aun así, una comparación de la afinidad aparente de PC con la afinidad aparente de DFMBA hace pensar que DFMBA es el grupo más importante para la unión a FtsZ, mientras que el otro fragmento de la molécula de PC, CTPM, tendría una afinidad mucho menor, suponiendo que PC fuera un ligando bifuncional ideal (Andreu y Timasheff, 1982). DFMBA no tuvo efecto sobre EcFtsZ, pero esto podría ser simplemente indicativo de que no es posible llegar a una concentración de DFMBA suficiente como para afectar a EcFtsZ dadas las limitaciones de solubilidad del compuesto. Aun así, no se puede descartar la posibilidad de que PC se una de una manera diferente en EcFtsZ a la que se une en BsFtsZ y SaFtsZ, y que esta forma de unión haga menos relevante el grupo DFMBA para la unión a EcFtsZ.

Una pregunta interesante es si la morfología de los polímeros de FtsZ estabilizados por PC puede ser relevante para su mecanismo de acción. La morfología de polímeros de FtsZ ensamblados en presencia de PC muestra una gran variabilidad dependiendo de la

especie de FtsZ y las condiciones utilizadas. Esta misma flexibilidad se ha apreciado anteriormente con aditivos poliiónicos empleando FtsZ de *E. coli* (Popp *et al.*, 2009), observándose la formación de toroides y de hélices de diferentes tamaños. Además, en un estudio reciente se ha caracterizado una proteína, FzlA, que inhibe a FtsZ *in vivo* (Goley *et al.*, 2010). Esta proteína funciona de una manera aparentemente análoga a PC, estabilizando polímeros de FtsZ. Cuando se incubó FtsZ de *C. crescentus* en presencia de FzlA con GTP y Mg^{2+} , se observó la formación de hélices gruesas de FtsZ que recuerdan a las encontradas en presencia de PC o con agentes de aglomeración molecular (Figura 39). Aunque el efecto *in vivo* de PC sobre FtsZ en *B. subtilis* fue descrito como la formación de foci desordenados, no se puede descartar la posibilidad de que FtsZ en presencia de PC esté formando hélices a lo largo de la célula (Figura 40, Haydon *et al.*, 2008)). Tanto la incubación de FtsZ con PC como con FzlA llevaron a una inhibición de la actividad GTPasa de FtsZ (Haydon *et al.*, 2008, Goley *et al.*, 2010, Andreu *et al.*, 2010) y, aunque se midió en otro estudio, se sabe que los agentes de aglomeración molecular pueden tener el mismo efecto (González *et al.*, 2003). Esto apoya a la idea de que la formación de haces gruesos de FtsZ provoca una disminución de la actividad GTPasa de la proteína y así disminuye su comportamiento dinámico, esencial para su función celular.

La flexibilidad morfológica de FtsZ en presencia de PC lleva a la formación de protofilamentos sencillos de diferente curvatura, gruesos haces rectos, toroides donde los protofilamentos muestran una aparente asociación lateral y hélices. Esta flexibilidad de los polímeros tiene importantes implicaciones en la función de FtsZ. Se ha postulado que la formación de polímeros curvos podría ser la fuente de la fuerza constrictora del anillo Z (Li *et al.*, 2007, Osawa *et al.*, 2009). Esto hace que PC pueda ser empleado, junto con otros compuestos que podrían tener como diana la hendidura entre la hélice H7 y el dominio C-terminal, como herramienta experimental para investigar las relaciones estructura-función de los polímeros de FtsZ. El mecanismo de acción de PC es análogo al mecanismo de acción de taxol sobre la tubulina (Diaz *et al.*, 1993). El taxol es una droga antitumoral y fue el primer miembro descubierto del grupo de los Agentes Estabilizadores de Microtúbulos (Schiff *et al.*, 1979). La estabilización de los microtúbulos por parte del taxol impide su comportamiento dinámico, esencial para su función en mitosis, lo cual provoca un bloqueo de la división y finalmente apoptosis de la célula (Jordan y Wilson, 2004). PC es un estabilizador de polímeros de FtsZ, una

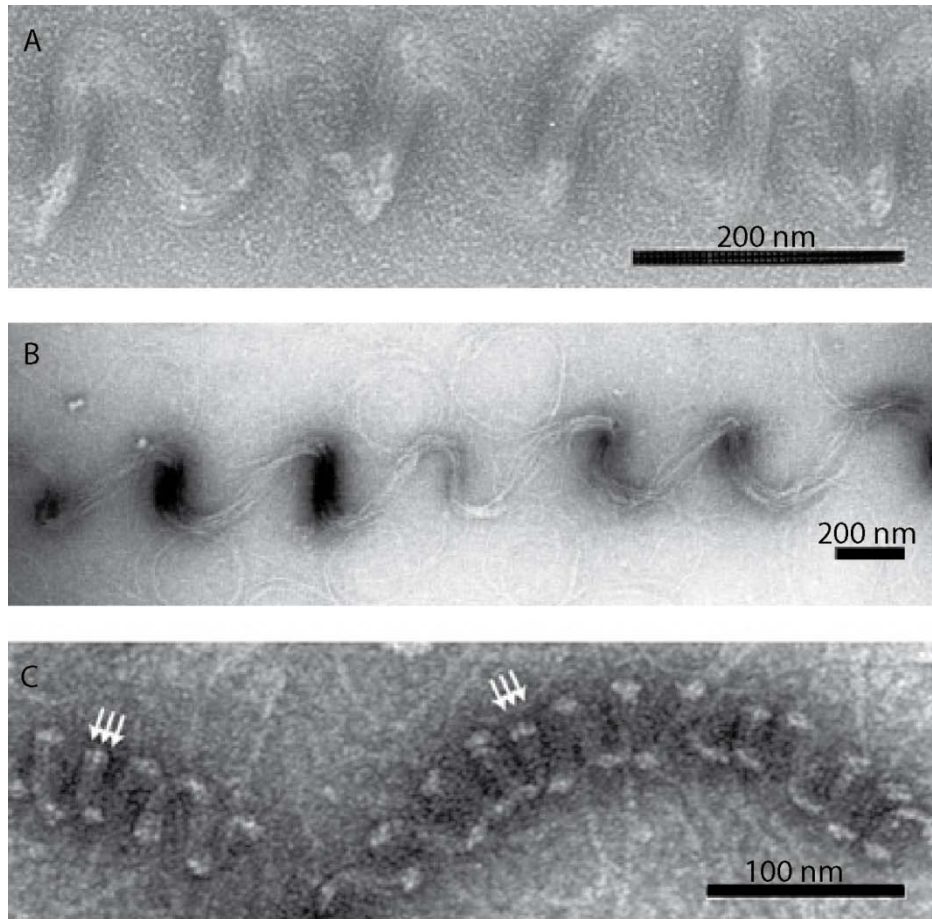


Figura 39: Comparación de polímeros estables de FtsZ: A – FtsZ de *B. subtilis* (10 μM) incubada en presencia de PC (20 μM), GTP (2 mM), y Mg^{2+} (10 mM) en 50 mM Hepes, pH 7.5 B – FtsZ de *E. coli* (12.5 μM) incubada en presencia de metilcelulosa (1.6%) (Popp *et al.*, 2009) C – FtsZ de *C. crescentus* (2 μM) incubada en presencia de FzIA (4 μM), GTP (2 mM) y Mg^{2+} (2.5 mM) en 50 mM Hepes, 50 mM KCl, 0.1 mM EDTA, pH 7.2 (Goley *et al.*, 2010)

homóloga de la tubulina, y el sitio predicho para su unión coincide con el sitio equivalente en la tubulina para el taxol. Estos motivos hacen pensar que PC190723 podría ser el primer miembro de una futura familia de Agentes Estabilizadores de FtsZ, aunque aún es necesario investigar si la estabilización de polímero provocado por ambos compuestos sigue un mecanismo estructural similar o diferente en ambas proteínas.

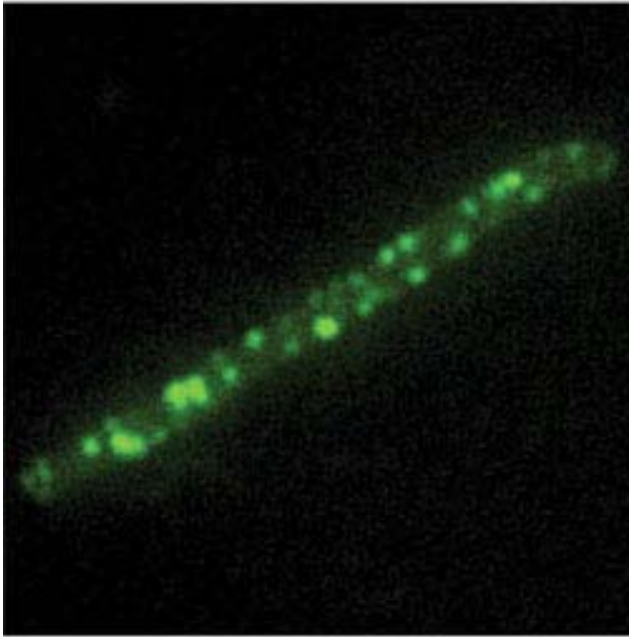


Figura 40: Efecto de PC sobre FtsZ en *B. subtilis*. *B. subtilis* de la cepa 2020, que expresa GFP-FtsZ, visualizado por microscopía de fluorescencia tras incubación en PC 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Haydon *et al.*, 2008)

CONCLUSIONES

Desarrollo de un método para medir la unión de compuestos al sitio de nucleótido de FtsZ

1. El método de competición con la sonda fluorescente mant-GTP puede detectar compuestos que se unan específicamente al sitio de unión de nucleótido de FtsZ.
2. Este método mide con precisión afinidades menores de 10^8 M^{-1} , siendo necesario recurrir al método de competición con $^3\text{H-GTP}$ para ligandos de mayor afinidad.
3. El uso de un método que emplea sonda fluorescente presenta ventajas de manejo práctico que lo hacen preferible a un método con $^3\text{H-GTP}$.

Unión de los constituyentes del GTP a FtsZ

4. Todas las partes del GTP se unen al sitio de unión de nucleótido de FtsZ, aunque contribuyen de una manera desigual a la unión del nucleótido.
5. El fosfato β establece la interacción más importante con FtsZ, contribuyendo por sí solo casi en igual medida que la guanosina.
6. GDP y GTP tienen una energía libre de unión a FtsZ muy similar a pesar de que el fosfato- γ establece interacciones con la proteína. Esta contradicción aparente se resuelve porque la presencia del fosfato- γ causa un reordenamiento de la proteína y del nucleótido, estableciendo interacciones con FtsZ, pero provocando una pérdida de interacciones en el resto del nucleótido.
7. Estas diferencias se pueden explicar por simulaciones de dinámica molecular de FtsZ-GDP y FtsZ-GTP, que además podrían contribuir a explicar la regulación GDP/GTP de FtsZ.

Búsqueda de nuevos inhibidores de FtsZ que se unan a su sitio de nucleótido.

8. Los análogos del GTP sustituidos en C8 se unen al sitio de unión a nucleótido de apoFtsZ con una afinidad que se correlaciona con su capacidad para inhibir la polimerización de FtsZ de *E. coli* y *B. subtilis*.
9. En general, los sustituyentes con un tamaño menor presentan una afinidad mayor por FtsZ, pero la relación tamaño-afinidad es imperfecta. Es posible

que las afinidades dependan del efecto del sustituyente sobre equilibrio de conformaciones *sin-anti* del nucleótido.

10. La búsqueda de otros compuestos con una química diferente al nucleótido que se unan a su sitio en FtsZ, por cribado virtual, está limitada por su baja solubilidad, siendo necesaria una mejora en la predicción de solubilidad previa al ensayo experimental.

Mecanismo de acción del inhibidor de división celular bacteriana PC190723:

11. El agente PC190723 es un estabilizador de polímeros de FtsZ de organismos susceptibles.
12. El efecto de PC190723 sobre la formación de polímero de FtsZ es compatible con la existencia de un solo sitio de unión por monómero de FtsZ polimerizada.
13. La difluorometoxibenzamida tiene efectos similares a PC190723, pero con una afinidad de unión mucho menor.
14. FtsZ de *E. coli*, clasificada inicialmente como no sensible, une PC190723, que acelera su despolimerización. Es posible que el compuesto establezca interacciones diferentes con FtsZ de *E. coli* o que se una en un sitio alternativo.

APÉNDICE

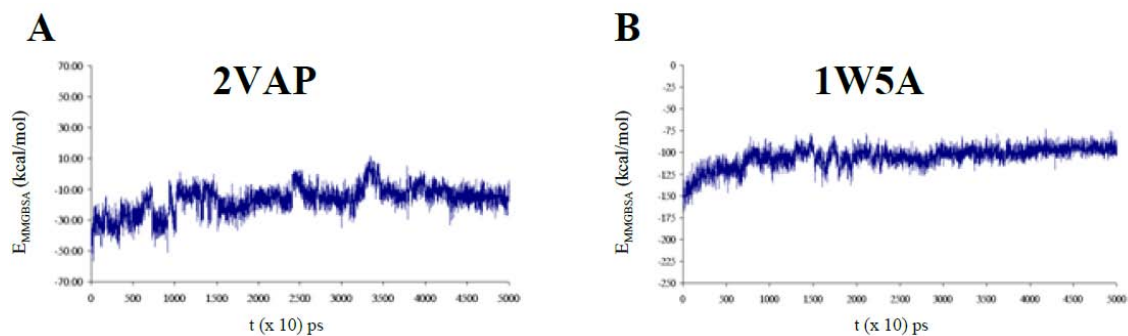


Figura A1: Trayectorias de MM-GBSA: Evolución de la energía libre de interacción (en kcal/mol) a lo largo de las trayectorias de dinámica molecular para A- GDP y B- GTP

Tabla A1: Energías calculadas para la dinámica molecular MjFtsZ-GDP

2VAP---GDP	X-ray	MIN	10ns	20ns	30ns	40ns	50ns
$\Delta H_{MM-GBSA}$	-9.03	-50.50	-27.29	-14.85	-16.57	-8.84	-14.15
σ	0.00	0.00	7.00	4.59	3.87	5.21	5.07
$-T\Delta S (t = \infty)^1$							-2.56
$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$							-16.71

Energías promedio MM-GBSA (y desviaciones estándar) calculadas a lo largo de las trayectorias de dinámica molecular en los últimos 500 ps para cada periodo de 10 ns para el complejo MjFtsZ-GDP (PDB: 2VAP). La entropía se estimó a $t = \infty$. Todas las unidades están en kcal/mol.

¹ La entropía (S) depende la longitud de la trayectoria (t) que se analiza, tendiendo a un límite (S_∞) a medida que se amplía la ventana de muestreo (Harris *et al.*, 2001). Las entropías calculadas en cada ventana se ajustan empleando la relación empírica:

$$S(t) = S_\infty - \frac{\alpha}{t^n}$$

donde α y n son los parámetros del ajuste. Este procedimiento permite una estimación de S_∞ independiente de la longitud de la dinámica molecular. Los ajustes se hicieron utilizando el programa gnuplot 4.0

Tabla A2: Energías calculadas para la dinámica molecular MjFtsZ-GTP

1W5A---GTP	X-ray	MIN	10ns	20ns	30ns	40ns	50ns(ca)	50ns(cb)
$\Delta H_{\text{MM-GBSA}}$	-28.02	-165.76	-105.36	-104.93	-101.91	-99.27	-93.61	-106.95
σ	0.00	0.00	7.96	5.71	5.40	5.60	5.77	5.83
$-T\Delta S (t = \infty)$							5.30	2.98
$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$							-88.31	-103.97

Energías promedio MM-GBSA (y desviaciones estándar) calculadas a lo largo de las trayectorias de dinámica molecular en los últimos 500 ps para cada periodo de 10 ns para el complejo MjFtsZ-GTP (PDB: 1W5A). La entropía se estimó a $t = \infty$ (ver explicación en Tabla A1). Todas las unidades están en kcal/mol. ca – cadena A; cb – cadena B

Tabla A3: Energías MM-GBSA por residuo de la dinámica molecular MjFtsZ-GDP

2VAP---GDP	X-ray	MIN	10ns	20ns	30ns	40ns	50ns
A48	-8.78	-8.69	-2.55	-3.06	-3.20	-3.16	-3.62
T159	-0.60	-0.66	-3.35	-0.57	-0.77	-0.56	-0.66
F162	-0.48	-0.23	-1.43	-2.49	-1.16	-2.45	-1.44
F208	-7.13	-7.23	-2.96	-5.80	-5.54	-4.22	-4.89
A211	-0.24	-0.65	-2.72	-0.32	-0.25	-0.18	-0.40
D212	-10.07	-11.48	-3.61	-0.74	-0.25	-0.49	-1.01
G130	-2.84	-2.87	-2.43	-2.55	-2.40	-1.83	-1.82
L131	-1.48	-1.76	-2.99	-3.09	-2.93	-1.22	-2.42
G132	-2.23	-3.75	-3.22	-1.85	-1.75	-1.88	-1.54
P161	-2.28	-1.51	-2.07	-1.97	-1.80	-1.52	-1.26
R169	-7.67	-28.79	-15.46	-15.88	-16.31	-12.52	-16.52
G133	-6.83	-10.10	-7.80	-7.63	-7.57	-7.12	-7.59
G46	-7.80	-9.99	-1.70	-2.25	-2.33	-1.86	-2.17
G47	-8.31	-9.10	-1.48	-1.93	-2.10	-2.08	-2.19
G99	-1.02	-0.67	-1.70	-0.07	-0.03	-0.01	-0.02
G134	-6.76	-7.31	-8.85	-5.28	-8.29	-9.11	-8.21
T135	-8.59	-12.13	-12.84	-14.81	-15.29	-14.86	-15.57
G136	-6.05	-6.58	-4.38	-4.51	-4.21	-4.16	-4.13

Energías de unión calculadas por residuo a lo largo de la trayectoria de dinámica molecular para MjFtsZ-GDP. Se calcularon las energías promedio en los últimos 0.5 ns para cada periodo de 10 ns. Unidades en kcal/mol.

Tabla A4: Energías MM-GBSA por residuo de la dinámica molecular MjFtsZ-GTP

1W5A---GTP	X-ray	MIN	10ns	20ns	30ns	40ns	50ns (ca)	50ns (cb)
A48	-9.18	-4.33	-5.31	-7.53	-8.47	-8.17	-7.32	-2.95
N51	-0.45	0.64	-1.14	-0.90	-1.55	-0.97	-0.71	-0.09
F208	-6.25	-6.69	-1.20	-0.18	-0.09	-0.21	-0.15	-5.10
K209	-0.64	-0.77	-6.01	-5.76	-4.84	-4.44	-4.45	-0.87
D212	-8.18	-11.77	-1.54	-7.77	-7.85	-8.25	-8.37	-1.98
G130	-2.39	-2.31	-2.09	-2.75	-2.34	-2.46	-2.78	-2.08
L131	-1.59	-1.56	-1.16	-1.61	-1.37	-1.42	-1.22	-2.11
G132	-2.50	-3.58	-2.73	-3.26	-2.95	-2.62	-2.81	-3.46
F162	-0.38	-0.28	-1.33	-0.62	-0.14	-1.28	-1.19	-0.57
E165	0.81	-9.21	-5.61	0.30	0.98	-5.92	-1.47	-7.46
R169	-8.36	-24.2	-2.10	-6.08	-5.96	-0.93	-2.40	-20.12
G47	-7.75	-8.40	-7.65	-9.66	-9.40	-9.80	-8.69	-5.10
G133	-7.78	-12.04	-8.79	-8.50	-8.20	-8.26	-7.70	-8.72
C45	-1.42	-2.16	-1.12	-1.05	-1.19	-1.15	-0.99	-0.42
G46	-8.29	-8.19	-6.32	-7.37	-8.63	-8.08	-6.77	-4.66
N70	-1.04	-2.59	-1.61	-1.38	-2.01	-1.40	-0.12	-1.63
G134	-9.84	-15.11	-10.41	-9.95	-9.76	-10.13	-9.35	-9.30
T135	-4.56	-23.85	-19.81	-18.90	-19.58	-19.65	-17.97	-17.75
G136	-5.38	-6.16	-4.62	-4.72	-5.16	-5.06	-4.85	-4.50
G96	-5.09	-5.99	-6.28	-1.33	-0.09	-0.09	-0.10	-0.97
A97	-7.80	-8.71	-7.44	-1.79	-0.06	-0.06	-0.07	-0.89
G98	-2.58	-9.14	-4.01	-0.22	-0.01	-0.06	0.08	-1.25
G99	-5.13	-8.14	-5.27	-0.77	-0.33	-0.45	-0.10	-1.62
C129	-1.94	-1.24	-0.51	-1.76	-1.88	-1.92	-1.84	-1.63
T159	-0.48	-0.42	-1.09	-3.44	-1.44	-2.37	-2.92	-2.08

Energías de unión calculadas por residuo a lo largo de la trayectoria de dinámica molecular para MjFtsZ-GTP. Se calcularon las energías promedio en los últimos 0.5 ns para cada periodo de 10 ns. “ca” representa la cadena A de la estructura MjFtsZ-GTP-Mg²⁺ y “cb” la cadena B de la misma estructura Unidades en kcal/mol

Tabla A5: Contribuciones relativas de las partes del GDP a la unión a MjFtsZ

2VAP---GDP	X-ray	MIN	10ns	20ns	30ns	40ns	50ns
Guanina^a	30.21	23.19	18.42	15.99	13.81	14.52	15.00
Ribosa^b	13.18	16.02	21.41	21.08	19.65	16.80	17.56
Fosfato α^c	9.57	19.63	17.43	19.26	19.29	17.20	19.62
Fosfato β^d	47.04	41.16	42.74	43.67	47.30	51.48	47.82

Energías individuales de interacción (MM-GBSA) que se asignan a las diferentes partes del GDP. Se calculan las contribuciones promedio en los últimos 0.5 ns de cada periodo de 10 ns. Todos los valores están en términos del porcentaje del cambio de energía libre. Abajo se detallan los cálculos empleados para la asignación del peso de las interacciones en cada caso.

$$\begin{aligned}
 \text{a} \quad E(\text{Guanina}) &= E(\text{D212}) + E(\text{A211}) + E(\text{F208}) + \\
 &+ E(\text{A48}) + \frac{2}{3}E(\text{T159}) + \frac{2}{3}E(\text{F162})
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{b} \quad E(\text{Ribosa}) &= \frac{1}{3}E(\text{T159}) + \frac{1}{3}E(\text{F162}) + E(\text{P161}) + \\
 &+ E(\text{G130}) + E(\text{L131}) + E(\text{G132}) + \\
 &+ \frac{1}{3}E(\text{R169})
 \end{aligned}$$

$$\text{c} \quad E(\text{fosfato} - \alpha) = \frac{2}{3}E(\text{R169}) + \frac{1}{2}E(\text{G133})$$

$$\begin{aligned}
 \text{d} \quad E(\text{fosfato} - \beta) &= \frac{1}{2}E(\text{G133}) + E(\text{G46}) + E(\text{G47}) + \\
 &+ E(\text{C99}) + E(\text{G134}) + E(\text{T135}) + \\
 &+ E(\text{G136})
 \end{aligned}$$

Tabla A6: Contribuciones relativas de las partes del GTP a la unión a MjFtsZ

1W5A---GTP	X-ray	MIN	10ns	20ns	30ns	40ns	50ns (ca)	50ns (cb)
Guanina^a	17.90	12.41	10.11	19.00	17.60	18.78	20.74	12.11
Ribosa^b	15.06	24.55	15.75	15.67	14.50	16.00	14.70	35.00
Fosfato α^c	9.01	3.83	5.44	8.36	9.40	8.87	9.00	4.21
Fosfato β^d	33.78	16.72	29.25	33.74	37.00	35.75	34.29	25.54
Fosfato γ^e	24.26	33.85	39.45	23.23	21.50	20.61	21.27	23.14

Energías individuales de interacción (MM-GBSA) que se asignan a las diferentes partes del GTP. Se calculan contribuciones medias en los últimos 0.5 ns de cada periodo de 10 ns. Todos los valores están en términos del porcentaje del cambio de energía libre. “ca” y “cb” representan la cadena A y B de FtsZ en la estructura 1W5A, respectivamente. Abajo se desglosan los cálculos empleados para la asignación del peso de las interacciones en cada caso

$$\begin{aligned}
 E(\text{Guanina}) &= \frac{1}{2} E_{hyd}(\text{A48}) + E(\text{N51}) + E(\text{F208}) + \\
 &+ \left[\frac{1}{2} E_{elec} + E_{hyd} \right] (\text{K209}) + E(\text{D212}) + E(\text{C129}) + \\
 &+ E(\text{T159})
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 E(\text{Ribosa}) &= \frac{1}{2} E_{hyd}(\text{A48}) + E(\text{G130}) + E(\text{L131}) + \\
 &+ E(\text{G132}) + E(\text{F162}) + E(\text{E165}) + \\
 &+ E(\text{R169}) + \frac{1}{2} E_{elec}(\text{K209})
 \end{aligned}$$

$$E(\text{fosfato} - \alpha) = E_{hyd}(\text{G47}) + E_{elec}(\text{A48}) + \frac{1}{3} E(\text{G133})$$

$$\begin{aligned}
 E(\text{fosfato} - \beta) &= E(\text{C45}) + E(\text{G46}) + E_{elec}(\text{G47}) + \\
 &+ E(\text{N70}) + \frac{1}{3} E(\text{G133}) + E(\text{G134}) + \\
 &+ E_{hyd}(\text{T135}) + E(\text{G136})
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 E(\text{fosfato} - \gamma) &= E(\text{G96}) + E(\text{A97}) + E(\text{G98}) + \\
 &+ E(\text{G99}) + \frac{1}{3} E(\text{G133}) + E_{elec}(\text{T135})
 \end{aligned}$$

Tabla A7: Cálculos para aproximar la contribución parcial de la ribosa y la guanina a la unión de GTP

Modificación de grupo	parte del GTP	$\Delta\Delta G^0$ kcal·mol⁻¹
PPPi → ATP	"ribosa"	-1.47
PPPi → CTP	"ribosa"	-1.72
PPPi → UTP	"ribosa"	-1.69
PPPi → NTP	"ribosa"_{med}	-1.63±0.14
ATP → GTP	"guanina"	-3.21
CTP → GTP	"guanina"	-2.96
UTP → GTP	"guanina"	-2.99
NTP → GTP	"guanina"_{med}	-3.05±0.14

Aproximación de la contribución parcial de la ribosa y la guanina a la unión del GTP suponiendo que bases diferentes de la guanina no contribuyen a la unión. La modificación de ligando indica las energías libres de unión empleadas en el cálculo (ver texto). Las $\Delta\Delta G^0$ de guanina_{med} y ribosa_{med} son la media de las tres $\Delta\Delta G^0$ calculadas con los tres ligandos (ATP, CTP y UTP) y están insertados en la Tabla 6.

BIBLIOGRAFÍA

- Adachi, S., K. Hori y S. Hiraga, (2006) Subcellular Positioning of F Plasmid Mediated by Dynamic Localization of SopA and SopB. *J. Mol. Biol.* **356**: 850-863.
- Adams, D. W. y J. Errington, (2009) Bacterial cell division: assembly, maintenance and disassembly of the Z ring. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**: 642-653.
- Addinall, S. G., C. Cao y J. Lutkenhaus, (1997) FtsN, a late recruit to the septum in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **25**: 303-309.
- Addinall, S. G. y J. Lutkenhaus, (1996) FtsA is localized to the septum in an FtsZ-dependent manner. *J. Bacteriol.* **178**: 7167-7172.
- Anderson, D. E., F. J. Gueiros-Filho y H. P. Erickson, (2004) Assembly dynamics of FtsZ rings in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* and effects of FtsZ-regulating proteins. *J. Bacteriol.* **186**: 5775-5781.
- Andreu, D., J. Ubach, A. Boman, B. Wahlin, D. Wade, R. B. Merrifield y H. G. Boman, (1992) Shortened cecropin-a melittin hybrids - significant size-reduction retains potent antibiotic-activity. *FEBS Lett.* **296**: 190-194.
- Andreu, J. M., M. A. Oliva y O. Monasterio, (2002) Reversible unfolding of FtsZ cell division proteins from archaea and bacteria. *J. Biol. Chem.* **277**: 43262-43270.
- Andreu, J. M., C. Schaffner-Barbero, S. Huecas, D. Alonso, M. L. Lopez-Rodriguez, L. B. Ruiz-Avila, R. Nunez-Ramirez, O. Llorca y A. J. Martin-Galiano, (2010) The antibacterial cell division inhibitor PC190723 is a FtsZ polymer stabilizing agent which induces filament assembly and condensation. *J. Biol. Chem.* **285**: 14239-14246.
- Andreu, J. M. y S. N. Timasheff, (1982) Interaction of tubulin with single ring analogs of colchicine. *Biochemistry* **21**: 534-543.
- Ausmees, N., J. R. Kuhn y C. Jacobs-Wagner, (2003) The bacterial cytoskeleton: An intermediate filament-like function. *Cell* **115**: 705-713.
- Aussel, L., F. X. Barre, M. Aroyo, A. Stasiak, A. Z. Stasiak y D. Sherratt, (2002) FtsK is a DNA motor protein that activates chromosome dimer resolution by switching the catalytic state of the XerC and XerD recombinases. *Cell* **108**: 195-205.
- Bagchi, S., H. Tomenius, L. M. Belova y N. Ausmees, (2008) Intermediate filament-like proteins in bacteria and a cytoskeletal function in *Streptomyces*. *Mol. Microbiol.* **70**: 1037-1050.
- Barasoain, I., A. M. Garcia-Carril, R. Matesanz, G. Maccari, C. Trigili, M. Mori, J. Z. Shi, W. S. Fang, J. M. Andreu, M. Botta y J. F. Diaz, (2010) Probing the Pore Drug Binding Site of Microtubules with Fluorescent Taxanes: Evidence of Two Binding Poses. *Chem. Biol.* **17**: 243-253.
- Bell-Pedersen, D., V. M. Cassone, D. J. Earnest, S. S. Golden, P. E. Hardin, T. L. Thomas y M. J. Zoran, (2005) Circadian rhythms from multiple oscillators: lessons from diverse organisms. *Nat Rev Genet* **6**: 544-556.
- Bernhardt, T. G. y P. A. J. de Boer, (2005) SimA, a nucleoid-associated, FtsZ binding protein required for blocking septal ring assembly over chromosomes in *E. coli*. *Mol. Cell* **18**: 555-564.
- Beuria, T. K., M. K. Santra y D. Panda, (2005) Sanguinarine blocks cytokinesis in bacteria by inhibiting FtsZ assembly and bundling. *Biochemistry* **44**: 16584-16593.
- Beuria, T. K., P. Singh, A. Surolia y D. Panda, (2009) Promoting assembly and bundling of FtsZ as a strategy to inhibit bacterial cell division: a new approach for developing novel antibacterial drugs. *Biochem. J.* **423**.

- Bi, E. y J. Lutkenhaus, (1991) FtsZ ring structure associated with division in *Escherichia coli*. *Nature* **354**: 161-164.
- Bi, E. y J. Lutkenhaus, (1993) Cell-division inhibitors SulA and MinCD prevent formation of the FtsZ ring. *J. Bacteriol.* **175**: 1118-1125.
- Buddelmeijer, N., N. Judson, D. Boyd, J. J. Mekalanos y J. Beckwith, (2002) YgbQ, a cell division protein in *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae*, localizes in codependent fashion with FtsL to the division site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**: 6316-6321.
- Buey, R. M., J. F. Diaz, J. M. Andreu, A. O'Brate, P. Giannakakou, K. C. Nicolaou, P. K. Sasmal, A. Ritzen y K. Namoto, (2004) Interaction of epothilone analogs with the paclitaxel binding site: Relationship between binding affinity, microtubule stabilization, and cytotoxicity. *Chem. Biol.* **11**: 225-236.
- Burchard, A. C., R. P. Burchard y J. A. Kloetzel, (1977) Intracellular, periodic structures in gliding bacterium *Myxococcus-xanthus*. *J. Bacteriol.* **132**: 666-672.
- Camberg, J. L., J. R. Hoskins y S. Wickner, (2009) ClpXP protease degrades the cytoskeletal protein, FtsZ, and modulates FtsZ polymer dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**: 10614-10619.
- Case, D. A., Darden, T. A., Cheatham, T. E., Simmerling, C. L., Wang, J., Duke, R. E., Luo, R., Crowley, M., Walker, R. C., Zhang, W., Merz, K. M., Wang, B., Hayik, S., Roitberg, A., Seabra, G., Kolossváry, I., Wong, K. F., Paesani, F., Vanicek, J., Wu, X., Brozell, S. R., Steinbrecher, T., Gohlke, H., Yang, L., Tan, C., Mongan, J., Hornak, V., Cui, G., Mathews, D. H., Seetin, M. G., Sagui, C., Babin, V., and Kollman, P. A., (2008) AMBER 10. In.: University of California, San Francisco, pp.
- Cordell, S. C., E. J. H. Robinson y J. Lowe, (2003) Crystal structure of the SOS cell division inhibitor SulA and in complex with FtsZ. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**: 7889-7894.
- Correia, J. J., L. T. Baty y R. C. Williams, (1987) Mg-2+ dependence of guanine-nucleotide binding to tubulin. *J. Biol. Chem.* **262**: 17278-17284.
- Croom, H. B., J. J. Correia, L. T. Baty y R. C. Williams, (1985) Release of exchangeably bound guanine nucleotides from tubulin in a magnesium-free buffer. *Biochemistry* **24**: 768-775.
- Czaplewski, L. G., I. Collins, E. A. Boyd, D. Brown, S. P. East, M. Gardiner, R. Fletcher, D. J. Haydon, V. Henstock, P. Ingram, C. Jones, C. Noula, L. Kennison, C. Rockley, V. Rose, H. B. Thomaidis-Brears, R. Ure, M. Whittaker y N. R. Stokes, (2009) Antibacterial alkoxybenzamide inhibitors of the essential bacterial cell division protein FtsZ. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **19**: 524-527.
- Chen, J. C., D. S. Weiss, J. M. Ghigo y J. Beckwith, (1999) Septal localization of FtsQ, an essential cell division protein in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **181**: 521-530.
- Chen, Y. D. y H. P. Erickson, (2005) Rapid in vitro assembly dynamics and subunit turnover of FtsZ demonstrated by fluorescence resonance energy transfer. *J. Biol. Chem.* **280**: 22549-22554.
- Chen, Y. D. y H. P. Erickson, (2008) In vitro assembly studies of FtsZ/Tubulin-like proteins (TubZ) from *Bacillus* plasmids - Evidence for a capping mechanism. *J. Biol. Chem.* **283**: 8102-8109.
- Chung, K. M., H. H. Hsu, S. Govindan y B. Y. Chang, (2004) Transcription regulation of *ezaA* and its effect on cell division of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **186**: 5926-5932.

- Chung, K. M., H. H. Hsu, H. Y. Yeh y B. Y. Chang, (2007) Mechanism of regulation of prokaryotic tubulin-like GTPase FtsZ by membrane protein EzrA. *J. Biol. Chem.* **282**: 14891-14897.
- Dajkovic, A., A. Mukherjee y J. Lutkenhaus, (2008) Investigation of regulation of FtsZ assembly by SulA and development of a model for FtsZ polymerization. *J. Bacteriol.* **190**: 2513-2526.
- Daniel, R. A. y J. Errington, (2000) Intrinsic instability of the essential cell division protein FtsL of *Bacillus subtilis* and a role for DivIB protein in FtsL turnover. *Mol. Microbiol.* **36**: 278-289.
- de Boer, P., R. Crossley y L. Rothfield, (1992a) The essential bacterial cell-division protein FtsZ is GTPase. *Nature* **359**: 254-256.
- de Boer, P. A. J., R. E. Crossley y L. I. Rothfield, (1989) A division inhibitor and a topological specificity factor coded for by the minicell locus determine proper placement of the division septum in *Escherichia coli*. *Cell* **56**: 641-649.
- de Boer, P. A. J., R. E. Crossley y L. I. Rothfield, (1990) Central role for the *Escherichia coli* MinC gene-product in 2 different cell division-inhibition systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**: 1129-1133.
- de Boer, P. A. J., R. E. Crossley y L. I. Rothfield, (1992b) Roles of MinC and MinD in the site-specific septation block mediated by the MinCDE system of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **174**: 63-70.
- de Pereda, J. M., D. Leynadier, J. A. Evangelio, P. Chacon y J. M. Andreu, (1996) Tubulin secondary structure analysis, limited proteolysis sites, and homology to FtsZ. *Biochemistry* **35**: 14203-14215.
- Derouaux, A., B. Wolf, C. Fraipont, E. Breukink, M. Nguyen-Disteche y M. Terrak, (2008) The monofunctional glycosyltransferase of *Escherichia coli* localizes to the cell division site and interacts with penicillin-binding protein 3, FtsW, and FtsN. *J. Bacteriol.* **190**: 1831-1834.
- Devoe, H. y S. P. Wasik, (1984) Aqueous solubilities and enthalpies of solution of Adenine and Guanine. *J. Solution Chem.* **13**: 51-60.
- Diaz, J. F. y R. M. Buey, (2007) Characterizing ligand-microtubule binding by competition methods. *Methods Mol Med* **137**: 245-260.
- Diaz, J. F., M. Menendez y J. M. Andreu, (1993) Thermodynamics of ligand-induced assembly of tubulin. *Biochemistry* **32**: 10067-10077.
- Dietrich, S. A., R. Lindauer, C. Stierlin, J. Gertsch, R. Matesanz, S. Netararigo, J. F. Diaz y K. H. Altmann, (2009) Etoposide Analogues with Benzimidazole and Quinoline Side Chains: Chemical Synthesis, Antiproliferative Activity, and Interactions with Tubulin. *Chem. Eur. J.* **15**: 10144-10157.
- Domadia, P., S. Swarup, A. Bhunia, J. Sivaraman y D. Dasgupta, (2007) Inhibition of bacterial cell division protein FtsZ by cinnamaldehyde. *Biochem. Pharmacol.* **74**: 831-840.
- Domadia, P. N., A. Bhunia, J. Sivaraman, S. Swarup y D. Dasgupta, (2008) Berberine targets assembly of *Escherichia coli* cell division protein FtsZ. *Biochemistry* **47**: 3225-3234.
- Dong, G., Q. Yang, Q. Wang, Y.-I. Kim, T. L. Wood, K. W. Osteryoung, A. van Oudenaarden y S. S. Golden, (2010) Elevated ATPase Activity of KaiC Applies a Circadian Checkpoint on Cell Division in *Synechococcus elongatus*. *Cell* **140**: 529-539.

- Draper, G. C., N. McLennan, K. Begg, M. Masters y W. D. Donachie, (1998) Only the N-terminal domain of FtsK functions in cell division. *J. Bacteriol.* **180**: 4621-4627.
- Dziedzic, R., M. Kiran, P. Plocinski, M. Ziolkiewicz, A. Brzostek, M. Moomey, I. S. Vadrevu, J. Dziadek, M. Madiraju y M. Rajagopalan, (2010) *Mycobacterium tuberculosis* ClpX Interacts with FtsZ and Interferes with FtsZ Assembly. *PLoS ONE* **5**: e11058.
- Eberhardt, C., L. Kuerschner y D. S. Weiss, (2003) Probing the catalytic activity of a cell division-specific transpeptidase in vivo with beta-lactams. *J. Bacteriol.* **185**: 3726-3734.
- Ebersbach, G., E. Galli, J. Moller-Jensen, J. Lowe y K. Gerdes, (2008) Novel coiled-coil cell division factor ZapB stimulates Z ring assembly and cell division. *Mol. Microbiol.* **68**: 720-735.
- Ebersbach, G. y K. Gerdes, (2004) Bacterial mitosis: partitioning protein ParA oscillates in spiral-shaped structures and positions plasmids at mid-cell. *Mol. Microbiol.* **52**: 385-398.
- Edwards, D. H. y J. Errington, (1997) The *Bacillus subtilis* DivIVA protein targets to the division septum and controls the site specificity of cell division. *Mol. Microbiol.* **24**: 905-915.
- Erickson, H. P., (1995) Ftsz, a prokaryotic homolog of tubulin. *Cell* **80**: 367-370.
- Erickson, H. P., (2009) Modeling the physics of FtsZ assembly and force generation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**: 9238-9243.
- Erickson, H. P., D. W. Taylor, K. A. Taylor y D. Bramhill, (1996) Bacterial cell division protein FtsZ assembles into protofilament sheets and minirings, structural homologs of tubulin polymers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**: 519-523.
- Fauchere, J. L., M. Charton, L. B. Kier, A. Verloop y V. Pliska, (1988) Amino-acid side-chain parameters for correlation studies in biology and pharmacology. *Int. J. Pept. Protein Res.* **32**: 269-278.
- Feucht, A., I. Lucet, M. D. Yudkin y J. Errington, (2001) Cytological and biochemical characterization of the FtsA cell division protein of *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **40**: 115-125.
- Fu, G., T. Huang, J. Buss, C. Coltharp, Z. Hensel y X. A. Jie, (2010) In Vivo Structure of the *E. coli* FtsZ-ring Revealed by Photoactivated Localization Microscopy (PALM). *Plos One* **5**.
- Gerdes, K., J. Moller-Jensen y R. B. Jensen, (2000) Plasmid and chromosome partitioning: surprises from phylogeny. *Mol. Microbiol.* **37**: 455-466.
- Gerding, M. A., B. Liu, F. O. Bendezu, C. A. Hale, T. G. Bernhardt y P. A. J. de Boer, (2009) Self-Enhanced Accumulation of FtsN at Division Sites and Roles for Other Proteins with a SPOR Domain (DamX, DedD, and RlpA) in *Escherichia coli* Cell Constriction. *J. Bacteriol.* **191**: 7383-7401.
- Gil-Redondo, R., J. Estrada, A. Morreale, F. Herranz, J. Sancho y A. Ortiz, (2009) VSDMIP: virtual screening data management on an integrated platform. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **23**: 171-184.
- Gill, S. C. y P. H. von Hippel, (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino-acid sequence data. *Anal. Biochem.* **182**: 319-326.
- Goehring, N. W. y J. Beckwith, (2005) Diverse paths to midcell: Assembly of the bacterial cell division machinery. *Curr. Biol.* **15**: R514-R526.

- Goehring, N. W., M. D. Gonzalez y J. Beckwith, (2006) Premature targeting of cell division proteins to midcell reveals hierarchies of protein interactions involved in divisome assembly. *Mol. Microbiol.* **61**: 33-45.
- Goley, E. D., N. A. Dye, J. N. Werner, Z. Gitai y L. Shapiro, (2010) Imaging-Based Identification of a Critical Regulator of FtsZ Protofilament Curvature in *Caulobacter*. *Mol. Cell* **39**: 975-987.
- González, J. M., M. Jiménez, M. Vélez, J. Mingorance, J. M. Andreu, M. Vicente y G. Rivas, (2003) Essential Cell Division Protein FtsZ Assembles into One Monomer-thick Ribbons under Conditions Resembling the Crowded Intracellular Environment. *J. Biol. Chem.* **278**: 37664-37671.
- Gordon, J. C., J. B. Myers, T. Folta, V. Shoja, L. S. Heath y A. Onufriev, (2005) H⁺⁺: a server for estimating pK(a)s and adding missing hydrogens to macromolecules. *Nucleic Acids Res.* **33**: W368-W371.
- Gueiros, F. J. y R. Losick, (2002) A widely conserved bacterial cell division protein that promotes assembly of the tubulin-like protein FtsZ. *Genes Dev.* **16**: 2544-2556.
- Haeusser, D. P., A. C. Garza, A. Z. Buscher y P. A. Levin, (2007) The division inhibitor EzrA contains a seven-residue patch required for maintaining the dynamic nature of the medial FtsZ ring. *J. Bacteriol.* **189**: 9001-9010.
- Haeusser, D. P., A. H. Lee, R. B. Weart y P. A. Levin, (2009) ClpX Inhibits FtsZ Assembly in a Manner That Does Not Require Its ATP Hydrolysis-Dependent Chaperone Activity. *J. Bacteriol.* **191**: 1986-1991.
- Haeusser, D. P., R. L. Schwartz, A. M. Smith, M. E. Oates y P. A. Levin, (2004) EzrA prevents aberrant cell division by modulating assembly of the cytoskeletal protein FtsZ. *Mol. Microbiol.* **52**: 801-814.
- Hale, C. A. y P. A. J. de Boer, (1997) Direct binding of FtsZ to ZipA, an essential component of the septal ring structure that mediates cell division in *E. coli*. *Cell* **88**: 175-185.
- Hale, C. A. y P. A. J. de Boer, (1999) Recruitment of ZipA to the septal ring of *Escherichia coli* is dependent on FtsZ and independent of FtsA. *J. Bacteriol.* **181**: 167-176.
- Hale, C. A. y P. A. J. de Boer, (2002) ZipA is required for recruitment of FtsK, FtsQ, FtsL, and FtsN to the septal ring in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **184**: 2552-2556.
- Hale, C. A., A. C. Rhee y P. A. J. de Boer, (2000) ZipA-induced bundling of FtsZ polymers mediated by an interaction between C-terminal domains. *J. Bacteriol.* **182**: 5153-5166.
- Hamoen, L. W., J. C. Meile, W. de Jong, P. Noirot y J. Errington, (2006) SepF, a novel FtsZ-interacting protein required for a late step in cell division. *Mol. Microbiol.* **59**: 989-999.
- Handler, A. A., J. E. Lim y R. Losick, (2008) Peptide inhibitor of cytokinesis during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **68**: 588-599.
- Harris, S. A., E. Gavathiotis, M. S. Searle, M. Orozco y C. A. Laughton, (2001) Cooperativity in drug-DNA recognition: A molecular dynamics study. *J. Am. Chem. Soc.* **123**: 12658-12663.
- Haydon, D. J., J. M. Bennett, D. Brown, I. Collins, G. Galbraith, P. Lancett, R. Macdonald, N. R. Stokes, P. K. Chauhan, J. K. Sutariya, N. Nayal, A. Srivastava, J. Beanland, R. Hall, V. Henstock, C. Noula, C. Rockley y L. Czaplewski, (2010) Creating an Antibacterial with in Vivo Efficacy: Synthesis

- and Characterization of Potent Inhibitors of the Bacterial Cell Division Protein FtsZ with Improved Pharmaceutical Properties. *J. Med. Chem.* **53**: 3927-3936.
- Haydon, D. J., N. R. Stokes, R. Ure, G. Galbraith, J. M. Bennett, D. R. Brown, P. J. Baker, V. V. Barynin, D. W. Rice, S. E. Sedelnikova, J. R. Heal, J. M. Sheridan, S. T. Aiwale, P. K. Chauhan, A. Srivastava, A. Taneja, I. Collins, J. Errington y L. G. Czaplewski, (2008) An inhibitor of FtsZ with potent and selective anti-staphylococcal activity. *Science* **321**: 1673-1675.
- Henriques, A. O., P. Glaser, P. J. Piggot y C. P. Moran, (1998) Control of cell shape and elongation by the rodA gene in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **28**: 235-247.
- Hirota, Y., A. Ryter y F. Jacob, (1968) Thermosensitive mutants of *E. coli* affected in processes of DNA synthesis and cellular division. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **33**: 677-&.
- Honig, B. y A. Nicholls, (1995) Classical electrostatics in biology and chemistry. *Science* **268**: 1144-1149.
- Hritz, J., T. Lippchen y C. Oostenbrink, (2010) Calculations of binding affinity between C8-substituted GTP analogs and the bacterial cell-division protein FtsZ. *Eur. Biophys. J.*: 1-8.
- Hu, Z. L., E. P. Gogol y J. Lutkenhaus, (2002) Dynamic assembly of MinD on phospholipid vesicles regulated by ATP and MinE. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**: 6761-6766.
- Hu, Z. L., A. Mukherjee, S. Pichoff y J. Lutkenhaus, (1999) The MinC component of the division site selection system in *Escherichia coli* interacts with FtsZ to prevent polymerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**: 14819-14824.
- Huang, Q., F. Kirikae, T. Kirikae, A. Pepe, A. Amin, L. Respicio, R. A. Slayden, P. J. Tonge y I. Ojima, (2006) Targeting FtsZ for antituberculosis drug discovery: Noncytotoxic taxanes as novel antituberculosis agents. *J. Med. Chem.* **49**: 463-466.
- Huecas, S. y J. M. Andreu, (2003) Energetics of the cooperative assembly of cell division protein FtsZ and the nucleotide hydrolysis switch. *J. Biol. Chem.* **278**: 46146-46154.
- Huecas, S. y J. M. Andreu, (2004) Polymerization of nucleotide-free, GDP- and GTP-bound cell division protein FtsZ: GDP makes the difference. *FEBS Lett.* **569**: 43-48.
- Huecas, S., O. Llorca, J. Boskovic, J. Martin-Benito, J. M. Valpuesta y J. M. Andreu, (2008) Energetics and geometry of FtsZ polymers: Nucleated self-assembly of single protofilaments. *Biophys. J.* **94**: 1796-1806.
- Huecas, S., C. Schaffner-Barbero, W. Garcia, H. Yebenes, J. M. Palacios, J. F. Diaz, M. Menendez y J. M. Andreu, (2007) The interactions of cell division protein FtsZ with guanine nucleotides. *J Biol Chem* **282**: 37515-37528.
- Huisman, O. y R. D'Ari, (1981) An inducible DNA replication-cell division coupling mechanism in *Escherichia coli*. *Nature* **290**: 797-799.
- Humphrey, W., A. Dalke y K. Schulten, (1996) VMD: Visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.* **14**: 33-&.
- Irwin, J. J. y B. K. Shoichet, (2005) ZINC - A free database of commercially available compounds for virtual screening. *J Chem Inf Model* **45**: 177-182.
- Ishikawa, S., Y. Kawai, K. Hiramatsu, M. Kuwano y N. Ogasawara, (2006) A new FtsZ-interacting protein, YlmF, complements the activity of FtsA during progression of cell division in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **60**: 1364-1380.

- Ito, H., A. Ura, Y. Oyamada, A. Tanitame, H. Yoshida, S. Yamada, M. Wachi y J. Yamagishi, (2006) A 4-aminofurazan derivative-A189-inhibits assembly of bacterial cell division protein FtsZ in vitro and in vivo. *Microbiol. Immunol.* **50**: 759-764.
- Izard, J., W. A. Samsonoff, M. B. Kinoshita y R. J. Limberger, (1999) Genetic and structural analyses of cytoplasmic filaments of wild-type *Treponema phagedenis* and a flagellar filament-deficient mutant. *J. Bacteriol.* **181**: 6739-6746.
- Jaiswal, R., T. K. Beuria, R. Mohan, S. K. Mahajan y D. Panda, (2007) Totarol inhibits bacterial cytokinesis by perturbing the assembly dynamics of FtsZ. *Biochemistry* **46**: 4211-4220.
- Janion, C., (2008) Inducible SOS Response System of DNA Repair and Mutagenesis in *Escherichia coli*. *International Journal of Biological Sciences* **4**: 338-344.
- Jenkins, C., R. Samudrala, I. Anderson, B. P. Hedlund, G. Petroni, N. Michailova, N. Pinel, R. Overbeek, G. Rosati y J. T. Staley, (2002) Genes for the cytoskeletal protein tubulin in the bacterial genus *Prostheco bacter*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**: 17049-17054.
- Johnson, J. E., L. L. Lackner, C. A. Hale y P. A. J. de Boer, (2004) ZipA is required for targeting of (D)MinC/DicB, but not (D)MinC/MinD, complexes to septal ring assemblies in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **186**: 2418-2429.
- Jordan, M. A. y L. Wilson, (2004) Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nature Reviews Cancer* **4**: 253-265.
- Jorgensen, W. L., J. Chandrasekhar, J. D. Madura, R. W. Impey y M. L. Klein, (1983) Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.* **79**: 926-935.
- Jorgensen, W. L. y E. M. Duffy, (2002) Prediction of drug solubility from structure. *Adv. Drug Del. Rev.* **54**: 355-366.
- Karimova, G., N. Dautin y D. Ladant, (2005) Interaction network among *Escherichia coli* membrane proteins involved in cell division as revealed by bacterial two-hybrid analysis. *J. Bacteriol.* **187**: 2233-2243.
- Karplus, M. y J. N. Kushick, (1981) Method for estimating the configurational entropy of macromolecules. *Macromolecules* **14**: 325-332.
- Kawai, Y., S. Moriya y N. Ogasawara, (2003) Identification of a protein, YneA, responsible for cell division suppression during the SOS response in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **47**: 1113-1122.
- Klieneberger, E., (1935) The natural occurrence of pleuropneumonia-like organisms in apparent symbiosis with *Streptobacillus moniliformis* and other bacteria. *J. Pathol. Bacteriol.* **40**: 93-105.
- Kollman, P. A., I. Massova, C. Reyes, B. Kuhn, S. H. Huo, L. Chong, M. Lee, T. Lee, Y. Duan, W. Wang, O. Donini, P. Cieplak, J. Srinivasan, D. A. Case y T. E. Cheatham, (2000) Calculating structures and free energies of complex molecules: Combining molecular mechanics and continuum models. *Acc. Chem. Res.* **33**: 889-897.
- Komeili, A., Z. Li, D. K. Newman y G. J. Jensen, (2006) Magnetosomes are cell membrane invaginations organized by the actin-like protein MamK. *Science* **311**: 242-245.
- Kong, C. G., K. Ito, M. A. Walsh, M. Wada, Y. Y. Liu, S. Kumar, D. Barford, Y. Nakamura y H. W. Song, (2004) Crystal structure and functional analysis of the eukaryotic class II release factor eRF3 from *S. pombe*. *Mol. Cell* **14**: 233-245.

- Koonin, E. V., (1993) A superfamily of ATPases with diverse functions containing either classical or deviant ATP-binding motif. *J. Mol. Biol.* **229**: 1165-1174.
- Kuntz, I. D., J. M. Blaney, S. J. Oatley, R. Langridge y T. E. Ferrin, (1982) A geometric approach to macromolecule-ligand interactions. *J. Mol. Biol.* **161**: 269-288.
- Kuroda, A., Y. Asami y J. Sekiguchi, (1993) Molecular cloning of a sporulation-specific cell wall hydrolase gene of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **175**: 6260-6268.
- Lackner, L. L., D. M. Raskin y P. A. J. de Boer, (2003) ATP-dependent interactions between *Escherichia coli* Min proteins and the phospholipid membrane in vitro. *J. Bacteriol.* **185**: 735-749.
- Lakowicz, J. R., (1999) *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, p. 15-16. Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York.
- Lan, G. H., B. R. Daniels, T. M. Dobrowsky, D. Wirtz y S. X. Sun, (2009) Condensation of FtsZ filaments can drive bacterial cell division. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**: 121-126.
- Lappchen, T., A. F. Hartog, V. A. Pinas, G. J. Koomen y T. den Blaauwen, (2005) GTP analogue inhibits polymerization and GTPase activity of the bacterial protein FtsZ without affecting its eukaryotic homologue tubulin. *Biochemistry* **44**: 7879-7884.
- Lappchen, T., V. A. Pinas, A. F. Hartog, G. J. Koomen, C. Schaffner-Barbero, J. M. Andreu, D. Trambaiolo, J. Lowe, A. Juhem, A. V. Popov y T. den Blaauwen, (2008) Probing FtsZ and tubulin with C8-substituted GTP analogs reveals differences in their nucleotide binding sites. *Chem. Biol.* **15**: 189-199.
- Lara, B., A. I. Rico, S. Petruzzelli, A. Santona, J. Dumas, J. Biton, M. Vicente, J. Mingorance y O. Massidda, (2005) Cell division in cocci: localization and properties of the *Streptococcus pneumoniae* FtsA protein. *Mol. Microbiol.* **55**: 699-711.
- Larsen, R. A., C. Cusumano, A. Fujioka, G. Lim-Fong, P. Patterson y J. Pogliano, (2007) Treadmilling of a prokaryotic tubulin-like protein, TubZ, required for plasmid stability in *Bacillus thuringiensis*. *Genes Dev.* **21**: 1340-1352.
- Leaver, M., P. Dominguez-Cuevas, J. M. Coxhead, R. A. Daniel y J. Errington, (2009) Life without a wall or division machine in *Bacillus subtilis*. *Nature* **457**: 849-853.
- Levin, P. A., I. G. Kurtser y A. D. Grossman, (1999) Identification and characterization of a negative regulator of FtsZ ring formation in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**: 9642-9647.
- Levin, P. A., R. L. Schwartz y A. D. Grossman, (2001) Polymer stability plays an important role in the positional regulation of FtsZ. *J. Bacteriol.* **183**: 5449-5452.
- Li, Z., M. J. Trimble, Y. V. Brun y G. J. Jensen, (2007) The structure of FtsZ filaments in vivo suggests a force-generating role in cell division. *EMBO J.* **26**: 4694-4708.
- Lindas, A. C., E. A. Karlsson, M. T. Lindgren, T. J. G. Ettema y R. Bernander, (2008) A unique cell division machinery in the Archaea. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**: 18942-18946.
- Liu, Z., A. Mukherjee y J. Lutkenhaus, (1999) Recruitment of ZipA to the division site by interaction with FtsZ. *Mol. Microbiol.* **31**: 1853-1861.
- Low, H. H., M. C. Moncrieffe y J. Lowe, (2004) The crystal structure of ZapA and its modulation of FtsZ polymerisation. *J. Mol. Biol.* **341**: 839-852.

- Löwe, J., (1998) Crystal structure determination of FtsZ from *Methanococcus jannaschii*. *J. Struct. Biol.* **124**: 235-243.
- Löwe, J. y L. A. Amos, (1998) Crystal structure of the bacterial cell-division protein FtsZ. *Nature* **391**: 203-206.
- Löwe, J. y L. A. Amos, (1999) Tubulin-like protofilaments in Ca²⁺-induced FtsZ sheets. *EMBO J.* **18**: 2364-2371.
- Löwe, J. y L. A. Amos, (2009) Evolution of cytomotive filaments: The cytoskeleton from prokaryotes to eukaryotes. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **41**: 323-329.
- Löwe, J., A. Ellonen, M. D. Allen, C. Atkinson, D. J. Sherratt y I. Grainge, (2008) Molecular mechanism of sequence-directed DNA loading and translocation by FtsK. *Mol. Cell* **31**: 498-509.
- Lu, C. L., M. Reedy y H. P. Erickson, (2000) Straight and curved conformations of FtsZ are regulated by GTP hydrolysis. *J. Bacteriol.* **182**: 164-170.
- Lluch-Senar, M., E. Querol y J. Piñol, (2010) Cell division in a minimal bacterium in the absence of ftsZ. *Mol. Microbiol.*: no-no.
- Ma, L. Y., G. F. King y L. Rothfield, (2004) Positioning of the MinE binding site on the MinD surface suggests a plausible mechanism for activation of the *Escherichia coli* MinD ATPase during division site selection. *Mol. Microbiol.* **54**: 99-108.
- Ma, X. L. y W. Margolin, (1999) Genetic and functional analyses of the conserved C-terminal core domain of *Escherichia coli* FtsZ. *J. Bacteriol.* **181**: 7531-7544.
- Margalit, D. N., L. Romberg, R. B. Mets, A. M. Hebert, T. J. Mitchison, M. W. Kirschner y D. RayChaudhuri, (2004) Targeting cell division: Small-molecule inhibitors of FtsZ GTPase perturb cytokinetic ring assembly and induce bacterial lethality (vol 101, pg 11821, 2004). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**: 13969-13969.
- Marston, A. L., H. B. Thomaidis, D. H. Edwards, M. E. Sharpe y J. Errington, (1998) Polar localization of the MinD protein of *Bacillus subtilis* and its role in selection of the mid-cell division site. *Genes Dev.* **12**: 3419-3430.
- Martín-Galiano, A. J., R. M. Buey, M. Cabezas y J. M. Andreu, (2010) Mapping Flexibility and the Assembly Switch of Cell Division Protein FtsZ by Computational and Mutational Approaches. *J. Biol. Chem.* **285**: 22554-22565.
- Mercer, K. L. N. y D. S. Weiss, (2002) The *Escherichia coli* cell division protein FtsW is required to recruit its cognate transpeptidase, FtsI (PBP3), to the division site. *J. Bacteriol.* **184**: 904-912.
- Mingorance, J., S. Rueda, P. Gomez-Puertas, A. Valencia y M. Vicente, (2001) *Escherichia coli* FtsZ polymers contain mostly GTP and have a high nucleotide turnover. *Mol. Microbiol.* **41**: 83-91.
- Miraldi, E. R., P. J. Thomas y L. Romberg, (2008) Allosteric models for cooperative polymerization of linear polymers. *Biophys. J.* **95**: 2470-2486.
- Mistry, B. V., R. Del Sol, C. Wright, K. Findlay y P. Dyson, (2008) FtsW is a dispensable cell division protein required for Z-ring stabilization during sporulation septation in *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.* **190**: 5555-5566.
- Monahan, L. G., A. Robinson y E. J. Harry, (2009) Lateral FtsZ association and the assembly of the cytokinetic Z ring in bacteria. *Mol. Microbiol.* **74**: 1004-1017.
- Mosyak, L., Y. Zhang, E. Glasfeld, S. Haney, M. Stahl, J. Seehra y W. S. Somers, (2000) The bacterial cell-division protein ZipA and its interaction with an FtsZ fragment revealed by X-ray crystallography. *EMBO J.* **19**: 3179-3191.

- Mukherjee, A., K. Dai y J. Lutkenhaus, (1993) Escherichia-coli cell-division protein FtsZ is a guanine-nucleotide binding-protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**: 1053-1057.
- Mukherjee, A. y J. Lutkenhaus, (1994) Guanine nucleotide-dependent assembly of FtsZ into filaments. *J. Bacteriol.* **176**: 2754-2758.
- Mukherjee, A. y J. Lutkenhaus, (1998) Dynamic assembly of FtsZ regulated by GTP hydrolysis. *EMBO J.* **17**: 462-469.
- Mukherjee, A., C. Saez y J. Lutkenhaus, (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.
- Mukherjee, S., C. A. Robinson, A. G. Howe, T. Mazor, P. A. Wood, S. Uргаonkar, A. M. Hebert, D. RayChaudhuri y J. T. Shaw, (2007) N-Benzyl-3-sulfonamidopyrrolidines as novel inhibitors of cell division in E-coli. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **17**: 6651-6655.
- Muller, P., C. Ewers, U. Bertsche, M. Anstett, T. Kallis, E. Breukink, C. Fraipont, M. Terrak, M. Nguyen-Disteche y W. Vollmer, (2007) The essential cell division protein FtsN interacts with the murein (peptidoglycan) synthase PBP1B in Escherichia coli. *J. Biol. Chem.* **282**: 36394-36402.
- Nguyen-Disteche, M., C. Fraipont, N. Buddelmeijer y N. Nanninga, (1998) The structure and function of Escherichia coli penicillin binding protein 3. *Cell. Mol. Life Sci.* **54**: 309-316.
- Nogales, E., K. H. Downing, L. A. Amos y J. Lowe, (1998a) Tubulin and FtsZ form a distinct family of GTPases. *Nat. Struct. Biol.* **5**: 451-458.
- Nogales, E., S. G. Wolf y K. H. Downing, (1998b) Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography. *Nature* **391**: 199-203.
- Nova, E., F. Montecinos, J. E. Brunet, R. Lagos y O. Monasterio, (2007) 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) induces bundling of Escherichia coli FtsZ polymers inhibiting the GTPase activity. *Arch. Biochem. Biophys.* **465**: 315-319.
- Ohashi, Y., Y. Chijiwa, K. Suzuki, K. Takahashi, H. Nanamiya, T. Sato, Y. Hosoya, K. Ochi y F. Kawamura, (1999) The lethal effect of a benzamide derivative, 3-methoxybenzamide, can be suppressed by mutations within a cell division gene, ftsZ, in Bacillus subtilis. *J. Bacteriol.* **181**: 1348-1351.
- Oliva, M. A., S. C. Cordell y J. Lowe, (2004) Structural insights into FtsZ protofilament formation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**: 1243-1250.
- Oliva, M. A., S. Huecas, J. M. Palacios, J. Martin-Benito, J. M. Valpuesta y J. M. Andreu, (2003) Assembly of archaeal cell division protein FtsZ and a GTPase-inactive mutant into double-stranded filaments. *J. Biol. Chem.* **278**: 33562-33570.
- Oliva, M. A., D. Trambaiolo y J. Lowe, (2007) Structural insights into the conformational variability of FtsZ. *J. Mol. Biol.* **373**: 1229-1242.
- Osawa, M., D. E. Anderson y H. P. Erickson, (2008) Reconstitution of contractile FtsZ rings in liposomes. *Science* **320**: 792-794.
- Osawa, M., D. E. Anderson y H. P. Erickson, (2009) Curved FtsZ protofilaments generate bending forces on liposome membranes. *EMBO J.* **28**: 3476-3484.
- Paradis-Bleau, C., M. Beaumont, F. Sanschagrin, N. Voyer y R. C. Levesque, (2007) Parallel solid synthesis of inhibitors of the essential cell division FtsZ enzyme as a new potential class of antibacterials. *Bioorg. Med. Chem.* **15**: 1330-1340.

- Paradis-Bleau, C., F. Sanschagrín y R. C. Levesque, (2004) Identification of *Pseudomonas aeruginosa* FtsZ peptide inhibitors as a tool for development of novel antimicrobials. *J. Antimicrob. Chemother.* **54**: 278-280.
- Perez, C. y A. R. Ortiz, (2001) Evaluation of docking functions for protein-ligand docking. *J. Med. Chem.* **44**: 3768-3785.
- Pichoff, S. y J. Lutkenhaus, (2002) Unique and overlapping roles for ZipA and FtsA in septal ring assembly in *Escherichia coli*. *EMBO J.* **21**: 685-693.
- Pichoff, S. y J. Lutkenhaus, (2005) Tethering the Z ring to the membrane through a conserved membrane targeting sequence in FtsA. *Mol. Microbiol.* **55**: 1722-1734.
- Pichoff, S. y J. Lutkenhaus, (2007) Identification of a region of FtsA required for interaction with FtsZ. *Mol. Microbiol.* **64**: 1129-1138.
- Pla, J., M. Sánchez, P. Palacios, M. Vicente y M. Aldea, (1991) Preferential cytoplasmic location of FtsZ, a protein essential for *Escherichia coli* septation. *Mol. Microbiol.* **5**: 1681-1686.
- Plaza, A., J. L. Keffer, G. Bifulco, J. R. Lloyd y C. A. Bewley, (2010) Chrysopaentins A-H, Antibacterial Bisdiarylbutene Macrocyces That Inhibit the Bacterial Cell Division Protein FtsZ. *J. Am. Chem. Soc.*
- Popp, D., M. Iwasa, A. Narita, H. P. Erickson y Y. Maeda, (2009) FtsZ Condensates: An In Vitro Electron Microscopy Study. *Biopolymers* **91**: 340-350.
- Radhakrishnan, S. K., S. Pritchard y P. H. Viollier, (2010) Coupling Prokaryotic Cell Fate and Division Control with a Bifunctional and Oscillating Oxidoreductase Homolog. *Dev. Cell* **18**: 90-101.
- Rai, D., J. K. Singh, N. Roy y D. Panda, (2008) Curcumin inhibits FtsZ assembly: an attractive mechanism for its antibacterial activity. *Biochem. J.* **410**: 147-155.
- Raskin, D. M. y P. A. J. de Boer, (1999) Rapid pole-to-pole oscillation of a protein required for directing division to the middle of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**: 4971-4976.
- RayChaudhuri, D., (1999) ZipA is a MAP-Tau homolog and is essential for structural integrity of the cytokinetic FtsZ ring during bacterial cell division. *EMBO J.* **18**: 2372-2383.
- Raychaudhuri, D. y J. T. Park, (1992) *Escherichia coli* cell-division gene FtsZ encodes a novel GTP-binding protein. *Nature* **359**: 251-254.
- Reiss, B., R. Sprengel y H. Schaller, (1984) Protein fusions with the kanamycin resistance gene from transposon Tn5. *EMBO J.* **3**: 3317-3322.
- Rico, A. I., M. García-Ovalle, J. Mingorance y M. Vicente, (2004) Role of two essential domains of *Escherichia coli* FtsA in localization and progression of the division ring. *Mol. Microbiol.* **53**: 1359-1371.
- Rico, A. I., M. García-Ovalle, P. Palacios, M. Casanova y M. Vicente, (2010) Role of *Escherichia coli* FtsN protein in the assembly and stability of the cell division ring. *Mol. Microbiol.* **9999**.
- Rivas, G., A. Lopez, J. Mingorance, M. J. Ferrandiz, S. Zorrilla, A. P. Minton, M. Vicente y J. M. Andreu, (2000) Magnesium-induced linear self-association of the FtsZ bacterial cell division protein monomer - The primary steps for FtsZ assembly. *J. Biol. Chem.* **275**: 11740-11749.
- Romberg, L. y T. J. Mitchison, (2003) Rate-Limiting Guanosine 5'-Triphosphate Hydrolysis during Nucleotide Turnover by FtsZ, a Prokaryotic Tubulin Homologue Involved in Bacterial Cell Division†. *Biochemistry* **43**: 282-288.

- Romberg, L., M. Simon y H. P. Erickson, (2001) Polymerization of FtsZ, a bacterial homolog of tubulin - Is assembly cooperative? *J. Biol. Chem.* **276**: 11743-11753.
- Rosenberger, C. M., R. L. Gallo y B. B. Finlay, (2004) Interplay between antibacterial effectors: A macrophage antimicrobial peptide impairs intracellular Salmonella replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**: 2422-2427.
- Rothfield, L., A. Taghbalout y Y. L. Shih, (2005) Spatial control of bacterial division-site placement. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**: 959-968.
- Ruiz, F. M., R. Gil-Redondo, A. Morreale, A. R. Ortiz, C. Fabrega y J. Bravo, (2008) Structure-based discovery of novel non-nucleosidic DNA alkyltransferase inhibitors: Virtual screening and in vitro and in vivo activities. *J Chem Inf Model* **48**: 844-854.
- Saleh, O. A., C. Perals, F. X. Barre y J. F. Allemand, (2004) Fast, DNA-sequence independent translocation by FtsK in a single-molecule experiment. *EMBO J.* **23**: 2430-2439.
- Santra, M. K., T. K. Beuria, A. Banerjee y D. Panda, (2004) Ruthenium red-induced bundling of bacterial cell division protein, FtsZ. *J. Biol. Chem.* **279**: 25959-25965.
- Scheffers, D. J., J. G. de Wit, T. den Blaauwen y A. J. M. Driessen, (2001) Substitution of a conserved aspartate allows cation-induced polymerization of FtsZ. *FEBS Lett.* **494**: 34-37.
- Scheffers, D. J., J. G. de Wit, T. den Blaauwen y A. J. M. Driessen, (2002) GTP hydrolysis of cell division protein FtsZ: Evidence that the active site is formed by the association of monomers. *Biochemistry* **41**: 521-529.
- Schiff, P. B., J. Fant y S. B. Horwitz, (1979) Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature* **277**: 665-667.
- Schlieper, D., M. A. Oliva, J. M. Andreu y J. Lowe, (2005) Structure of bacterial tubulin BtubA/B: Evidence for horizontal gene transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**: 9170-9175.
- Schlitter, J., (1993) Estimation of absolute and relative entropies of macromolecules using the covariance-matrix. *Chem. Phys. Lett.* **215**: 617-621.
- Schoonmaker, R., (1972) Physical biochemistry (Van Holde, Kensal Edward). *J. Chem. Educ.* **49**: A654-null.
- Shapiro, L. y R. Losick, (2000) Dynamic Spatial Regulation in the Bacterial Cell. *Cell* **100**: 89-98.
- Shapiro, L., H. H. McAdams y R. Losick, (2009) Why and How Bacteria Localize Proteins. *Science* **326**: 1225-1228.
- Sharp, M. D. y K. Pogliano, (1999) An in vivo membrane fusion assay implicates SpoIIIE in the final stages of engulfment during Bacillus subtilis sporulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**: 14553-14558.
- Shen, B. y J. Lutkenhaus, (2010) Examination of the interaction between FtsZ and MinCN in E-coli suggests how MinC disrupts Z rings. *Mol. Microbiol.* **75**: 1285-1298.
- Shih, Y. L., T. Le y L. Rothfield, (2003) Division site selection in Escherichia coli involves dynamic redistribution of Min proteins within coiled structures that extend between the two cell poles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**: 7865-7870.
- Shimotohno, K. W., F. Kawamura, Y. Natori, H. Nanamiya, J. Magae, H. Ogata, T. Endo, T. Suzuki y H. Yamaki, (2010) Inhibition of Septation in Bacillus subtilis by a Peptide Antibiotic, Edeine B-1. *Biol. Pharm. Bull.* **33**: 568-571.

- Singh, J. K., R. D. Makde, V. Kumar y D. Panda, (2007) A membrane protein, EzrA, regulates assembly dynamics of FtsZ by interacting with the C-terminal tail of FtsZ. *Biochemistry* **46**: 11013-11022.
- Singh, J. K., R. D. Makde, V. Kumar y D. Panda, (2008) SepF Increases the Assembly and Bundling of FtsZ Polymers and Stabilizes FtsZ Protofilaments by Binding along Its Length. *J. Biol. Chem.* **283**: 31116-31124.
- Small, E., R. Marrington, A. Rodger, D. J. Scott, K. Sloan, D. Roper, T. R. Dafforn y S. G. Addinall, (2007) FtsZ polymer-bundling by the Escherichia coli ZapA orthologue, YgfE, involves a conformational change in bound GTP. *J. Mol. Biol.* **369**: 210-221.
- Sprang, S. R., (1997) G protein mechanisms: Insights from structural analysis. *Annu. Rev. Biochem.* **66**: 639-678.
- Stokes, N. R., J. Sievers, S. Barker, J. M. Bennett, D. R. Brown, I. Collins, V. M. Errington, D. Foulger, M. Hall, R. Halsey, H. Johnson, V. Rose, H. B. Thomaidis, D. J. Haydon, L. G. Czaplewski y J. Errington, (2005) Novel inhibitors of bacterial cytokinesis identified by a cell-based antibiotic screening assay. *J. Biol. Chem.* **280**: 39709-39715.
- Stricker, J., P. Maddox, E. D. Salmon y H. P. Erickson, (2002) Rapid assembly dynamics of the Escherichia coli FtsZ-ring demonstrated by fluorescence recovery after photobleaching. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**: 3171-3175.
- Suefuiji, K., R. Valluzzi y D. RayChaudhuri, (2002) Dynamic assembly of MinD into filament bundles modulated by ATP, phospholipids, and MinE. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**: 16776-16781.
- Sugimoto, S., K. Yamanaka, S. Nishikori, A. Miyagi, T. Ando y T. Ogura, (2010) AAA(+) Chaperone ClpX Regulates Dynamics of Prokaryotic Cytoskeletal Protein FtsZ. *J. Biol. Chem.* **285**: 6648-6657.
- Thanbichler, M. y L. Shapiro, (2006) MipZ, a spatial regulator coordinating chromosome segregation with cell division in Caulobacter. *Cell* **126**: 147-162.
- Townsend, R., D. B. Archer y K. A. Plaskitt, (1980) Purification and preliminary characterization of Spiroplasma fibrils. *J. Bacteriol.* **142**: 694-700.
- Urgaonkar, S., H. S. La Pierre, I. Meir, H. Lund, D. RayChaudhuri y J. T. Shaw, (2005) Synthesis of antimicrobial natural products targeting FtsZ: (+/-)-Dichamanetin and (+/-)-2"-hydroxy-5"-benzylisouvarinol-B. *Org. Lett.* **7**: 5609-5612.
- van den Ent, F., L. A. Amos y J. Lowe, (2001) Prokaryotic origin of the actin cytoskeleton. *Nature* **413**: 39-44.
- van den Ent, F. y J. Lowe, (2000) Crystal structure of the cell division protein FtsA from Thermotoga maritima. *EMBO J.* **19**: 5300-5307.
- van den Ent, F., J. Moller-Jensen, L. A. Amos, K. Gerdes y J. Lowe, (2002) F-actin-like filaments formed by plasmid segregation protein ParM. *EMBO J.* **21**: 6935-6943.
- Varma, A., M. A. de Pedro y K. D. Young, (2007) FtsZ directs a second mode of peptidoglycan synthesis in Escherichia coli. *J. Bacteriol.* **189**: 5692-5704.
- Vaughan, S., B. Wickstead, K. Gull y S. G. Addinall, (2004) Molecular evolution of FtsZ protein sequences encoded within the Genomes of archaea, bacteria, and eukaryota. *J. Mol. Evol.* **58**: 19-39.
- Vicente, M. y A. I. Rico, (2006) The order of the ring: assembly of Escherichia coli cell division components. *Mol. Microbiol.* **61**: 5-8.
- Vollmer, W., (2006) The prokaryotic cytoskeleton: a putative target for inhibitors and antibiotics? *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **73**: 37-47.

- Wang, J., A. Galgoci, S. Kodali, K. B. Herath, H. Jayasuriya, K. Dorso, F. Vicente, A. Gonzalez, D. Cully, D. Bramhill y S. Singh, (2003) Discovery of a small molecule that inhibits cell division by blocking FtsZ, a novel therapeutic target of antibiotics. *J. Biol. Chem.* **278**: 44424-44428.
- Wang, J. M., P. Cieplak y P. A. Kollman, (2000) How well does a restrained electrostatic potential (RESP) model perform in calculating conformational energies of organic and biological molecules? *J. Comput. Chem.* **21**: 1049-1074.
- Wang, K., M. Murcia, P. Constans, C. Perez y A. R. Ortiz, (2004) Gaussian mapping of chemical fragments in ligand binding sites. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **18**: 101-118.
- Wang, L. L. y J. Lutkenhaus, (1998) FtsK is an essential cell division protein that is localized to the septum and induced as part of the SOS response. *Mol. Microbiol.* **29**: 731-740.
- Wang, X. y J. Lutkenhaus, (1996) Characterization of the ftsZ gene from *Mycoplasma pulmonis*, an organism lacking a cell wall. *J. Bacteriol.* **178**: 2314-2319.
- Weart, R. B., A. H. Lee, A. C. Chien, D. P. Haeusser, N. S. Hill y P. A. Levin, (2007) A metabolic sensor governing cell size in bacteria. *Cell* **130**: 335-347.
- Weart, R. B. y P. A. Levin, (2003) Growth rate-dependent regulation of medial FtsZ ring formation. *J. Bacteriol.* **185**: 2826-2834.
- Weart, R. B., S. Nakano, B. E. Lane, P. Zuber y P. A. Levin, (2005) The ClpX chaperone modulates assembly of the tubulin-like protein FtsZ. *Mol. Microbiol.* **57**: 238-249.
- White, E. L., W. J. Suling, L. J. Ross, L. E. Seitz y R. C. Reynolds, (2002) 2-Alkoxy-carbonylamino-pyridines: inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* FtsZ. *J. Antimicrob. Chemother.* **50**: 111-114.
- Woldringh, C. L., E. Mulder, P. G. Huls y N. Vischer, (1991) Toporegulation of bacterial division according to the nucleoid occlusion model. *Res. Microbiol.* **142**: 309-320.
- Wu, L. J. y J. Errington, (2004) Coordination of cell division and chromosome segregation by a nucleoid occlusion protein in *Bacillus subtilis*. *Cell* **117**: 915-925.
- Wu, L. J., S. Ishikawa, Y. Kawai, T. Oshima, N. Ogasawara y J. Errington, (2009) Noc protein binds to specific DNA sequences to coordinate cell division with chromosome segregation. *EMBO J.* **28**: 1940-1952.
- Yang, R. F., S. Bartle, R. Otto, A. Stassinopoulos, M. Rogers, L. Plamann y P. Hartzell, (2004) AglZ is a filament-forming coiled-coil protein required for adventurous gliding motility of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **186**: 6168-6178.
- Yu, X. C. y W. Margolin, (1998) Inhibition of assembly of bacterial cell division protein FtsZ by the hydrophobic dye 5,5'-bis-(8-anilino-1-naphthalenesulfonate). *J. Biol. Chem.* **273**: 10216-10222.
- Zhou, H. J., R. Schulze, S. Cox, C. Saez, Z. L. Hu y J. Lutkenhaus, (2005) Analysis of MinD mutations reveals residues required for MinE stimulation of the MinD ATPase and residues required for MinC interaction. *J. Bacteriol.* **187**: 629-638.

Artículos Publicados

- Huecas, S., C. Schaffner-Barbero, W. Garcia, H. Yebenes, J. M. Palacios, J. F. Diaz, M. Menendez y J. M. Andreu, (2007) The interactions of cell division protein FtsZ with guanine nucleotides. *J Biol Chem* **282**: 37515-37528.
- Lappchen, T., V. A. Pinas, A. F. Hartog, G. J. Koomen, C. Schaffner-Barbero, J. M. Andreu, D. Trambaiolo, J. Lowe, A. Juhem, A. V. Popov y T. den Blaauwen, (2008) Probing FtsZ and tubulin with C8-substituted GTP analogs reveals differences in their nucleotide binding sites. *Chem. Biol.* **15**: 189-199.
- Andreu, J. M., C. Schaffner-Barbero, S. Huecas, D. Alonso, M. L. Lopez-Rodriguez, L. B. Ruiz-Avila, R. Nunez-Ramirez, O. Llorca y A. J. Martin-Galiano, (2010) The antibacterial cell division inhibitor PC190723 is a FtsZ polymer stabilizing agent which induces filament assembly and condensation. *J. Biol. Chem.* **285**: 14239-14246.
- Schaffner-Barbero C., R. Gil-Redondo, L.B. Ruiz-Ávila, S. Huecas, T. Lappchen, T. den Blaauwen, J.F. Diaz, A. Morreale and J.M. Andreu, (2010) Insights into nucleotide recognition by cell division protein FtsZ from a mant-GTP competition assay and molecular dynamics. *Biochemistry* (aceptado para su publicación).