

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



**TESIS DOCTORAL**

**Inhibidores sintéticos de FtsZ con actividad antibacteriana**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Laura Ruiz Ávila**

Directores

José Manuel Andreu Morales  
Sonia Huecas Gayo

**Madrid, 2014**

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



**INHIBIDORES SINTÉTICOS DE FtsZ  
CON ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA**

TESIS DOCTORAL  
**Laura Ruiz Avila**  
Madrid, 2013



Directores: Prof. José Manuel Andreu Morales y Dra. Sonia Huecas Gayo  
CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
CSIC, Madrid



## **ÍNDICE GENERAL**

### **ABREVIATURAS** **9**

---

### **SUMMARY** **11**

---

### **INTRODUCCIÓN** **25**

---

1. El citoesqueleto bacteriano	25
2. La división celular bacteriana	26
2.1. El anillo Z y ensamblaje del divisoma bacteriano	28
2.2. Regulación espacial del anillo Z	35
3. La proteína de división celular bacteriana FtsZ	38
3.1. Distribución de la familia de proteínas FtsZ en procariontes y orgánulos eucariotas	38
3.2. Estructura y función de FtsZ	39
3.3. Ensamblaje de FtsZ	41
4. FtsZ como diana para el descubrimiento de nuevos antibióticos	45
4.1. Compuestos que interactúan con el sitio de unión del nucleótido de FtsZ	48
4.2. Compuestos que se unen al sitio de PC190723	48

### **OBJETIVOS** **53**

---

### **MATERIALES Y MÉTODOS** **57**

---

1. Materiales	57
1.1. Reactivos (origen)	57
1.2. Medios de cultivo y tampones (composición)	57
2. Purificación de FtsZ y tubulina	58
2.1. Expresión de las distintas construcciones en <i>Escherichia coli</i>	58
2.2. Purificación de FtsZ de <i>B.subtilis</i>	60
2.3. Purificación de FtsZ de <i>M. jannaschii</i> y de <i>E. coli</i>	61
2.4. Extracción del nucleótido y cambio de tampón de Mj-FtsZ	62
2.5. Purificación y equilibrio de tubulina	63
3. Determinación de la concentración de FtsZ y tubulina	64
3.1. Cálculo de la concentración de FtsZ	64
3.2. Cálculo de la concentración de tubulina	65
4. Métodos computacionales	66
5. Pequeñas moléculas	68
5.1. Origen, identidad y pureza	68
5.2. Conservación	69
5.3. Determinación de la solubilidad	70
5.4. Controles de absorción y fluorescencia los compuestos	71

6. Métodos de competición de los ligandos por el sitio de unión del nucleótido de FtsZ	72
6.1. Método radiactivo	72
6.1.1. Titulación y afinidades de los ligandos de referencia	73
6.1.2. Competición de los ligandos con <sup>3</sup> H-GTP por el sitio de unión del nucleótido	73
6.2. Método de fluorescencia	75
6.2.1. Titulación y afinidades de los ligandos de referencia	76
6.2.2. Competición de los ligandos con mant-GTP por el sitio del nucleótido	77
7. Ligandos fluorescentes que se unen al sitio de unión de PC190723	77
8. Espectroscopía diferencial de absorción	78
9. Ultracentrifugación analítica	78
10. Ensamblaje de las distintas proteínas	78
10.1. Sedimentación de polímeros	79
10.2. Dispersión de luz	81
10.3. Actividad GTPasa	81
11. Microscopía electrónica	82
12. Técnicas celulares	83
12.1. Experimentos <i>in vivo</i> con células bacterianas	83
12.1.1. Determinación de la actividad antibacteriana	83
12.1.2. Estudios del fenotipo de la división celular bacteriana	83
12.1.3. Visualización de FtsZ-GFP por microscopía de fluorescencia	84
12.2. Experimentos con células de mamífero	84
12.2.1. Cultivo de células de mamífero	84
12.2.2. Análisis de la inhibición del crecimiento celular, alteración de la disposición de los microtúbulos y ciclo celular	85
<b>RESULTADOS</b>	<b>89</b>
<b>A. Inhibidores que reemplazan el nucleótido unido a FtsZ</b>	<b>89</b>
1. Análogos de GTP sustituidos en el carbono 8 de la guanina	89
1.1. Los C8 derivados de GTP se unen al sitio de unión del nucleótido inhibiendo el ensamblaje de FtsZ bacteriana	89
1.2. Diferencias en el efecto inhibitorio de los C8 derivados en FtsZ de la arqueobacteria <i>M. jannaschii</i>	91
1.3. Epítomos y conformaciones unidas de los C8 nucleótidos	93
2. Ligandos sintéticos	96
2.1. Compuestos descritos previamente en la literatura. El caso especial de PC170942	96
2.2. Compuestos provenientes de un cribado virtual	98
2.3. Compuestos que provienen de la biblioteca sintética UCM	99
2.4. Caracterización preliminar de la cinética de unión de los compuestos UCM al sitio del nucleótido de Bs-FtsZ	103
2.5. Modelos estructurales de los complejos de Bs-FtsZ con los inhibidores UCM05 y UCM44	104
2.6. Caracterización bioquímica de los ligandos UCM	107
2.6.1. Interacción de los compuestos con FtsZ no ensamblada	107
2.6.2. Modulación del ensamblaje de FtsZ por UCM05 y UCM44	111
2.7. Efecto de los compuestos sobre el ensamblaje de tubulina	120
2.8. Inhibición de la división celular y actividad antibacteriana de los ligandos UCM05, UCM44 y UCM53	122

3. Optimización de inhibidores	128
3.1. Análisis de las afinidades y actividad antimicrobiana de los ligandos modificados	128
3.1.1. Sustitución del núcleo de naftaleno del ligando	129
3.1.2. Cambios en los espaciadores de la molécula	132
3.1.3. Eliminación de grupos hidroxilo del ligando de referencia	133
3.1.4. Sustitución de hidroxilos por cloro	135
3.2. Actividad antimicrobiana, afinidad de unión y perfil microbiológico	136
3.3. Selectividad de los inhibidores de FtsZ frente a tubulina	139
<b>B. Exploración del sitio de unión de PC190723 entre los dominios estructurales de FtsZ</b>	<b>148</b>
1. Efectos de PC190723 y sus fragmentos sobre el ensamblaje y la actividad GTPasa de FtsZ	148
1.1. PC190723 y sus fragmentos modulan el ensamblaje y la actividad GTPasa de Bs-FtsZ	148
1.2. Comparación de los efectos sobre el ensamblaje de FtsZ de PC190723 y 8J	152
2. Sondas fluorescentes del sitio de unión de PC190723	154
2.1. Diseño de sondas fluorescentes al sitio de PC190723	154
2.2. Caracterización de DFMBBA-NBD como sonda fluorescente del sitio de unión de PC190723	157
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>165</b>
<hr/>	
1. Las diferencias en el reconocimiento molecular de los derivados de GTP en posición 8 y su posible mecanismo de inhibición del ensamblaje de FtsZ	165
2. El inhibidor de la división celular bacteriana PC170942 se une fuera del sitio del nucleótido de FtsZ	169
3. Inhibidores polifenólicos de FtsZ	170
4. UCM05 y UCM44 reemplazan al nucleótido unido a Bs-FtsZ	172
5. UCM05 y UCM44 alteran el ensamblaje de FtsZ	173
6. UCM05, UCM44 y UCM53 como inhibidores de la división celular bacteriana	175
7. Optimización de inhibidores de la serie UCM05	178
8. Los ligandos que se unen al sitio de PC190723 alteran la relación entre el ensamblaje y la actividad GTPasa de FtsZ	182
9. DFMBBA-NBD funciona como una sonda fluorescente que se une al sitio de PC190723 en los polímeros de FtsZ	184
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>189</b>
<hr/>	
<b>ANEXOS</b>	<b>195</b>
<hr/>	
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>199</b>
<hr/>	



## **ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS**

### **FIGURAS**

#### ***INTRODUCCIÓN***

Figura 1:	División celular de distintas especies bacterianas: <i>E.coli</i> , <i>B.subtilis</i> y <i>M.jannaschii</i> .....	28
Figura 2:	Representación esquemática de la división celular de <i>E.coli</i> .....	29
Figura 3:	Representación esquemática de los sistemas de regulación espacial del anillo Z .....	36
Figura 4:	Representación de la estructura cristalográfica de FtsZ de <i>S.aureus</i> con GDP unido .....	40
Figura 5:	Micrografías electrónicas de filamentos de Bs-FtsZ .....	41
Figura 6:	Modelo de uno de los mecanismos propuestos de generación de fuerza mecánica para la constricción bacteriana .....	45
Figura 7:	Estructura cristalográfica del complejo FtsZ-PC190723-GDP .....	50

#### ***MATERIALES Y MÉTODOS***

Figura 8:	Expresión de FtsZ de <i>B.subtilis</i> en <i>E.coli</i> BL21 (DE3), pLysS.....	59
Figura 9:	Análisis de las etapas de purificación de FtsZ de <i>B.subtilis</i> .....	61
Figura 10:	PAGE-SDS de purificaciones de FtsZ .....	63
Figura 11:	Esquema de los métodos computacionales usados: cribado virtual, ajuste y simulaciones de dinámica molecular .....	67
Figura 12:	Controles de fluorescencia de algunos compuestos probados .....	71
Figura 13:	Titulaciones de los ligandos de referencia de los métodos de competición .....	74

#### ***RESULTADOS***

Figura 14:	Análogos de GTP con sustituciones en el carbono 8 de la guanina (C8 derivados).....	91
Figura 15:	El MorphGTP induce la polimerización de Mj-FtsZ.....	92
Figura 16:	Conformaciones anti y syn de los nucleótidos de guanina.....	93
Figura 17:	Mapa de los epítomos de unión de los C8 derivados a Mj-FtsZ y Bs-FtsZ .....	94
Figura 18:	Espectros TrNOESY del nucleótido GMP y los derivados C8 en presencia de Mj-FtsZ .....	95
Figura 19:	Inhibición de Bs-FtsZ por PC170942 .....	97
Figura 20:	El compuesto VS2.18 se une al sitio de nucleótido de Bs-FtsZ .....	99
Figura 21:	Compuestos polifenólicos que se unen al sitio de unión de nucleótido de Bs-FtsZ.....	100
Figura 22:	Compuestos de la biblioteca sintética.....	101
Figura 23:	UCM05 y UCM44 desplazan al <sup>3</sup> H-GTP del sitio de unión del nucleótido de Bs-FtsZ y Mj-FtsZ .....	102
Figura 24:	Cinética de asociación de los compuestos UCM al sitio de unión de nucleótido de Bs-FtsZ y Mj-FtsZ.....	104
Figura 25:	Imágenes representativas de simulaciones de dinámica molecular de uno de los modos de unión de UCM05 y UCM44 a Bs-FtsZ.....	106

Figura 26:	Evidencia de la unión de UCM05 a Bs-FtsZ mediante espectroscopía de absorción diferencial.....	107
Figura 27:	Unión de UCM05 a Bs-FtsZ mediante experimentos de ultracentrifugación analítica.....	109
Figura 28:	Unión de UCM44 a Bs-FtsZ mediante experimentos de ultracentrifugación analítica.....	110
Figura 29:	Efecto de UCM05 y UCM44 en el ensamblaje y la actividad GTPasa de Bs-FtsZ, Ec-FtsZ y Mj-FtsZ.....	112
Figura 30:	Imágenes representativas de microscopía electrónica que muestran el efecto de UCM05 y UCM44 en el ensamblaje de Bs-FtsZ y Ec-FtsZ .....	113
Figura 31:	Efectos del Tritón X-100 en el ensamblaje de Bs-FtsZ y Ec-FtsZ .....	116
Figura 32:	UCM05 y UCM44 inducen el ensamblaje de apoMj-FtsZ .....	118
Figura 33:	Los fragmentos de UCM05, UCM16 y UCM17 inducen el ensamblaje de apoMj-FtsZ.....	119
Figura 34:	Efecto de los compuestos UCM sobre el ensamblaje de microtúbulos de tubulina .....	121
Figura 35:	Efectos <i>in vivo</i> de UCM05, UCM44 y UCM53 sobre células de <i>B.subtilis</i> .....	123
Figura 36:	Efecto <i>in vivo</i> de los compuestos UCM sobre la formación de microtúbulos citoplasmáticos .....	127
Figura 37:	Cambios en la posición de unión de los anillos fenólicos al núcleo de la molécula de UCM05.....	129
Figura 38:	Cambios en el núcleo de la molécula de UCM05 .....	130
Figura 39:	Cambios en el espaciador de la molécula de UCM05.....	133
Figura 40:	Eliminación de grupos hidroxilo y metoxilación de UCM05 .....	134
Figura 41:	Adiciones de cloro a la molécula de UCM05 .....	136
Figura 42:	Correlación entre las constantes de afinidad de unión de los compuestos al sitio de nucleótido de Bs-FtsZ y la actividad antimicrobiana .....	137
Figura 43:	Efectos de los ligandos modificados sobre la actividad de FtsZ <i>in vivo</i> .....	140
Figura 44:	Efecto de UCM57, UCM59, UCM62 y UCM63 sobre el ensamblaje de Bs-FtsZ y tubulina.....	141
Figura 45:	Efecto de PC190723 y sus fragmentos sobre el ensamblaje y la actividad GTPasa de Bs-FtsZ y Ec-FtsZ.....	150
Figura 46:	Comparación del efecto de PC190723 y su análogo 8J sobre el ensamblaje y la morfología de polímeros de Bs-FtsZ .....	153
Figura 47:	Características fluorescentes de los compuestos derivados de DFMBBA y 8J .....	155
Figura 48:	El análogo fluorescente DFMBBA-NBD tiene efecto sobre el ensamblaje y la actividad GTPasa de Bs-FtsZ.....	158
Figura 49:	Relación entre la variación de anisotropía y el ensamblaje de la sonda fluorescente DFMBBA-NBD .....	160

## **DISCUSIÓN**

Figura 50:	Posiciones de unión de los C8 derivados a Mj-FtsZ en el sitio de unión del nucleótido .....	167
Figura 51:	Modelo de unión de los C8 derivados a Mj-FtsZ y Bs-FtsZ .....	168
Figura 52:	Esquema de modificaciones de EGCG, UCM05 y sus derivados.....	171
Figura 53:	Estructura química de los compuestos hemi-crisofoaentina y UCM44.....	175

## **TABLAS**

Tabla 1:	Coefficientes de extinción molar en 6M GdmCl de cada proteína .....	65
Tabla 2:	Constantes de afinidad y cambios de energía libre de unión de los C8 derivados de GTP a FtsZ .....	90
Tabla 3:	Inhibición de la polimerización de FtsZ en presencia de los C8 derivados .....	90
Tabla 4:	Conformaciones anti y syn de los análogos mono-fosfato de GTP con sustituciones en el carbono 8.....	95
Tabla 5:	Constantes de afinidad de unión y efecto sobre el ensamblaje de FtsZ y tubulina de los compuestos que se unen al sitio del nucleótido de Bs-FtsZ.....	100
Tabla 6:	Inhibición del crecimiento celular bacteriano por los compuestos UCM .....	124
Tabla 7:	Inhibición del crecimiento de células de mamífero.....	125
Tabla 8:	Índice de selectividad antimicrobiano.....	126
Tabla 9:	Perfil antimicrobiano de los compuestos UCM .....	138
Tabla 10:	Características principales de los compuestos UCM .....	142
Tabla 11:	Efecto de PC190723 y sus fragmentos sobre el ensamblaje y la actividad GTPasa de FtsZ .....	151
Tabla 12:	Longitudes de onda de excitación y emisión de los compuestos fluorescentes .....	156
Tabla 13:	Anisotropía de los compuestos fluorescentes derivados de benzamidas .....	157
Tabla 14:	Anisotropía de DFMBBA-NBD y sus fragmentos en presencia de FtsZ de distintas especies .....	162

## **ANEXOS**

Anexo 1:	Compuestos que provienen del cribado virtual .....	195
Anexo 2:	Flexibilidad del sitio del nucleótido de Bs-FtsZ en presencia de UCM05 y UCM44.....	197
Anexo 3:	Imágenes representativas de los posibles modos de unión de UCM05 y UCM44 a Bs-FtsZ .....	198



## ABREVIATURAS

### Abreviatura

<sup>3</sup>H-GTP  
 Å  
 ADN  
 ATP  
 APS  
 Br-GTP  
 cpm  
 C-terminal  
 CTPM  
 DAPI  
 DFMBA  
 DMSO  
 DMSO-D6  
 EDTA  
 FM4-64  
  
 GdmCl  
 GDP  
 GTP  
 GFP  
 GMPCPP  
 Hepes  
 HPLC  
 IPTG  
 kDa  
*mant*-GTP  
 MEDIO LB  
 Mes  
 MeO-GTP  
 Morph-GTP  
 ns  
 N-terminal  
 PAGE  
 PC190723 (PC)  
 PDB  
 Pipes  
 Pyrr-GTP  
 PMSF  
 rpm  
 SDS  
 STD-RMN  
 TEMED  
 Tris  
 Tr-NOESY  
 RMN  
 T<sub>1/2</sub>

### Significado

Guanosina-5'-trifosfato tritiado  
 Amgstrong  
 Ácido desoxirribonucléico  
 Adenosina-5'-trifosfato  
 Persulfato amónico  
 8-bromo- Guanosina-5'-trifosfato  
 cuentas por minuto  
 carboxi-terminal  
 2 (6-cloro [1,3]tiazolo[5,4-b]piridina-2-il) metanol  
 4',6-diamidino-2-fenilindole  
 2,6-difluoro-3-hydroxybenzamide  
 Dimetilsulfóxido  
 Dimetilsulfóxido deuterado  
 Ácido etilen diamino tetracético  
 N-(3-trietilamoniopropil)-4-(4-dietilaminofenilhexatrienil)piridinio dibromo  
 Cloruro de guanidinio  
 Guanosina-5'-difosfato  
 Guanosina-5'-trifosfato  
 Proteína fluorescente verde  
 Guanosina-5'-[(2,β)-metilen]trifosfato  
 Ácido(4-(2-hidroxietyl)-1piperazin-etanosulfónico  
 Cromatografía líquida de alta eficacia  
 Isopropil β-D-tiogalactopiranosido  
 kiloDalton  
 2'(3')-O-(N-metilantraniolil)-guanosina-5'-trifosfato  
 Medio de cultivo Luria-Bertani  
 Ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico  
 8-metoxi- Guanosina-5'-trifosfato  
 8-morfolino- Guanosina-5'-trifosfato  
 Nanosegundo  
 Amino-terminal  
 Electroforesis en gel de poliacrilamida  
 3-[(6-Cloro[1,3]tiazolo[5,4-B]piridin-2-Yl)metoxi]-2,6-difluorobenzamida  
 Banco de Datos de Estructura de Proteínas  
 Ácido piperazin-N,N'-bis [2-etanosulfónico]  
 8-pirrolidil- Guanosina-5'-trifosfato tritiado  
 Fluoruro de fenilmetilsulfonilo  
 Revoluciones por minuto  
 Dodecilsulfato sódico  
 Transferencia de saturación diferencial-Resonancia Magnética Nuclear  
 Tetrametiletlenodiamina  
 Tris-hidroximetil-aminometano  
 Efecto nuclear Overhauser transferido  
 Resonancia Magnética Nuclear  
 Tiempo de vida media



## SUMMARY

### Synthetic FtsZ inhibitors with antibacterial activity

Laura Ruiz-Avila, PhD Thesis, UCM, Madrid, 2013

Cell division is one of the most fundamental biological processes, essential for the propagation of living species. Cell division is carried out with the participation of cytoskeleton or cytomotive proteins. The eukaryotic cytoskeleton is composed of three types of cytoskeletal fibers formed by actin, intermediate filaments and tubulin. Prokaryotic cells have cytomotive homologues of each of these proteins and lack motor proteins. Thus, MreB, ParM and FtsA (van den Ent et al., 2001a; van den Ent et al., 2001b; van den Ent and Lowe, 2000) were described as bacterial proteins with a fold similar to actin. Crescentin (Ausmees et al., 2003) was found in *Caulobacter crescentus* bacteria and is homologue of intermediate filaments. The essential bacterial cell division protein FtsZ, bacterial tubulin BtubA/B and TubZ are the three prokaryotic tubulinhomologues.

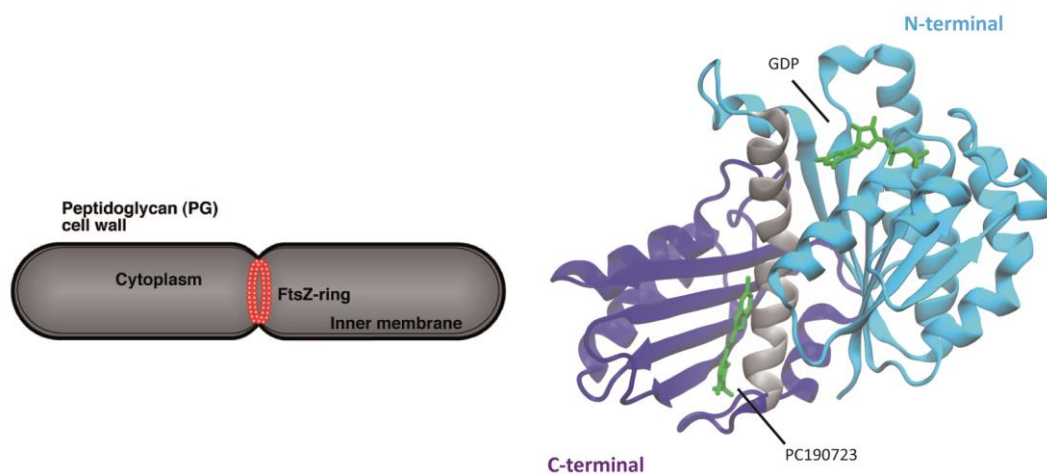
The aim in this Thesis is the assembly of FtsZ as a target for the discovery of new antibiotics. This protein was identified by the isolation of mutations that causes the formation of filaments at a nonpermissive temperature and it is for that reason that is called FtsZ (*Filamentous temperature sensitive Z*). FtsZ is the most conserved bacterial cell division protein and it is also present in some plastids and mitochondria of several groups of the Eukarya (Margolin, 2005).

FtsZ is the first known protein to localize to the midcell, where it polymerizes into a ring-like structure known as Z-ring (Bi et al., 1991) that marks the position of the future division site. It is still unclear how the Z-ring is built, but it has been proposed that it is formed by the association of short FtsZ protofilaments. The Z-ring persists during the division guiding the synthesis and location of the division septum and it serves as a scaffold for the recruitment of other proteins involved in the bacterial cell division process, which all together form the divisome.

The function of many of the proteins that are involved in bacterial cell division is not fully understood; however, their roles involve i) assisting in the formation and stabilization of the Z-ring, ii) permitting the correct DNA replication and avoiding the formation of Z-ring over the nucleoid, iii) recruiting and stabilizing the divisome at the division site and iv) directing the synthesis of peptidoglycan in order to form the division septum (Harry et al., 2006).

The position of Z-ring is important to prevent its assembly at inappropriate locations and to permit the correct chromosome replication and segregation. There are three systems that influence the position of Z-ring: the MINCDE/DivIVA system in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*, the nucleoid occlusion guiding by SlmA and Noc in *E.coli* and *B.subtilis* respectively, and the regulation by the protein MipZ in *C. crescentus*.

FtsZ and tubulin are thought to share an ancestral homologue. Both proteins have the same fold (Lowe and Amos, 1998; Nogales et al., 1998) despite of the low overall amino acid identity. FtsZ and tubulin are GTPases and the residues required for GTP binding and hydrolysis are those which show the highest degree of conservation. FtsZ is composed of two globular subdomains which are independently folded. The two subdomains are connected by a long helix, H7, which is sandwiched between them (**Figure A**). FtsZ is a self-activating GTPase and the hydrolysis of GTP depends on the polymerization of the protein. The GTPase catalytic site is formed during filament assembly. For polymerization, the T7 loop in the “upper” subunit is inserted into the nucleotide binding pocket of the “lower” subunit where the catalytic residues activate GTP hydrolysis (Lowe and Amos, 1999). For these reasons the assembly and dynamic behavior of FtsZ polymers is driven by guanosine triphosphate (GTP) binding and hydrolysis.



**Figure A. Schematic representation of FtsZ-ring in a bacterial cell (on the left) and crystal structure of the complex FtsZ from *Staphylococcus aureus* with GDP and PC190723 (on the right).** Is shown N-terminal domain (cyan), C-terminal domain (blue) and H7 helix (grey). Ligands GDP and PC190723 are shown in green.

FtsZ assembles into polar tubulin-like one-stranded protofilaments (Huecas and Andreu, 2003; Huecas et al., 2008; Romberg et al., 2001). Monomers of protein can exist in two states: the inactive state with low affinity to form polymers and active state with high affinity for polymerization (Chen and Erickson, 2011; Huecas et al., 2008; Martin-Galiano et al., 2010). The inactive form of FtsZ monomers has been observed in most crystal structures of FtsZ from different species (Oliva et al., 2007). The crystal structure of an FtsZ protofilament (Elsen et al., 2012; Matsui et al., 2012; Tan et al., 2012) has recently shown what has been proposed to be the active conformation, and possibly the conformational changes between both FtsZ states.

The important role of FtsZ in bacterial cell division, and the fact that currently no available antibiotics specifically inhibit the bacterial division, have made FtsZ an attractive target for antibacterial drug discovery (Sass and Brotz-Oesterhelt, 2013; Vollmer, 2006). The emergence of bacterial resistance to antibiotics is a major health problem and, therefore, it is critical to develop new antibiotics with novel modes of action for effective treatments against new multi-drug resistant pathogens such as methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Several small-molecule inhibitors have been reported to modulate the assembly/disassembly dynamics of FtsZ, some of which showed important antibacterial activity against important pathogens and were efficacious in *in vivo* models of infection (Schaffner-Barbero et al., 2012).

The described compounds that target FtsZ have different origins: high-throughput screening (HTS) of chemical libraries, natural product discovery, previously known antibacterial compounds, compounds from tubulin field and synthetic compounds specifically developed to inhibit FtsZ. Some of these compounds are: difluoro-benzamide derivatives such as PC190723 (Haydon et al., 2008) and 8J (Adams et al., 2011), viriditoxin (Wang et al., 2003a), totarol (Jaiswal et al., 2007), zantrins (Margalit et al., 2004), PC170942 and PC58538 (Stokes et al., 2005), chrysopaentin A (Plaza et al., 2010) and its fragment hemi-chrysopaentin (Keffer et al., 2013), cinnamaldehyde (Domadia et al., 2008), sanguinarine (Beuria et al., 2005), C8-GTP analogs (Lappchen et al., 2008) and amikacin (Possoz et al., 2007). However, it is still unknown where these compounds bind to FtsZ except the GTP analogs, chrysopaentin A and its fragment, which bind to the nucleotide site of FtsZ (Keffer et al., 2013) and PC190723, which binds between the N- and C-terminal domains of FtsZ.

The main cavities available for ligand binding in FtsZ monomer are the nucleotide-binding cup in the N-terminal domain and the long cleft between N- and C-terminal domains, known as PC190723 binding site (**Figure A**). The nucleotide binding site in FtsZ is conserved among FtsZs from different organisms (Oliva et al., 2007). Some compounds targeting the nucleotide site

have similar chemical structure to the nucleotide, such as the C8-GTP derivatives that selectively inhibit FtsZ but promote tubulin assembly (Lappchen et al., 2008), while others have different chemical structures such as PC170942 (Stokes et al., 2005). In this Thesis, the effects on the functional activity of FtsZ of both types of ligands have been examined. The discovery of the PC190723 binding site in FtsZ is recent (Haydon et al., 2008) and the crystal structure of FtsZ with bound PC190723 was made available last year (Elsen et al., 2012; Tan et al., 2012 and Matsui et al., 2012). Few compounds that bind to this site have been reported, all of them derivatives of PC190723. In this work we have characterized the effect of PC190723, its fragments and an analog (8J) on the assembly and GTPase activity of FtsZ.

The objectives in this Thesis were i) to find new compounds targeting the nucleotide binding site in the protein and ii) to explore the PC190723 binding site in FtsZ. To our first purpose, an in-depth study of the mechanism of action of the C8 substituted GTP analogs on the assembly of FtsZ from several species were carried out. We also were interested in searching for small molecules structurally different to GTP that could replace the nucleotide in FtsZ and with antimicrobial activity. Once this goal was achieved, we attempted to optimize the compound's chemical structure to obtain ligands with higher affinity for our target and a better antimicrobial activity. Regarding the second objective, the exploration of the PC190723 binding site in FtsZ, we had this synthetic ligand, its fragments difluorometoxibenzamide (DFMBA) and cloro-tihazol-pyridine (CTPM), and an analog (8J) available. The goal was the biochemical characterization of these compounds on the assembly and GTPase activity of FtsZ. On the other hand, we also were interested in the development of a fluorescence probe to detect and characterize novel compounds that bind to the PC190723 site in FtsZ.

The approaches used in this work towards these objectives are summarized in **Figure B**. Once we had the compounds to be tested, we proceeded with two main controls: determination of its solubility in our experimental buffer and a register of fluorescence to discard those compounds which could interfere with *mant*-GTP signal. In the case of the small-molecules supposed to bind to the nucleotide site of FtsZ we first detected indirectly their binding using a competition assay with *mant*-GTP, which allows us to determine the competitor binding affinity ( $K_b$ ). For those compounds we were more interested in, we confirmed their binding affinities with another competition assay using the radioactive ligand  $^3\text{H}$ -GTP. For direct detection and characterization of ligands binding, we performed different assays such as analytic ultracentrifugation, difference absorption spectroscopy, nuclear magnetic resonance and computational experiments (docking and molecular dynamics).

We use diverse methods to study the effect of compounds on the assembly of FtsZ and to check for possible cross-effects on tubulin. By measuring the right angle light scattering and small sample ultracentrifugation we observed the effect of compounds in the polymerization of the protein, and electron microscopy gave us qualitative information of polymer structure. Knowing that GTPase activity depends on polymerization it was also important to determine the rate of GTP hydrolysis in the presence of the ligands. Finally, we used microbiological methods to study the effect of inhibitors on FtsZ *in vivo* such as the antibacterial spectrum and potency of a compound, determining its minimal inhibitory concentration (MIC) and observing the presence of cell filamentation or FtsZ delocalization. We also tested FtsZ inhibitors for possible cross-effect on microtubule assembly on human cell lines.

For those compounds targeting PC190723 binding site, we studied their effect on the assembly of FtsZ as above. Since we were interested in the development of a fluorescence assay to detect and characterize novel compounds that bind to the PC190723 site in FtsZ we measured fluorescence intensity and anisotropy of fluorescent PC derivatives to detect any changes between their free and FtsZ-bound forms.

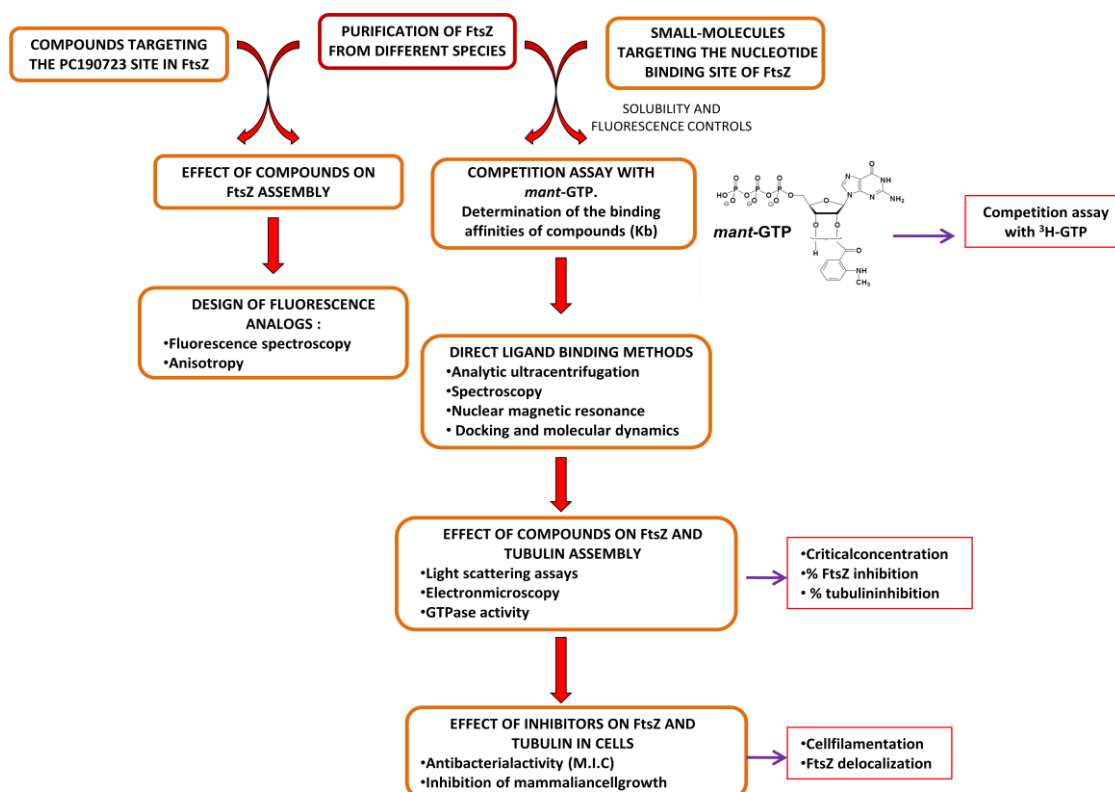


Figure B. Simplified representation of the experimental procedures employed in this work

The results of this Thesis are divided in two main sections. In the first section we analyze the effects of compounds targeting the nucleotide binding site in FtsZ and in the second section the PC190723 binding site in FtsZ is explored.

#### **A. Inhibitors that bind to the nucleotide site of FtsZ**

##### ➤ C8 substituted GTP analogs:

We found that C8 substituted GTP analogs bind to the nucleotide site of FtsZ from a bacteria, *Bacillus subtilis* (Bs-FtsZ) and an archaea, *Methanococcus jannaschii* (Mj-FtsZ) inhibiting the assembly of both proteins. The ligands bind to nucleotide binding site with similar affinities according to the structural similarity of nucleotide pocket in FtsZ. We observed that the assembly inhibitory potencies of the C8-GTP analogs on Bs-FtsZ correlate with their binding affinities to this protein. Unexpectedly, we found a different relationship of the assembly inhibitory capacity with the binding affinity of these compounds in Mj-FtsZ. Moreover, the analog of GTP, MorphGTP does not inhibit the assembly of FtsZ from the arqueobacteria but induces an abnormal polymerization of the protein.

We have analyzed by Nuclear Magnetic Resonance (NMR) STD and trNOESY methods the molecular recognition of the C8-GTP analogs by bacterial and archaeal FtsZ. The results show significant differences in the binding mode of the nucleotide and its C8-modified analog to the proteins and they also exhibit a distinct geometric conformation (anti and syn) between its forms free or bound to FtsZ from both species. By computational experiments (docking and molecular dynamic simulations) we propose models of how the C8-analogs inhibit FtsZ. C8-analogs generate significant changes in size, shape and electrostatic surface at the interface between FtsZ monomers, which probably lead to the observed inhibition of FtsZ assembly.

##### ➤ Non-nucleotide synthetic inhibitors:

For our purpose of finding small molecules structurally different to GTP that could replace the nucleotide in FtsZ, we tested several compounds which came from: i) virtual screening of chemical libraries, ii) previously described FtsZ-interacting molecules, or iii) synthetic compounds selected from an in-house library after docking into the Bs-FtsZ GTP site. In order to detect the binding of these compounds to the GTP site and measure their affinities we used a fluorescence assay, which measure the anisotropy change of *mant*-GTP upon binding to nucleotide-free FtsZ monomers.

Compounds from a virtual screening campaign and several which has been reported to interact with FtsZ; amikacin, PC170942 and the polyphenolic compounds curcumin, chlorogeinc acid and caffeic acid, gave negative results in *mant*-GTP competition assays. Nevertheless, we observed that PC170942 (Stokes et al., 2005) inhibits FtsZ polymerization and GTPase activity. We propose this functional inhibitor of FtsZ either binds weakly to the nucleotide site of FtsZ or binds to an allosteric site.

In collaboration with the Medicinal Chemistry Lab, Universidad Complutense de Madrid (UCM), we found several compounds targeting the nucleotide binding site FtsZ from their in-house synthetic library. Most of them are polyphenolic derivatives and we identified the *hit* compound UCM05 (**Figure C**), which binds to the nucleotide site of Bs-FtsZ,  $K_b = 4.30 \pm 0.04 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ . Analogs of UCM05 were synthesized and two compounds that increase the binding affinity for the GTP site of Bs-FtsZ were easily found: the simplified tetra-hydroxy analog UCM44,  $K_b = 1.5 \pm 0.3 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$  and the chlorinated analog UCM53,  $K_b = 1.3 \pm 0.2 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ .

We analyzed the effects of UCM05 and UCM44 on the assembly of FtsZ from three different species: Bs-FtsZ, Ec-FtsZ (FtsZ from *Escherichia coli*) and Mj-FtsZ. In Bs-FtsZ, the compounds inhibit the assembly of the protein in the presence of nucleotide and, without adding GTP, UCM05 y UCM44 induce the formation of disordered polymers and aggregates. By docking and molecular dynamic simulation experiments we observed UCM05 and UCM44 bind to Bs-FtsZ in two possible modes. In addition, we performed analytic ultracentrifugation assays in which we observed that ligands enhanced the formation of FtsZ dimers. Taken these results together, we propose UCM compounds are probably distorting FtsZ self-association interface leading the formation of disorder polymers but we cannot discard an allosteric binding of the ligands. In contrast to the results obtained with Bs-FtsZ, UCM05 and UCM44 did not reduce the polymerization of Ec-FtsZ, so we conclude they are weak inhibitors in FtsZ from this species.

UCM05 and UCM44 induce the polymerization of Mj-FtsZ in the absence of nucleotide, forming well-ordered protofilaments of this protein different to the Mj-FtsZ filaments forming with GTP. The analysis of images of the UCM05 induced polymer is compatible with two possibilities: a pair of FtsZ protofilaments or hollow tubes formed by 5-7 monomers per turn. These results suggested that UCM05 and UCM44 replace GTP in Mj-FtsZ, inducing a structural rearrangement different to GTP, which leads the formation of tubule-like polymers.

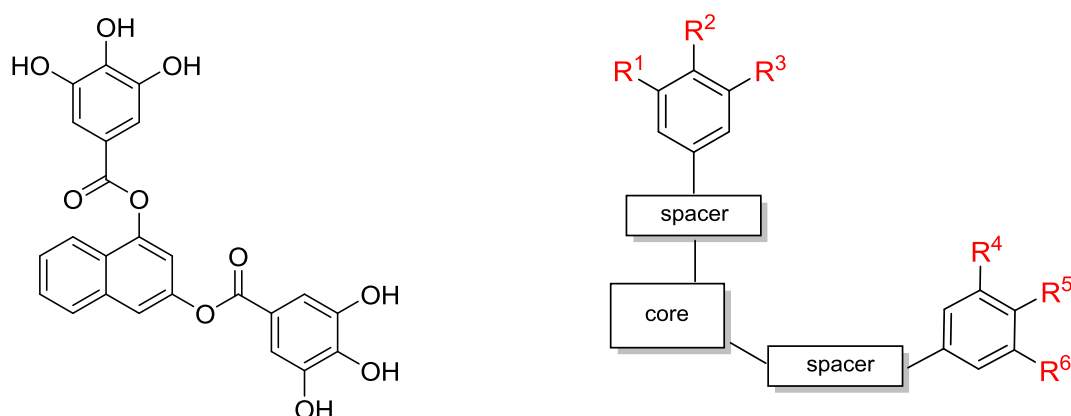
UCM05, UCM44 and UCM53 inhibit the bacterial cell division and induce filamentation of *B.subtilis* cells. All of them are active against Gram-positive pathogens but havemuch less

antimicrobial activity against Gram-negative bacteria. UCM53 is also active on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), ampicillin- and levofloxacin-resistant *Enterococcus faecalis*. Furthermore, these inhibitors induce FtsZ delocalization with formation of numerous punctuate *foci* and distort the Z-ring structure in *B.subtilis*. Finally, we have confirmed these ligands act specifically on FtsZ and they do not affect the formation of tubulin microtubules.

➤ Optimization of new FtsZ inhibitors:

After we had found the *hit* compound, UCM05, we conducted a systematic chemical structure modification of the compound to improve affinity to nucleotide binding site of FtsZ (*in vitro* potency) and antibacterial activity (*in vivo* efficacy). For this purpose we measured the binding affinities of the ligands for the nucleotide binding site of Bs-FtsZ and we determined the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) on *B.subtilis* cells.

In the search of new derivatives of UCM05 compounds were synthesized with modification in: i) the central core of the molecule, replacing 1,3-naphthalene by different chemical groups such as phenyl and cyclohexane rings, ii) the ester bonds used as a spacer in the molecule by other spacers such as amides, sulfonamides and double bonds and iii) In the hydroxy groups of the phenyl rings by reduction of the number, modifying of position of these groups or replacing them by other substituents such as methoxy or chlorine (**Figure C**)



**Figure C. Chemical structure of UCM05 (left) and simplified representation of modified analogs (right).**

Based on the determination of binding affinity and antimicrobial activity, we have confirmed that naphthalene scaffold and ester bonds are the most favorable central core and linker in the molecule. Also position R<sup>1</sup> and R<sup>3</sup> present in UCM05 are the best locations for the

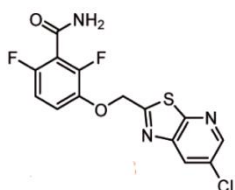
phenyl rings on the naphthalene core. The reduction in the number of hydroxy groups on both phenyl rings improves the binding affinity comparing with UCM05. These last series of modifications have permitted us to identify the hydroxy groups in positions R<sup>1</sup>, R<sup>4</sup> and R<sup>5</sup> as the most important in the molecule since compounds where they are present have significantly improved K<sub>b</sub> and MIC values. Finally, we observed that the combination of hydroxy and chlorine substituents in the same phenyl ring improves affinity (from 10<sup>5</sup> to 10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup>) and antibacterial activity (20-fold) when comparing with UCM05. The modified ligands inhibit FtsZ assembly, leading to functional inhibition of FtsZ and blocking the bacterial cell division. They are more active against Gram-positive resistant pathogens including different strains of MRSA, *Listeria monocytogenes* and *E. faecalis* comparing with UCM05.

### B. Study of the PC190723 binding site in FtsZ

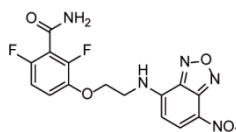
We first determined the effect of PC190723 (PC) and its fragments on the assembly and GTPase activity of FtsZ from *B. subtilis* and *E. coli*. We confirmed that PC190723 (PC) is a stabilizer of FtsZ polymers from susceptible species (Bs-FtsZ) (Andreu et al., 2010; Haydon et al., 2008) and reduces the GTPase activity of the protein. We have also identified the benzamide fragment (DFMBA) as the principal of the molecule since retain the stabilizer effects on polymerization and reduces GTPase activity than PC in Bs-FtsZ.

From several derivatives of PC190723 or DFMBA attached to different fluorophores, we found a compound NBD-DFMBA (Figure D) that specifically bind to PC190723 site in FtsZ from susceptible species. This probe increases its anisotropy upon binding to FtsZ polymers rather than to FtsZ monomers. We have observed that the anisotropy change in the compound follows the time course polymerization of the protein. These results support the proposed structural mechanism of the FtsZ assembly switch and should facilitate screening for new antibacterial compounds binding to the PC190723 site of FtsZ.

**PC190723**



**DFMBA-NBD**



**Figure D. Chemical structures of PC190723 and NBD-DFMBA**

## References

- Adams, D.W., Wu, L.J., Czaplowski, L.G., and Errington, J. (2011). Multiple effects of benzamide antibiotics on FtsZ function. *Mol Microbiol* *80*, 68-84.
- Andreu, J.M., Schaffner-Barbero, C., Huecas, S., Alonso, D., Lopez-Rodriguez, M.L., Ruiz-Avila, L.B., Nunez-Ramirez, R., Llorca, O., and Martin-Galiano, A.J. (2010). The antibacterial cell division inhibitor PC190723 is an FtsZ polymer-stabilizing agent that induces filament assembly and condensation. *J Biol Chem* *285*, 14239-14246.
- Ausmees, N., Kuhn, J.R., and Jacobs-Wagner, C. (2003). The bacterial cytoskeleton: an intermediate filament-like function in cell shape. *Cell* *115*, 705-713.
- Beuria, T.K., Santra, M.K., and Panda, D. (2005). Sanguinarine blocks cytokinesis in bacteria by inhibiting FtsZ assembly and bundling. *Biochemistry* *44*, 16584-16593.
- Bi, E., Dai, K., Subbarao, S., Beall, B., and Lutkenhaus, J. (1991). FtsZ and cell division. *Res Microbiol* *142*, 249-252.
- Chen, Y., and Erickson, H.P. (2011). Conformational changes of FtsZ reported by tryptophan mutants. *Biochemistry* *50*, 4675-4684.
- Chen, Y., and Erickson, H.P. (2011). Conformational changes of FtsZ reported by tryptophan mutants. *Biochemistry* *50*, 4675-4684.
- Domadia, P.N., Bhunia, A., Sivaraman, J., Swarup, S., and Dasgupta, D. (2008). Berberine targets assembly of Escherichia coli cell division protein FtsZ. *Biochemistry* *47*, 3225-3234.
- Elsen, N.L., Lu, J., Parthasarathy, G., Reid, J.C., Sharma, S., Soisson, S.M., and Lumb, K.J. (2012). Mechanism of action of the cell-division inhibitor PC190723: modulation of FtsZ assembly cooperativity. *J Am Chem Soc* *134*, 12342-12345.
- Harry, E., Monahan, L., and Thompson, L. (2006). Bacterial cell division: the mechanism and its precision. *Int Rev Cytol* *253*, 27-94.
- Haydon, D.J., Stokes, N.R., Ure, R., Galbraith, G., Bennett, J.M., Brown, D.R., Baker, P.J., Barynin, V.V., Rice, D.W., Sedelnikova, S.E., *et al.* (2008). An inhibitor of FtsZ with potent and selective anti-staphylococcal activity. *Science* *321*, 1673-1675.
- Huang, Q., Kirikae, F., Kirikae, T., Pepe, A., Amin, A., Respicio, L., Slayden, R.A., Tonge, P.J., and Ojima, I. (2006). Targeting FtsZ for antituberculosis drug discovery: noncytotoxic taxanes as novel antituberculosis agents. *J Med Chem* *49*, 463-466.
- Huecas, S., and Andreu, J.M. (2003). Energetics of the cooperative assembly of cell division protein FtsZ and the nucleotide hydrolysis switch. *J Biol Chem* *278*, 46146-46154.
- Huecas, S., Llorca, O., Boskovic, J., Martin-Benito, J., Valpuesta, J.M., and Andreu, J.M. (2008). Energetics and geometry of FtsZ polymers: nucleated self-assembly of single protofilaments. *Biophys J* *94*, 1796-1806.
- Jaiswal, R., Beuria, T.K., Mohan, R., Mahajan, S.K., and Panda, D. (2007). Totarol inhibits bacterial cytokinesis by perturbing the assembly dynamics of FtsZ. *Biochemistry* *46*, 4211-4220.
- Keffer, J.L., Huecas, S., Hammill, J.T., Wipf, P., Andreu, J.M., and Bewley, C.A. (2013). Chrysopaentins are competitive inhibitors of FtsZ and inhibit Z-ring formation in live bacteria. *Bioorg Med Chem* *21*, 5673-5678.
- Lappchen, T., Pinas, V.A., Hartog, A.F., Koomen, G.J., Schaffner-Barbero, C., Andreu, J.M., Trambaiolo, D., Lowe, J., Juhem, A., Popov, A.V., *et al.* (2008). Probing FtsZ and tubulin with C8-substituted GTP analogs reveals differences in their nucleotide binding sites. *Chem Biol* *15*, 189-199.
- Lowe, J., and Amos, L.A. (1998). Crystal structure of the bacterial cell-division protein FtsZ. *Nature* *391*, 203-206.
- Lowe, J., and Amos, L.A. (1999). Tubulin-like protofilaments in Ca<sup>2+</sup>-induced FtsZ sheets. *EMBO J* *18*, 2364-2371.
- Margalit, D.N., Romberg, L., Mets, R.B., Hebert, A.M., Mitchison, T.J., Kirschner, M.W., and RayChaudhuri, D. (2004). Targeting cell division: small-molecule inhibitors of FtsZ GTPase perturb cytokinetic ring assembly and induce bacterial lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 11821-11826.

- Margolin, W. (2005). FtsZ and the division of prokaryotic cells and organelles. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 862-871.
- Martin-Galiano, A.J., Buey, R.M., Cabezas, M., and Andreu, J.M. (2010). Mapping flexibility and the assembly switch of cell division protein FtsZ by computational and mutational approaches. *J Biol Chem* 285, 22554-22565.
- Matsui, T., Yamane, J., Mogi, N., Yamaguchi, H., Takemoto, H., Yao, M., and Tanaka, I. (2012). Structural reorganization of the bacterial cell-division protein FtsZ from *Staphylococcus aureus*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 68, 1175-1188.
- Nogales, E., Downing, K.H., Amos, L.A., and Lowe, J. (1998a). Tubulin and FtsZ form a distinct family of GTPases. *Nat Struct Biol* 5, 451-458.
- Nogales, E., Wolf, S.G., and Downing, K.H. (1998b). Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography. *Nature* 391, 199-203.
- Oliva, M.A., Trambaiolo, D., and Lowe, J. (2007). Structural insights into the conformational variability of FtsZ. *J Mol Biol* 373, 1229-1242.
- Plaza, A., Keffer, J.L., Bifulco, G., Lloyd, J.R., and Bewley, C.A. (2010). Chrysophaentins A-H, antibacterial bisdiarylbutene macrocycles that inhibit the bacterial cell division protein FtsZ. *J Am Chem Soc* 132, 9069-9077.
- Possoz, C., Newmark, J., Sorto, N., Sherratt, D.J., and Tolmasey, M.E. (2007). Sublethal concentrations of the aminoglycoside amikacin interfere with cell division without affecting chromosome dynamics. *Antimicrob Agents Chemother* 51, 252-256.
- Romberg, L., Simon, M., and Erickson, H.P. (2001). Polymerization of FtsZ, a bacterial homolog of tubulin. is assembly cooperative? *J Biol Chem* 276, 11743-11753.
- Sass, P., and Brotz-Oesterhelt, H. (2013). Bacterial cell division as a target for new antibiotics. *Curr Opin Microbiol*.
- Schaffner-Barbero, C., Martin-Fontecha, M., Chacon, P., and Andreu, J.M. (2012). Targeting the assembly of bacterial cell division protein FtsZ with small molecules. *ACS Chem Biol* 7, 269-277.
- Stokes, N.R., Sievers, J., Barker, S., Bennett, J.M., Brown, D.R., Collins, I., Errington, V.M., Foulger, D., Hall, M., Halsey, R., *et al.* (2005). Novel inhibitors of bacterial cytokinesis identified by a cell-based antibiotic screening assay. *J Biol Chem* 280, 39709-39715.
- Tan, C.M., Therien, A.G., Lu, J., Lee, S.H., Caron, A., Gill, C.J., Lebeau-Jacob, C., Benton-Perdomo, L., Monteiro, J.M., Pereira, P.M., *et al.* (2012). Restoring methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* susceptibility to beta-lactam antibiotics. *Sci Transl Med* 4, 126ra135.
- van den Ent, F., Amos, L., and Lowe, J. (2001a). Bacterial ancestry of actin and tubulin. *Curr Opin Microbiol* 4, 634-638.
- van den Ent, F., Amos, L.A., and Lowe, J. (2001b). Prokaryotic origin of the actin cytoskeleton. *Nature* 413, 39-44.
- van den Ent, F., and Lowe, J. (2000). Crystal structure of the cell division protein FtsA from *Thermotoga maritima*. *EMBO J* 19, 5300-5307.

## Papers published:

Andreu, J.M., Schaffner-Barbero, C., Huecas, S., Alonso, D., Lopez-Rodriguez, M.L., **Ruiz-Avila, L.B.**, Nunez-Ramirez, R., Llorca, O., and Martin-Galiano, A.J. (2010). The antibacterial cell division inhibitor PC190723 is an FtsZ polymer-stabilizing agent that induces filament assembly and condensation. *J Biol Chem* 285, 14239-14246.

Schaffner-Barbero, C., Gil-Redondo, R., **Ruiz-Avila, L.B.**, Huecas, S., Lappchen, T., den Blaauwen, T., Diaz, J.F., Morreale, A., and Andreu, J.M. (2010). Insights into nucleotide recognition by cell division protein FtsZ from a mant-GTP competition assay and molecular dynamics. *Biochemistry* 49, 10458-10472.

**Ruiz-Avila, L.B.**, Huecas, S., Artola, M., Vergonos, A., Ramirez-Aportela, E., Cercenado, E., Barasoain, I., Vazquez-Villa, H., Martin-Fontecha, M., Chacon, P., *et al.* (2013). Synthetic Inhibitors of Bacterial Cell Division Targeting the GTP-Binding Site of FtsZ. *ACS Chem. Biol.* 8,2072-2083

Marcelo, F., Huecas, S., **Ruiz-Avila, L.B.**, Cañada, F.J., Perona, A., Poveda, A., Martin-Santamaria, S., Jimenez-Barbero, J., Morreale, A., Jimenez-Barbero, J., Andreu, J.M. (201). Interaction of bacterial cell division protein FtsZ with C8-substituted guanine nucleotides inhibitors. A combined NMR, biochemical and molecular modeling perspective. *J. Am. Chem. Soc.* DOI:10.1021/ja05515r

# INTRODUCCIÓN



## INTRODUCCIÓN

### 1. El citoesqueleto bacteriano

La mayoría de las bacterias, arqueas y células eucariotas utilizan filamentos protéicos para dividirse o separar sus cromosomas entre otras funciones. Las bacterias poseen lo que se denomina como proteínas citomotrices que son esenciales en el desarrollo de funciones celulares a través de la naturaleza dinámica de los filamentos que forman (Lowe and Amos, 2009). Las células bacterianas son más pequeñas y menos complejas que las eucariotas por lo que durante muchos años se consideraron como un estado celular primitivo y los estudios sobre las estructuras citoesqueléticas, transporte intracelular o localización de proteínas se limitaron a células eucariotas. Sin embargo, durante las últimas décadas se ha demostrado que las células procariontas poseen un alto grado de organización celular y actualmente se acepta que poseen proteínas estructuralmente homólogas a elementos del citoesqueleto de las células eucariotas. El citoesqueleto bacteriano está formado por filamentos citoplásmicos que autoensamblan y son capaces de producir movilidad sin necesidad de proteínas motoras (Lowe and Amos, 2009). Su función es dirigir y organizar procesos fisiológicos muy importantes en la célula como lo son el crecimiento, la división celular, la forma y polaridad celular y la segregación plasmídica (Vollmer, 2006).

El citoesqueleto eucariota se ha dividido en tres grupos según las proteínas que lo componen: (i) redes formadas por filamentos de actina, (ii) filamentos intermedios y (iii) microtubulos formados por tubulina. Actualmente se conocen homólogos procariontas para cada uno de estos elementos. MreB, ParM y FtsA (van den Ent et al., 2001a; van den Ent et al., 2001b; van den Ent and Lowe, 2000; van den Ent et al., 2002) son proteínas bacterianas que adoptan un plegamiento similar a la actina (Bork *et al.*, 1992), mientras que la crescentina (Ausmees et al., 2003), encontrada en bacterias del género *Caulobacter crescentus*, es una proteína homóloga a los filamentos intermedios de los eucariotas. Hasta el momento se han descrito tres proteínas bacterianas homólogas a tubulina: BtubA/B, FtsZ y TubZ. BtubA y BtubB se encontraron en bacterias del género *Verrucomicrobia* (Jenkins *et al.*, 2002) y tienen una estructura tridimensional prácticamente idéntica a la tubulina eucariota (Schlieper *et al.*, 2005) por lo que se cree han sido adquiridas desde un antecesor extinto de los eucariotas por transferencia horizontal (Martin-Galiano *et al.*, 2010). FtsZ, la proteína principal del citoesqueleto bacteriano implicada en la división celular, fue también descrita como homóloga

de la tubulina eucariota ya que presenta un plegamiento similar (Lowe and Amos, 1998) aunque con una identidad en su secuencia de aminoácidos menor que el 20% (Erickson, 2007; Nogales *et al.*, 1998). Finalmente, TubZ (Larsen *et al.*, 2007) codificada por plásmidos, presenta similitud estructural tanto con la tubulina como con FtsZ (Aylett *et al.*, 2011).

En células procariotas se han descubierto además otros elementos y factores exclusivos que constituyen nuevos sistemas de regulación. Por ejemplo, las proteínas MinD/ParA con un dominio ATPasa de tipo Walker modificado (Koonin, 1993) tienen la capacidad de formar polímeros *in vivo*. MinD forma polímeros helicoidales debajo de la membrana plasmática en *Escherichia coli* (Shih *et al.*, 2003) y forma parte de un sistema de regulación espacial necesario durante la división celular. ParA también forma polímeros helicoidales *in vivo* (Adachi *et al.*, 2006; Ebersbach and Gerdes, 2004) y participa en la segregación de los plásmidos a las células hijas (Gerdes *et al.*, 2000). Por el contrario, algunas bacterias de vida libre del género *Spiroplasma*, que carecen de un sáculo de mureína para definir su forma celular, han desarrollado una estructura citoesquelética interna para mantener su forma y movilidad (Trachtenberg, 1998). El citoesqueleto de estas bacterias se compone de fibras intracelulares formadas por una proteína que podría ser el factor de elongación EF-Tu (Beck, 1979; Mayer, 2003).

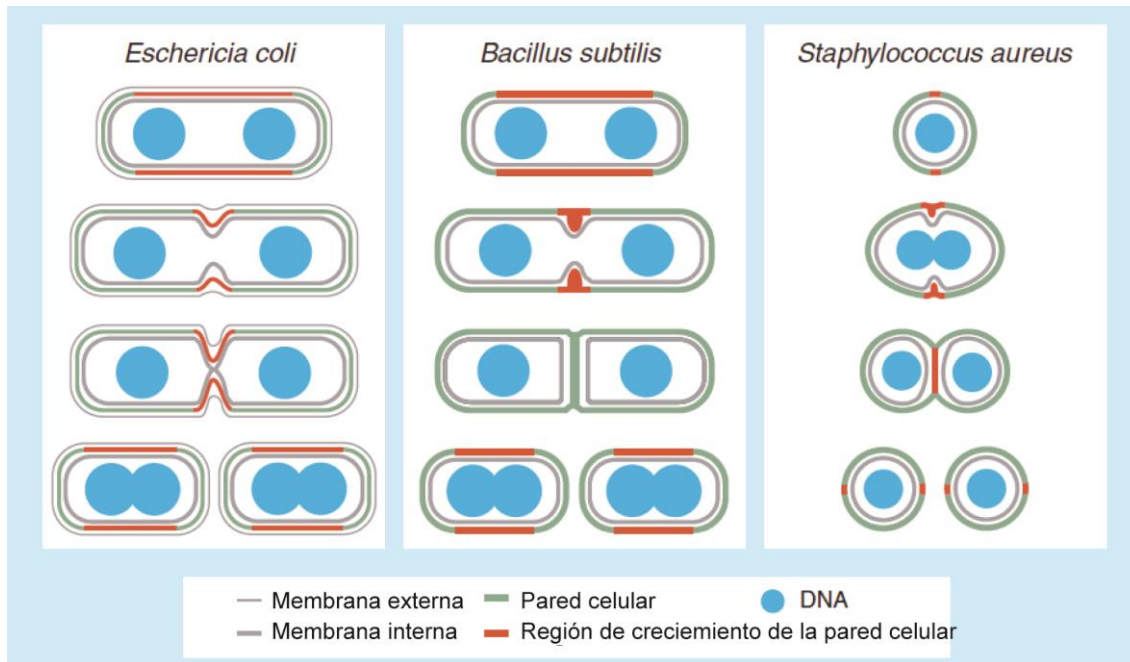
## 2. La división celular bacteriana

La división celular es un proceso esencial para la propagación de las especies vivas. En la citoquinesis se necesita una fuerza mecánica para que ocurra la separación de la célula madre en dos células hijas y este proceso debe estar regulado espacialmente para una correcta partición del material genético. En los años 1960 se empezó la caracterización de diversos procesos celulares en bacterias del género *Escherichia coli*, obteniéndose una amplia colección de mutantes termosensibles que afectaban al crecimiento y la replicación del organismo. Algunos de los mutantes obtenidos eran defectivos en la división celular y generaban largas células filamentosas a altas temperaturas (Hirota *et al.*, 1968). El análisis genético de los mismos permitió la identificación de una serie de genes llamados *fts* (*filamentous temperaturesensitive*), cuyos productos resultaban esenciales para el proceso de división bacteriana.

La división celular bacteriana ha sido estudiada principalmente en *E.coli* y *Bacillus subtilis*, dos organismos que comparten los elementos básicos de la maquinaria de división celular (Errington *et al.*, 2003). En ambos organismos el sitio de división se localiza normalmente en la mitad celular, perpendicular al eje longitudinal de la célula. En bacterias Gram-negativas (*E.coli*) participan las proteínas FtsZ, ZipA, FtsA, ZapA, FtsK, FtsQ, FtsL, FtsB, FtsW, FtsI, FtsN, FtsP y AmiC, y en Gram-positivas (*B.subtilis*) existen homólogos para casi todas estas proteínas salvo FtsK, FtsP y FtsN. La función de muchas de estas proteínas aún no se conoce, sin embargo su papel está relacionado con (i) ayudar a la formación del septo bacteriano, (ii) evitar la replicación del DNA en el sitio de división celular y permitir la segregación de cromosomas entre las células hijas, (iii) estabilizar el sitio de división celular y (iv) dirigir la formación de la pared y membrana celular para la formación del septo de división (Harry *et al.*, 2006).

En bacterias Gram-negativas la división celular se produce de modo constrictivo, es decir, la síntesis y separación del septo de peptidoglicano ocurre simultánea y coordinadamente en las tres capas de la envuelta celular (den Blaauwen *et al.*, 2008; Uehara *et al.*, 2009). Al contrario, en bacterias Gram-positivas como *B.subtilis* y *Staphylococcus aureus*, las células hijas permanecen conectadas por el septo de mureina hasta que éste es degradado por autolisinas al final de la división celular (Goehring and Beckwith, 2005) (**Figura 1**).

La citoquinesis en bacterias se puede dividir en tres etapas, (i) formación del anillo Z en la membrana citoplasmática donde participan proteínas de anclaje a membrana y donde es importante la regulación espacial y temporal para asegurar la correcta localización del anillo Z (Lutkenhaus, 2007; Pichoff and Lutkenhaus, 2002), (ii) integración de distintas proteínas al anillo Z que concluye con la formación del divisoma bacteriano (Aarsman *et al.*, 2005; Gamba *et al.*, 2009; Goley *et al.*, 2011) y (iii) formación del septo en bacterias Gram-negativas (Uehara and Bernhardt, 2011) y separación de las células hijas. A continuación se detallan cada una de éstas etapas.



**Figura 1.** División celular de distintas especies bacterianas: *E.coli*, *B.subtilis* y *S.aureus*. Las líneas rojas indican el lugar donde ocurre la síntesis del peptidoglicano. Representación tomada de la revisión de Goehring y Beckwith, 2005.

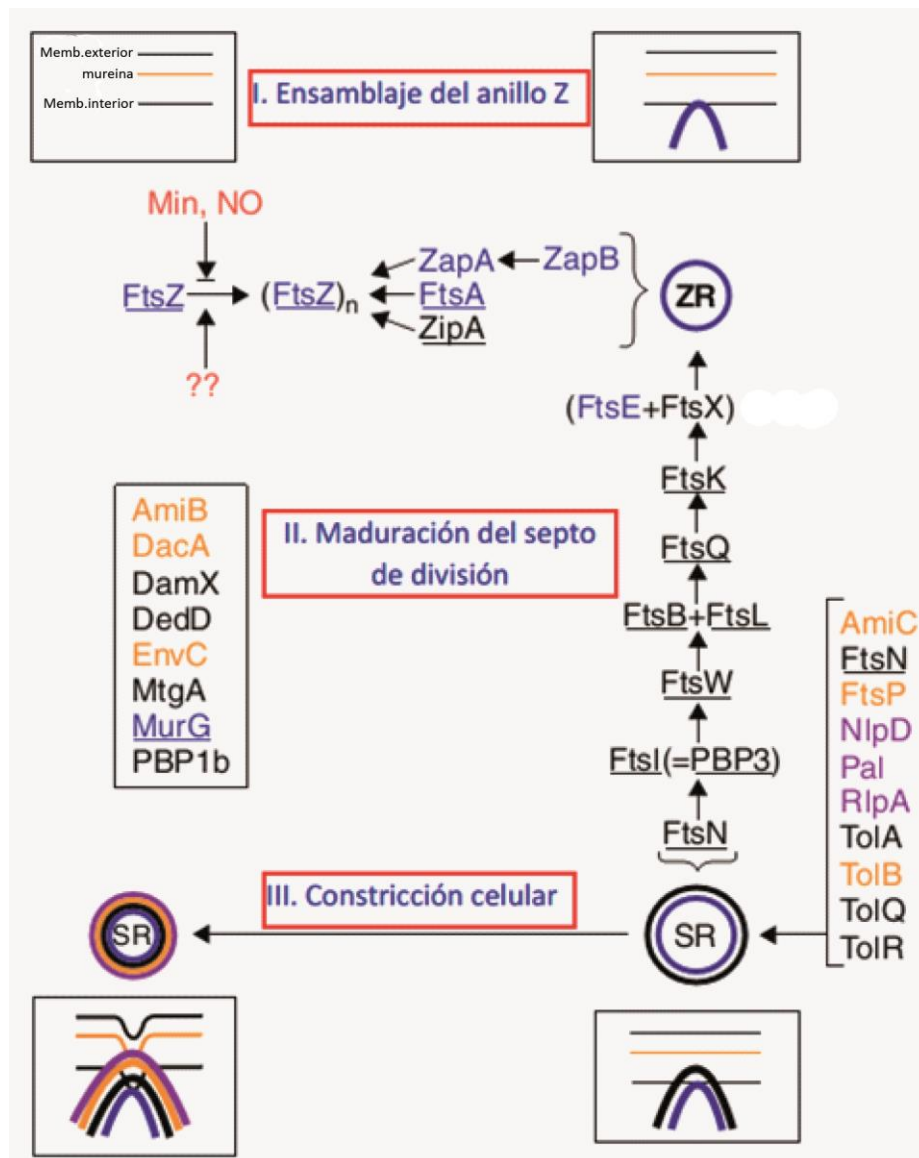
## 2.1. El anillo Z y ensamblaje del divisoma bacteriano

FtsZ es la proteína mayoritaria y más abundante en la división celular bacteriana. Esta proteína de división celular se encuentra además ampliamente distribuida en procariotas y su función de división celular es ubicua. En 1991 se llevó a cabo un experimento trascendental mediante inmunomicroscopía electrónica en *E.coli* que demostró que FtsZ ensambla en una estructura en forma de anillo (anillo Z) en el interior de la membrana citoplásmica marcando el sitio exacto de la citoquinesis (Bi and Lutkenhaus, 1991). Posteriormente esta estructura fue visualizada por microscopía de inmunofluorescencia (Addinall et al., 1996; Levin and Losick, 1996) y en células vivas que expresan FtsZ fusionada a una proteína fluorescente (GFP) (Ma et al., 1996). En estos experimentos se observó que FtsZ ensambla gradualmente en la mitad celular y eventualmente se fusiona para formar el anillo Z. Esta última transición correlaciona con la segregación del nucleóide (Inoue et al., 2009) y es promovida por varias proteínas no esenciales que se asocian a FtsZ (Zap) y que tienen la habilidad de estabilizar polímeros de la proteína (Dajkovic et al., 2010; Durand-Heredia et al., 2012; Gueiros-Filho and Losick, 2002; Hale et al., 2011; Monahan et al., 2009). Durante los últimos años se han desarrollado nuevas técnicas de visualización que han permitido conocer con más detalle la localización y formación del anillo Z. Todos los aspectos relacionados con el ensamblaje de FtsZ para formar

el anillo Z, así como los modelos de constricción asociados al anillo Z se comentaran en el apartado 3 de la Introducción (Ensamblaje de FtsZ *in vivo*).

Una vez conocida la existencia del anillo Z, varios laboratorios siguieron su estudio usando aproximaciones genéticas y herramientas novedosas de microscopía de fluorescencia, lo que llevó a la identificación de al menos otras 15 proteínas que jugaban un papel importante en la división celular bacteriana (Buddelmeijer and Beckwith, 2002; Scheffers, 2007). Algunas de estas proteínas también colocalizaban en la mitad celular durante el proceso de citoquinesis formando un complejo de división celular o divisoma.

En *E.coli*, inicialmente se pensaba que las proteínas de división celular se localizaban en el septo siguiendo un patrón lineal y jerárquico (Goehring and Beckwith, 2005; Schmidt et al., 2004), sin embargo, se ha visto como algunas de estas proteínas están agrupadas previamente en complejos que se asocian directamente al anillo Z sin seguir dicho orden lineal (Goehring et al., 2006). Por el contrario, en bacterias Gram-positivas (como *B.subtilis* o *Streptococcus pneumoniae*) las proteínas se localizan de forma independiente en el divisoma lo que sugiere que siguen un ensamblaje de tipo cooperativo (Errington et al., 2003; Morlot et al., 2003). Atendiendo a la función que realizan estas proteínas en la división celular, las podríamos dividir en varios grupos (i) unión del anillo Z a la membrana (FtsA, ZipA) y regulación del ensamblaje de FtsZ (ZapA-D, SepF, EzrA, ClpX, SulA), (ii) ensamblaje de proteínas tardías al divisoma (FtsEX, FtsK, FtsQ (DivIB), FtsL, FtsB (DivIC)) y (iii) proteínas encargadas de la elongación del septo (FtsW, FtsI (PBP3)PBP1, PBP2, FtsN, FtsP) y la hidrólisis del peptidoglicano (AmiA, AmiB, AmiC, EnvC, NplD) (**Figura 2**).



**Figura 2. Representación esquemática de la división celular de *E. coli*.** Se indican las tres etapas necesarias para la formación del septo de división (SR): acumulación de FtsZ en el sitio de división para la formación del anillo Z (ZR), maduración del septo de división y constricción celular. En cada etapa se indican las proteínas que participan durante el proceso: las que son esenciales para la viabilidad celular (subrayadas), las proteínas que interaccionan con la membrana plasmática interna, IM (azul); las proteínas transmembrana (negro), las proteínas periplásmicas (naranja) y las que se unen a la membrana externa, OM (violeta). Esquema de Boer, 2010.

i) Proteínas que unen el anillo Z a la membrana y regulan el ensamblaje de FtsZ

Aunque FtsZ no tiene una afinidad directa por la membrana, en todos los modelos descritos de división bacteriana se ha propuesto que el anillo Z debe estar anclado a la membrana citoplásmica ya que es la única forma de mantener la integridad estructural durante la septación, asegurar una correcta segregación cromosómica (Lutkenhaus, 2007) y posiblemente proporcionar la fuerza necesaria para que se produzca la constricción (Errington et al., 2003; Li et al., 2007; Romberg and Levin, 2003). En 1985 se describió FtsA, la proteína

más conservada en la división celular bacteriana después de FtsZ y homóloga estructural de la actina (van den Ent and Lowe, 2000). FtsA se localiza en el anillo Z a la vez que FtsZ (Den Blaauwen et al., 1999; Feucht et al., 2001; Ma et al., 1996; Wang et al., 1997) por lo que debería tener un papel importante en la regulación y formación del septo (Tormo *et al.*, 1985). Posteriormente se observó que FtsA interacciona por un lado con el dominio C-terminal de FtsZ y por otro lado se ancla a la bicapa lipídica a través de una hélice anfipática (Erickson, 2001; Hale and de Boer, 1999) siendo su función principal anclar el anillo Z a la membrana plasmática.

A parte de FtsA, ZipA también se requiere para la unión de FtsZ a la membrana en *E.coli* (Pichoff and Lutkenhaus, 2002). ZipA es una proteína de membrana (Ohashi *et al.*, 2002) aislada por primera vez en prostecobacterias (Margolin, 2000a) y cuya estructura primaria se encuentra poco conservada en los organismos procariontes. Al igual que FtsA, ZipA se une por un lado a la membrana plasmática a través de un dominio transmembrana y por otro lado a residuos muy conservados de FtsZ. En *E.coli*, tanto FtsA como ZipA, ayudan igualmente a la formación y estabilización del anillo Z (Pichoff and Lutkenhaus, 2002); mientras que en *B.subtilis* FtsA es imprescindible para el correcto ensamblaje del anillo Z (Jensen *et al.*, 2005).

Existen otras proteínas no esenciales para la división celular bacteriana pero que interactúan con FtsZ promoviendo su ensamblaje como ZapA-D y SepF. Dentro de la familia de las proteínas Zap, ZapA y ZapD están muy conservadas en la evolución y ayudan a la formación del divisoma en etapas muy tempranas de la división, estimulando la asociación entre protofilamentos de FtsZ y estabilizando el anillo Z (de Boer, 2010; Durand-Heredia *et al.*, 2012; Gueiros-Filho and Losick, 2002; Hale *et al.*, 2011). ZapA forma dímeros y tetrámeros en solución y aunque su mecanismo de acción no se conoce exactamente se sabe que promueve la estabilidad del anillo Z induciendo la formación de manojos e inactivando la actividad GTPasa de FtsZ (Mohammadi *et al.*, 2009; Pacheco-Gomez *et al.*, 2013). ZapB también estabiliza el anillo Z, por si sola o interactuando con ZapA, por lo que regula la división celular de dos formas distintas (Ebersbach *et al.*, 2008; Galli and Gerdes, 2010). Recientemente se identificaron ZapC y ZapD (Durand-Heredia *et al.*, 2011; Hale *et al.*, 2011) con funciones similares a las anteriores. SepF también participa en las primeras etapas del ensamblaje del divisoma (Hamoen *et al.*, 2006) y promueve la formación de manojos de FtsZ pero sin alterar su actividad GTPasa. Por si sola forma anillos regulares (Gundogdu *et al.*, 2011) pero cuando se unen al dominio C-terminal de protofilamentos de FtsZ de *B.subtilis* o *E.coli* (Krol *et al.*, 2012) forma estructuras tubulares cuya relevancia fisiológica se desconoce.

Se han descrito muchos reguladores negativos de FtsZ que, a diferencia de los anteriores, inhiben la polimerización de la proteína. Algunos de ellos sólo se han encontrado en bacterias Gram-negativas (SulA) mientras que otros están presentes en un amplio rango bacteriano (EzrA y ClpX). SulA es una proteína que se expresa en *E.coli* como parte del sistema SOS en respuesta al daño del ADN y se une a FtsZ (Higashitani et al., 1995; Huang et al., 1996; Jones and Holland, 1985) inhibiendo la división celular ya que bloquea el ensamblaje del anillo Z (Bi and Lutkenhaus, 1993). SulA forma dímeros en solución y se une a FtsZ bloqueando la interfaz de polimerización de la proteína por lo que impide la unión de los distintos monómeros de FtsZ (Cordell *et al.*, 2003). En *B.subtilis* se conoce la existencia de una proteína homóloga funcional de SulA, YneA, que también se expresa en respuesta al sistema SOS pero que está poco relacionada estructuralmente con SulA (Kawai *et al.*, 2003).

A diferencia de SulA, EzrA es una proteína muy conservada en bacterias Gram-positivas y actúa como desestabilizante de los polímeros de FtsZ (Levin *et al.*, 2001) ya que incrementa la concentración crítica de ensamblaje y la actividad GTPasa de la proteína (Chung et al., 2007; Haeusser *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2007). Curiosamente, aunque su función es la opuesta, comparte una estructura primaria muy similar a la de ZipA por lo que se ha propuesto que podrían ser proteínas homólogas estructurales. ClpX (Camberg et al., 2009; Sugimoto et al., 2010; Weart et al., 2005) es una chaperona de la familia de las ATPasas que forma un complejo con ClpP, una serin proteasa. En *B.subtilis* ClpX regula la división celular *in vivo*, mientras que *in vitro* el complejo ClpXP inhibe la polimerización de FtsZ en presencia de ATP. ClpXP degrada tanto monómeros como filamentos de FtsZ de *E.coli* *in vitro*.

## ii) Unión al divisoma de proteínas de división tardías

El ensamblaje de proteínas tardías en el septo de división ocurre una vez formado el anillo Z y antes de que ocurra la división celular. En *E.coli*, participan durante esta fase las proteínas FtsE (con un dominio de unión a ATP) y FtsX (con un dominio transmembrana) (Schmidt et al., 2004). El complejo FtsEX es el regulador principal de la hidrólisis de la pared celular en el sitio de división celular. FtsEX se une a la proteína EnvC que a su vez activa las proteínas amidasas que se encargan de la ruptura de peptidoglicano de la pared celular (Yang *et al.*, 2011).

La siguiente proteína en unirse al divisoma en *E.coli* es FtsK (Margolin, 2000b). FtsK, una translocasa de ADN muy conservada en el reino bacteriano, contiene tres dominios estructurales: un dominio N-terminal con cuatro secuencias transmembrana responsables de su localización en el anillo Z (Begg *et al.*, 1995; Yu *et al.*, 1998), un dominio central con secuencias muy conservadas entre las distintas especies bacterianas, y un dominio C-terminal necesario para la segregación de los cromosomas y la movilización del DNA (Aussel *et al.*, 2002). Por ello se postuló que FtsK coordinaría la división celular y la segregación cromosómica. En *E.coli*, FtsK se une a una secuencia específica de ADN (KOPS) a través de su dominio C-terminal permitiendo la correcta localización de los cromosomas durante la división celular (Lowe *et al.*, 2008). La homóloga de FtsK en *B.subtilis* es SpoIIIE que además de asegurar la translocación adecuada de los cromosomas entre los distintos compartimentos se encarga de la fusión de membrana durante la esporulación (Sharp and Pogliano, 2003; Wu and Errington, 1997). Sin embargo SpoIIIE a diferencia de FtsK, no es una proteína esencial en el proceso de septación.

Seguidamente se produce la localización del complejo FtsQ-FtsL-FtsB en *E.coli* y DivIB-FtsL-DivIC en *B.subtilis*, lo que requiere la unión previa de FtsK. La topología de estas proteínas es similar en ambos organismos: una corta región citoplásmica, un segmento transmembrana y un largo dominio periplásmico. Ambos complejos se localizan en el septo formado por la pared celular (Buddelmeijer and Beckwith, 2004; Chen and Beckwith, 2001; Chen *et al.*, 1999). En *E.coli* el ensamblaje de estas proteínas sigue un patrón jerárquico lineal, mientras que en *B.subtilis* su localización es dependiente de la proteína PBP2B (Daniel *et al.*, 2000). La función principal del complejo es la regulación de la síntesis del peptidoglicano del septo (Katis *et al.*, 2000; Margolin, 2000a) y permitir el ensamblaje de FtsW, una proteína que participa en la síntesis del peptidoglicano.

### iii) Síntesis e hidrólisis del peptidoglicano

Cuando se completa el ensamblaje del divisoma comienza la síntesis del peptidoglicano en lo que constituirá los polos de las nuevas células. Este proceso es llevado a cabo por las sintasas PBP3 y PBP1 previo anclaje al divisoma por FtsW y FtsN. En *E.coli*, una vez se ha producido la división celular y las células hijas están formadas, es necesaria la hidrólisis y recambio del peptidoglicano llevado a cabo por las amidasas (AmiA, AmiB y AmiC) y cuya actividad está a su vez regulada por las proteínas EnvC y NplD. En *B.subtilis* no está claro aún el proceso de síntesis e hidrólisis del peptidoglicano pero se ha descrito que puede debido a la

actividad de las amidasas CwIC y SpoIIB (Errington et al., 2003) que se localizan en el septo y que aparecen al inicio de la esporulación (Perez et al., 2000). También podría estar implicada la proteína PBP2B ya que su disminución conduce a la formación de un septo y en algunos casos a una constricción de la membrana (Daniel et al., 2000).

FtsW pertenece a una familia de proteínas integrales de membrana implicadas en diversas funciones relacionadas con la determinación de la forma celular, elongación, división y esporulación conocida con el nombre de SEDS (Shape, Elongation, Division and Sporulation). La familia de proteínas SEDS está presente en aquellas bacterias que tienen pared celular de peptidoglicano (Henriques *et al.*, 1998; Jung *et al.*, 1989) e incluye proteínas esenciales en *B.subtilis* encargadas de la elongación como RodA, o implicadas en la esporulación como SpoVE (Lara and Ayala, 2002). FtsW tiene 10 regiones transmembrana y se ha descrito como una proteína transportadora de precursores lipídicos (flipasa) (Mohammadi et al., 2011) encargada de anclar las sintasas de peptidoglicano PBP1B y PBP3.

FtsI (PBP3) de *E.coli* y su homólogo PBP2B en *B.subtilis* cumplen un papel central en el divisoma bacteriano y son esenciales para la síntesis del peptidoglicano del septo. Las PBP pertenecen a la familia de proteínas acil serin transferasas (Goffin and Ghuysen, 1998) que contienen un dominio catalítico responsable de la introducción de un enlace cruzado en el peptidoglicano del septo. FtsI interactúa con FtsW, FtsL, FtsQ, FtsN y PBP1B (Karimova *et al.*, 2005) y su localización depende del complejo FtsQLB.

FtsN es una proteína de membrana con una región corta citoplásmica y una larga región periplásmica o dominio de unión a peptidoglicano (SPOR) (Yang et al., 2004) que sólo se ha encontrado en enterobacterias (Margolin, 2000a) por lo que está poco conservada entre las distintas especies bacterianas. FtsN se une al septo (Chen and Beckwith, 2001) y en *E.coli* se sabe que interactúa con proteínas de localización tempranas y tardías en el divisoma: FtsA, ZapA, PBP3 y PBP1B (Busiek *et al.*, 2012; Muller *et al.*, 2007). Aunque su papel durante la división celular no es conocido, se sabe que estimula la actividad de PBP1B coordinando la síntesis del peptidoglicano durante la septación y estabilizando el divisoma bacteriano (Rico *et al.*, 2010). Se conoce también la existencia de una proteína periplásmica soluble que participa en la división celular, FtsP, que se localiza en el sitio de división dependiente de FtsZ, FtsQ, FtsL y FtsN (Tarry et al., 2009) y sólo resulta esencial en bacterias que crecen bajo condiciones de estrés oxidativo o con daños en su ADN (Samaluru et al., 2007), si bien su función exacta se desconoce.

Las hidrolasas de peptidoglicano son enzimas ubicuas en bacterias. Muchas de ellas son parte esencial de su sistema de defensa (Vollmer, 2008), mientras que otras son producidas por la bacteria para remodelar o destruir su propio peptidoglicano. En *E.coli* estas últimas se conocen como Amidases (AmiA, AmiB y AmiC) y son enzimas que remueven los péptidos atados a cadenas de glicanos (que constituyen el peptidoglicano de la pared celular) lo que permite que la célula pueda separarse (Bernhardt and de Boer, 2004). Aunque el mecanismo de acción no se conoce, se sabe que las amidases actúan de forma solapante y la presencia de cada una asegura la supervivencia celular. AmiB y AmiC se localizan en el septo (Peters *et al.*, 2011) y requieren para su activación de dos proteínas, EnvC y NlpD, las cuales a su vez son dependientes de FtsN o FtsEX (Uehara *et al.*, 2010). AmiA no se localiza en el septo pero es capaz de llevar a cabo la rotura del peptidoglicano previa activación por EnvC (Peters *et al.*, 2011).

## 2.2. Regulación espacial del anillo Z

La regulación espacial del ensamblaje del anillo Z ha sido estudiada sobre todo en *E.coli*, *B.subtilis* y *Caulobacter crescentus* (Lutkenhaus *et al.*, 2012). Dichos estudios mostraron la existencia de distintos reguladores negativos (MinC, SlmA y MipZ) cuya función es evitar la formación del anillo Z en un lugar distinto a la mitad celular (Cho *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 1999; Thanbichler and Shapiro, 2006). En *E.coli* y *B.subtilis* se conocen dos sistemas de regulación negativa, Min (del inglés minicell) y NO (del inglés nucleoid occlusion) llamados así por la forma en la que posicionan al anillo Z. A parte de estos, se sabe la existencia de otros reguladores en bacterias de la especie *C.crescentus* como MipZ (**Figura 3**).

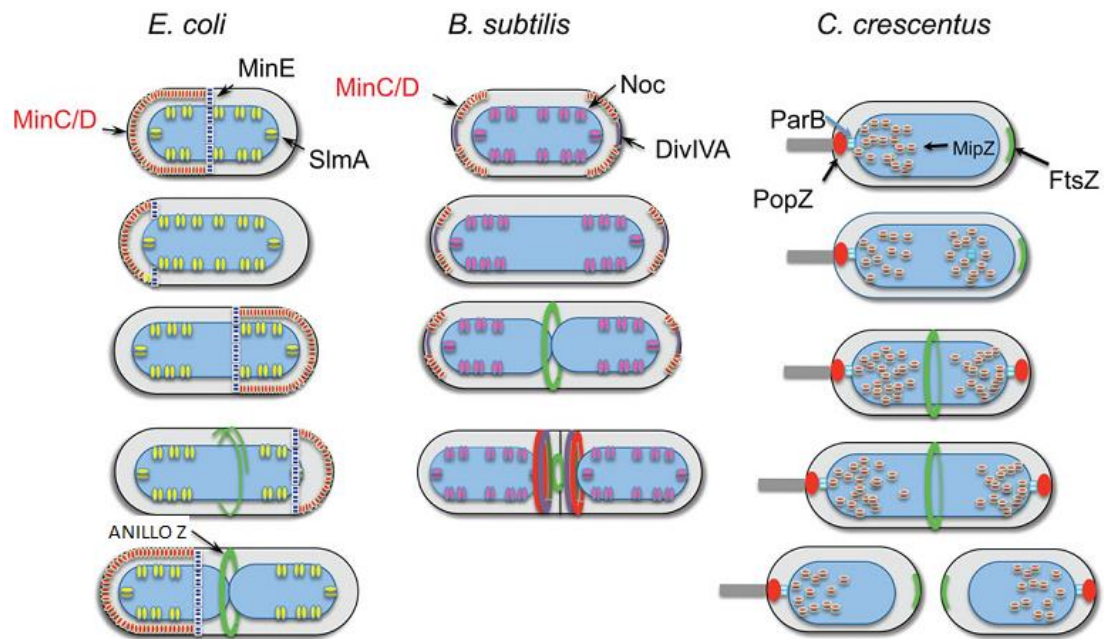


Figura 3. Representación esquemática de los sistemas de regulación espacial del anillo Z en *E. coli*, *B. subtilis* y *C. crescentus*. Figura obtenida de la revisión de Lütkenhaus y Pichoff, 2012.

### ➤ Sistema Min

El estudio de este sistema de regulación comenzó hace unas décadas gracias al aislamiento en *E. coli* y *B. subtilis* de mutantes que tenían la propiedad de dividirse en los polos celulares generando una mezcla de células pequeñas (minicells) carentes de DNA (Adler *et al.*, 1967; Reeve *et al.*, 1973) y otras de tamaño normal (Teather *et al.*, 1974). La mutación se localizó en el locus *min* y se identificaron tres genes *minC*, *minD* y *minE* que actuaban de manera coordinada para poder bloquear la división celular en los polos (de Boer *et al.*, 1988, 1989; Lutkenhaus, 2007). MinC actúa como un regulador de la división celular inhibiendo el ensamblaje de FtsZ. MinC carece de especificidad en su localización y es necesaria la presencia de otras dos proteínas MinD y MinE para proporcionar la especificidad topológica en su función. MinD es una ATPasa de membrana que se une y ancla las proteínas MinC y MinE. Esta última es un regulador negativo que asegura que el proceso de inhibición de la división se produzca solo en los polos.

MinC y MinD forman un complejo asociado a la membrana que se extiende desde uno de los polos hasta las proximidades de la zona media de la bacteria. Cuando ambas proteínas están unidas, MinD aumenta la afinidad de unión de MinC por FtsZ (Johnson *et al.*, 2002; Shen and Lutkenhaus, 2009). Al mismo tiempo, la proteína asociada a membrana MinE polimeriza en una estructura tipo anillo que se localiza cerca del límite de MinCD y no se mantiene fija

sino que oscila de un lado a otro mientras que el resto de la proteína MinE asociada a membrana, ensambla en el límite de la misma región polar donde había ensamblado el complejo MinCD. Cuando MinE se une a MinD activa su ATPasa y la hace separarse de la membrana (Lackner et al., 2003; Zhou et al., 2005), por lo que MinD difunde hacia el polo celular opuesto y se une nuevamente a MinC. Como resultado, se crea una oscilación de MinC/MinD dentro de los polos celulares que se caracteriza por la formación de ondas en la membrana plasmática. En *B.subtilis* y en la mayoría de bacterias Gram-positivas el regulador negativo del complejo MinCD es una proteína con dominios *coil-coil*, DivIVA (Oliva et al., 2010). Esta proteína también ensambla en una estructura tipo anillo y se localiza en la invaginación de la membrana que se genera durante el inicio de la citoquinesis, donde ancla a MinC y a MinD a través del intermediario MinJ (Bramkamp et al., 2008; Patrick and Kearns, 2008). Debido a que el complejo MinCD está fijo en la membrana no se observan oscilaciones de MinC/MinD en la célula. Así, DivIVA evita que las proteínas Min se localicen en el septo de división y permiten que FtsZ se distribuya igualmente en las células hijas (Gregory et al., 2008).

➤ Sistema NO

El nucleóide desarrolla un papel importante en la posición del septo de división celular. En 1989, análisis de mutantes de *E.coli* en genes necesarios para la replicación del ADN o la segregación de cromosomas mostraron como estos solo se dividían en un lado del nucleóide (no es su conjunto) y tras la división celular daban origen a células anucleadas (Mulder and Woldringh, 1989). Estos resultaron postularon la existencia de otro sistema de regulación espacial del anillo Z aparte del sistema Min, donde participara el nucleóide y que posteriormente fue conocido como sistema de oclusión por nucleóide (NO). El sistema NO ha sido descrito en *E.coli* y *B.subtilis* (Harry et al., 1999; Sun et al., 1998; Yu and Margolin, 1999) y en él participan las proteínas, SImA y Noc (Bernhardt and de Boer, 2005), en *E.coli* y *B.subtilis* respectivamente, que se unen a sitios inespecíficos de ADN y se encuentran dispersas en casi todo el cromosoma circular bacteriano (Wu et al., 2009).

SImA es una proteína de la familia TetR que se une tanto al ADN como a los filamentos de FtsZ (Cho et al., 2011) impidiendo la formación del anillo Z durante la duplicación de los cromosomas por lo que evitan que los cromosomas se rompan o alteren durante la replicación y segregación (Bernhardt and de Boer, 2005; Wu and Errington, 2003). Noc pertenece a la familia ParB y se sabe que une ADN y previene la formación del septo sobre el nucleóide, pero no está clara su interacción con FtsZ. Los dobles mutantes *min<sup>-</sup> noc<sup>-</sup>* conducen a la formación

de de un septo de división aberrante. En *B.subtilis*, estudios de la formación del anillo Z durante la germinación de sus esporas (Migocki et al., 2002), mostraron como los dobles mutantes *min<sup>-</sup> noc<sup>-</sup>* conducen a la formación de células viables en las que se retrasa la formación del anillo Z, pero al no ser este un fenotipo completamente aberrante se ha sugerido que deben existir factores adicionales para posicionar el anillo Z (Lutkenhaus et al., 2012).

➤ Otro regulador espacial: MipZ

Las bacterias de la especie *C.crescentus* carecen del sistema Min, pero regulan la posición del anillo Z mediante una ATPasa, MipZ (Thanbichler and Shapiro, 2006). Para desarrollar su función, los monómeros de MipZ se unen a una proteína ubicada en los polos celulares, ParB, y forman el complejo MipZ-ParB. Posteriormente, este complejo se une a la proteína ParA (anclada a los polos celulares por el intermediario PopZ) localizada muy cerca del origen de replicación y que está implicada en la segregación cromosómica. Una vez formado el complejo MipZ-ParB-ParA, ParB induce la dimerización de MipZ que se separa del complejo, difunde en la célula y se une a zonas no específicas de ADN evitando el ensamblaje de FtsZ en esta zona (Kiekeleybusch et al., 2012). Esta unión es pasajera ya que cuando MipZ hidroliza ATP se separa del ADN. Ciclos continuos de dimerización de la proteína y de unión/disociación al ADN generan un gradiente de MipZ en la célula que es mayor en las zonas cercanas a ParB. Una vez que el cromosoma se ha replicado y segregado a ambos lados de la célula, hay un gradiente bipolar de MipZ muy bajo cerca de la mitad celular lo que permite el ensamblaje de FtsZ y la formación del anillo Z.

### **3. La proteína de división celular bacteriana FtsZ**

#### **3.1. Distribución de la familia de proteínas FtsZ en procariotas y orgánulos eucariotas**

FtsZ es una proteína muy importante dentro de la división celular bacteriana y está ampliamente representada en todos los géneros bacterianos, salvo algunas excepciones. Por ejemplo, FtsZ no está presente en bacterias intracelulares de la familia *Chlamydiaceae* (Vaughan et al., 2004) y en *Verrucomicrobia*, las cuales se dividen usando la maquinaria de división celular de la célula hospedadora, ni en algunas bacterias de vida libre

como *Ureaplasma urealyticum* (Glass et al., 2000) o *Pirellula* (Glockner et al., 2003) en las cuales no está claro como se lleva a cabo el proceso de división celular. Dentro de las arqueobacterias (*Euriarqueotas*, *Crenarqueota* y *Korarqueotas*), FtsZ está conservada en todos los grupos salvo en *Crenarqueotas* que usa el producto de los genes del operón *cdv* como única maquinaria de división celular. Además, FtsZ está presente en orgánulos de células eucariotas como los cloroplastos de las plantas del género *Arabidopsis thaliana* donde ensambla en una estructura tipo anillo en el centro del orgánulo (Osteryoung and Vierling, 1995; Vitha et al., 2001) y en la mitocondria de eucariotas primitivos como algunas algas y amebas (Osteryoung and Nunnari, 2003).

Las proteínas Cdv presentes en *Crenarqueotas* han sido descritas como homólogos del sistema ESCRT-III de eucariotas (Lindas et al., 2008) y se ha propuesto que dichos genes han sido adquiridos desde los eucariotas por transferencia genética horizontal. La presencia de FtsZ en orgánulos eucariotas apoya claramente la teoría endosimbionte ya que la FtsZ mitocondrial es muy semejante a la de  $\alpha$ -proteobacterias, que serían los predecesores de las mitocondrias y la FtsZ de cloroplastos está muy relacionada con la de las cianobacterias, posibles predecesores de los cloroplastos.

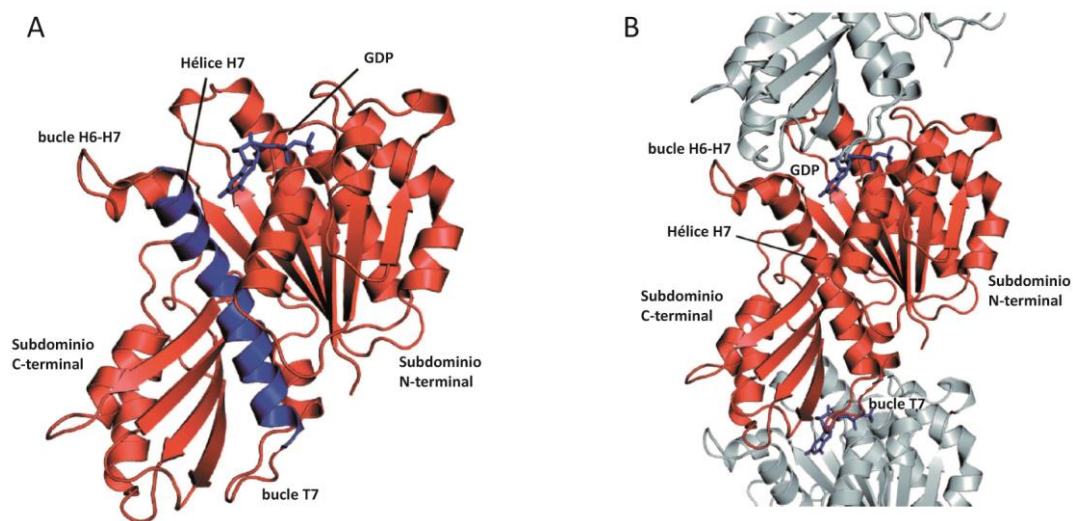
### 3.2. Estructura y función de FtsZ

Análisis bioquímicos y de la secuencia de aminoácidos de FtsZ y tubulina sugirieron que FtsZ debería ser homóloga de la tubulina eucariota (de Pereda et al., 1996). En 1998 las estructuras a alta resolución de FtsZ de *M.jannaschii*  $\alpha$ - y  $\beta$ - tubulina mostraron como efectivamente ambas proteínas tenían un plegamiento muy similar (Löwe y Amos, 1998; Nogales et al., 1998b). Sin embargo, se observaron diferencias entre FtsZ y tubulina ya que, por ejemplo, la identidad global de aminoácidos entre ellas es solo del  $\approx 20\%$ , existiendo mayor grado de conservación en aquellos residuos que participan en la unión e hidrólisis del GTP (Erickson, 2007). Además, la unidad funcional de FtsZ es el monómero y la de tubulina el heterodímero.

FtsZ y tubulina constan de dos dominios globulares (N y C terminal) conectados por una hélice central (hélice H7). El dominio N-terminal o dominio de unión del nucleótido presenta un plegamiento tipo Rossmann y está formado por una lámina  $\beta$  formada por seis segmentos  $\beta$  paralelos rodeadas por  $\alpha$  hélices unidas por bucles que contienen los residuos que participan en la unión del GTP. El nucleótido se une en uno de los extremos de las hélices y establece

contacto con todos los bucles de ese lado, de igual forma que ocurre cuando el GTP se une a tubulina; por ello ésta es la región con más homología entre ambas proteínas (Lowe, 1998; Nogales et al., 1998). El dominio C-terminal está formado prácticamente en su totalidad por una lámina  $\beta$  formada por cuatro segmentos  $\beta$  en contacto con dos hélices a cada lado y contiene todos los aminoácidos de la parte superior de la interfaz de polimerización incluido el bucle “catalítico” T7 implicado en la hidrólisis del GTP. Este dominio contiene el sitio de reconocimiento de varias proteínas inhibitoras (Mosyak et al., 2000; Yan et al., 2000) (Figura 4A y B).

En FtsZ y tubulina el sitio de unión del GTP se completa cuando la proteína polimeriza (de Boer et al., 1992; RayChaudhuri and Park, 1992). Durante su polimerización el bucle T7 de la subunidad de arriba se inserta dentro del sitio de unión del nucleótido de la subunidad de abajo (Lowe and Amos, 1999) y activa la hidrólisis del GTP. De esta forma, la actividad GTPasa dependerá de la polimerización de la proteína (Oliva et al., 2004; Scheffers et al., 2002) (Figura 4A y B).

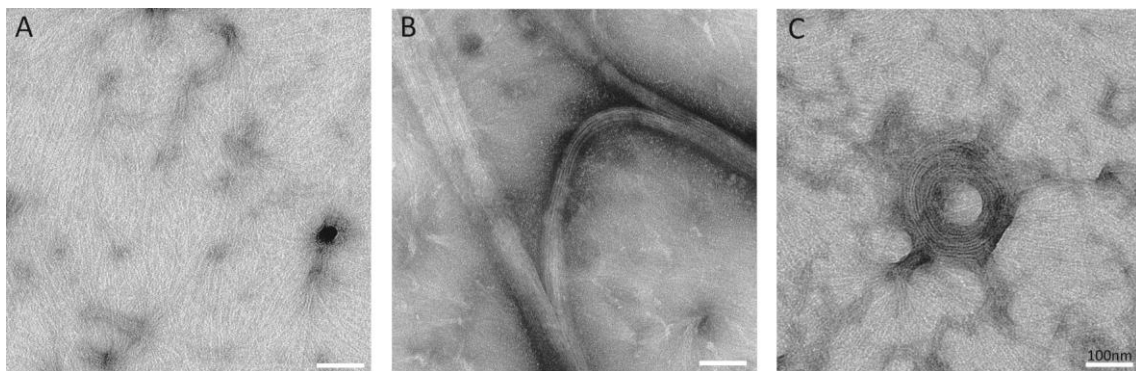


**Figura 4. Representación de la estructura cristalográfica de FtsZ de *S. aureus* con GDP unido.** En A, la molécula se muestra en rojo salvo la hélice H7 (residuos 179-202) y el GDP que están en azul; y en B, se muestra la estructura de un monómero de la proteína en rojo y moléculas de los monómeros contiguos en gris. La molécula de GDP se representa en azul. Figura de Matsui et al., 2012.

### 3.3. Ensamblaje de FtsZ

➤ Ensamblaje *in vitro* de FtsZ

FtsZ purificada ensambla en filamentos por asociación de subunidades individuales cabeza-cola en presencia de GTP y forma diversas estructuras poliméricas donde se establecen contactos longitudinales y laterales (Mukherjee y Lutkenhaus, 1994; Erickson et al., 1996; Löwe y Amos, 1999; Oliva et al., 2003; Oliva et al., 2004; Huecas et al., 2008). Los protofilamentos de FtsZ observados *in vitro* pueden ser rectos o curvos, y dependiendo de las condiciones experimentales usadas se pueden identificar otras morfologías que incluyen desde filamentos simples hasta anillos, manojos, túbulos, láminas, hélices, etc (Chen and Erickson, 2005; Mukherjee and Lutkenhaus, 1994) (**Figura 5**).



**Figura 5. Micrografías electrónicas de filamentos de Bs-FtsZ.** Se visualizaron muestras de Bs-FtsZ (10  $\mu$ M) con 2 mM de GTP y 10 mM de  $MgCl_2$  en tampón Hepes pH 6.8 (50 mM Hepes-KOH, 50 mM KCl, 1 mM EDTA). En A, filamentos simples de FtsZ; en B, manojos y en C, toroides.

FtsZ polimeriza cooperativamente formando protofilamentos de una subunidad de ancho (Huecas y Andreu, 2003; Huecas et al., 2008). En este tipo de ensamblaje es necesario una concentración mínima de monómeros (concentración crítica) para que comience la polimerización de la proteína y se identifican dos fases, la fase de nucleación donde se forma un núcleo de polimerización y la fase de elongación en la cual el polímero se empieza a ensamblar a partir del núcleo.

El hecho de que FtsZ ensamble cooperativamente formando protofilamentos simples se podría explicar con la existencia de un cambio conformacional que incrementara la afinidad de unión cuando un monómero se une al siguiente. De esta forma, los monómeros de FtsZ podrían encontrarse en dos estados diferentes, un estado inactivo de baja afinidad para la formación de filamentos y un estado activo de alta afinidad para la polimerización (Huecas et

al., 2008; Dajkovic et al., 2008; Miraldi et al., 2008; Erickson 2010). Se postuló que la existencia de estos dos estados de la proteína podía venir dado por la presencia de nucleótidos  $\gamma$ -fosfato en el ensamblaje o desensamblaje de la proteína (Martin-Galiano et al., 2010; Chen y Erickson, 2011) por lo que FtsZ actuaría como un interruptor molecular regulado. Sin embargo esto no estaría claro ya que las estructuras cristalográficas de FtsZ de distintas especies (Oliva et al., 2004) solo han mostrado el estado inactivo de FtsZ tanto en presencia de GTP como de GDP.

Recientemente, la estructura cristalográfica del protofilamento de FtsZ de *Staphylococcus aureus* (Elsen et al., 2012; Matsui et al., 2012) ha mostrado la existencia de los dos posibles estados de los monómeros de FtsZ y el cambio conformacional que se da entre los ellos. La resolución de la estructura cristalográfica del complejo de FtsZ de *S.aureus* (Sa-FtsZ) mostró la conformación de alta afinidad de FtsZ (conformación abierta no visto hasta entonces). La comparación de la estructura cristalográfica de este complejo con la de FtsZ de *B.subtilis* sin compuesto mostró además los cambios conformacionales que se dan entre ambos estados, aunque aún hace falta resolver la estructura cristalográfica de monómeros Sa-FtsZ sin formar filamentos para comprobar dichos cambios en FtsZ de la misma especie.

FtsZ requiere GTP para ensamblar y su desensamblaje conlleva la hidrólisis del nucleótido a GDP (Huecas and Andreu, 2004; Mukherjee and Lutkenhaus, 1994). A diferencia de la tubulina, cuyo sitio de unión está ocluido por el protofilamento (Nogales et al., 1998; Oliva et al., 2004), el sitio del nucleótido de FtsZ está más expuesto (Mingorance et al., 2001, Romberg y Mitchinson, 2003). Hay evidencias de que en los protofilamentos de FtsZ se puede intercambiar GDP por GTP que se encuentra libre en solución (Harry et al., 2006; Mingorance et al., 2001; Tadros et al., 2006), gracias a lo observado en la estructura cristalográfica de dímeros FtsZ de *M.jannaschii* (Oliva et al., 2004) y por experimentos *in vitro* que mostraron como una vez ensamblados los protofilamentos de FtsZ, el GDP, el mant-GTP o el GTP $\gamma$ S pueden asociarse dentro de estos polímeros (Huecas et al., 2007) (Scheffers et al., 2000).

Los filamentos de FtsZ *in vitro* presentan diferentes curvaturas. Las primeras observaciones de filamentos curvados de FtsZ (Erickson et al., 1996) postularon que dicho estado podría deberse a la presencia de GDP unido a los polímeros (Lu et al., 2000; Huecas et al., 2003; Huecas et al., 2004). Estudios posteriores de microscopía de fuerza atómica y microscopía electrónica (Mingorance et al., 2005) han mostrado como en presencia de GTP también se forman polímeros de FtsZ curvados; y más recientemente se ha observado que la formación de filamentos de FtsZ en presencia de GMPCPP (análogo no hidrolizable de GTP) son capaces de inducir constricción de liposomas artificiales (Osawa y Erickson, 2011; Osawa et al., 2008). La

posibilidad de que filamentos de FtsZ con GTP adopten una curvatura que pueda deformar membranas formadas *in vitro*, ha sido usada como base para proponer que FtsZ puede proveer la fuerza necesaria para la constricción de la membrana bacteriana (Erickson et al., 2010).

➤ Ensamblaje *in vivo* de FtsZ

La relevancia *in vivo* de los polímeros que forma FtsZ *in vitro* aun no está clara, aunque en general se asume que estos protofilamentos son la unidad básica estructural para el posterior ensamblaje del anillo Z. Ensayos de FRAP (“Fluorescence Recovery After Photobleaching”) y microscopía de alta resolución STED (“Stimulated Emission Depletion”) han demostrado que el anillo Z no es una estructura estática sino que las subunidades de FtsZ presentes en el anillo Z se intercambian rápidamente ( $T_{1/2}$  de 8-10 segundos) con aquellas que están libres, por lo que se ha propuesto que los filamentos que forman el anillo Z deberían ser cortos (Erickson et al., 2010; Jennings et al., 2010; Stricker et al., 2002). La remodelación del anillo Z depende además de la actividad GTPasa del polímero (Stricker et al., 2002; Erickson et al., 2010) que promueve el desensamblaje de los protofilamentos y es la clave de la naturaleza dinámica de los polímeros de FtsZ, que se observan tanto *in vitro* como *in vivo* (Mukherjee y Lutkenhaus, 1998; Stricker et al., 2001; Anderson et al., 2004; Chen y Erickson, 2005).

Se sabe que solo el 30-40% de FtsZ estaría en el anillo Z y que dicha cantidad es suficiente para formar un filamento continuo que diese 2 o 3 vueltas a la circunferencia de la bacteria (Anderson et al., 2004; Geissler et al., 2007). La observación de estos filamentos en células de *Caulobacter crescentus* (mediante criotomografía electrónica), mostró que FtsZ polimeriza en filamentos cortos en la región del septo que se localizaban perpendicularmente al eje longitudinal de la célula sin que lleguen a converger (Li et al., 2007). A partir de estos resultados se han propuesto dos modelos posibles de cómo los protofilamentos de FtsZ ensamblarían para formar el anillo Z. En el primer modelo se sugiere que estos filamentos cortos ensamblarían de forma solapada hasta definir el anillo Z (Li et al., 2007) y la segunda opción sería que estos filamentos de FtsZ se condensan en uno solo o en protofilamentos más largos que pudieran rodear la circunferencia bacteriana (Erickson et al., 2010).

Existen a su vez varios modelos de cómo a partir del anillo Z podría producirse la constricción de la membrana durante la división celular. En el primer modelo, “modelo andamio”, los polímeros de FtsZ no producirían la fuerza de constricción “*per se*” sino que sólo servirían como soporte para unión y ensamblaje de otras proteínas del divisoma, que serían las encargadas de la constricción (Li et al., 2007). Este modelo no explica sin embargo por que FtsZ

anclada a una membrana *in vitro* es capaz de producir constricción en liposomas (Osawa et al., 2008; et al., 2009). Los otros dos modelos asumen que FtsZ es capaz por sí misma de producir la fuerza de constricción necesaria durante la división celular. El “modelo deslizante” propone que protofilamentos de FtsZ solapados se deslizan entre sí de forma que al haber un incremento entre las interacciones laterales, y al estar unidos a la membrana plasmática por FtsA y ZipA, generarían la fuerza de constricción necesaria durante el proceso de división (Monahan et al., 2009). El modelo de pinzamiento “iterativo” propone que la fuerza de constricción proviene de un cambio conformacional de los polímeros de FtsZ desde una conformación “recta” a una “curva” causada por el intercambio entre GTP y GDP (Lu et al., 2000, Li et al., 2007; Erickson, 2009). Este último modelo apoyaría la constricción de liposomas por FtsZ.

Algunos trabajos han mostrado como también filamentos de FtsZ con GTP unido podrían causar una deformación de la membrana y generar la fuerza de constricción sin necesidad de hidrolizar el GTP (Chen et al., 2005; Gonzalez et al., 2005; Mingorance et al., 2005; Huecas et al., 2008; Osawa y Erickson, 2011; Hsin et al., 2012). Teniendo como base lo anterior y el tipo de filamentos de FtsZ observados por criotomografía (Li et al., 2007); se ha propuesto un nuevo modelo en el cual los filamentos estarían ligeramente curvados sin hidrólisis del GTP y posteriormente, al haber ciclos rápidos de polimerización / despolimerización el GDP unido, se favorecería una fuerte curvatura del filamento (**Figura 6**). Los filamentos curvados unidos a la membrana plasmática generarían la fuerza necesaria que se requiere para la constricción (Hsin et al., 2012).

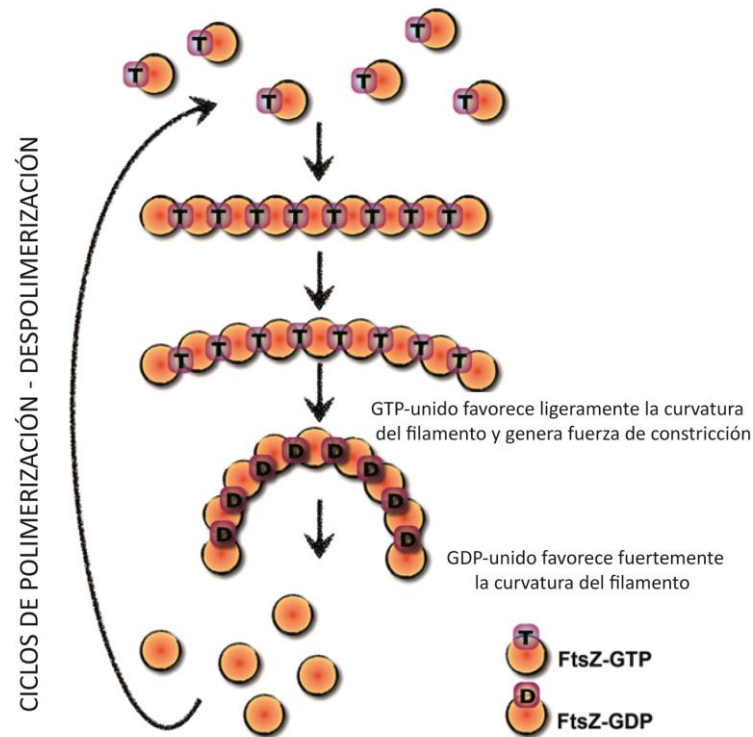


Figura 6. Modelo de uno de los mecanismos propuesto de generación de fuerza mecánica para la constricción de membrana en la citoquinesis. Figura extraída de Balasubramain et al., 2012.

#### 4. FtsZ como diana para el descubrimiento de nuevos antibióticos

Las infecciones bacterianas que causan serios problemas sobre la salud humana, se combaten con diversos antibióticos como la penicilina, los  $\beta$ -lactámicos o algunos derivados que abarcan un amplio espectro antibacteriano como son la cefalosporina y los carbapenemos. Sin embargo, el uso intensivo o el mal uso de los antibióticos ha contribuido al incremento de bacterias resistentes a antibióticos como es el caso de las cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) o de las especies *Enterococcus faecalis* y *Pseudomonas aeruginosa* (Nordmann et al., 2007, Lowry, 1998 y Gordon y Lowry, 2008). De esta forma, los antibióticos actuales dirigidos hacia rutas metabólicas del ADN, ARN, síntesis de proteínas y de la pared celular se han quedado obsoletos siendo necesaria la búsqueda de nuevas dianas y mecanismos de acción para el desarrollo de una nueva generación de antibióticos eficaces frente a patógenos con susceptibilidad reducida a las terapias antibióticas actuales (revisión Sass y Brötz-Oesterhelt, 2013).

FtsZ es una diana atractiva para este propósito debido a varias razones: estar presente en la mayoría de bacterias, ser una proteína esencial para la división celular (Vollmer, 2006; Lock y Harry, 2008), estar ausente en mitocondrias de los eucariotas más evolucionados, su distancia evolutiva respecto a la tubulina y además porque se conoce su actividad bioquímica y estructura atómica. El descubrimiento del compuesto PC190723 efectivo frente a *S.aureus* resistente a meticilina y que actúa sobre FtsZ, ha validado esta proteína como una diana óptima para el descubrimiento de nuevos fármacos (Haydon et al., 2008).

En los últimos años se han descrito muchos compuestos que interaccionan con FtsZ y cuyo origen es variado: (i) cribados de alto rendimiento (High-throughput screening, HTS) de bibliotecas de compuestos (ii) productos naturales descritos previamente como antimicrobianos, (iii) compuestos que interaccionan con la tubulina eucariota, (iv) compuestos sintéticos desarrollados para interaccionar con FtsZ y (v) compuestos que interaccionan bien con proteínas del divisoma alterando su unión con FtsZ o que actúan sobre ClpP para aumentar la degradación de FtsZ.

Muchos de estos compuestos modulan la dinámica de ensamblaje/desensamblaje de FtsZ y algunos de ellos tienen incluso una potente actividad antimicrobiana frente a patógenos humanos y son eficaces en modelos de infección *in vivo* (Sass y Brötz-Oesterhelt, 2013). Los inhibidores de FtsZ afectan el ensamblaje y/o la actividad GTPasa de la proteína ya que alteraciones en cualquiera de estas dos funciones de FtsZ conduce a la alteración en la formación del anillo Z y del septo de división provocando la apoptosis celular.

En base a su estructura química, los compuestos descritos previamente en la literatura que interaccionan con FtsZ, se pueden dividir en 6 grupos (Schaffner-Barbero et al., 2012): (i) compuestos derivados de la guanina, como los derivados de GTP con sustituciones en el carbono 8 (Lappchen et al., 2008) que carecen de actividad antibacteriana y el “compuesto 14” (Paradis-Bleau et al., 2007); (ii) ácidos carboxílicos como los compuestos PC190742 o PC58538 (Stokes et al., 2005) y OTBA (Beuria et al., 2009), todos con actividad antimicrobiana frente a células de *B.subtilis* 168 (MIC = 40  $\mu$ M y 2  $\mu$ M respectivamente); (iii) compuestos fenólicos o polifenólicos como la viriditoxina (Wang et al., 2003, Park et al., 2011) activa frente a patógenos MRSA (MIC = 2-16  $\mu$ g/mL), el toratol (Jaiswal et al., 2007, Kim y Shaw, 2010) que inhibe débilmente el crecimiento de MRSA y finalmente la crisofaentina A y el fragmento hemi-crisofaentina (Keffer et al., 2013) que son activos frente a MRSA (MIC  $\sim$  2  $\mu$ M), (iv) derivados de benzamida como la 3-metoxibenzamida (3-MBA), el PC190723 (Haydon et al., 2008) y su análogo, el 8J (Adams et al., 2011) (los dos últimos con actividad antimicrobiana

frente a MRSA; (MIC = 0.5-1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  respectivamente); (v) compuestos con heterociclos (N-heterocíclicos) como las zantrinas (Z1, Z2, Z3, Z4 y Z5) (Margalit et al., 2004) donde destacan Z1 y Z4 con potente actividad antimicrobiana frente a MRSA (MIC  $\sim$  3-10  $\mu\text{M}$ ) y la sanguinarina (Beuria et al., 2005) y (vi) otros compuestos como la Bis-ANS (Yu y Margolin, 2008) descrito como inhibidor de la polimerización de microtubulos, con actividad antimicrobiana frente a *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (MIC = 1  $\mu\text{M}$ ), los taxanos (Huang et al., 2006) activos frente a *M. tuberculosis*, y la amikacina (Possoz et al., 2007) con actividad antimicrobiana frente a *E. coli* (MIC = 55  $\mu\text{M}$ ).

El estudio bioquímico del efecto de estos compuestos sobre el ensamblaje y la actividad GTPasa de la proteína se puede abordar mediante ensayos cuantitativos de sedimentación de los polímeros de FtsZ, ensayos cualitativos de dispersión de luz de polímeros de FtsZ, visualización de las estructuras poliméricas de FtsZ mediante microscopía electrónica de transmisión y mediante la determinación de la actividad GTPasa de la proteína. La unión directa de los ligandos a FtsZ se puede analizar, comprobar o detectar mediante espectroscopía de absorción diferencial, calorimetría de reacción (ITC), ultracentrifugación analítica, técnicas de resonancia magnética nuclear (RMN), determinación de la estructura cristalográfica del complejo FtsZ-ligando o análisis de secuencias genéticas de mutantes de resistencia. También es posible detectar la unión del ligando a la proteína indirectamente usando sondas marcadas con fluorescencia o radiactividad. Mediante técnicas celulares se puede analizar el efecto de los ligandos sobre la inhibición del crecimiento bacteriano (determinación de MIC), fenotipo de las células bacterianas (por ejemplo mediante la visualización de filamentación por microscopía de contraste de fases), posible deslocalización del anillo Z (microscopía de fluorescencia en células que tienen FtsZ-GFP como única fuente de FtsZ) o alteraciones del nucleóide o la membrana plasmática celular (por ejemplo mediante microscopía de fluorescencia de células marcadas con DAPI o FM4-64 respectivamente).

En cuanto al lugar donde se unen estos ligandos a FtsZ, hasta el momento se han descrito dos sitios principales; el sitio de unión del nucleótido y el sitio de unión de PC190723. Sin embargo, no se pueden descartar otros sitios de unión de ligandos a FtsZ. Por ejemplo, durante el desarrollo de este trabajo hemos estudiado el efecto de algunos compuestos que sin unirse al sitio del nucleótido o de PC190723 son inhibidores de la proteína y hemos sugerido que estos podrían unirse a la interfaz de polimerización de los monómeros de FtsZ o a un sitio cercano.

#### 4.1. Compuestos que interactúan con el sitio de unión del nucleótido de FtsZ

El sitio de unión del nucleótido de FtsZ está muy conservado en FtsZ de las distintas especies (Oliva et al., 2007)(Figura 4), siendo la unión del GTP indispensable para la función de la proteína. Se han diseñado compuestos que mimeticen el GTP para que interfieran con la actividad de FtsZ como algunos derivados de GTP, teniendo la desventaja de que puedan actuar sobre otras proteínas GTPasas como lo es la tubulina. Este inconveniente se solventó en algunos compuestos descritos como los derivados de GTP con sustituciones en el carbono 8 (C8 derivados) (Läppchen et al., 2008) que inhiben la polimerización y actividad GTPasa de FtsZ sin afectar al ensamblaje de la tubulina eucariota. Sin embargo estos derivados carecen de actividad antimicrobiana, posiblemente al no poder atravesar la pared bacteriana por lo que es necesario modificarlos para mejorar esta deficiencia. Paralelamente se ha llevado el estudio de compuestos no análogos de GTP pero que se unen al sitio del nucleótido de FtsZ e interfieren en su función. Algunos de los compuestos con mejor actividad inhibitoria frente a FtsZ son compuestos sintéticos como PC58538 y PC170942 (obtenidos a partir de mutantes de resistencia para la división celular y cuyas mutaciones mapean alrededor del sitio del nucleótido), compuestos como la crisofaentina Acon potente actividad antimicrobiana y que inhiben la GTPasa de FtsZ u otros como la amikacina, el ácido clorogénico y el ácido caféico que inhiben el ensamblaje de FtsZ y alteran su actividad GTPasa. Muchos de ellos se han probado en este trabajo y sus resultados se presentan más adelante.

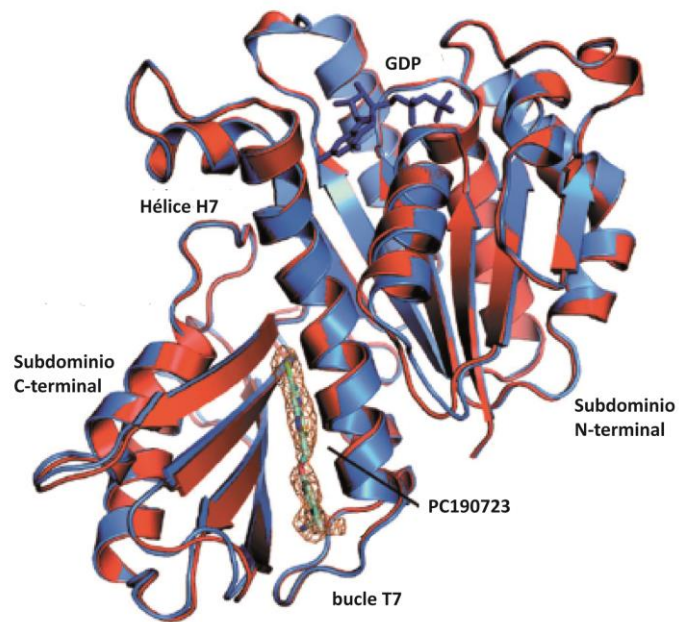
#### 4.2. Compuestos que se unen al sitio de PC190723

Con el descubrimiento en 2008 del compuesto PC190723 (PC) (Haydon et al., 2008) se propuso un nuevo sitio de unión de inhibidores a FtsZ diferente del sitio del nucleótido, lo cual se comprobó posteriormente con la resolución de la estructura cristalográfica del complejo de FtsZ de *S. aureus* y PC190723 (Tan et al., 2012; Matsui et al., 2012; Elsen et al., 2012). PC190723 se localiza en una hendidura entre los dos dominios de FtsZ formada por la hélice H7, el bucle T7 y 4 segmentos $\beta$  del dominio C-terminal de Sa-FtsZ. El compuesto de PC190723 es un derivado de la 3-metoxibenzamida y está formado por dos partes diferentes, un fragmento de benzamida y uno de tiazolpiridina que se insertan dentro del sitio en el mismo plano. La benzamida se ajusta en el extremo de la hendidura e interactúa directamente con el bucle T7, mientras que el heterociclo localiza su extremo lipófilico en un túnel hidrofóbico formado por la hélice H7 y 2 residuos de la hélice  $\beta$  del dominio C-terminal (Figura 7).

PC190723 se une a FtsZ y promueve su polimerización (Andreu et al., 2010). El compuesto se une a la forma activa de FtsZ en la que los dominios N y C terminal están separados formando el sitio de PC; estando esta apertura ausente en la forma inactiva de FtsZ (Martin-Galiano et al., 2010; Chen y Erickson, 2011, Elsen et al., 2012). Esto sugiere que el compuesto interactúa con el polímero de la proteína (mayoritariamente en su conformación “abierta”) más que con el monómero. Se ha especulado que el sitio de unión de PC en FtsZ sería similar al del taxol en tubulina ya que ambos ligandos estabilizan los polímeros de la proteína en su forma recta induciendo seguramente cambios estructurales durante el ensamblaje (Andreu et al., 2010; Ellie-Caille et al., 2007). Sin embargo, en vista de la estructura cristalográfica del complejo, se ha indicado que este sitio no tiene por qué ser homólogo en FtsZ y tubulina aunque los mecanismos de acción de ambos compuestos sean similares (Matsui et al., 2012).

Debido a las importantes características de este compuesto y siendo novedoso su sitio de unión a FtsZ, se ha continuado con la optimización de más derivados de la 3-metoxibenzamida donde destacan el compuesto 8J (Haydon et al., 2010) y el reciente descrito “compuesto 1”(Stokes et al., 2012) que presenta una mejora importante en su actividad antimicrobiana frente a MRSA respecto a PC190723.

El descubrimiento de este nuevo sitio de unión de compuestos a FtsZ abre las puertas al desarrollo de nuevos compuestos inhibidores de la proteína y de estructura química más variada. Siendo el PC190723 una herramienta prometedora para la búsqueda de nuevos compuestos, parte de este trabajo se basa en la caracterización bioquímica del mismo, sus fragmentos, análogos y algunos derivados fluorescentes.



**Figura 7. Estructura cristalográfica del complejo FtsZ-PC190723-GDP.** En azul la estructura del complejo Sa-FtsZ con PC190723 y GDP, en rojo la estructura cristalográfica del complejo FtsZ con GDP. El PC190723 y el GDP, en sus respectivos sitios de unión, se muestran en verde y azul respectivamente. Figura extraída de Matsui et al., 2012.

## **OBJETIVOS**



## OBJETIVOS

Los objetivos generales de esta Tesis son por un lado la búsqueda de inhibidores del sitio de unión de GTP en FtsZ, determinando su mecanismo de acción molecular y celular, y por otro la exploración del sitio de unión del ligando PC190723 en FtsZ. Para ello se plantean los siguientes objetivos concretos:

**1.** Estudio de la unión de los derivados de GTP sustituidos en el carbono 8 al sitio del nucleótido de FtsZ de una especie bacteriana, *B.subtilis* y de una arqueobacteria, *M.jannaschii*. Para este objetivo:

- a. Se caracterizará el efecto de los ligandos sobre el ensamblaje de FtsZ mediante técnicas bioquímicas.
- b. Mediante métodos de resonancia magnética nuclear (RMN) se determinará el epítipo de unión del ligando a la proteína y la conformación del ligando unido.
- c. Se intentará explicar los resultados experimentales mediante métodos computacionales (métodos de ajuste y dinámica molecular)

**2.** Búsqueda de inhibidores específicos de FtsZ con estructura química distinta al GTP que se unan al sitio del nucleótido, tengan actividad antibacteriana y que puedan constituir cabezas de serie para el desarrollo potencial de nuevos antibióticos. Para ello:

- a. Se realizará una búsqueda de ligandos que se unan específicamente al sitio del nucleótido a partir de compuestos con alguna actividad sobre FtsZ descritos previamente en la literatura o cuyo origen sea un cribado virtual de bibliotecas comerciales de moléculas pequeñas o de una biblioteca interna.
- b. Se detectará la unión de estos ligandos a FtsZ mediante el método de competición de *mant*-GTP.
- c. Se analizará bioquímicamente el efecto de dichos ligandos sobre el ensamblaje de FtsZ.
- d. Se determinará el efecto de posibles inhibidores sobre la división celular bacteriana.

**3.** Estudio del mecanismo de acción de PC190723, sus fragmentos y un análogo sobre FtsZ de *B.subtilis*, *E.coli* y *S.aureus*. Para ello se determinará el efecto de cada compuesto sobre el ensamblaje y la actividad GTPasa de la proteína.

**4.** Desarrollo de un ensayo fluorescente para detectar y caracterizar la unión de compuestos que se unan específicamente al sitio de PC190723. Para ello se buscará una sonda fluorescente entre compuestos sintetizados químicamente (en colaboración con un laboratorio de Química-Médica de la UCM) derivados de PC190723 u 8J a los que se les acoplará un fluoróforo en su estructura.



## **MATERIALES Y MÉTODOS**



## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Materiales

#### 1.1. Reactivos (origen)

Los reactivos básicos para la preparación de los tampones y medios de cultivo como el KCl, el NaCl, el KOH, el Tris, el glicerol y el HCl proceden de Merck, el extracto de levadura y la bacto triptona de Becton Dickinson & Co, el EDTA, el Pipes, el Mes, el Hepes provienen de Sigma-Aldrich, el PMSF de Calbiochem y la leupeptina de Sigma. Para la preparación y tinción de los geles PAGE-SDS se usaron acrilamida, bisacrilamida, TEMED, APS y el 2-mercaptoetanol de bioRad, el ácido acético de Merck, el SDS y el azul de Coomassie de Sigma-Aldrich, el metanol de Panreac y el marcador de bajo peso molecular (LMWM) de BioRad. Durante la expresión y purificación de las distintas proteínas se empleó el IPTG de Merck, la kanamicina de Sigma-Aldrich, la ampicilina de Roche, el cloranfenicol de Boehringer; así como las columnas HiTrapQ HP (5 mL), las Phenyl HP (1 mL), la de Desalting (5 mL) y la resina Sephadex G-25 que procedieron de GE Healthcare, mientras que los filtros, Centriprep y Centricore (15 K) fueron comprados a Milipore. En la determinación de la concentración de proteína se usó el ácido perclórico de Merck y el cloruro de guanidinio de Calbiochem. Distintos experimentos requirieron la presencia de un sistema de regeneración de GTP compuesto por acetil fosfato y acetato quinasa ambos provenientes de Sigma-Aldrich o de DMSO (o DMSO-D6) que provienen de Merck. Para la tinción negativa se usó acetato de uranilo de Merck y para la preparación del reactivo verde malaquita, el oxalato de verde malaquita y el molibdato sódico fueron de Sigma-Aldrich. El tritón X-100 usado para la preparación del verde malaquita y los ensayos de ensamblaje también provino de Sigma-Aldrich.

#### 1.2. Medios de cultivo y tampones (composición)

Medio LB:	10 g/L triptona, 10 g/L NaCl, 5 g/L extracto de levadura, pH 7.0
Medio 2xYT:	16 g/L triptona, 5 g/L NaCl, 10 g/L extracto de levadura, pH 7.0
Tampón A:	50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl <sub>2</sub> , pH 8.0
Tampón A2:	50 mM Mes-KOH, 5 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 % glicerol, pH 6.5
Tampón A3:	50 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> / K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -KOH, 0.8 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 1 mM EDTA, pH 7.5
Tampón A4:	50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0

Tampón B:	50 mM Mes-KOH, 5 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 M KCl, 10 % glicerol, pH 6.5
Tampón B2:	50 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> / K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -KOH, 1mM EDTA, pH 7.5
Tampón B3:	50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 1 M KCl, pH 8.0
Tampón C:	50mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1 mM EDTA, 10% glicerol, pH 7.5
Tampón C2:	20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 1 mM NaN <sub>3</sub> , pH 8.0
Tampón TKM:	50 mM tris-HCl, 50 mM KCl, 5 mM MgCl <sub>2</sub> , pH 8.0
Tampón GdmHCl:	50 mM Mes-KOH, 2.5 M GdmHCl, pH 6.5
Tampón PMG:	10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1 M sacarosa, 0.5 mM MgCl <sub>2</sub> , pH 7.0
Tampón PEM:	50 mM PIPES, 5 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 mM EDTA, pH 6.5
Tampón GAB:	10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 3.5 M glicerol, 1 mM EGTA, 0.1 mM GTP pH 7.0
Tampón Hepes pH 6.8:	50 mM Hepes-KOH, 50 mM KCl, 1 mM EDTA, pH 6.8
Tampón Hepes pH 7.5:	50mM Hepes-NaOH, 50 mM KCl, pH 7.5
Tampón Mes pH 6.5:	50 mM Mes-KOH, 50 mM KCl, 1 mM EDTA, pH 6.5

## 2. Purificación de FtsZ y tubulina

### 2.1. Expresión de las distintas construcciones en *Escherichia coli*

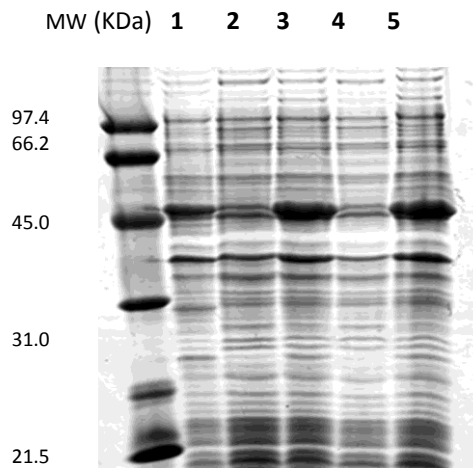
Se expresó FtsZ de 2 especies bacterianas, *Bacillus subtilis* (Bs-FtsZ) y *Escherichia coli* (Ec-FtsZ), y de una arqueobacteria, *Methanococcus jannaschii* (Mj-FtsZ). Durante el desarrollo del trabajo se usó también FtsZ de *Staphylococcus aureus* (Sa-FtsZ) donada por la Dra. María A. Oliva (procedimiento de expresión y purificación no publicado). Para obtener las proteínas de *B.subtilis* y *M.jannaschii* se utilizaron construcciones que contenían la versión completa del gen *ftsZ* en el vector pHis17 (con el gen  $\beta$ -lactamasa que le confiere resistencia a ampicilina) y bajo el control del promotor T7. El DNA plasmídico purificado se usó para transformar células competentes de *E.coli* CD41 (DE3) para Bs-FtsZ y BL21 (DE3)-pLysS para Mj-FtsZ. Para la proteína FtsZ de *E.coli*, el gen *ftsZ* se clonó en el vector pET-28 (con resistencia a kanamicina) y se transformó la cepa *E.coli* BL21 (DE3). En todos los casos las células transformadas se conservaron en glicerol (33%) a -80°C.

Para la expresión de las distintas proteínas se preparó un preinóculo de las células transformadas en 20 mL del medio LB con 50  $\mu$ g/mL de Kanamicina para Ec-FtsZ o 50  $\mu$ g/mL de cloranfenicol y ampicilina para Mj-FtsZ, y se dejó crecer durante toda la noche a 200 rpm y 37°C. En el caso de Bs-FtsZ el medio usado fue 2xYT, que mejora la expresión de la proteína, y se suplementó con 100  $\mu$ g/mL de ampicilina. Mediante una dilución 1:100 del preinóculo se

prepararon 2 cultivos de 0,5 L en presencia de los antibióticos requeridos y se dejó crecer durante 2 horas aproximadamente hasta que el cultivo llegó a fase exponencial (0.4 - 0.6 unidades de densidad óptica medidas a una longitud de onda de 600 nm). En este momento se indujo la expresión de las distintas proteínas con 1 mM de IPTG durante 3 horas a 37°C. Para comprobar la expresión de la proteína se tomaron muestras de cada uno de los pasos realizados (preinoculo, inóculo y cultivo inducido) y se llevó a cabo una electroforesis PAGE-SDS (**Figura 8**).

Durante todo el trabajo las electroforesis que se realizaron para visualizar y cuantificar la proteína fueron en geles con una concentración del 12% de poliacrilamida en presencia de SDS (PAGE-SDS) aplicando un voltaje de 100 V. Posteriormente los geles se tiñeron con azul de Coomassie durante 20 minutos y una vez desteñidos se escanearon en un densitómetro calibrado (CS-800 de BioRad).

Las bacterias se sedimentaron mediante centrifugación a 8000 x g, 10 minutos a 4°C en el rotor GSA de una centrifuga Sorval RC-5C plus; tras lo que se desechó el sobrenadante y se resuspendieron las células (sedimento) en tampón A para Mj-FtsZ, tampón TKM para Bs-FtsZ y tampón PEM para Ec-FtsZ. Las células resuspendidas se conservaron a -80°C hasta el momento de la purificación de la proteína.



**Figura 8. Expresión de FtsZ de *B. subtilis* en *E. coli* BL21 (DE3), pLysS.** Electroforesis en condiciones desnaturalizantes y reductoras (en presencia de SDS y  $\beta$ -mercaptoetanol) en geles de poliacrilamida al 12%. Se muestra la expresión de FtsZ en medio 2xYT. *Calle 1*, marcador de peso molecular en kDa; *calle 2*, muestra del preinoculo; *calles 3 y 5*, muestras de los cultivos antes de inducir; *calles 4 y 6*, muestras de los cultivos inducidos con 1 mM de IPTG.

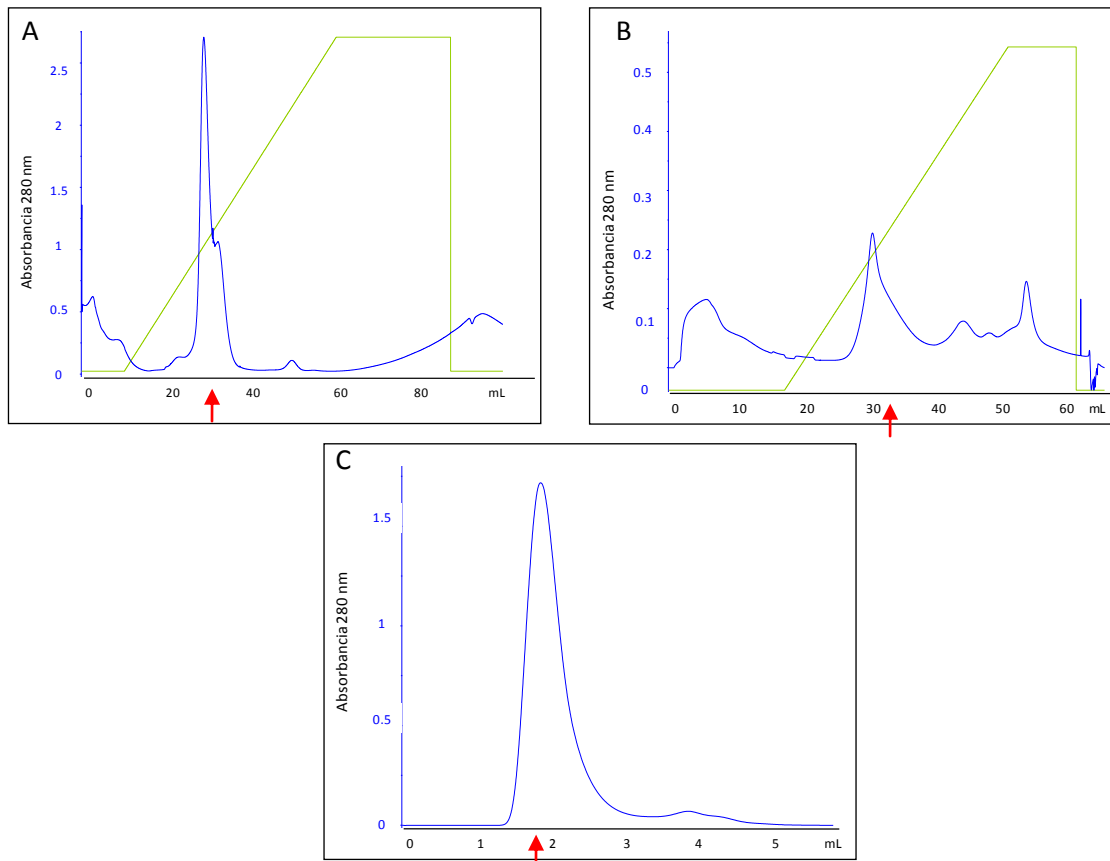
## 2.2. Purificación de FtsZ de *B.subtilis*

La purificación de la proteína se realizó siguiendo el protocolo descrito (Schaffner-Barbero et al., 2010) modificado. La proteína de Bs-FtsZ se purifica siguiendo cuatro pasos; precipitación con sulfato amónico, cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de interacción hidrofóbica y un paso final de cambio de tampón. Durante el proceso, las cromatografías se realizaron usando el ÄKTA purifier P-900 (GE Healthcare) y para concentrar la proteína se usaron los filtros Centriprep 10K (Amikon) en ciclos de 15 minutos a 3200 rpm. La purificación se inicia descongelando las células resultantes de la expresión. Bs-FtsZ es susceptible a la degradación proteolítica, por ello, una vez descongeladas las células se les añadió 200 µg/mL de PMSF y 2 µg/mL de leupeptina (inhibidores de proteasas). Seguidamente, las células se sometieron a un proceso de rotura física mediante sonicación (con una sonda de un centímetro de diámetro en el sonicador *Sonoplus* HD200 (Brandelin)) con 6 pulsos de 20 segundos y 20% de potencia y a continuación se centrifugaron a 100.000 x g durante 1 hora a 4°C en el rotor 70.1 Ti en una ultracentrífuga Beckman.

El sobrenadante obtenido se pasó a un vaso de cristal y se añadió lentamente sulfato amónico,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , hasta un 40% de saturación, se dejó durante 20 minutos con agitación en hielo y posteriormente se centrifugó 5000 x g durante 30 minutos a 4°C en un rotor SS-34 empleando una centrífuga RC-5C Plus (Sorvall). El sobrenadante se desechó y el sedimento que contiene nuestra proteína se resuspendió en 10 mL de tampón A2. A continuación se clarificó mediante una centrifugación a 5000 x g durante 10 minutos y el sobrenadante se cargó en una columna de intercambio aniónico HiTrap Q-HP de 5mL (GE Healthcare) previamente equilibrada con tampón A2. La proteína se eluyó con un gradiente de 0-100% de tampón B durante 50 minutos a un flujo 1 mL/min y su elución se monitorizó a 280 nm (**Figura 9A**). Se recogieron aquellas fracciones en las que se detectó absorción a 280 nm y se cargaron en un gel PAGE-SDS para localizar la proteína.

Las fracciones que contenían FtsZ se concentraron hasta 2 mL, seguidamente se diluyó 5 veces en tampón A3 y se cargó en la columna de interacción hidrofóbica fenil-agarosa HiTrap Phenyl HP (GE Healthcare) de 1 mL, previamente equilibrada en tampón A3. La proteína se eluyó en un gradiente 0-100% de tampón B2 durante 35 minutos a un flujo de 1 ml/min y se recogieron fracciones de 2 mL(**Figura 9B**). La cromatografía se monitorizó de igual forma que la anterior y aquellas fracciones con absorbancia a 280 nm se cargaron en geles SDS-PAGE para comprobar la presencia de la proteína.

Para eliminar la alta concentración de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  residual, la proteína resultante de la cromatografía hidrofóbica se concentró hasta un volumen final de 500  $\mu\text{L}$  y se cargó en una columna HP Desalting (GE Healthcare) de 5 mL equilibrada en tampón C. La proteína se eluyó a un flujo de 1 mL/min recogiéndose alícuotas de 500  $\mu\text{L}$  y su monitorización fue igual que en las anteriores cromatografías (**Figura 9C**). Las fracciones con proteína se concentraron hasta un volumen de aproximadamente 500  $\mu\text{L}$ . Se determinó la concentración de la proteína (apartado 2), se alícuotó y se conservó a  $-80^\circ\text{C}$  hasta su uso.



**Figura 9. Análisis de las etapas de purificación de FtsZ de *B.subtilis*.** Perfil de elución de Bs-FtsZ. En (A), cromatografía de intercambio aniónico; en (B), cromatografía de interacción hidrofóbica y en (C), equilibrado de Bs-FtsZ. La línea azul representa la absorción de FtsZ a 280 nm y la línea verde el porcentaje de tampón de elución. La flecha roja indica el volumen de elución de la proteína.

### 2.3. Purificación de FtsZ de *M. jannaschii* y de *E. coli*

La purificación de Mj-FtsZ (Huecas y Andreu, 2003) se realizó siguiendo los mismos pasos que para Bs-FtsZ salvo algunas modificaciones. Las células descongeladas se sonicaron directamente sin añadir PMSF y leupeptina, y la precipitación con sulfato amónico se hizo al 33% de saturación. Los tampones usados fueron diferentes; la proteína se resuspendió en una mezcla de tampón A4 con un 15% de tampón B3 y este mismo tampón fue el usado para

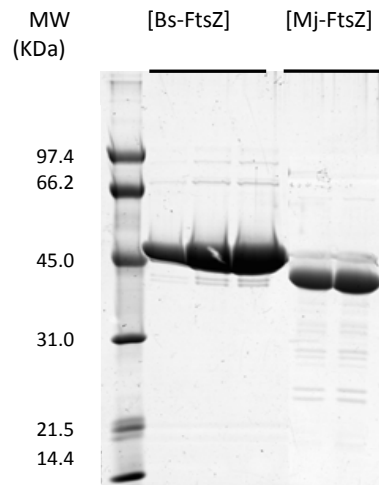
equilibrar la columna y eluir la proteína en la cromatografía de intercambio aniónico (durante 60 minutos a un flujo de 1 mL/min) y el tampón usado para equilibrar y conservar la proteína en el paso final de la purificación fue el tampón C2. Además, durante el proceso, la proteína se concentró usando los filtros Centriprep ultra-15 (Amikon) en ciclos de 20 minutos, 5000 rpm a 4°C. La purificación de Ec-FtsZ se realizó mediante precipitación con calcio y cromatografía por intercambio aniónico siguiendo el protocolo descrito (Rivas et al., 2000).

#### 2.4. Extracción del nucleótido y cambio de tampón de Mj-FtsZ

La proteína FtsZ se purifica con una cierta cantidad de nucleótido unido que varía entre las distintas especies. Para determinar la cantidad de nucleótido unido a la proteína purificada, definimos el valor “r” como la relación entre la concentración de nucleótido y la concentración de proteína. En el caso de Bs-FtsZ,  $r \approx 0.02$ , en Ec-FtsZ,  $r \approx 0.30$  y en Mj-FtsZ  $r \approx 0.40$ . En el caso de FtsZ de la arqueobacteria *M.jannaschii* es posible eliminar el nucleótido unido incubándola con 2.5 M de GdmHCl sin que ésta sufra modificaciones estructurales (desplegamiento), de estabilidad o funcionalidad (Huecas and Andreu, 2004)(Andreu et al., 2002). La extracción del nucleótido de Mj-FtsZ (forma “apo”) facilita el estudio de los mecanismos funcionales y de ensamblaje de la proteína en presencia de ligandos que puedan reemplazar al nucleótido. En *E.colino* ha sido posible extraer el nucleótido manteniendo la proteína en su forma nativa(Andreu et al., 2002) y en el caso de *B.subtilis* no se ha intentado pero debido a la poca cantidad de nucleótido con la que se purifica la proteína esto no es necesario.

Para separar el nucleótido de Mj-FtsZ, la proteína previamente incubada con 2.5 de GdmHCl durante 30 minutos a temperatura ambiente, se cargó en una columna Sephadex G-25 de 0.9 x 25 cm y se eluyó en tampón GdmHCl en al menos 20 alícuotas de 1 mL. Para identificar en cuál de ellas estaba la proteína y el nucleótido se registró absorbancia de cada fracción a 2 longitudes de onda, 254 nm (para identificar el nucleótido) y 280 nm (en el caso de la proteína), en el espectrofotómetro Evolution 300 UV-VISy las fracciones con proteína se concentraron hasta un volumen de 500  $\mu$ L. La proteína en su forma “apo” se pasó nuevamente por la columna equilibrada con tampón Mes pH 6.5 y las fracciones que contenían FtsZ se concentraron nuevamente hasta un volumen de 500  $\mu$ L. Se calculó la concentración de la proteína, se alicuotó y se conservó en nitrógeno líquido hasta su uso.

Para evaluar la pureza de las preparaciones de FtsZ, alícuotas de las proteínas purificadas se cargaron en un gel PAGE-SDS (**Figura 10**).



**Figura 10. PAGE-SDS de purificaciones de FtsZ.** Distintas concentraciones de preparaciones de Bs-FtsZ (10, 30 y 40  $\mu\text{M}$ ) y Mj-FtsZ (13 y 15  $\mu\text{M}$ ) se sobrecargaron en PAGE-SDS para ver la presencia de pequeños contaminantes. La pureza de la purificación de Bs-FtsZ fue alrededor del 98% y de Mj-FtsZ fue superior a 95%.

## 2.5. Purificación y equilibrado de tubulina

La tubulina eucariota que se utilizó durante el desarrollo de este trabajo fue cedida por el Dr. José Manuel Andreu y fue purificada siguiendo un protocolo a gran escala a partir de cerebro bovino que incluye una homogenización de los tejidos, eliminación de las membranas celulares, fraccionamiento con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , cromatografía de intercambio aniónico, precipitación con  $\text{MgCl}_2$ , diálisis y almacenaje de la proteína en tampón PMG en nitrógeno líquido (Andreu, 2007). Para el uso adecuado de la tubulina en los experimentos se eliminó el exceso de sacarosa presente en el tampón de almacenaje, cargando la tubulina en una columna Sephadex G-25 previamente equilibrada en tampón GAB. La proteína se eluyó de la columna en al menos 20 alícuotas de 0.5 mL, se midió su absorbancia a una longitud de onda de 276 nm y se escogieron aquellas fracciones donde estaba presente la proteína. Seguidamente la proteína se clarificó para eliminar posibles agregados centrifugándola 50000 rpm durante 10 minutos a 4°C en el rotor TLA 100 (ultracentrifuga (Beckman)) y finalmente se determinó su concentración como se indica en el siguiente apartado. Tanto el tampón como la proteína equilibrada deben mantenerse en frío durante todo el proceso y la tubulina solo será funcional durante las siguientes 4 horas desde su preparación.

### 3. Determinación de la concentración de FtsZ y tubulina

#### 3.1. Cálculo de la concentración de FtsZ

El cálculo de la concentración de proteína y del nucleótido unido resultante de la purificación se determinó espectrofotométricamente (espectrofotómetro Evolution 300 UV-VIS) usando cubetas de cuarzo de paso óptico 1 cm mediante dos procedimientos distintos. En el primero (método doble longitud de onda) se consideró la absorción de la proteína y del nucleótido en GdmHC (6M) y en el segundo se determinó la concentración del nucleótido unido a FtsZ extraído con ácido perclórico. La concentración de proteína final fue la media del valor obtenido por ambos procedimientos que resultaron ser siempre muy similares.

➤ Método de doble longitud de onda

Se preparó una dilución 1/20 de la proteína purificada en 6M GdmCl y se registró su espectro de absorción entre longitudes de onda de 240 a 350 nm. Sabiendo que la longitud máxima de absorción de la proteína es cerca de 280 nm ( $A_{280}$ ) y la del nucleótido a 254 nm ( $A_{254}$ ); y en base a la ecuación de Lambert-Beer tenemos:

$$A_{280} = (\epsilon_{\text{prot}(280)} \times C_{\text{prot}} \times l) + (\epsilon_{\text{nucl}(280)} \times C_{\text{nucl}} \times l) \quad (1)$$

$$A_{254} = (\epsilon_{\text{prot}(254)} \times C_{\text{prot}} \times l) + (\epsilon_{\text{nucl}(254)} \times C_{\text{nucl}} \times l) \quad (2)$$

donde,  $\epsilon_{\text{prot}(280)}$ ,  $\epsilon_{\text{prot}(254)}$ ,  $\epsilon_{\text{nucl}(280)}$  y  $\epsilon_{\text{nucl}(254)}$  son los coeficientes de extinción molar teórico de la proteína y el nucleótido en 6M GdmCl a dos longitudes de onda,  $C_{\text{prot}(280)}$  y  $C_{\text{nucl}}$  es la concentración de proteína y nucleótido respectivamente; y  $l$  el paso óptico.

Los coeficientes de extinción molar para nuestra proteína se calcularon en función del número de fenilalaninas, tirosinas y triptófanos que contienen (**tabla 1**) sabiendo que a 280 nm  $\epsilon_{\text{phe}} = 0 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ,  $\epsilon_{\text{tyr}} = 1280 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  y  $\epsilon_{\text{trp}} = 5690 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  y a 254 nm  $\epsilon_{\text{phe}} = 140 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ,  $\epsilon_{\text{tyr}} = 2795 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  y  $\epsilon_{\text{try}} = 309 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Fasman, 1992). Los coeficientes de extinción molar del nucleótido GXP (GTP o GDP) en GdmCl son  $8100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  y  $13620 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  a 280 y 254 nm respectivamente (Correia et al., 1987). La concentración de proteína ( $C_p$ ) se determinó resolviendo el sistema de ecuaciones (1) y (2).

Tabla 1. Coeficiente de extinción molaren 6M GdmClde cada proteína

Proteína	Nº Phe	Nº Tyr	Nº Trp	$\epsilon_{254} (\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1})$	$\epsilon_{280} (\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1})$
Bs-FtsZ	9	2	0	1878	2560
Mj-FtsZ	8	1	1	4224	6970
Ec-FtsZ	13	3	0	2747	3840

➤ Método de extracción del nucleótido

Parala extracción del nucleótido se incubó una muestra de proteína durante 10 minutos con 0.5 N HClO<sub>4</sub> a 4°C (que induce precipitación de la proteína y liberación del nucleótido al sobrenadante) y se centrifugó a 15000 x g a 4°C durante otros 10 minutos. Se registró el espectro de absorción del sobrenadante y conociendo el coeficiente de extinción molar del nucleótido en medio ácido  $\epsilon_{GXP(254)} = 12400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Diaz and Andreu, 1993), se calculó la concentración de nucleótido y la concentración de proteína aplicando la ecuación (3).

$$C_{prot} = \left[ \frac{A_{280} - (\epsilon_{GXP(280)} \times C_{nucl})}{\epsilon_{prot(280)}} \right] \quad (3)$$

### 3.2. Cálculo de la concentración de tubulina

La concentración de tubulina (previamente equilibrada en tampón GAB) se determinó espectrofotométricamente utilizando su coeficiente de extinción molar a 276 nm [ $\epsilon_{tub(276)} = 1.16 \text{ g} / (\text{L} / \text{cm}^1)$ ] (Andreu y Timasheff, 1982) sobre el espectro de absorción corregido por una pequeña dispersión de luz.

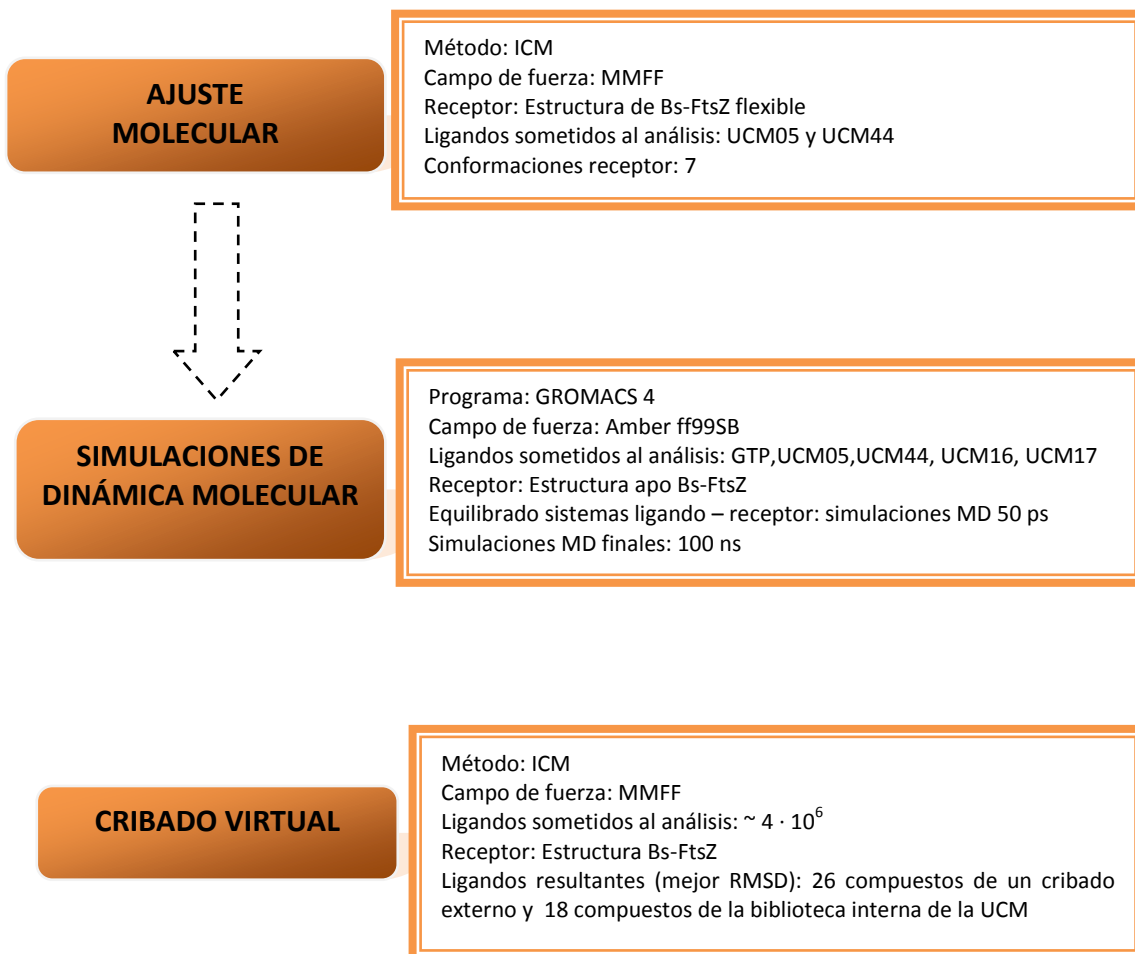
#### 4. Métodos computacionales

El análisis computacional llevado a cabo dentro de esta investigación fue realizado como parte de una colaboración, por el laboratorio del Dr. Pablo Chacón del Instituto de Química Física Rocasolano (CSIC), <http://chaconlab.org/>. Los métodos computacionales usados, y que se describirán a continuación, fueron: ajuste molecular (*docking*), cribado virtual y simulaciones de dinámica molecular.

➤ Cribado virtual y ajuste molecular (*docking*)

Para el cribado virtual y el ajuste molecular se usó el paquete bioinformático ICM (Internal Coordinate Mechanics) basado en un mecanismo de coordenadas internas que fue diseñado y construido para predecir las posibles conformaciones que pueden adquirir ligandos flexibles en un receptor (Totrov y Abagyan, 1997). Usando el programa ICM se llevó a cabo el cribado de una biblioteca de pequeños ligandos (aproximadamente 4 millones) que pudieran ser reconocidos por el sitio del nucleótido de FtsZ usando los parámetros estándar del programa, mientras que para el ajuste molecular de ciertos ligandos además, se tuvieron en cuenta diferentes conformaciones del receptor como fue descrito en trabajos previos (Bottegoni *et al.*; 2009). En ambos casos, las energías fueron calculadas usando el campo de fuerza MMFF y empleando términos energéticos ECEPP/3 (Némethy *et al.*, 1992) y para el ajuste molecular de los ligandos se complementó éste cálculo con la probabilidad parcial de Monte Carlo (Abagyan y Totrov, 1994). Se empleó la estructura cristalográfica de la forma apo de FtsZ de *B.subtilis* obtenida por rayos X (PDB ID 2vxy). Para validar la interacción del ligando con la proteína se realizó un primer ajuste con GDP dirigido al sitio del nucleótido de Bs-FtsZ y posteriormente este complejo de proteína – nucleótido se sometió a simulaciones de dinámica molecular (100 ns) que se compararon con la estructura cristalográfica conocida. Para el ajuste molecular 4D se definió una caja que contenía el sitio de unión del nucleótido teniendo en cuenta siete conformaciones diferentes obtenidas mediante simulaciones de dinámica molecular de la estructura de FtsZ en su forma libre y se normalizaron usando el protocolo estándar ICM. Los límites de la caja con el sitio de unión se obtuvieron en base a la estructura del GDP en su forma cristalizada (PDB ID 2rhl). Se siguieron los procedimientos estándar del método para designar las coordenadas atómicas 3D, formas tautoméricas, estereoquímica, átomos de hidrógeno y estados protonados de los ligandos. Las moléculas se prepararon para ajuste molecular mediante minimización Cartesiana usando el campo de fuerza MMFF (Halgren,

1996) en ausencia del receptor y la búsqueda de las distintas conformaciones de los ligandos se hizo en base a una función de energía de coordenadas internas (**Figura 11**).



**Figura 11.** Esquema de los métodos computacionales usados: cribado virtual, ajuste molecular y simulaciones de dinámica molecular. Se muestran en cada uno los parámetros usados más importantes.

➤ Simulaciones de dinámica molecular

Las simulaciones MD se realizaron a partir de la estructura cristalográfica de Bs-FtsZ de *B.subtilis* (PDB ID 2vxy) usándose el campo de fuerza AMBER ff99SB (Hornak *et al.*, 2006). La preparación del ligando y la proteína fue la misma que se ha indicado para el ajuste molecular y el cribado virtual. Los mismos parámetros que resultaron del docking con GDP se usaron para el análisis de los demás ligandos, UCM05, UCM44, UCM16 y UCM17. Para construir la estructura de los ligandos, se usó el campo de fuerza GAFF (Amber) mediante la herramienta *antechamber*, asumiéndose la carga total de los ligandos como neutra, salvo el GDP. Los distintos sistemas proteína – ligando se incluyeron en cajas dodecahédricas sin límites de movimiento que contenían moléculas de agua (TIP3P). Para mantener la neutralidad de los

sistemas se añadieron iones y se minimizó la energía de cada uno con una serie de 10000 pasos de gradientes conjugativos. El equilibrado del sistema se inició a una temperatura de 50 K y con velocidades al azar generadas en base a la distribución Maxwell y posteriormente, cada una se sometió a un incremento gradual de temperatura, 50 K cada 50 ps, hasta los 298 K. Durante este incremento de temperatura, el sistema, que antes mantenía la estructura de los complejos restringida, comienza a experimentar una liberación gradual de los átomos que contiene.

Una vez las estructuras se habían equilibrado, se iniciaron las simulaciones MD de 100 ns con número de átomos, temperatura (298 K) y presión (1 atm) constantes (NTP). Las simulaciones MD y sus respectivos análisis se hicieron usando el programa GROMACS 4 (11). Finalmente, el análisis de las interacciones electrostáticas se hizo mediante el método de red de partículas Ewald, PME (particle-mesh Ewald); y con interacciones de Van der Waals truncadas a 14 Å (**Figura 11**).

## 5. Pequeñas moléculas

### 5.1. Origen, identidad y pureza

#### ➤ Nucleótidos

Los derivados de GTP sustituidos en el carbono 8 de la guanosina; morfolino-GTP (MorphGTP), metoxi-GTP (MeOGTP) y sus análogos GMP (MorphGMP y PyrrGMP) fueron sintetizados bajo encargo por la casa comercial Jena Biosciences y su pureza determinada por HPLC fue mayor a 95%. MeOGTP y PyrrGTP provienen del laboratorio de la Dra. Tanneke den Blaauwen y se prepararon como se indica (Lappchen et al., 2008), siendo su pureza también mayor al 95% medida por HPLC. Br-GTP y Mant-GTP son de Jena Bioscience. GTP, GDP y GMP provienen de Sigma y [8-<sup>3</sup>H] GTP (35.5 Ci/mmol) se compró a Perkin Elmer.

#### ➤ Compuestos no análogos de GTP

La amikacina, la curcumina, el ácido caféico y el ácido clorogénico se compraron en Sigma. Los 27 compuestos provenientes del cribado virtual se compraron a distintas casas comerciales (Enamine, Life e lbs).

La serie de 76 compuestos UCM provenientes del laboratorio de Química Médica (Dpto. Química Orgánica I de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid (laboratorio UCM, <http://pendientedemigracion.ucm.es/info/quimicamedica/web>) se sintetizaron como se describe (Ruiz-Avila et al., 2013)(Artola et al., 2013 en preparación). El análisis elemental de cada compuesto mostró una desviación menor al 0.5 % respecto a los valores teóricos y la pureza determinada por HPLC fue mayor que 95%. PC170942 (Stokes et al., 2005) también fue sintetizado por el laboratorio UCM para este trabajo.

➤ PC190723, análogos y compuesto fluorescentes

PC190723 (PC) (Haydon *et al.*, 2008 ) y 8J (Adams *et al.*, 2011), al igual que los fragmentos de PC: 2,6-difluoro-3-hidroxibenzamida (DFMBA) y 6-cloro [1,3] thiazolo [5,4-b] piridin-2-yl (CTPM) fueron sintetizados por el laboratorio UCM como se describe (Andreu et al., 2010). El derivado de DFMBA con el grupo fluorescente NBD (DFMBA-NBD) también se sintetizó en el laboratorio UCM pero su descripción no ha sido publicada. La pureza de todos ellos se analizó mediante HPLC y espectrometría de masas siendo mayor del 99%.

## 5.2. Conservación

Desde la recepción, cada compuesto se mantuvo correctamente etiquetado así como cada una de las diluciones que se realizaron del mismo. A los compuestos de cribado virtual (VS) se les asignó un código numérico (diferente del que tenían de serie) junto con las iniciales de la casa comercial de la que proviniesen para mayor facilidad de indentificación, mientras que en los demás ligandos se conservó la identidad asignada en el laboratorio de síntesis o la casa comercial. En cualquier caso, los compuestos se disolvieron en DMSO-D6: como sigue. Se pesó una pequeña fracción de cada compuesto ( $2-4 \pm 0.02$  mg) en la balanza AG135 (Mettler Toledo) y se disolvió en DMSO-D6 hasta una concentración de 100 mM. Una vez comprobada su solubilidad (ver siguiente apartado) se procedió a la preparación de concentraciones más diluidas del compuesto en DMSO. La dilución original y las que no estuvieron en uso conservaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ , las demás a  $-20^{\circ}\text{C}$  y todas se taparon con *parafilm* y se conservaron en cajas que contenían gel de sílice desecante.

Los derivados C8 de GTP venían contenidos en viales de plástico en estado sólido, así que se diluyeron en agua o agua deuterada (los que se usaron en los experimentos de RMN) a la concentración deseada y se comprobó que el pH estuviera cercano a la neutralidad. De todos ellos se realizaron diluciones a concentraciones inferiores en viales de 1.5 mL y se conservaron a -20°C.

### 5.3. Determinación de la solubilidad

Los compuestos disueltos a 100 mM en DMSO-D6 se centrifugaron 5 minutos a 13.000 rpm en una centrífuga Mikroliter (Hettich). Si en algún caso se observaba precipitación, el compuesto se diluyó sucesivamente en DMSO hasta una concentración en la que no se observase ningún tipo de precipitado que indicara que el compuesto no estaba soluble.

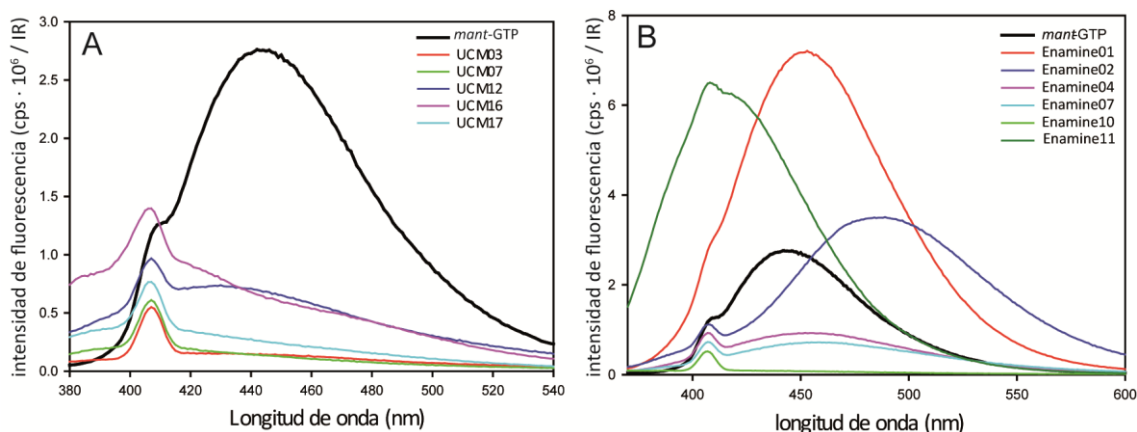
Para la determinación de la solubilidad de los compuestos se eligió el tampón Hepes pH 6.8 en presencia de 2% DMSO y las condiciones de centrifugación características de los ensayos con Bs-FtsZ. Primero se determinó el espectro de absorción de distintas diluciones de los compuestos (10 a 200  $\mu$ M) en tampón Hepes pH 6.8 (volumen final 300  $\mu$ L) barriendo longitudes de onda desde los 200 hasta los 600 nm, y empleando el espectrofotómetro de doble haz Evolution 300 UV-VIS usando microcubetas de plástico (*l* de 0.2 mm) y registrando la absorbancia hasta un límite de 2.0. Con los espectros de absorción de los ligandos a distintas concentraciones se determinó la (o las) longitudes de onda máximas de absorción de cada compuesto y sus coeficientes de extinción molar ( $\epsilon$ ).

De las anteriores muestras se tomaron alícuotas (100  $\mu$ L) que se centrifugaron en tubos de policarbonato usando el rotor TLA-100 (de la ultracentrífuga Beckman) a 386.000 x g (100.000 rpm) durante 20 minutos a 25°C y se volvió a hacer el barrido espectrofotométrico. Aquella concentración donde el valor máximo de absorbancia del compuesto no varía respecto a las muestras no centrifugadas, fue la designada como la concentración máxima soluble del compuesto en el tampón experimental. Cabe destacar que los compuestos presentaron mayor solubilidad cuando estaba presente FtsZ o cuando estaban en medios de cultivo.

#### 5.4. Controles de absorción y fluorescencia de los compuestos

El método de cribado que empleamos para elegir compuestos que se unieran al sitio del nucleótido fue el ensayo de desplazamiento de la sonda fluorescente, *mant*-GTP (ver siguiente apartado). Debido a esto es necesario realizar un control para descartar aquellos compuestos que puedan absorber o emitir luz a la misma longitud de onda que el compuesto fluorescente y descartar aquellos que puedan interferir en las medidas (**Figura 12**).

Los compuestos se prepararon sistemáticamente a sus concentraciones máximas solubles en tampón Hepes pH 6.8 con 2% de DMSO (volumen final de 500  $\mu$ L) y se registraron espectros de emisión de fluorescencia usando una cubeta de cuarzo (*l* de 1) con un espectrofluorímetro contador de fotones Fluoromax-4 (Horiba Jobin Yvon) a 25°C. Las muestras se excitaron a una longitud de onda de 357 nm (longitud de onda de excitación del *mant*-GTP) y se recogió su espectro de emisión ente 350-600 nm. Para estas medidas se usó una anchura de banda de fluorescencia de 2 nm para la excitación, 5 nm para la emisión y un tiempo de integración de un segundo. La intensidad de fluorescencia obtenida (cps) se dividió entre la intensidad del haz de referencia (IR, referencia interna del instrumento). Esta prueba también sirvió para comprobar que la intensidad de fluorescencia total no cambiaba durante el desarrollo de los experimentos debida a fotólisis.



**Figura 12. Controles de fluorescencia de algunos compuestos probados.** Se muestran los espectros de emisión de fluorescencia de compuestos provenientes del cribado de una biblioteca interna (compuestos UCM) (A) o de un cribado virtual (B). En la adquisición de los espectros los compuestos se han excitado a la máxima longitud de onda de excitación del ligando fluorescente *mant*-GTP (357 nm).

## 6. Métodos de competición de los ligandos por el sitio de unión del nucleótido de FtsZ

Para los ensayos de competición con Bs-FtsZ se usó el tampón Hepes pH 6.8; y los experimentos se llevaron a cabo a 25°C. En el caso de los compuestos no análogos de GTP, la mezcla siempre contuvo un 2% de DMSO.

### 6.1. Método radiactivo

El ligando radiactivo usado fue el  $^3\text{H}$ -GTP y los ensayos que se llevaron a cabo siguieron un protocolo común. Se prepararon muestras con  $^3\text{H}$ -GTP y la concentración deseada de Bs-FtsZ diluida en tampón hasta un volumen final de 200  $\mu\text{L}$ . Las mezclas se centrifugaron en una ultracentrífuga TLX (Beckman) usando el rotor TLA-100 durante 1.5 horas a 386.000 x g (100.000 rpm) y a 25°C; tras lo cual se separó la mitad superior del tubo (donde se comprobó que se había deplecionado la proteína) (100  $\mu\text{L}$ ) y la inferior (los otros 100  $\mu\text{L}$ ). A cada una de las partes se les añadió 100  $\mu\text{L}$  del tampón y 1.3 mL del líquido de centelleo HISAFE 2. Sabiendo que la concentración de  $^3\text{H}$ -GTP es proporcional a la actividad detectada en cuentas por minuto (cpm), se determinó la concentración de  $^3\text{H}$ -GTP libre en la mitad superior de los tubos usando el contador de centelleo 1450 microbeta Wallac Trilux (PerkinElmer) (con una eficiencia del 25%) y la concentración de  $^3\text{H}$ -GTP unida en la parte inferior como se muestra en la ecuación 5. En todos los experimentos se realizaron controles en ausencia de proteína lo que permitió calcular el factor  $F_s$  (ecuación 6) para corregir la pequeña concentración de ligando radiactivo que sedimenta a consecuencia de la fuerza centrífuga aplicada.

$$[{}^3\text{H} - \text{GTP}]_b = \frac{\text{cpm}_T - \text{cpm}_{\text{top}} \times (1 + F_s)}{[{}^3\text{H} - \text{GTP}]_T} \quad (4)$$

$$F_s = \text{cpm}_{\text{bot-z}} - \text{cpm}_{\text{top-z}} \quad (5)$$

En las ecuaciones 5 y 6;  $[{}^3\text{H}\text{-GTP}]_b$  y  $[{}^3\text{H}\text{-GTP}]_T$  son las concentraciones de  $^3\text{H}$ -GTP unido y total respectivamente,  $\text{cpm}_T$  y  $\text{cpm}_{\text{top}}$  son la actividad total y la actividad de la parte superior de las muestras respectivamente; y  $\text{cpm}_{\text{bot-z}}$  y  $\text{cpm}_{\text{top-z}}$  son la actividad en la mitad inferior y en la superior de las muestras en ausencia de proteína como se ha descrito (Schaffner-Barbero et al., 2010).

### 6.1.1. Titulación y afinidades de los ligandos de referencia

Muestras de  $^3\text{H-GTP}$  (200 nM) se titularon con concentraciones crecientes de Bs-FtsZ y las concentraciones de ligando radiactivo libres y unidas se calcularon como se describió en el apartado anterior. Suponiendo una unión uno a uno de ligando y proteína se determinó la fracción de  $^3\text{H-GTP}$  unido a la proteína (ecuación 7) y se obtuvo el valor de constante de afinidad  $K_b$  de  $^3\text{H-GTP}$  ( $K_{3\text{H-GTP}}$ ) que mejor se ajustó a los datos, empleando el programa informático SigmaPlot (Systat Software) que resolvió numéricamente el ajuste iterativo de  $[\text{}^3\text{H-GTP}]_b / [\text{}^3\text{H-GTP}]_T$  vs.  $[\text{P}]_f$ .

$$\frac{[\text{}^3\text{H-GTP}]_b}{[\text{}^3\text{H-GTP}]_T} = \frac{K_{3\text{H-GTP}} \times [\text{P}]_f}{1 + K_{3\text{H-GTP}} \times [\text{P}]_f} \quad (7)$$

siendo,  $K_{3\text{H-GTP}}$  la constante de afinidad de unión de  $^3\text{H-GTP}$  a Bs-FtsZ y  $[\text{P}]_f$  la concentración de proteína libre ( $[\text{P}]_f = [\text{P}]_T - [\text{}^3\text{H-GTP}]_b$ , donde  $[\text{P}]_T$  es la concentración de proteína total). El mejor valor de  $K_{3\text{H-GTP}}$  fue  $(7.02 \pm 0.74) \cdot 10^6 \text{M}^{-1}$  (**Figura 13A**).

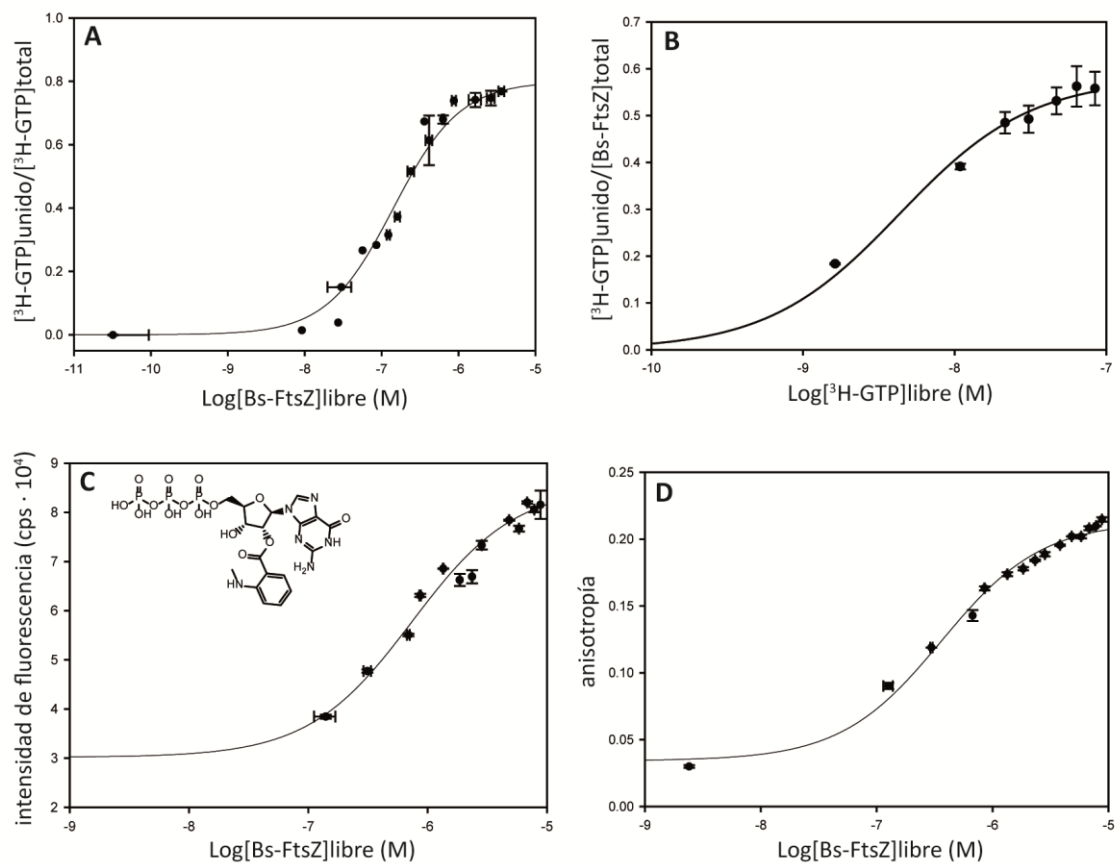
También se tituló la proteína Bs-FtsZ (100 nM) con concentraciones crecientes de  $^3\text{H-GTP}$  (**Figura 13B**), lo que sirvió para determinar el número de sitios de  $^3\text{H-GTP}$  en Bs-FtsZ ( $n = 0.58 \pm 0.01$ ) que se usó para ajustar las competiciones con los compuestos. Este valor se calculó ajustando iterativamente la siguiente ecuación:

$$\frac{[\text{}^3\text{H-GTP}]_b}{[\text{P}]_T} = \frac{n \times K_{3\text{H-GTP}} \times [\text{}^3\text{H-GTP}]}{1 + K_{3\text{H-GTP}} \times [\text{}^3\text{H-GTP}]} \quad (8)$$

### 6.1.2. Competición de los ligandos con $^3\text{H-GTP}$ por el sitio de unión del nucleótido

Para realizar los desplazamientos de  $^3\text{H-GTP}$  del sitio de unión del nucleótido de Bs-FtsZ por los compuestos, se prepararon muestras de 100 nM de proteína y 100 nM de  $^3\text{H-GTP}$ , con concentraciones crecientes del ligando problema. En todos los ensayos se incluyeron los siguientes controles: 2 mM de GTP, 2 mM de GDP, sin proteína y sin compuesto. Las muestras se procesaron como se indicó anteriormente. Se determinó la fracción de  $^3\text{H-GTP}$  unido y a continuación la afinidad del ligando competidor ( $K_L$ ) mediante un programa informático desarrollado con anterioridad en nuestro laboratorio, Equigra5 (Diaz and Buey, 2007) que

resuelve numéricamente el sistema de ecuaciones aplicable como se describió anteriormente (Schaffner-Barbero et al., 2010).



**Figura 13. Titulación de los ligandos de referencia en los métodos de competición.** A. Titulación de  $^3\text{H-GTP}$  (200 nM) con concentraciones crecientes de Bs-FtsZ. B. Titulación de Bs-FtsZ (100 nM) con concentraciones crecientes de  $^3\text{H-GTP}$  de donde se obtuvo el número de sitios (n) por molécula de proteína. C. Variación de la intensidad de fluorescencia registrada durante la titulación de *mant*-GTP y Bs-FtsZ que permitió calcular el factor de corrección R. Se muestra la estructura química del ligando fluorescente. D. Titulación medida por anisotropía y ajustada con el valor R de donde se obtuvo la constante de afinidad de *mant*-GTP a Bs-FtsZ ( $K_{\text{mant-GTP}}$ ) usada para el ajuste de los desplazamientos. Las líneas sólidas son el mejor ajuste para los datos experimentales.

El valor de la constante de afinidad de  $^3\text{H-GTP}$  por apoMj-FtsZ ( $(2.84 \pm 0.36) \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ ), el número de sitios del ligando por la proteína ( $0.77 \pm 0.07$ ) así como las condiciones para realizar los desplazamientos de  $^3\text{H-GTP}$  por los compuestos, se tomaron del trabajo previamente realizado en nuestro grupo (Schaffner-Barbero et al., 2010).

## 6.2. Método de fluorescencia

El nucleótido fluorescente *mant*-GTP se une a los monómeros de FtsZ en el sitio de unión del GTP variando su anisotropía de fluorescencia lo que permite por desplazamiento del mismo, detectar indirectamente la unión de ligandos al sitio del nucleótido en FtsZ. La anisotropía refleja el movimiento rotacional del fluoróforo cuando es expuesto a luz polarizada. La anisotropía es menor cuanto más libertad tenga en el medio en que se encuentra (Lakowicz, 1999 pgs 291-300). De esta forma la unión del *mant*-GTP al sitio del nucleótido en FtsZ se refleja en un aumento de su anisotropía de fluorescencia.

Para los ensayos de competición de los compuestos con el ligando fluorescente se parte de muestras con la concentración deseada de Bs-FtsZ y *mant*-GTP y en presencia o ausencia de los compuestos (volumen final del 500  $\mu$ L) y el registro de la anisotropía se realiza 4 minutos después de la preparación de la muestra. Además de las muestras con FtsZ y *mant*-GTP, se realizaron controles de *mant*-GTP libre (en ausencia de proteína) y con 500 nM de GTP (ligando que desplaza el *mant*-GTP del sitio del nucleótido de FtsZ). Las medidas se realizaron en el espectrofluorímetro contador de fotones Fluoromax-4 (Horiba Jobin Yvon) con formato L usando cubetas de cuarzo de 2x10 mm. Este espectrofluorímetro nos da los valores de intensidad de emisión de fluorescencia de luz polarizada vertical u horizontal, empleando luz polarizada verticalmente para excitación, y procesa las medidas para calcular la anisotropía ( $r$ ) (ecuaciones 9, 10, Lacovitz, 2000).

Las medidas de anisotropía se adquirieron excitando el fluoróforo a 357 nm con un ancho de banda de 5nm y recogiendo su emisión a 445 nm con un ancho de banda de 10 nm. En las medidas de anisotropía se mantuvo constante el factor instrumental "G" cercano a 1.0 (ecuación 10), que compensa la sensibilidad del sistema de detección de la luz polarizada vertical y horizontal.

$$r = \frac{I_{vv} - G \times I_{vh}}{I_{vv} + 2 \times G \times I_{vh}} \quad (9)$$

En la ecuación,  $I_{VV}$  y  $I_{VH}$  corresponden a las intensidades de fluorescencia excitando con luz polarizada vertical y recogiendo la emisión de luz polarizada vertical y horizontal respectivamente,  $I_{HH}$  es la intensidad de fluorescencia excitando y recogiendo emisión de luz

polarizada horizontal y  $I_{hv}$  es la intensidad de fluorescencia excitando con luz polarizada horizontal y recogiendo emisión de luz polarizada vertical.

$$G = \frac{I_{hv}}{I_{hh}} \quad (10)$$

### 6.2.1. Titulación y afinidades de los ligandos de referencia

La unión del *mant*-GTP a la FtsZ causa una variación en la intensidad de fluorescencia; así que para determinar la constante de afinidad del *mant*-GTP por Bs-FtsZ mediante la variación de la anisotropía es necesario una medida previa de las intensidades de fluorescencia del ligando libre y unido. Para ello se tituló el ligando fluorescente (200 nM) con concentraciones crecientes de Bs-FtsZ en tampón y se determinó la intensidad de fluorescencia de cada muestra " $I_M$ " como se muestra en la ecuación 11 (Lakowicz, 2000) (**Figura 13C**). Con los datos obtenidos se calculó el factor " $R$ " ( $2.78 \pm 0.77$ ) que es el cambio de intensidad de fluorescencia entre la forma libre ( $I_{Mf} = (3.0 \pm 0.2) \cdot 10^4$ ) y unida ( $I_{Mb} = (8.5 \pm 0.2) \cdot 10^4$ ) del *mant*-GTP (ecuación 12).

$$I_M = I_{vv} + 2 \times G \times I_{vh} \quad (11)$$

$$R = \frac{I_{MB}}{I_{MF}} \quad (12)$$

El factor " $R$ " fue el usado para el ajuste de los valores de anisotropía (**Figura 13D**) y permitió determinar la fracción de fluoróforo unido " $v_b$ " a la proteína y la constante de afinidad de *mant*-GTP por Bs-FtsZ ( $K_{mGTP} = 9.85 \pm 1.05 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ ) como se describe (Schaffner-Barbero et al., 2010) y se indica en las siguientes ecuaciones:

$$v_b = \frac{[mant - GTP]_b}{[mant - GTP]_T} = \frac{r - r_f}{(r - r_{rf}) + R \times (r_b - r)} \quad (13)$$

$$r = \frac{r_f + K_{mGTP} \times [P]_f \times R \times r_b}{1 + K_{mant-GTP} \times [P]_f \times R} \quad (14)$$

donde;  $[mant-GTP]_b$  y  $[mant-GTP]_T$  son las concentraciones del ligando fluorescente unido y total respectivamente,  $r$  la anisotropía de las muestras,  $r_b$  la anisotropía del ligando unido

$(0.213 \pm 0.002)$ ,  $r_f$  la del ligando libre ( $0.025 \pm 0.005$ ) y  $[P]_f$  la concentración de proteína libre. El valor de  $K_{mGTP}$  es el usado para la determinación de las constantes de afinidad de los ligandos que se unen al sitio del nucleótido de Bs-FtsZ.

### 6.2.2. Competición de los ligandos con mant-GTP por el sitio del nucleótido

Para los ensayos de competición se partió de una mezcla (250  $\mu$ L) que contenía 1  $\mu$ M de mant-GTP y 1  $\mu$ M de Bs-FtsZ ( $n = 0.58$ ) a la que se añadió 250  $\mu$ L del doble de la concentración final deseada del ligando. Se registró la anisotropía de la muestra, se determinó la fracción unida de mant-GTP (ecuación 13) y se determinó la afinidad del ligando competidor ( $K_i$ ) de igual forma que para las competiciones con el ligando radiactivo.

## 7. Ligandos fluorescentes que se unen al sitio de unión de PC190723

Las medidas de fluorescencia se realizaron en el espectrofluorímetro contador de fotones Fluoromax-4 (Horiba Jobin Yvon). Los espectros de emisión de cada compuestos se hicieron en muestras (500  $\mu$ L) que contenían 10  $\mu$ M de los ligandos en tampón Hepes pH 6.8 con un 2% de DMSO, usando como longitud de onda de excitación las obtenidas a partir de los espectros de absorción (realizadas para determinar la solubilidad de los ligandos) y recogiendo su emisión entre 400-700 nm con un tiempo de integración de 0,5 segundos y anchuras de banda de 2 nm para la excitación y 5 nm para la emisión. La longitud de onda máxima de emisión de fluorescencia obtenida se utilizó para realizar un espectro de excitación de fluorescencia y comprobar la longitud de onda máxima de excitación de cada compuesto.

Conocida la longitud de onda máxima de excitación y partiendo de la mezcla utilizada previamente, se realizaron espectros de emisión de fluorescencia de cada compuesto en tampón y añadiendo consecutivamente 10  $\mu$ M de FtsZ, 0.1 mM de GMPCPP, 10 mM de  $MgCl_2$ , y 10  $\mu$ M de PC190723 u 8J. Como controles del experimento, se realizaron espectros de emisión de fluorescencia de cada compuesto en ausencia de proteína y en presencia de cada uno de los demás componentes (GMPCPP,  $MgCl_2$  y PC190723 u 8J). Las condiciones del experimento variaron según la proteína de que especie se probara (Bs-FtsZ, Ec-FtsZ o Sa-FtsZ), usándose tampón Hepes pH 6.8 para Bs-FtsZ y Ec-FtsZ a 25°C y 30°C respectivamente o tampón Mes pH 6.5 a 25°C para Sa-FtsZ.

## 8. Espectroscopía diferencial de absorción

En los experimentos de espectroscopía diferencial de absorción (Donovan, 1973) se usaron celdas en tándem con paso óptico de  $0.438 + 0.438$  cm (Hellma). El ensayo sirvió para determinar las posibles perturbaciones en el espectro de absorción originadas por interacción de UCM05 con la proteína de Bs-FtsZ. Ambos compartimentos de cada celda se llenaron gravimétricamente con las soluciones de proteína y de ligando y se hizo un barrido de su absorbancia entre longitudes de onda de 240 y 450 nm a  $25^{\circ}\text{C}$  usando el espectrofotómetro de doble haz Cary 4000. A continuación se mezclaron las soluciones de proteína y ligando en la celda muestra y se recogió el espectro de interacción.

## 9. Ultracentrifugación analítica

Se realizaron experimentos de velocidad de sedimentación en una ultracentrífuga analítica Optima XL-I (Beckman) a 45000 rpm y  $25^{\circ}\text{C}$  utilizando el rotor An50/Ti. Se usaron celdas de doble sector (paso óptico de 12 mm). El sistema óptico realiza una detección de la muestra tanto por absorción como por interferencia (cambios en el índice de refracción). Esto nos permitió seguir simultáneamente la sedimentación de FtsZ por interferencia y la del ligando por absorción a 315 nm, longitud de onda a la que no absorbe la proteína. El análisis de los perfiles de sedimentación obtenidos a intervalos de tiempo regulares se realizó mediante el ajuste directo de la ecuación de Lamm con el programa SEDFIT (Schuck et al., 2002). Los coeficientes de sedimentación se corrigieron teniendo en cuenta la densidad y viscosidad en  $\text{H}_2\text{O}$  a  $20^{\circ}\text{C}$ .

## 10. Ensamblaje de las distintas proteínas

El efecto de los compuestos en el ensamblaje de FtsZ y tubulina se determinó mediante ensayos de sedimentación y dispersión de luz de los polímeros de FtsZ, determinación de la actividad GTPasa y visualización de los polímeros por microscopía electrónica. Las condiciones se especifican en cada apartado siendo comunes las condiciones con sistema de regeneración de GTP (SR) donde se usó 1 unidad/ml de acetato quinasa y 15 mM de acetil fosfato. En el caso de compuestos disueltos en DMSO (todos excepto los C8 derivados), las muestras incluían un 2% de DMSO total a menos que se indique lo contrario.

### 10.1. Sedimentación de polímeros

Para los experimentos de sedimentación de polímeros de FtsZ y tubulina se prepararon muestras (50 o 100  $\mu\text{L}$  según se indique) en tubos de policarbonato en un termobloque a la temperatura deseada y se centrifugaron en la ultracentrífuga Optima TLX (Beckman) usando el rotor TLA-100. A continuación se separó el sobrenadante del sedimento, se resuspendieron en el mismo volumen de tampón de carga y al sedimento se le añadió un volumen extra del tampón experimental. Posteriormente cada una de las muestras del sobrenadante y del sedimento se cargaron en geles PAGE-SDS en el mismo carril del gel con un intervalo entre cargas de 15 minutos y una vez terminada la electroforesis los geles se destiñieron, se escanearon en un densitómetro calibrado (CS-800 de BioRad) y las bandas de proteína se cuantificaron mediante el programa Quantity One (BioRad).

➤ Compuestos sustituidos en el carbono 8 del GTP (C8 derivados)

Para el estudio del efecto de los derivados de GTP en la polimerización de FtsZ se prepararon muestras (50  $\mu\text{L}$ ) de 9  $\mu\text{M}$  de FtsZ con distintas concentraciones de los compuestos en dos tampones distintos dependiendo de la proteína empleada, tampón Hepes pH 7.5 para Ec-FtsZ y tampón Mes pH 6.5 para Bs-FtsZ y Mj-FtsZ, usando sistema de regeneración de GTP (SR) en todos los casos. En el caso de Ec-FtsZ y Bs-FtsZ la polimerización se inició con la adición de 10 mM de  $\text{MgCl}_2$  y 60  $\mu\text{M}$  de GTP, tras lo cual las muestras se centrifugaron a 386,000 x g (100.000 rpm) durante 10 minutos a 37°C (Ec-FtsZ) o durante 20 minutos a 25°C (Bs-FtsZ). En el caso de Mj-FtsZ la polimerización comenzó añadiendo 10 mM de  $\text{MgCl}_2$  y 100  $\mu\text{M}$  de GTP, y las muestras se centrifugaron 139,000 x g (60.000 rpm) durante 6 minutos a 40°C. Como controles del experimento se incluyeron muestras con 1 mM de GDP y 60  $\mu\text{M}$  de GTP (para Ec-FtsZ y Bs-FtsZ) o 100  $\mu\text{M}$  de GTP (para Mj-FtsZ). Las muestras de sobrenadante y sedimentos se resuspendieron en el tampón experimental y el tampón de carga como se indicó anteriormente, salvo en el caso de los experimentos de inhibición de Ec-FtsZ y Mj-FtsZ donde los sedimentos se resuspendieron en una proporción 1/3 de tampón y 1/3 de tampón de carga. Posteriormente las muestras se cargaron en geles PAGE-SDS y se cuantificó la proteína sedimentada.

➤ Demás compuestos no análogos de GTP

Los ensayos de sedimentación con los demás compuestos se llevaron a cabo sobre muestras (50  $\mu\text{L}$ ) de Bs-FtsZ (10  $\mu\text{M}$ ) y Ec-FtsZ (12  $\mu\text{M}$ ) en tampón Hepes pH 6.8 o de apoMj-FtsZ (9  $\mu\text{M}$ ) en tampón Mes pH 6.5 en presencia de un 2% de DMSO (salvo en los estudios con Tritón X-100 donde se probaron distintas concentraciones de DMSO) y con distintas concentraciones de los compuestos en estudio. Según se indique las muestras incluían SR, GTP o GMPCPP. En cualquier caso, se incluyeron controles en ausencia de nucleótido,  $\text{MgCl}_2$ , compuesto o Tritón X-100 (según proceda) y en presencia de 1 mM de GDP y 3 mM de GTP. En todos los experimentos, los compuestos se incubaron 15 minutos con la proteína y la polimerización se inició al añadir 10 mM de  $\text{MgCl}_2$  y 50, 60 o 100  $\mu\text{M}$  de GTP (Bs-FtsZ, Ec-FtsZ y apoMj-FtsZ respectivamente). Seguidamente, las muestras se centrifugaron a 386,000 x g (100.000 rpm) 20 minutos a 25°C o 30°C para Bs-FtsZ y Ec-FtsZ respectivamente; y 139,000 x g (60.000 rpm) durante 6 minutos a 40°C en el caso de apoMj-FtsZ.

El análisis sobre el efecto de los compuestos UCM en el ensamblaje de tubulina (15  $\mu\text{M}$ ) se llevo a cabo en el tampón GAB, 6 mM de  $\text{MgCl}_2$  y 2% de DMSO, previamente equilibrada la proteína en el tampón. La mezcla de la proteína y los compuestos se preparó sobre hielo, se les añadió 0.9 mM de GTP, se incubaron durante 30 minutos a 37°C y a continuación se centrifugaron a 50.000 rpm durante 10 minutos en la ultracentrifuga a la misma temperatura. En todos los casos se hicieron controles con 1 mM de GTP, 2 mM de GDP y 50  $\mu\text{M}$  de podofilotoxina (un inhibidor conocido de microtubulos).

El porcentaje de inhibición del ensamblaje de FtsZ o tubulina por cada compuesto se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{Inhibición FtsZ o tubulina} = 100 \frac{1 - (\%UCM_p - \%GDP_p)}{\%GTP_p - \%GDP_p} \quad (15)$$

siendo,  $\%UCM_p$ , el porcentaje de FtsZ o tubulina en el sedimento en presencia del compuesto UCM y;  $\%GDP_p$  y  $\%GTP_p$  los porcentajes de FtsZ o tubulina en el sedimento en ausencia del compuesto y con presencia de GDP (2 mM) o GTP (50  $\mu\text{M}$ ) respectivamente.

## 10.2. Dispersión de luz

Los ensayos de dispersión de luz de polímeros de FtsZ y tubulina se hicieron sobre muestras (500  $\mu$ L) que se introdujeron en cubetas de cuarzo en el espectrofluorímetro Fluorolog 3-221 (Jobin Yvon-Spex, Longjumeau, Francia). Las longitudes de onda de emisión y excitación de luz fueron 350 nm para FtsZ y 450 nm para tubulina, con un tiempo de integración de 0.5 segundos y anchuras de banda de 0.5 nm para excitación y emisión. En los registros de la dispersión de luz, las muestras se incubaron durante 5 minutos en el espectrofluorímetro, se añadió 10 mM  $MgCl_2$  y se inició la polimerización al añadir GTP. La dispersión de luz se registró durante 1 hora aproximadamente.

Se analizó el efecto de los compuestos no análogos de GTP y los derivados de PC190723 sobre el ensamblaje de FtsZ de 4 especies distintas; *B.subtilis*, *E.coli*, *M.jannaschii* y *S.aureus* (Sa-FtsZ). Las condiciones usadas para Bs-FtsZ, Ec-FtsZ y apoMj-FtsZ fueron las mismas que para los ensayos de sedimentación. En el caso de Sa-FtsZ (10  $\mu$ M), la proteína se diluyó en tampón Mes pH 6.5 con un 2% de DMSO y presencia de la concentración deseada de los compuestos, y los experimentos se realizaron a 25°C. En todos los experimentos se realizaron controles en ausencia de compuesto o nucleótido.

El efecto de los compuestos sobre la dispersión de luz de tubulina (15  $\mu$ M) se realizaron en las mismas condiciones que las usadas para los ensayos de sedimentación de polímeros; incubando en este caso la mezcla de tubulina y compuesto en el tampón durante 2 minutos a 37°C (en la cubeta de cuarzo dentro del espectrofluorímetro), y añadiendo el GTP pasados 3 minutos. El registro de la dispersión de luz se monitorizó durante 1 hora. Como controles de los experimentos, por un lado al tras una hora las muestras se posaron en hielo dos minutos (lo que induce el desensamblaje de los microtubulos) y por otro lado se realizó el experimento en las mismas condiciones pero en ausencia del compuesto.

## 10.3. Actividad GTPasa

El análisis de la actividad GTPasa de la proteína se realizó mediante el método modificado de determinación de fosfato inorgánico con verde malaquita (Kodama et al., 1986). El reactivo verde malaquita (2 g/L molibdato sódico, 0.3 g/L oxalato de verde malaquita, 0.5 g/L triton-X100 y 0.7M HCl) se preparó en el laboratorio y se dejó reposar al menos una noche a 4°C. La valoración de la actividad GTPasa se realizó a partir de muestras (100 $\mu$ L) con la

concentración deseada de FtsZ y ligando en el tampón experimental en un termobloque. Los experimentos con Bs-FtsZ y Ec-FtsZ se realizaron en tampón Hepes pH 6.8 a 25°C o 30°C respectivamente y para Mj-FtsZ en tampón Mes pH 6.5 a 40°C. En todos los casos se realizaron controles en ausencia de compuesto y con 1 mM de GTP. El experimento comenzó al añadir GTP a la mezcla y desde este momento se tomaron alícuotas (5 µL) cada 5 o 10 minutos (según la especie bacteriana) durante 1 hora para Bs-FtsZ, 45 minutos para Ec-FtsZ y 30 minutos para apoMj-FtsZ. Las muestras se incuban con una mezcla de 300 µL del reactivo y 295 µL de agua y a los 15 minutos se registra la absorbancia de las a 650 nm ( $A_{650\text{nm}}$ ).

Para calcular la concentración de fosfato inorgánico en los experimentos, se determinó una recta patrón con distintas concentraciones de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  en verde malaquita y semidió su absorbancia a 650 nm. Con los datos de absorbancia de las muestras y la regresión obtenida por la recta patrón se determinó la velocidad a la que FtsZ hidroliza el GTP de la siguiente forma:

$$\text{velocidad de hidrólisis del GTP (min}^{-1}\text{)} = \frac{[\text{Pi}]/[\text{FtsZ}]_T}{\text{tiempo}} \quad (16)$$

donde, [Pi] es la concentración de fosfato inorgánico y  $[\text{FtsZ}]_T$  es la concentración de proteína total.

## 11. Microscopía electrónica

La visualización de los polímeros de FtsZ o microtubulos de tubulina se realizó mediante microscopía electrónica de transmisión. Las rejillas de cobre (G400) se prepararon cubriéndolas con una solución al 0.25% de resina de formvar (ted Pella, Inc.) en cloroformo y sombreándolas ligeramente con carbón (Servicio de Microscopía Electrónica del CIB-CSIC). En todos los experimentos se tomaron 20 µL de muestra que se adsorbieron sobre la rejilla en una placa a la temperatura deseada para cada experimento durante 1 minuto. La rejilla con la muestra se lavó pasándola por 4 gotas de 20 µL de una solución de acetato de uranilo al 2% y se dejó teñir durante 1 minuto con la misma solución de acetato de uranilo. Las imágenes se adquirieron a un aumento de x 40.000 (a menos que se indique lo contrario) usando el microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-1230 a 100 Kv acoplado a una cámara digital CMOS, TemCam-F416 TVIPS, de 16 MegaPixel, y un tamaño de pixel de 16x16 micras.

## 12. Técnicas celulares

### 12.1. Experimentos *in vivo* con células bacterianas

#### 12.1.1. Determinación de la actividad antibacteriana

La concentración mínima inhibitoria (MIC) y la concentración mínima bactericida (MBC) de cada compuesto frente a distintas cepas bacterianas se hizo siguiendo las recomendaciones del “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI) que es una organización que promueve la formulación, aplicación de normal y consenso de pruebas de sensibilidad a antimicrobianos (CLSI, 2006; CLSI, 1999). La MIC frente a la cepa de *B.subtilis* 168 se determinó mediante macrodiluciones en medio líquido Mueller-Hinton II broth (CAMHB) (Becton Dickinson) con agitación y a 37°C. Se definió el valor de MIC como la concentración más baja de compuesto a la que se inhibe el crecimiento bacteriano medido por absorbancia de 600 nm. Para la determinación de la MIC de los compuestos frente a un panel de bacterias patógenas, se siguió el método de microdiluciones del medio CAMHB sólido (Oxoid, Basingstoke, UK) probando los compuestos a concentraciones entre 0.12-128 mg/L y se obtuvieron los resultados después de 24 horas de incubación de las muestras a 35-37°C. Como control de los experimentos se realizaron muestras en presencia solo de DMSO ya que este compuesto orgánico puede inhibir el crecimiento bacteriano.

La concentración mínima bactericida (MBC) se define como la dilución más baja en la que hay una reducción completa del crecimiento bacteriano respecto a un control en ausencia de compuesto. Para su determinación, muestras (0.1 mL) con distintas concentraciones de los compuestos (concentraciones de MIC o 4 veces inferiores) se dispusieron en el centro de placas de agar sangre y se dejaron secar. Posteriormente, con un asa estéril se disperso el inóculo sobre toda la superficie de la placa y se incubó entre 35-37°C durante 24 o 48 horas, momento en el cual se realizó su lectura.

#### 12.1.2. Estudios del fenotipo de la división celular bacteriana

Para ver el efecto de los distintos compuestos sobre la división celular bacteriana, células de *B.subtilis* 168 que habían crecido hasta 0.1-0.2 unidades de absorción óptica (a 600 nm) en el medio CAMHB a 37°C se dividieron en viales con concentraciones de compuesto

deseadas. A distintos intervalos de tiempo se extrajeron pequeñas alícuotas (10  $\mu$ L) y se visualizaron en un microscopio óptico de contraste de fases.

### *12.1.3. Visualización de FtsZ-GFP por microscopía de fluorescencia*

Para observar FtsZ en células vivas se empleó una cepa de *B.subtilis* SU570 (168 trpC2 ftsZ::ftsZ-gfp-Spec (Levin et al., 1999; Strauss et al., 2012)) donde se ha reemplazado toda la FtsZ nativa por FtsZ fusionada a GFP (proteína verde fluorescente). La cepa, donada por la Dra. Elisabeth J. Harry del Instituto de Biociencias Médicas y Moleculares en Australia se resuspendió en el medio número 3 (Pennassay broth, Becton Dickinson) con 50  $\mu$ g/mL de espectinomicina y se dejó crecer a 30°C hasta un valor de absorbancia de 0.2 (a 600 nm). Posteriormente muestras del cultivo se mezclaron con un volumen igual de medio que contenía el doble de concentración de compuesto que la deseada y a distintos tiempos se tomaron alícuotas de 10  $\mu$ L. Finalmente 10  $\mu$ L de esta muestra se visualizó en un microscopio de fluorescencia (Zeiss Axioplan) equipado con un objetivo Plan Apochromatic (60X) y una cámara CCD (Hamamatsu 4742-95). Para observar el nucleóide se añadió 0.25  $\mu$ g/mL de 4,6-diamino-2phenylindole (DAPI) y para la observación de la membrana se añadió 1  $\mu$ g/mL de FM4-64.

## **12.2. Experimentos con células de mamífero**

### *12.2.1. Cultivo de células de mamífero*

Para los experimentos se utilizaron dos medios diferentes según las líneas celulares usadas: (i) medio RPMI 1640 suplementado con 10% FCS, glutamina y antibióticos (Buey et al., 2007) para células humanas A549 de carcinoma de pulmón (no microcíticas) y células humanas de carcinoma A2780 (este último suplementado con 0.25 unidades/mL de insulina bovina); y (ii) medio DMEM con 10% de FCS, glutamina y antibióticos para los cultivos con células de carcinoma humano de pecho Hs578T o carcinoma de cervix HeLa, células normales de riñón de perro MDCK, fibroblastos humanos de pulmón IMR90 y fibroblastos murinos normales (3T3) o transformados (3T3-SV40). En el caso particular de los cultivos con las células Hs578T el medio se suplementó con 0.25 unidades/mL de insulina bovina, células MDCK y el medio IMR90 (con aminoácidos no esenciales y piruvato). También se utilizaron células endoteliales de cordón

umbilical humano (HUVEC) que se crecieron previamente en viales cubiertos con 0.2 % de gelatina en el medio EGM-2 SingleQuots (Lonza).

### *12.2.2. Análisis de la inhibición del crecimiento celular, alteración de la disposición de los microtúbulos y ciclo celular*

La determinación de la citotoxicidad se realizó mediante inmunofluorescencia indirecta en diferentes líneas celulares empleando el ensayo con MTT (bromo 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium) modificado (Yang et al., 2007). La visualización de muestras se realizó sobre un cultivo de células A549 en un cubreobjetos (12 mm) que habían crecido durante toda la noche en ausencia de compuestos (solo DMSO como vehículo) o en presencia de distintas concentraciones de los ligandos. Las células se permeabilizaron con Tritón X-100 y se fijaron con formaldehído (3.7%). Los microtubulos se tiñeron específicamente con anticuerpos monoclonales DMIA  $\alpha$ -tubulina y el DNA con Hoeschst 33342 como se ha descrito (de Ines et al., 1994). Las preparaciones se visualizaron en el microscopio de epifluorescencia axioplan Zeiss y las imágenes se adquirieron con la cámara CCD Hamamatsu 4742-95. El análisis de la progresión del ciclo celular se realizó mediante la determinación del ADN marcado con yoduro de propidio como se ha descrito (Andreu and Barasoain, 2001) en el citómetro de flujo Coulter Epics XL.



## **RESULTADOS**



## RESULTADOS

### A. Inhibidores que reemplazan el nucleótido unido a FtsZ

Como se ha expuesto en la Introducción, FtsZ es una proteína que une nucleótidos de guanina (Mukherjee et al., 1993; RayChaudhuri and Park, 1992)(Oliva et al., 2004) y presenta un ensamblaje dinámico asociado a la hidrólisis de GTP (Mukherjee and Lutkenhaus, 1998). Este sitio de unión está muy conservado entre las distintas especies bacterianas y es una diana obvia para la búsqueda de nuevos inhibidores de la división celular bacteriana que actúen sobre FtsZ. Los ligandos que se unen a este sitio pueden ser análogos del nucleótido o tener una estructura química completamente distinta. Nuestros estudios con ambos tipos de ligandos se presentan en los siguientes apartados.

#### 1. Análogos de GTP sustituidos en el carbono 8 de la guanina

##### 1.1. Los derivados en C8 de GTP se unen al sitio de unión del nucleótido inhibiendo el ensamblaje de FtsZ bacteriana

Estudios previos mostraron cómo los análogos de GTP con sustituciones en el carbono 8 (C8 derivados) (**Figura 14A**) tienen la capacidad de unirse específicamente a FtsZ e inhibir su polimerización mientras que permiten el ensamblaje de tubulina eucariota, revelando posibles diferencias en la interfaz de asociación de los monómeros durante el ensamblaje (Lappchen et al., 2008). El estudio de estos derivados ha continuado en nuestro grupo determinando las afinidades de unión de los C8 derivados al sitio del nucleótido en FtsZ de *M.jannaschii* (Schaffner-Barbero et al., 2010) y *B.subtilis* (Marcelo et al., 2013) mediante el método de competición de *mant*-GTP. Las constantes de unión fueron similares en ambas especies y las diferencias de energía libre de unión ( $\Delta G$ ) de cada nucleótido en ambas proteínas son poco significativas, con un valor medio de  $0.21 \pm 0.37$  kcal mol<sup>-1</sup> (**Tabla 2**). Estos resultados mostraron una conservación de la energía de unión en el sitio del nucleótido de FtsZ en ambas especies, lo cual no es sorprendente debido a su conocida similitud estructural (Oliva et al., 2007).

**Tabla 2. Constantes de afinidad y cambios en la energía libre de unión de los C8 derivados de GTP a FtsZ.**

Ligando	Mj-FtsZ <sup>a</sup>		Bs-FtsZ <sup>b</sup>	
	Kd (μM)	ΔG <sup>0</sup> (kcal mol <sup>-1</sup> )	Kd (μM)	ΔG <sup>0</sup> (kcal mol <sup>-1</sup> )
<b>GTP</b>	~0.009 ± 0.005 <sup>c</sup>	~-10.98 ± 0.25	~0.033 ± 0.006	~-10.21 ± 0.10
<b>GMP</b>	38.2 ± 9.0	-6.02 ± 0.12	39.2 ± 5.0	-6.01 ± 0.07
<b>MorphGTP</b>	0.433 ± 0.008	-8.67 ± 0.01	0.274 ± 0.015	-8.95 ± 0.04
<b>MorphGMP</b>	233 ± 42	-4.95 ± 0.10	103 ± 2	-5.44 ± 0.02
<b>PyrrGTP</b>	0.019 ± 0.006	-10.52 ± 0.19	0.042 ± 0.001	-10.07 ± 0.02
<b>PyrrGMP</b>	208 ± 30	-5.02 ± 0.06	97.1 ± 20.0	-5.47 ± 0.11
<b>MeOGTP</b>	~0.006 ± 0.001 <sup>c</sup>	~-11.2	0.010 ± 0.001	-10.90 ± 0.02
<b>MeOGMP</b>	57.1 ± 24.6	-5.79 ± 0.19	27.6 ± 8.5	-6.22 ± 0.13
<b>Br-GTP</b>	0.079 ± 0.031	-9.68 ± 0.58	0.054 ± 0.015	-9.91 ± 0.14

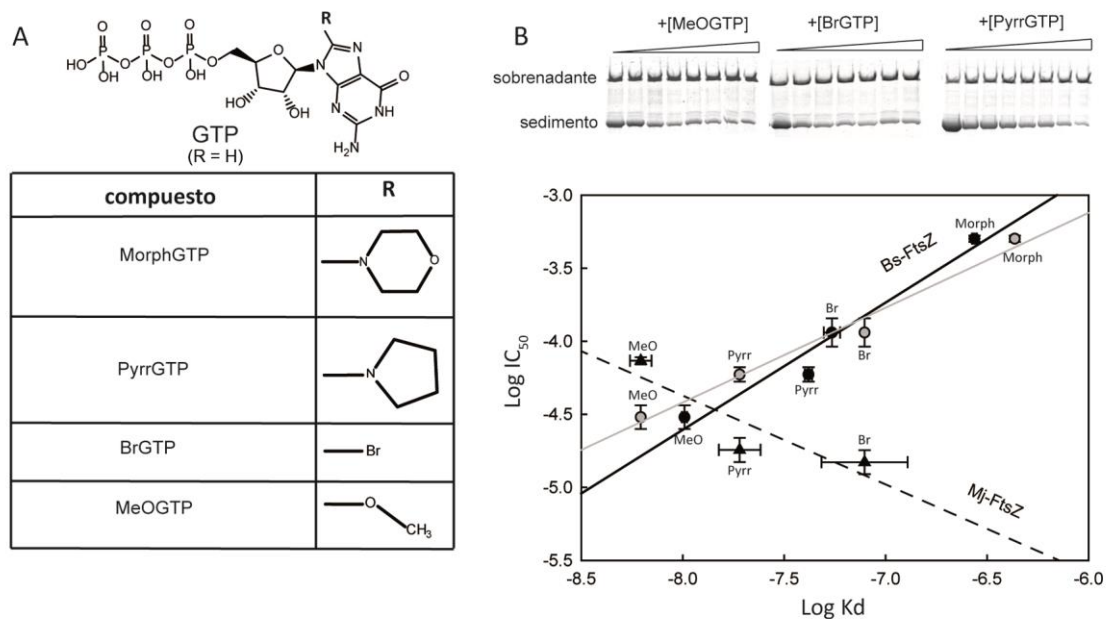
Se muestran los datos de las constantes de disociación, Kd ( $K_d = K_b^{-1}$ ) y cambios en la energía libre de unión de los C8 derivados. <sup>a</sup>Kd, datos de Schaffner-Barbero *et al.*, 2010; <sup>b</sup>Kd datos de Marcelo y Huecas *et al.*, 2013. En todos los casos, las constantes de unión se determinan a partir del método de competición de los compuestos con el ligando fluorescente *mant*-GTP. <sup>c</sup>La afinidad del GTP es mucho mayor que la del *mant*-GTP por lo que fue difícil su determinación exacta.

Mediante ensayos de sedimentación de los polímeros de FtsZ, determinamos la capacidad inhibitoria (IC<sub>50</sub>) de MorphGTP, PyrrGTP, BrGTP y MeOGTP sobre el ensamblaje de FtsZ (9 μM) en dos especies bacterianas *E.coli* y *B.subtilis* y una arqueobacteria *M.jannaschii*. Los experimentos se llevaron a cabo en presencia de un sistema de regeneración de GTP (SR) usando tampón Hepes pH 7.5 para Ec-FtsZ o Mes pH 6.5 para Bs-FtsZ y Mj-FtsZ (**tabla 3 y figura 14**). Tanto en Bs-FtsZ como en Ec-FtsZ se observó una correlación entre la capacidad inhibitoria de los ligandos y su afinidad de unión por el sitio del nucleótido. Sorprendentemente, en el caso de Mj-FtsZ dicha correlación fue inversa a la que presentaban los ligandos en las FtsZ de las especies bacterianas, existiendo menor inhibición del compuesto conforme la afinidad al sitio del nucleótido era mayor (**figura 14B**). Más aun, MorphGTP no inhibió el ensamblaje de la proteína de *M.jannaschii* (**tabla 3**).

**Tabla 3. Inhibición de la polimerización de FtsZ en presencia de los C8 derivados.**

Ligando	IC <sub>50</sub> Polimerización (μM)		
	Mj-FtsZ <sup>a</sup>	Bs-FtsZ <sup>b</sup>	Ec-FtsZ <sup>c</sup>
<b>MorphGTP</b>	-	503.7 ± 26.0	110.5 ± 15.3
<b>BrGTP</b>	14.9 ± 3.1	114.8 ± 28.8	48.7 ± 6.23
<b>PyrrGTP</b>	18.0 ± 3.8	59.3 ± 7.1	21.4 ± 0.9
<b>MeOGTP</b>	73.5 ± 4.3	30.3 ± 6.2	11.4 ± 1.96

Se muestra la concentración en la cual los C8 derivados inhiben del 50% de la polimerización (IC<sub>50</sub>) de Mj-FtsZ, Bs-FtsZ y Ec-FtsZ. <sup>a</sup> las IC<sub>50</sub> de los compuestos en Mj-FtsZ de Marcelo *et al.*, 2013, <sup>b</sup> y <sup>c</sup> Los valores IC<sub>50</sub> de los compuestos en Bs-FtsZ y Ec-FtsZ del trabajo de Schaffner-Barbero *et al.*, 2010.



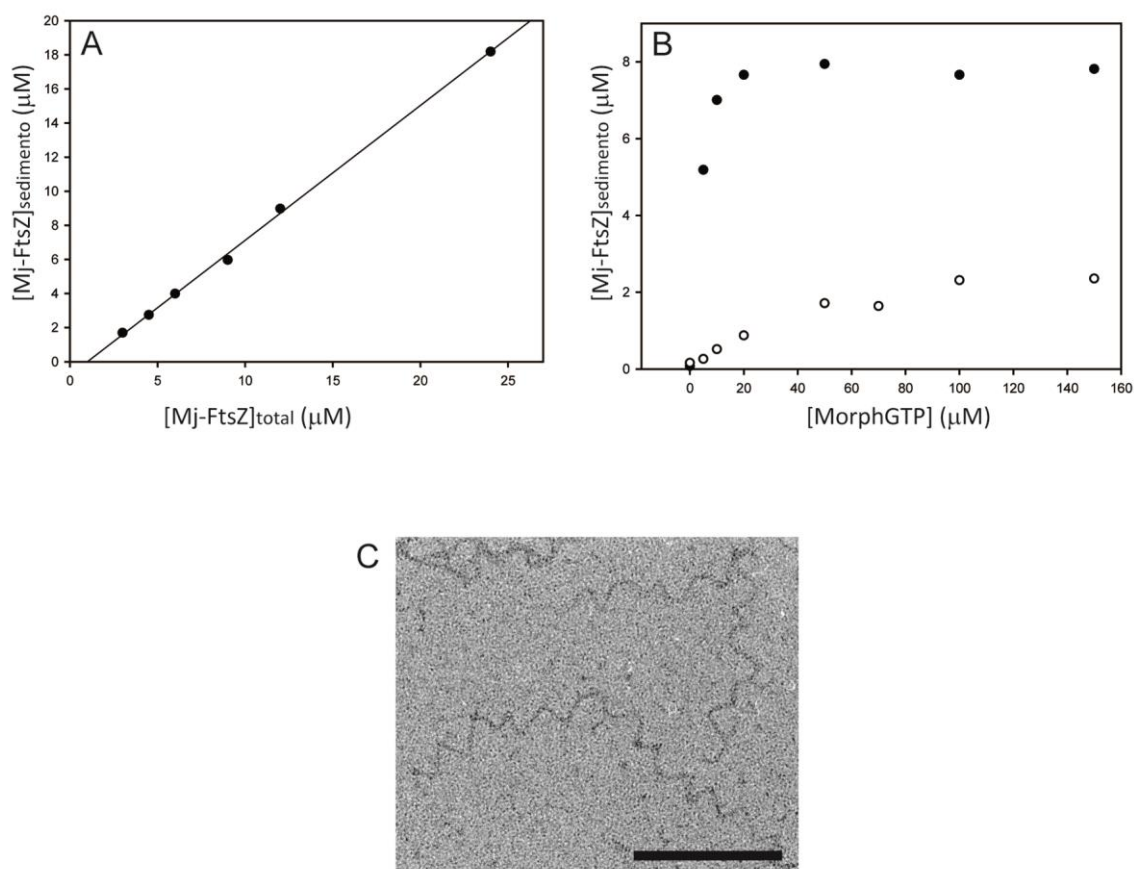
**Figura 14. Análogos de GTP con sustituciones en el carbono 8 (C8 derivados).** A. Estructura química de GTP con el sustituyente (R) en posición 8 sobre el cual se han añadido los distintos grupos funcionales que dan origen a los compuestos ensayados y que se muestran en la tabla. B. Arriba, inhibición en el ensamblaje de Mj-FtsZ al incrementar las concentraciones de los análogos de GTP. Abajo, correlación de la inhibición en la polimerización de FtsZ ( $\log IC_{50}$ ) con las constantes de disociación ( $\log Kd$ ;  $Kd = Kb^{-1}$ ) en Mj-FtsZ (triángulos negros) y Bs-FtsZ (círculos negros). En círculos grises se muestra la correlación interespecífica entre el  $\log IC_{50}$  de Bs-FtsZ vs.  $Kd$  de Mj-FtsZ (Schaffner-Barbero *et al.*, 2010). Las líneas son el mejor ajuste lineal de los datos.

## 1.2. Diferencias en el efecto inhibitorio de los C8 derivados en FtsZ de la arqueobacteria *M.jannaschii*

Como se ha mostrado anteriormente el MorphGTP inhibe el ensamblaje de Bs-FtsZ y Ec-FtsZ con  $IC_{50}$  de  $503.7 \pm 26.0 \mu M$  y  $110.5 \pm 15.2 \mu M$  respectivamente; mientras que no inhibe la polimerización de Mj-FtsZ. Para caracterizar el efecto del MorphGTP ( $100 \mu M$ ) sobre el ensamblaje de Mj-FtsZ ( $9 \mu M$ ) se realizaron experimentos de sedimentación de polímeros de FtsZ, se determinó la actividad GTPasa de la proteína y se visualizaron muestras mediante microscopía electrónica. Los experimentos de sedimentación de polímeros hechos en tampón Mes pH 6.5 sin GTP, indicaron cómo el MorphGTP induce una polimerización nucleada de Mj-FtsZ con una concentración crítica de ensamblaje (Cr) de  $1.00 \pm 0.02 \mu M$  (Figura 15A), equivalente a la que presenta la proteína en presencia de GTP,  $Cr = 1.30 \pm 0.11 \mu M$  (Huecas and Andreu, 2004), lo que no se observó con ninguno de los otros C8 derivados probados. Se realizaron titulaciones de Mj-FtsZ con varias concentraciones de MorphGTP ( $5 - 150 \mu M$ ) a  $35^\circ C$  y  $55^\circ C$  en ausencia de GTP, observándose un incremento en la fracción de polímero de FtsZ formado (Figura 15B) y llegando a  $55^\circ C$  a condiciones de saturación con 1 molécula de MorphGTP por molécula de FtsZ. La determinación de la velocidad de hidrólisis de este

compuesto de FtsZ mostró que no era hidrolizado por la proteína (velocidad =  $0.0035 \pm 0.0030 \text{ min}^{-1}$ ).

Para conocer qué tipo de estructuras poliméricas forma FtsZ en presencia del MorphGTP, se visualizaron muestras por microscopía electrónica observándose que el ligando induce la formación de polímeros de Mj-FtsZ en forma de espirales de una subunidad de ancho ( $5.5 \pm 0.3 \text{ nm}$ ) similares a aquellos que se forman en presencia de GDP y agentes agregantes (Huecas and Andreu, 2004)(Figura 15C). Este fenómeno no se observó con los demás ligandos los cuales solo inducían la agregación de la proteína.



**Figura 15. El MorphGTP induce la polimerización de Mj-FtsZ.** A. Polimerización de Mj-FtsZ en presencia de MorphGTP. B. Inducción de polimerización de Mj-FtsZ por el incremento en la concentración de MorphGTP a 35° (círculos vacíos) y 55°C (círculos llenos). C. Micrografía electrónica de polímeros de Mj-FtsZ formados en presencia del ligando. La barra de aumento corresponde a 200nm.

Mediante métodos de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) se determinaron las conformaciones libres y unidades de PyrrGTP y MorphGTP a FtsZ y por simulaciones de dinámica molecular se evaluó la geometría global de las moléculas en su estado unido a la proteína, para intentar explicar por qué hay ligandos que inhiben el ensamblaje de FtsZ de *M.jannaschii* y

otros como el MorphGTP no lo hacen. El modelo de unión planteado para los C8 derivados a FtsZ se presentará en la Discusión.

### 1.3. Epítomos y conformaciones unidas de los C8 nucleótidos

En colaboración con el laboratorio del Dr. Jesús Jiménez Barbero en el CIB-CSIC se investigó el reconocimiento molecular de los nucleótidos modificados por las FtsZ de *B.subtilis* y *M.jannaschii*, mediante técnicas de Resonancia Magnética Nuclear (RMN). Para el estudio de los nucleótidos en su estado libre se usaron los análogos tri-fosfato de GTP. Se estudiaron las posibles conformaciones geométricas “anti” y “syn” de los ligandos mediante el análisis del NOE (Efecto Nuclear Overhauser) (**figura 16**), observándose que el GTP adopta una conformación mayoritariamente “anti” en solución (85%) mientras que Morph y Pyrr se encuentran siempre en su conformación “syn”. Esto estuvo en concordancia con estudios previos donde se proponía que nucleótidos de purina en solución y con sustituyentes grandes en el carbono 8 predominan en su conformación syn, mientras que si este sustituyente es más pequeño, existe un equilibrio entre ambas conformaciones (Tavale and Sobell, 1970).

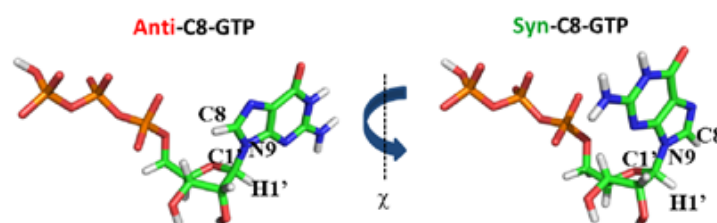
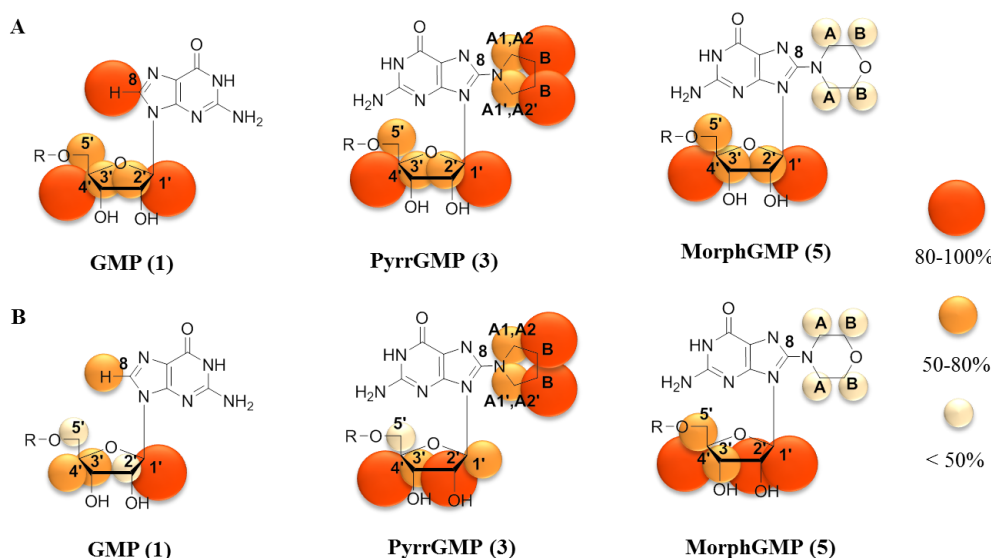


Figura 16. Conformación anti y syn de los nucleótidos de guanina según el ángulo de torsión de su enlace glicosídico.

Para el estudio de los ligandos en su forma unida a FtsZ se usaron los análogos mono-fosfato (MorphGMP y PyrrGMP) que como se comprobó por desplazamientos de *mant*-GTP se unen al mismo sitio que los ligandos tri-fosfato (**tabla 2**). Los ligandos mono-fosfato tienen constantes de afinidad menores y velocidades de disociación mayores que nos permitieron adquirir los datos de STD-RMN (Transferencia de Saturación – RMN) y tr-NOESY (Efecto Nuclear Overhauser Transferido). Mediante STD-RMN se identificó el epítomo de unión de los ligandos a ambas proteínas. PyrrGMP y MorphGMP mostraron diferencias tanto en el modo de unión a FtsZ con respecto a GMP como en la forma en que se unen a FtsZ de ambas especies (**figura 17**). GMP presenta altos porcentajes de saturación en el protón de la ribosa H1' en FtsZ de ambas especies mientras que en H2' y H5' estos porcentajes varían según la especie. Las

diferencias entre los análogos residen principalmente en sus sustituyentes en el carbono 8, de forma que el anillo pirrolidil presenta un alto porcentaje de saturación cuando se une a ambas proteínas mientras que la interacción del anillo del morfolino con FtsZ de ambas especies es mínima.

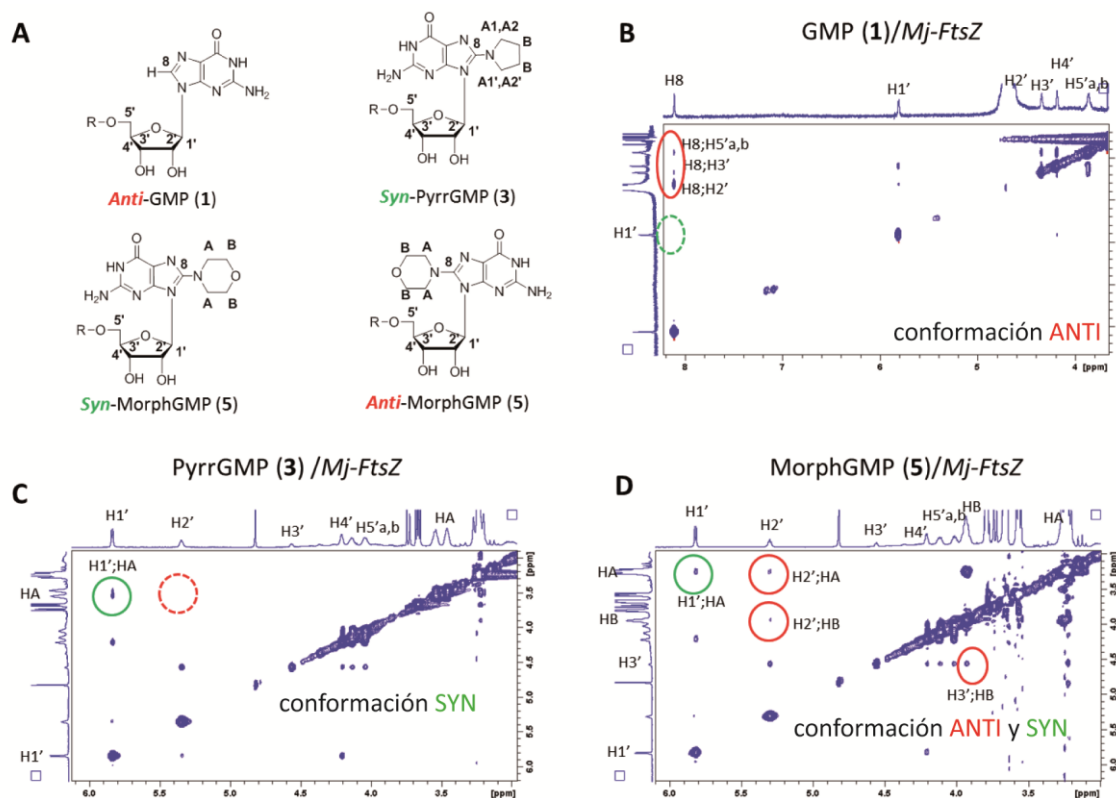


**Figura 17.** Mapa de los epítomos de unión de los nucleótidos C8 de guanosina (1, 3 y 5) a FtsZ de *M.jannaschii* (A) o *B.subtilis* (B). Las zonas con mayor porcentaje de saturación (coloración más intensa) indican los protones del ligando que tienen mayor interacción con la proteína.

La determinación de las conformaciones de los ligandos en su forma unida a la proteína monomérica de *M.jannaschii* y *B.subtilis* se llevó a cabo mediante análisis tr-NOESY que también mostró diferencias en el modo de unión de los C8 derivados. En el caso de Mj-FtsZ, GMP se une a la proteína únicamente en conformación “anti”, PyrrGMP en la forma “syn” y el MorphGMP se puede unir a la proteína adoptando ambas conformaciones (**tabla 4** y **figura 18**). En el caso de Bs-FtsZ, GMP y PyrrGMP se unen en la misma conformación que a MjFtsZ, pero MorphGMP sólo se une en la conformación geométrica “anti” (**tabla 4**). Estos resultados muestran variaciones en las conformaciones de los análogos en su forma unida a las distintas proteínas, indicando un modo de reconocimiento distinto por parte de Mj-FtsZ y Bs-FtsZ.

**Tabla 4. Conformación anti o syn de los análogos mono-fosfato de GTP con sustituciones en el carbono 8 en sus formas libre o unida a FtsZ de *B.subtilis* o *M.jannaschii***

Derivados C8 en presencia de Bs-FtsZ o Mj-FtsZ	Conformación en su estado unido a FtsZ	Conformación en su estado libre
GMP / Mj-FtsZ	anti	85% anti
GMP / Bs-FtsZ	anti	
PyrrGMP / Mj-FtsZ	syn	100% syn
PyrrGMP / Bs-FtsZ	syn	
MorphGMP / Mj-FtsZ	anti / syn	100% syn
MorphGMP / Bs-FtsZ	anti	



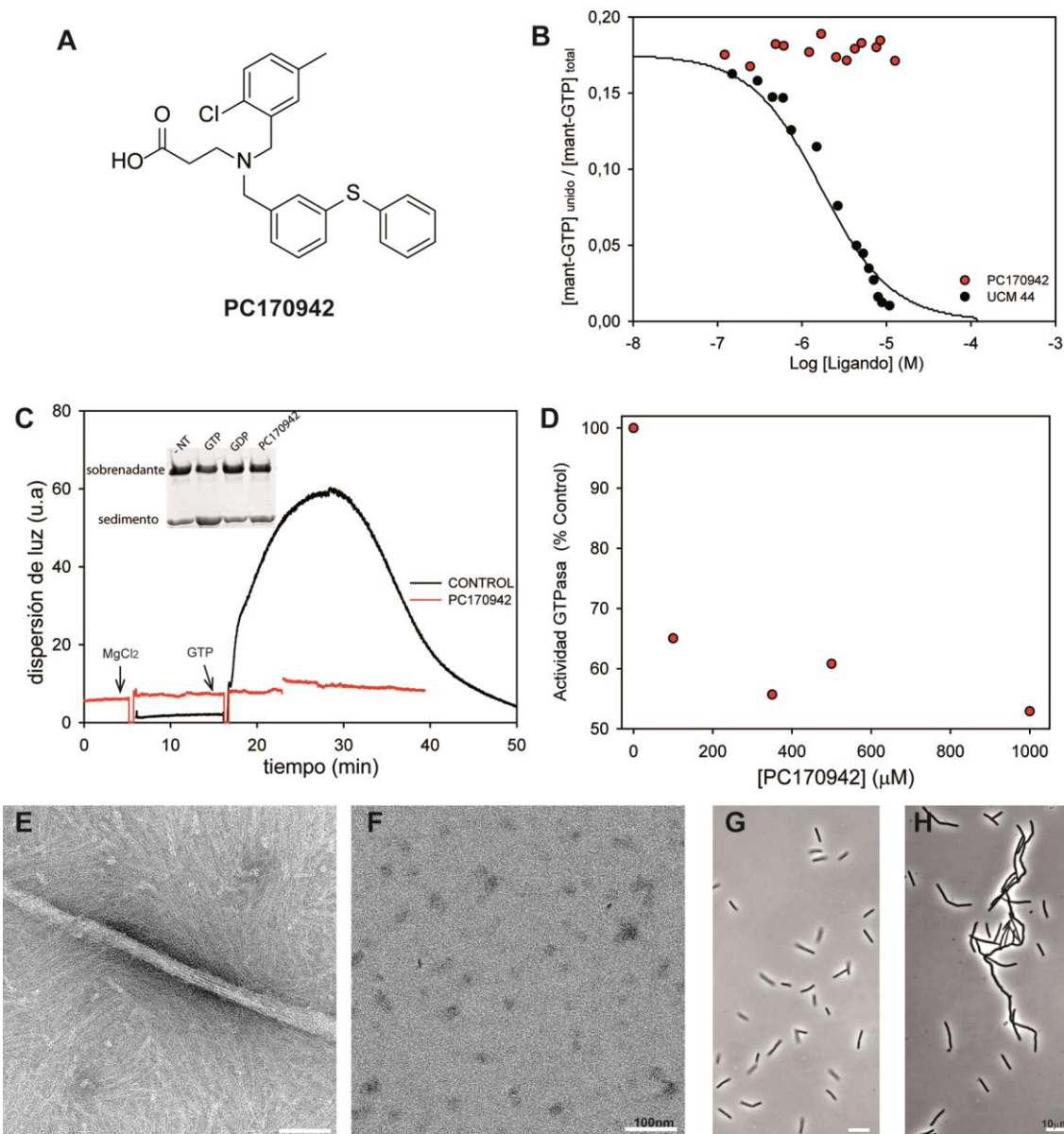
**Figura 18. Espectros trNOESY del nucleótido GMP y sus análogos sustituidos en el carbono 8 en presencia de Mj-FtsZ.** realizados con una proporción de ligando-proteína 20:1 a 298 K y 100 ms. A. Estructura química de GMP y sus análogos. Se indica la numeración seguida para los experimentos RMN. B. Espectro trNOESY de GMP (1). C. Espectro trNOESY de PyrrGMP (3). D. Espectro trNOESY de MorphGMP (5).

## 2. Ligandos sintéticos

Uno de los principales objetivos en esta Tesis ha sido la búsqueda de pequeñas moléculas con estructura distinta al GTP que puedan unirse al sitio del nucleótido de FtsZ. Estos compuestos se obtuvieron a partir de: (i) compuestos descritos previamente en la literatura, (ii) provenientes de un cribado virtual o (iii) de una biblioteca sintética de nuestros colaboradores (compuestos UCM). La detección de los compuestos que se unen al sitio del nucleótido se llevó a cabo adaptando el método de fluorescencia que había sido descrito previamente por nuestro grupo (Schaffner-Barbero et al., 2010) a FtsZ de *B.subtilis*, donde el cambio de anisotropía de fluorescencia de un análogo de GTP (*mant*-GTP) entre sus formas libre o unida al monómero de FtsZ permite la medida de las afinidades de unión de los ligandos competidores desde  $\approx 1$  mM hasta  $\approx 10$  nM.

### 2.1. Compuestos descritos previamente en la literatura. El caso especial de PC170942

Como se describió en la Introducción hay muchos compuestos que interaccionan con FtsZy algunos presentan puntuaciones medio-altas de interacción con el sitio del nucleótido en simulaciones de ajuste molecular (ICM y GLIDE) en base a las estructuras cristalográficas de FtsZ de *B.subtilis* y de *M.jannaschii* (Schaffner-Barbero et al., 2012). Nuestro interés se centró en comprobar experimentalmente si algunos de estos compuestos interaccionaban con el sitio del nucleótido de Bs-FtsZ. Los ligandos seleccionados, fueron en su mayoría compuestos fenólicos solubles en nuestro tampón experimental. La amikacina presentó una solubilidad de 1.5 mM, la curcumina de 150  $\mu$ M, el ácido caféico de 80  $\mu$ M y el ácido clorogénico de 50  $\mu$ M; pero desafortunadamente al someterlos a una comprobación experimental con el método de desplazamiento de *mant*-GTP no se unieron al sitio del nucleótido aun cuando se probaron a sus máximas concentraciones solubles.



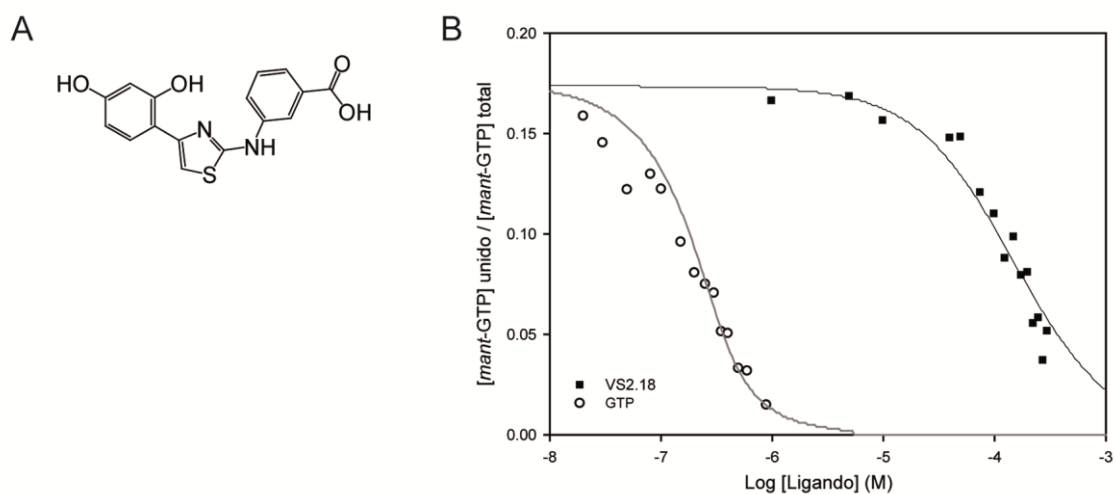
**Figura 19. Inhibición de Bs-FtsZ por PC170942.** A. Estructura química de PC170942. B. Se muestran la curva de desplazamiento de un compuesto de la serie UCM que se discutirá en el siguiente apartado (UCM44) (círculos negros) y que compite con mant-GTP por el sitio de unión del nucleótido de Bs-FtsZ, a modo de comparación con PC170942 (círculos rojos) que no desplazó al ligando fluorescente. C. Inhibición de la polimerización de Bs-FtsZ por PC170942 mediante ensayos de dispersión de luz; en línea roja experimento en presencia del compuesto, las flechas indican el momento de adición de 10 mM de MgCl<sub>2</sub> y 200 μM de GTP, en línea negra el mismo experimento en ausencia del compuesto. Se muestra también un ensayo de sedimentación de polímeros en ausencia de nucleótido (NT) o presencia de 3mM de GTP, 1 mM de GDP o 15 μM de PC170942. D. Inhibición de la actividad GTPasa de Bs-FtsZ inducida por la presencia del compuesto. En E y F se muestran micrografías electrónicas de Bs-FtsZ con GTP en ausencia o presencia de PC170942 respectivamente. G. Morfología de células de *B. subtilis* 168 observadas por microscopía de contraste de fases. H. Filamentación las mismas células cuando se incubaron con el compuesto durante 3 horas.

Otro compuesto probado fue el PC170942 (Figura 19A), que había sido descrito previamente como un inhibidor de la división bacteriana cuyas mutaciones de resistencia mapean alrededor del sitio de unión de GTP en FtsZ (Stokes et al., 2005). Sin embargo, ensayos de competición del compuesto con *mant*-GTP (Figura 19B) y <sup>3</sup>H-GTP indicaron que este

compuesto tampoco desplazaba el nucleótido de Bs-FtsZ incluso a su límite de solubilidad (15  $\mu\text{M}$ ). El estudio del efecto de PC170942 (15  $\mu\text{M}$ ) sobre el ensamblaje de Bs-FtsZ (10  $\mu\text{M}$ ) se realizó mediante ensayos de sedimentación, dispersión de luz y microscopía electrónica de los polímeros de FtsZ formados en presencia del compuesto. PC170942 reduce significativamente los polímeros de FtsZ formados respecto al control en presencia de GTP (200  $\mu\text{M}$ ) (**Figura 19C**) y dicho efecto se comprobó por microscopía electrónica donde se observó que la presencia del compuesto impide la formación de los manojos de proteína característicos en estas condiciones (**Figura 19E-F**). El efecto inhibitorio de la velocidad de hidrólisis del GTP de Bs-FtsZ (10  $\mu\text{M}$ ) en presencia del ligando (inhibición del 50% de la actividad GTPasa) respecto a un control sin compuesto (**Figura 19D**), está ligado a la inhibición de la polimerización de la proteína. Adicionalmente comprobamos cómo PC170942 (20  $\mu\text{M}$ ) inhibe el crecimiento de células de *B.subtilis* 168(MIC=40  $\mu\text{M}$ ) e induce su filamentación(**Figura 19G-H**) como había sido descrito previamente(Stokes et al., 2005). Con estos resultados confirmamos que PC170942 es un inhibidor del ensamblaje de Bs-FtsZ que no se une al sitio del nucleótido de la proteína. Sugerimos que el compuesto debe unirse en un sitio cercano a la interfaz de polimerización de la proteína afectando su ensamblaje y actividad GTPasa, o en un sitio distinto pero cuya unión tenga un efecto alostérico sobre la interfaz.

## 2.2. Compuestos provenientes de un cribado virtual

Con el fin de identificar otros inhibidores de FtsZ se realizó un cribado virtual empleando el método ICM y usando la estructura cristalográfica de Bs-FtsZ (ver Materiales y Métodos). En el cribado se utilizó una biblioteca de  $\sim 4 \cdot 10^6$  compuestos de los que se seleccionaron los 42 compuestos con las mejores puntuaciones de ajuste molecular en el sitio de unión del nucleótido. En este Trabajo se probaron los primeros 26 compuestos(**Anexo 1**)pero desafortunadamente ninguno de ellos se unió al sitio del nucleótido de la proteína en nuestro ensayo de competición con *mant*-GTP. Durante la escritura de este trabajo se ha continuado probando en nuestro laboratorio el segundo conjunto de compuestos y se ha identificado uno de ellos, VS2.18, que se une al sitio del nucleótido con una afinidad aparente  $K_b = (1.1 \pm 0.4) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ ; aunque carece de actividad antibacteriana en *B.subtilis*(MIC > 600  $\mu\text{M}$ ) (**Figura 20**). Actualmente se continúa probando compuestos relacionados y optimizando el métodos de cribado virtual.

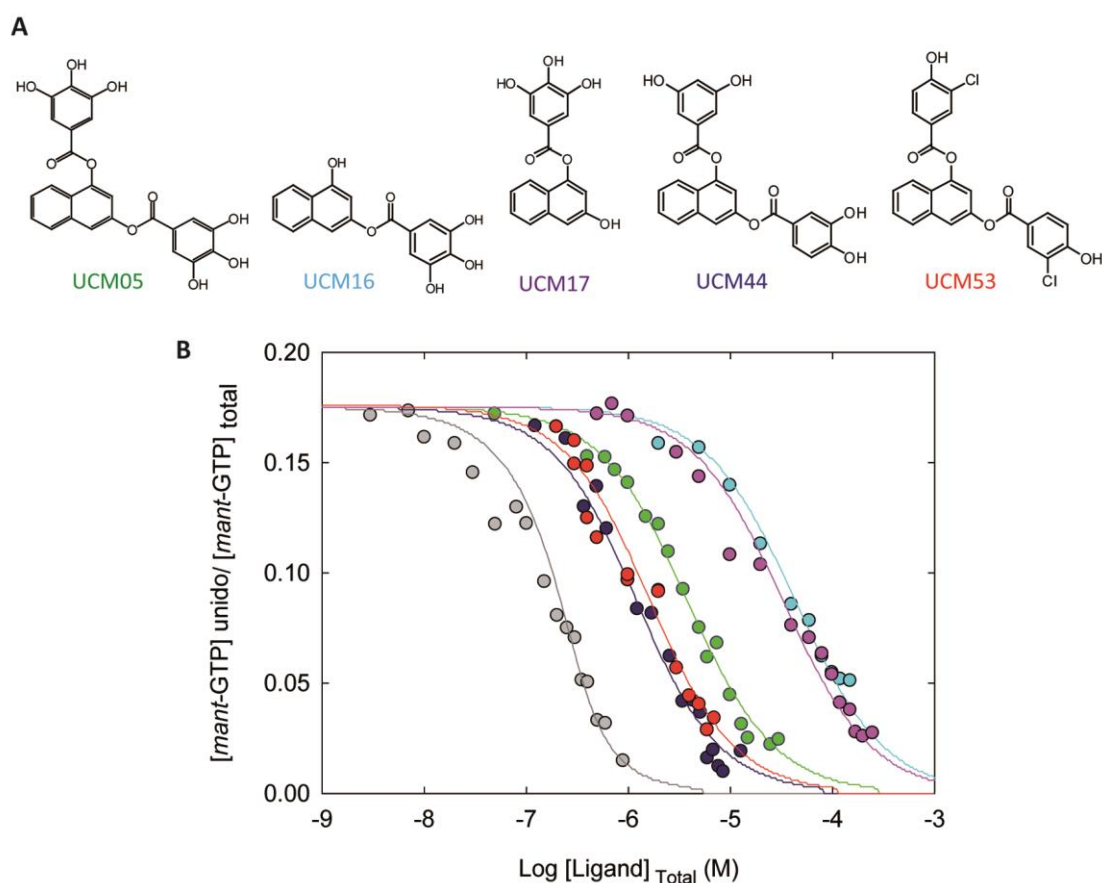


**Figura 20.** El compuesto de cribado virtual VS2.18. se une al sitio de unión del nucleótido deBs-FtsZ. A. Estructura química de VS2.18. B. Curva de competición de VS2.18 con *mant*-GTP por el sitio de GTP ( $K_b = (1.1 \pm 0.4) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ ) (cuadrados negros). A modo de comparación se muestra la curva de desplazamiento del *mant*-GTP por el nucleótido natural ( $K_b = (3.3 \pm 0.8) \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ ) (círculos vacíos). Las curvas corresponden al mejor ajuste de los datos con un método de competición de los ligandos por el sitio de unión (Métodos).

### 2.3. Compuestos que provienen de la biblioteca sintética UCM

Una serie de compuestos provenientes de la biblioteca sintética del laboratorio de Química Médica (Departamento de Química Orgánica I de la Universidad Complutense de Madrid, UCM) se sometieron a un cribado virtual eligiéndose los 18 compuestos con mejor puntuación en un ajuste dirigido para el sitio de unión de GTP en Bs-FtsZ. La principal característica de estos compuestos fue que varios eran polifenoles con un núcleo central formado por una molécula de naftaleno. El compuesto parental es UCM05 (**Figura 21**), que fue descrito previamente como un inhibidor con actividad antitumoral de la enzima ácido graso sintetasa (FASN) que se sobreexpresa en distintos carcinomas (Puig et al., 2009; Turrado et al., 2012), y es activo frente a cáncer de mama en tumores tratados en ratón (Oliveras et al., 2010). UCM05 es un análogo de la epigallocatequina-3-galato (EGCG) (**Figura 22**), la principal catequina polifenólica presente en el té verde. EGCG, además de inhibir FASN, induce la apoptosis de múltiples líneas celulares de tumores (Jatoi et al., 2003). En suero, UCM05 puede hidrolizarse en sus enlaces éster formando dos fragmentos, UCM16 y UCM17; o eventualmente en ambos enlaces originando dos fragmentos pequeños, ácido gálico y 1,3-dihidroxinaftaleno. En este primer estudio se realizó una caracterización bioquímica de estos compuestos y de dos análogos de UCM05 (sintetizados posteriormente), UCM44 (donde se redujo el número de hidroxilos de la molécula) y UCM53 (donde se sustituyeron dos hidroxilos del anterior por cloro) (**Figura 21A**). Previamente a los experimentos, se determinó la

solubilidad de todos ellos (ver materiales y métodos) (Tabla 5) y se determinaron los coeficientes de extinción molar de UCM05 ( $24000 \pm 900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  a 286 nm), UCM44 ( $16300 \pm 800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  a 260 nm) y UCM53 ( $6700 \pm 540 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  a 312 nm).

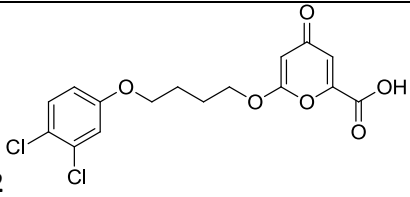
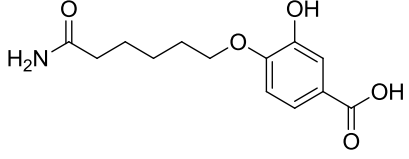
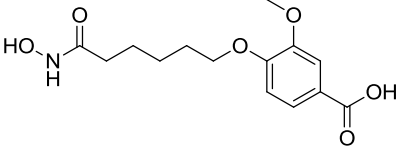
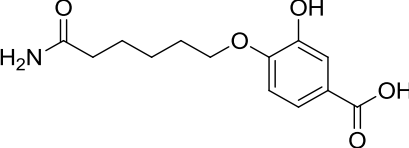
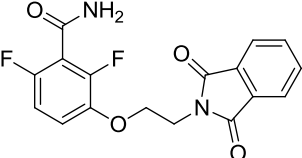
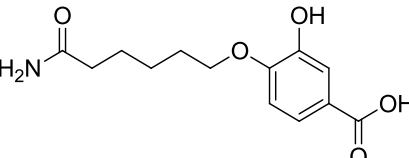
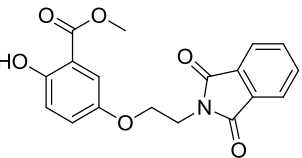
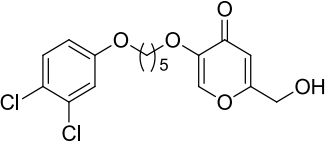
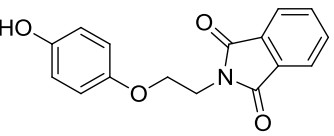
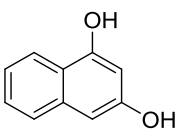
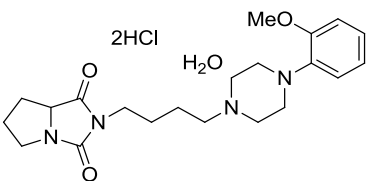
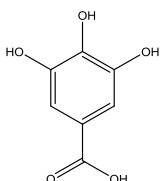
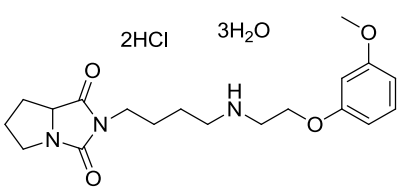
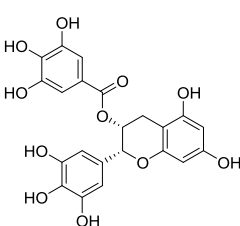


**Figura 21. Compuestos polifenólicos que se unen al sitio de unión del nucleótido de Bs-FtsZ.** A. Estructura química de UCM05, sus fragmentos UCM16 y UCM17, y sus derivados UCM44 y UCM53. B. Curvas de desplazamiento de mant-GTP del sitio de unión de GTP de Bs-FtsZ por los ligandos UCM05 (línea verde), UCM16 (línea azul clara), UCM17 (línea violeta), UCM44 (línea azul oscura), UCM53 (línea roja) y GTP (línea gris).

**Tabla 5. Constantes de afinidad de unión y efecto sobre el ensamblaje de FtsZ y tubulina de los compuestos que se unen al sitio del nucleótido de Bs-FtsZ**

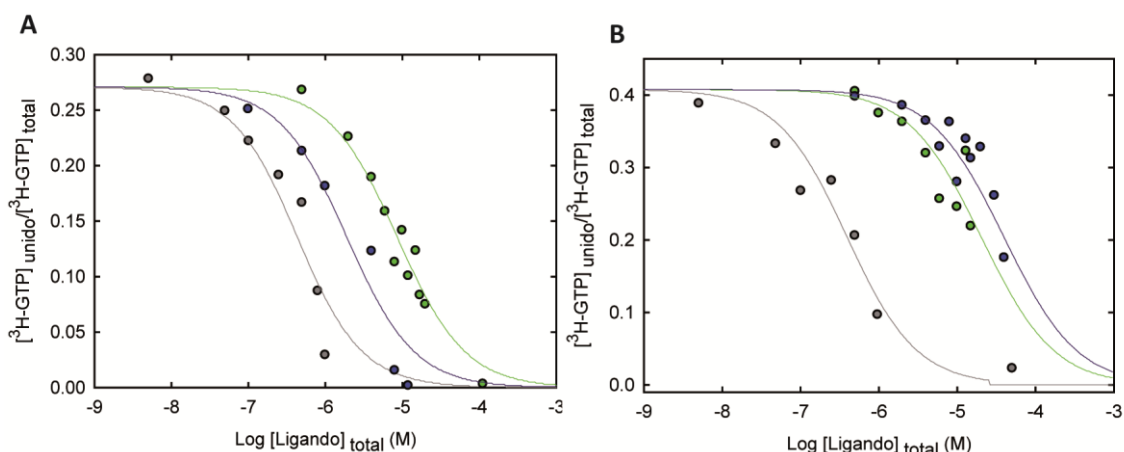
Compuesto	Solubilidad ( $\mu\text{M}$ )	Kb ( $\text{M}^{-1}$ )	$\Delta G^0$ ( $\text{Kcal mol}^{-1}$ )	% inhibición ensamblaje Bs-FtsZ	MIC ( $\mu\text{M}$ ) <i>B.subtilis</i>	% inhibición ensamblaje tubulina
GTP		$(3.3 \pm 0.8) \times 10^7$	$-10.2 \pm 0.1$	-	-	-
UCM05	50	$(4.30 \pm 0.04) \times 10^5$	$-7.70 \pm 0.05$	0	100	80
UCM44	30	$(1.5 \pm 0.3) \times 10^6$	$-8.4 \pm 0.1$	27	25	19
UCM53	10	$(1.3 \pm 0.2) \times 10^6$	$-8.30 \pm 0.01$	19	13	88
UCM16	$\geq 120$	$(3.0 \pm 0.9) \times 10^4$	$-6.1 \pm 0.2$	0	200	0
UCM17	$\geq 120$	$(3.9 \pm 1.3) \times 10^4$	$-6.2 \pm 0.2$	0	>250	0
EGCG	$\geq 140$	$(8.9 \pm 2.5) \times 10^3$	$-10.2 \pm 0.1$	12	>500	0
Ácido Gálico	200	-	-	13	>200	0
1,3-DHN	$\geq 400$	-	-	15	>200	0

Ensayos con los compuestos que se unen al sitio de nucleótido de Bs-FtsZ, sus fragmentos y el compuesto parental de donde provienen. Se indica para cada compuesto su solubilidad en tampón Hepes pH 6.8, su constante de afinidad (Kb), cambio de energía libre de unión  $\Delta G^0$ , así como su efecto en la inhibición del ensamblaje de Bs-FtsZ y tubulina, y la inhibición del crecimiento de células de *B.subtilis* 168.

<p><b>UCM02</b></p> 	<p><b>UCM14</b></p> 
<p><b>UCM03</b></p> 	<p><b>UCM15</b></p> 
<p><b>UCM08</b></p> 	<p><b>UCM19</b></p> 
<p><b>UCM09</b></p> 	<p><b>UCM20</b></p> 
<p><b>UCM10</b></p> 	<p><b>1,3 DIHIDROXINAFTALENO</b></p> 
<p><b>UCM11</b></p> 	<p><b>ÁCIDO GÁLICO</b></p> 
<p><b>UCM12</b></p> 	<p><b>EGCG</b></p> 

**Figura 22. Compuestos de la biblioteca sintética.** Estructura química de algunos de los compuestos sintéticos elegidos de la biblioteca interna del laboratorio UCM que no se muestran en la figura 21 o han dado resultado negativo. Se muestra también la estructura química del compuesto EGCG, el 1,3 dihidroxinaftaleno y el ácido gálico obtenidos comercialmente.

UCM05, sus fragmentos UCM16, UCM17 y sus análogos UCM44 y UCM53 se unen al sitio del nucleótido de Bs-FtsZ como mostró el ensayo de competición demant-GTP (**Figura 21B**). Esto además fue comprobado con ensayos de desplazamiento de  $^3\text{H}$ -GTP donde se obtuvieron valores de constantes de afinidad similares para UCM05 y UCM44 (**Figura 23**). El compuesto natural EGCG se une débilmente al sitio del nucleótido en nuestro ensayo mientras que UCM05 se une con una afinidad aparente,  $K_b = (4.30 \pm 0.04) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ . Los principales fragmentos de UCM05, UCM16 y UCM 17 retuvieron parte de la afinidad del ligando parental ( $K_b = (3.0 \pm 0.9) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  y  $3.9 \pm 1.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  respectivamente), mientras que los más pequeños, el ácido gálico y el 1,3-dihidroxinaftaleno, no se unen al sitio del nucleótido. Por otro lado, los compuestos modificados UCM44 y UCM53 presentan una afinidad que se ve incrementada hasta 3.5 veces respecto al UCM05 ( $K_{b\text{UCM44}} = (1.5 \pm 0.3) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$  y  $K_{b\text{UCM53}} = 1.3 \pm 0.2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ ), aunque sus afinidades de unión siguen siendo 20 veces menor que la del GTP ( $K_{b\text{GTP}} = (3.1 \pm 0.5) \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ ) (**Tabla 5**).



**Figura 23. UCM05 (verde) y UCM44 (azul) desplazan al  $^3\text{H}$ -GTP del sitio de unión del nucleótido de Bs-FtsZ y Mj-FtsZ.** A. Experimento con Bs-FtsZ donde las líneas corresponden al mejor valor de constante de afinidad ( $K_b$ ) de los competidores: UCM05,  $K_b = 2.3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$  y UCM44,  $K_b = 1.1 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ . En gris se muestra el desplazamiento con GTP ( $K_b = 5.1 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ ). B. Experimento semejante realizado en Mj-FtsZ que dio valores de constantes de afinidad para cada competidor de: UCM05,  $K_b \sim 1.9 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ ; UCM44,  $K_b \sim 1.0 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$  y GTP,  $K_b = 1.1 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ .

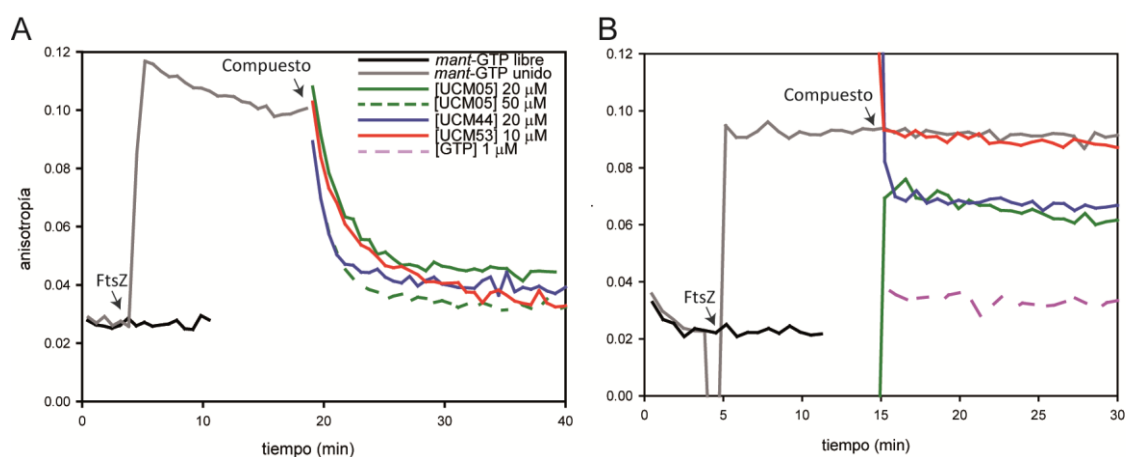
## 2.4. Caracterización preliminar de la cinética de unión de los compuestos UCM al sitio del nucleótido de Bs-FtsZ

Las constantes de afinidad de los ligandos UCM al sitio del nucleótido de apoMj-FtsZ no pudieron ser determinadas mediante el método de desplazamiento de *mant*-GTP al no detectarse una disminución en la anisotropía del ligando fluorescente durante el experimento en presencia de los compuestos. Para buscar las posibles causas de este resultado no esperado, se procedió a comparar la cinética de unión de los compuestos al sitio del nucleótido de Bs-FtsZ y Mj-FtsZ.

La velocidad de unión de UCM05, UCM44 y UCM53 al sitio de GTP en FtsZ se pudo estimar indirectamente en cursos de tiempo de anisotropía del *mant*-GTP (**Figura 24**). Se sabe que la disociación del *mant*-GTP del sitio de nucleótido es rápida (Huecas et al., 2008). En los ensayos se registró la anisotropía en tres condiciones distintas: (i) anisotropía de la molécula fluorescente libre en solución ( $r_{\text{mant-GTP libre}} = 0.025 \pm 0.002$ ), (ii) anisotropía del *mant*-GTP en presencia de la proteína ( $r_{\text{mant-GTP unida}} = 0.098 \pm 0.02$  o  $0.097 \pm 0.013$  para Bs-FtsZ y Mj-FtsZ respectivamente) y por último (iii) anisotropía causada por el desplazamiento del *mant*-GTP del sitio del nucleótido en presencia de los compuestos. Esta última condición mostró diferencias claras en la unión del ligando a ambas proteínas. Ya desde la puesta a punto de los ensayos de competición de *mant*-GTP con Bs-FtsZ se detectó una disminución de la anisotropía del control con proteína en el tiempo independientemente del tampón y del pH (6.5 – 7.5) que se usara, lo que indicó una inestabilidad del complejo *mant*-GTP – Bs-FtsZ (**Figura 24A**). El caso del complejo *mant*-GTP-Mj-FtsZ fue claramente diferente y la anisotropía del fluoróforo unido a la proteína permaneció estable más de 6 horas.

La competición de los compuestos con *mant*-GTP por el sitio del nucleótido (situación iii) ocurrió a tiempos relativamente cortos en los experimentos con Bs-FtsZ, siendo todos los ligandos capaces de desplazar el fluoróforo del sitio de unión del GTP, con constantes de velocidad aparente de  $0.42 \pm 0.01 \text{ min}^{-1}$  (UCM05 a  $20 \mu\text{M}$ ),  $0.65 \pm 0.04 \text{ min}^{-1}$  (UCM44 a  $20 \mu\text{M}$ ) y  $0.24 \pm 0.01 \text{ min}^{-1}$  (UCM53 a  $10 \mu\text{M}$ ) (**Figura 24**). Por el contrario, los ligandos no desplazaron al *mant*-GTP unido a Mj-FtsZ durante el experimento. No se registró variación de la anisotropía tras añadir UCM53, o sólo una ligera bajada (~28 %) al añadir UCM05 y UCM44. GTP ( $1 \mu\text{M}$ ) desplazó el ligando fluorescente del sitio de unión del nucleótido de Mj-FtsZ lo que validó el experimento.

Estos resultados nos sirven para mostrar la diferencia en la cinética de unión de los compuestos a FtsZ de ambas especies. Como posibles hipótesis se podría decir que bien, (i) la unión de los ligandos a Mj-FtsZ sigue una cinética de unión lenta en cuyo caso será necesario comprobar la unión a tiempos más largos; o (ii) que podría haber una interacción de los compuestos con el mant-GTP o la proteína, que impide la disociación del ligando fluorescente pero no del GTP (**Figura 24B**). En cualquier caso se trata de un problema técnico con FtsZ de la arqueobacteria que es poco relevante para conocer el efecto de los compuestos sobre la actividad de FtsZ de las especies bacterianas.



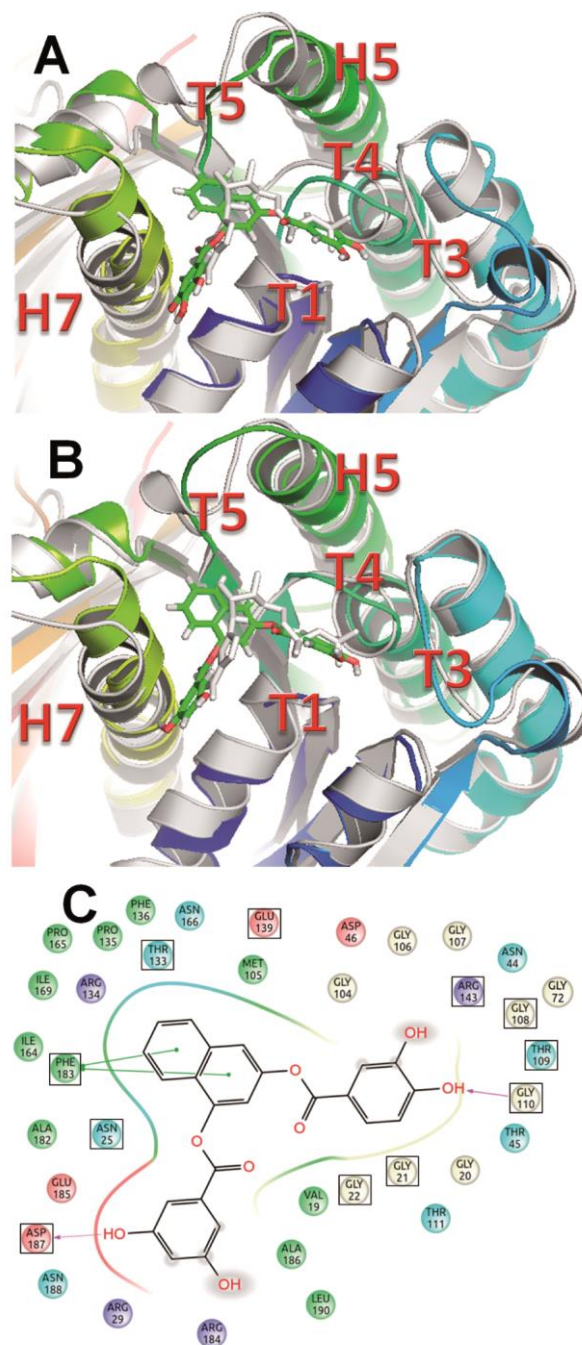
**Figura 24. Cinética de asociación de los compuestos UCM al sitio de unión del nucleótido de Bs-FtsZ (A) y Mj-FtsZ (B).** Se muestra en línea negra la anisotropía de mant-GTP libre, en gris la anisotropía de mant-GTP unido a FtsZ, y en color la anisotropía del complejo al añadir los compuestos que se unen al sitio de unión de GTP. Las concentraciones de los compuestos añadidas fueron 20  $\mu\text{M}$  y 50  $\mu\text{M}$  de UCM05 (línea verde y verde punteada respectivamente, el último caso sólo en Bs-FtsZ), 20  $\mu\text{M}$  de UCM44 (línea azul), 10  $\mu\text{M}$  de UCM53 (roja) y 1 mM de GTP (en violeta como control en Mj-FtsZ). Los compuestos se unieron con constantes de velocidad diferentes en ambas proteínas.

## 2.5. Modelos estructurales de los complejos de Bs-FtsZ con los inhibidores UCM05 y UCM44

En colaboración con el grupo de Bioinformática Estructural del Instituto de Química-Física Rocasolano CSIC (laboratorio del Dr. Pablo Chacón) se realizó el análisis computacional de los modos de unión de los inhibidores a FtsZ mediante ajuste molecular y simulaciones de dinámica molecular, empleando la estructura cristalográfica de Bs-FtsZ a 1.7 Å de resolución y cuya validación se explica en Materiales y Métodos. En primer lugar se caracterizó el sitio de unión del nucleótido y la estructura de la proteína unida a GDP mediante simulaciones de dinámica molecular. El sitio del nucleótido se mostró bastante flexible y el GDP osciló alrededor de 1 Å de media, dándose los mayores movimientos en el bucle T3 y el extremo N-terminal de la hélice H7 (**Anexo 2A**). Independientemente de la flexibilidad del sitio, se pudieron registrar simulaciones estables durante 100 ns.

La dinámica del complejo Bs-FtsZ-GDP fue descrita previamente (Schaffner-Barbero et al., 2010) donde se indicó cómo el anillo de guanina del GDP se aloja entre las hélices H7 (Phe183) y H1, mientras que sus fosfatos interactúan con los bucles T4 y T1 (ricos en glicina); además se mostró la importancia de las interacciones establecidas entre el anillo de ribosa del nucleótido y el bucle T5 con la Phe183. Teniendo claras las interacciones entre el nucleótido natural y su bolsillo de unión, y para incluir la flexibilidad del receptor en el ajuste de los ligandos, se procedió a caracterizar el sitio de unión mediante ajuste molecular. Para el ajuste se usó el protocolo ICM 4D que buscó múltiples conformaciones del receptor (7 conformeros distintos) y de esta forma se ampliaron las configuraciones en las que se llevó a cabo el ajuste con los ligandos. Una vez preparado correctamente el receptor se llevó a cabo el ajuste molecular con los ligandos (UCM05 y UCM44) y los mejores resultados se sometieron a simulaciones de dinámica molecular para confirmar la estabilidad del ligando en el sitio del nucleótido. Este último abordaje indicó que los ligandos fluctuaban en el sitio del nucleótido al igual que el GDP (**Anexo 2B-E**) y se identificaron dos posibles modos de unión de los ligandos a FtsZ.

En la **Figura 25A y 25B** se representa uno de los modos de unión (pose 1) a Bs-FtsZ de UCM05 y UCM44, respectivamente. Durante las simulaciones de dinámica molecular se observó como el anillo de naftaleno de los ligandos se une entre las hélices H7 y H5 y el bucle T5 en el bolsillo hidrofóbico del receptor. El brazo 1-poli-hidroxibenzoil de los ligandos hace contacto con la hélice H7 y el otro extremo (3-poli-hidroxibenzoil) interactúa con el bucle T4 y T1. En el segundo modo de unión (pose 2), el naftaleno se localizaría en una región más profunda de la proteína y de forma opuesta a su sustituyente 1-poli-hidroxibenzoil que estaría hacia el exterior interactuando con los bucles T1, T4 y T5 (**Anexo 3**). La **Figura 25C** es una representación 2D obtenida a partir de las simulaciones de dinámica molecular que muestra las interacciones entre los aminoácidos de UCM44 y el bolsillo de unión (pose 1). Ambos modos de unión de los ligandos al sitio del nucleótido de Bs-FtsZ mostraron interacciones que reemplazan a las que establece el GDP. Estos resultados explican por qué los ligandos se pueden comportar como inhibidores, aunque no es posible descartar otros modos de unión de estos compuestos al sitio del nucleótido de FtsZ diferentes a las obtenidas en el modelo.

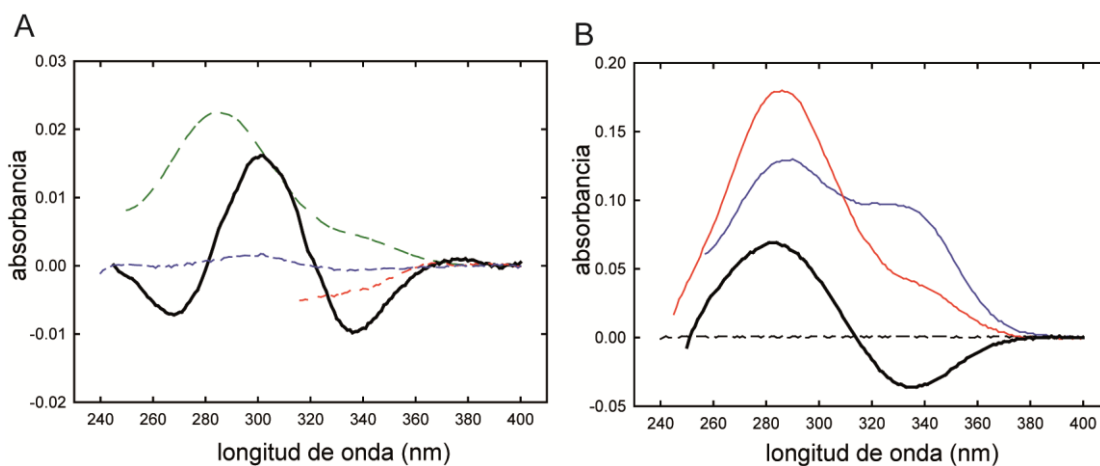


**Figura 25.** Imágenes representativas de dinámica molecular de uno de los modos de unión a Bs-FtsZ de UCM05 (A) y UCM44 (B). En color se observan las interacciones que establecen los ligandos y el receptor; y en gris se superpone la estructuracristalográfica con GDP unido a FtsZ. En C, diagrama de residuos que participan en la interacción de UCM44 con el sitio de unión a nucleótido. Se muestra en distintos colores la naturaleza de los aminoácidos: hidrofóbicos (verde), glicinas (gris), polares (azul claro), cargados positivamente (magenta) y cargados negativamente (rojo). Las flechas magenta representan los puentes de hidrógeno y las líneas verdes corresponden a las interacciones  $\pi$ - $\pi$ . Los átomos sombreados son aquellos expuestos al solvente.

## 2.6. Caracterización bioquímica de los ligandos UCM

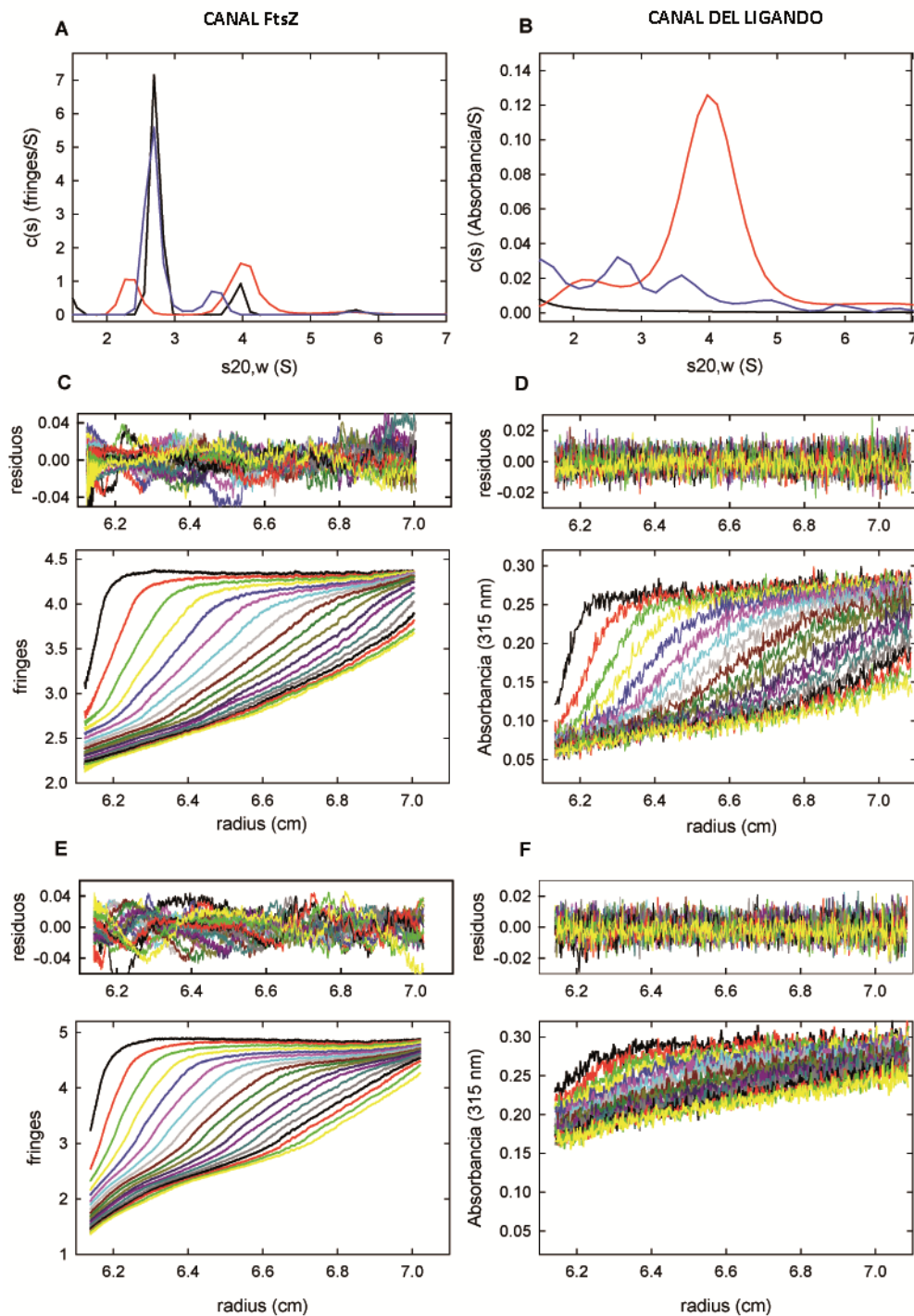
### 2.6.1. Interacción de los compuestos con FtsZ no ensamblada

Para observar directamente la unión de los compuestos con Bs-FtsZ y determinar si era posible desplazar estos ligandos del sitio de unión del nucleótido con GTP se realizaron ensayos de espectroscopía de absorción diferencial y de ultracentrifugación analítica. Mediante espectroscopía de absorción se observó que la adición de la proteína a una solución con UCM05 modifica su espectro de absorción ultravioleta (las bandas de absorción a 286 nm y 336 nm) y dicho efecto se suprime con la adición de GTP (**Figura 26A**). El espectro de absorción diferencial del ligando a distintos pH (pH 6.8 vs. 7.5) (**Figura 26B**) muestra que hay una variación en la banda de absorción a 336 nm semejante a la del compuesto en presencia de proteína, sugiriendo que la unión de UCM05 a Bs-FtsZ se da cuando el compuesto tiene protonados sus anillos fenólicos. Sabiendo que los hidroxilos fenólicos del ligando se ionizan a un pKa 7.2 (Vartanyan y E.M, 1963) y debido a la semejanza de este espectro (336 nm) con el del compuesto en presencia de la proteína (figura26A, línea negra) se puede sugerir que el compuesto se une a Bs-FtsZ preferiblemente en su forma protonada.

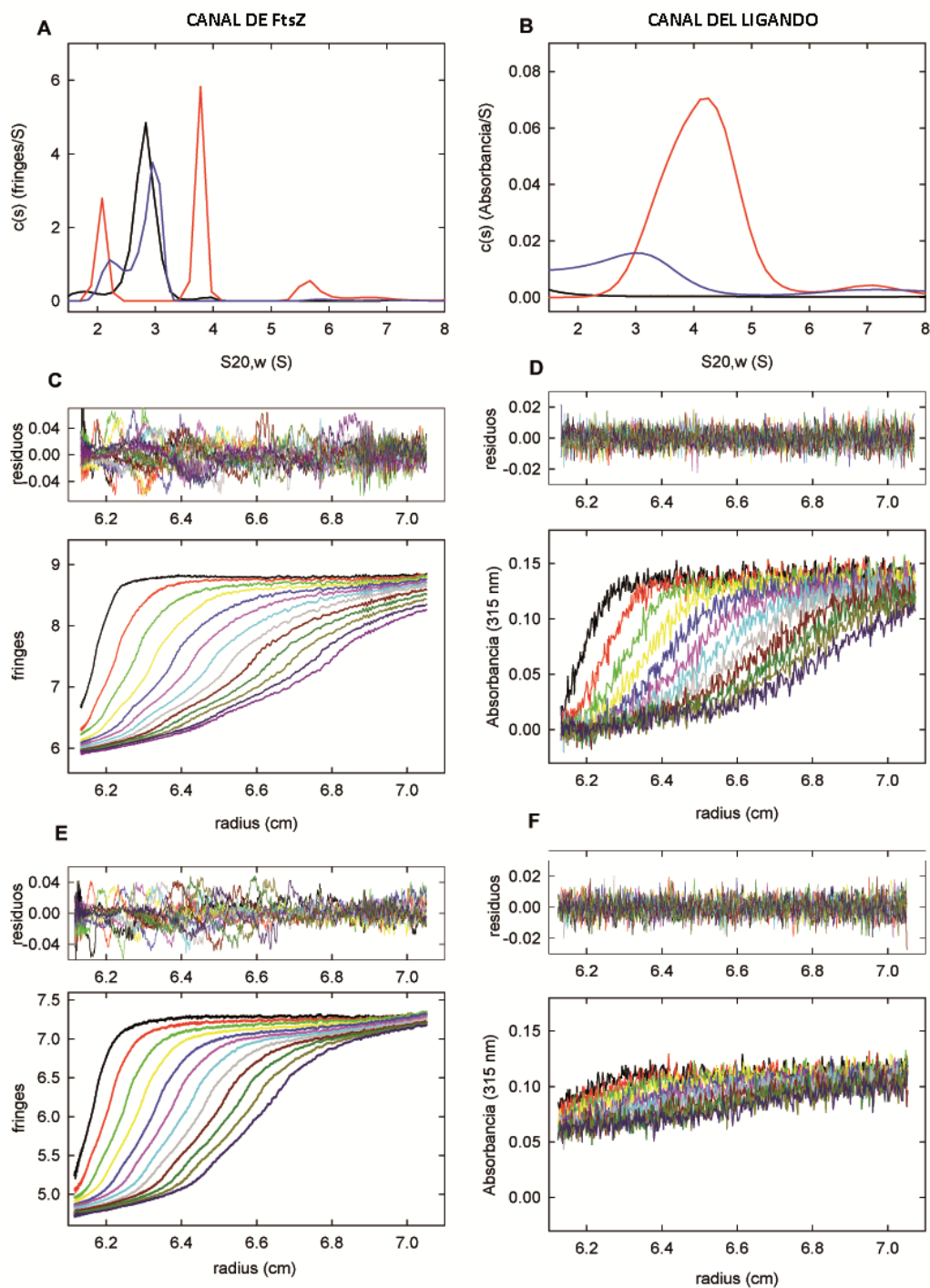


**Figura 26. Evidencia de la unión de UCM05 a Bs-FtsZ mediante espectroscopía de absorción diferencial.** A. Espectro diferencial de absorción generado por la interacción de UCM05 (10  $\mu$ M) y Bs-FtsZ (10  $\mu$ M) en tampón Hepes pH 6.8 a 25°C (línea negra) y en presencia de GTP (10  $\mu$ M) (línea punteada verde). Se muestra en rojo el espectro de absorción del compuesto solo (cuyas unidades de absorbancia han sido reducidas 11.4 veces para realizar la comparación) y en azul la línea base del espectro diferencial de absorción. B. Espectro de absorción de UCM05 (7.5  $\mu$ M) en tampón Hepes pH 6.8 (línea roja) y a pH 7.5 (línea azul). En negro se muestra la diferencia del espectro de absorción de UCM05 a pH 6.8 menos el de pH 7.5. En línea punteada negra se muestra la línea base en el mismo pH.

Experimentos de ultracentrifugación analítica mostraron que Ec-FtsZ a concentraciones bajas de magnesio sedimenta en su forma monomérica, y el magnesio induce la formación de oligómeros lineares (Rivas et al., 2000). En la **Figura 27 y 28** se muestran nuestros ensayos de velocidad de sedimentación donde se observa que Bs-FtsZ también sedimenta preferiblemente en su forma monomérica ( $S_{20,w} = 2.7$  S) y se quiso determinar si la unión de los ligandos a la proteína afectaba a su estado de asociación. Los resultados mostraron la interacción de UCM05 (**Figura 27**) y UCM44 (**Figura 28**) con Bs-FtsZ ya que cosedimentan con la proteína e inducen la formación de dímeros de FtsZ ( $S_{20,w} = 4.0$  S), y este efecto se revierte al añadir GDP. También se observó que los compuestos en ausencia de FtsZ no sedimentan, lo que nos indica que no hay agregación de los compuestos en estas condiciones. A partir del área de los picos del ligando y de la proteína se calculó el número de moléculas de compuesto que cosedimentaban con cada molécula de FtsZ que resultó ser 1.6 para UCM05 y 1 para UCM44. Los experimentos de espectroscopía de absorción diferencial y ultracentrifugación analítica demuestran que ambos ligandos se unen reemplazando el nucleótido de Bs-FtsZ.



**Figura 27. Unión de UCM05 a Bs-FtsZ mediante experimentos de ultracentrifugación analítica.** Todos los experimentos se realizaron en tampón Hepes pH 6.8 a 25°C. *A*, distribución de los coeficientes de sedimentación de la proteína(s) medido con la óptica de interferencia, de muestras con Bs-FtsZ (20  $\mu$ M) y GDP (100  $\mu$ M) (línea negra), UCM05 (40  $\mu$ M) (línea roja) y UCM05 (40  $\mu$ M) con GDP (200  $\mu$ M) (línea azul). *B*, Corresponde a la distribución de los coeficientes de sedimentación del ligando medidas por absorbancia radial a 315 nm de muestras de UCM05 (40  $\mu$ M) (línea negra), en presencia de FtsZ (20  $\mu$ M) (línea roja) o con FtsZ y GDP (línea azul). Las siguientes gráficas corresponden a los datos usados para obtener las distribuciones de los coeficientes de sedimentación (*A* y *B*) mediante el programa SEDFIT y se muestran los residuos del ajuste. En *C*, barridos sucesivos de las interferencias radiales (de cada dos realizados) de la distribución de FtsZ (20  $\mu$ M) en presencia de UCM05 (40  $\mu$ M) durante el experimento de sedimentación; en *D*, barridos de la absorbancia radial a 315 nm que muestra la cosedimentación de UCM05 en el mismo experimento; en *E*, igual que *C* pero añadiendo a la mezcla GDP (200  $\mu$ M) y en *F*, barrido de la absorbancia radial del mismo experimento donde se observa la anulación de la cosedimentación del ligando.



**Figura 28. Unión de UCM44 a Bs-FtsZ mediante experimentos de ultracentrifugación analítica.** Todos los experimentos se realizaron en tampón Hepes pH 6.8 a 25°C. *A*, distribución de los coeficientes de sedimentación de la proteína(s) medido con la óptica de interferencia, de muestras con Bs-FtsZ (20 mM) y GDP (100 mM) (línea negra), UCM44 (20 mM) (línea roja), UCM05 (40  $\mu$ M) y con GDP (200  $\mu$ M) (línea azul). *B*, Corresponde a la distribución de los coeficientes de sedimentación del ligando medidas por absorbancia radial a 315 nm de muestras de UCM44 (20 mM) (línea negra), en presencia de FtsZ (20 mM) (línea roja) o con FtsZ y GDP (línea azul). Las siguientes gráficas corresponden a los datos usados para obtener las distribuciones de los coeficientes de sedimentación mediante el programa SEDFIT (*A* y *B*) y se muestran los residuos del ajuste. En *C*, uno de los barridos sucesivos de las interferencias radiales (de cada dos realizados) de la distribución de FtsZ (20 mM) en presencia de UCM44 (20 mM) durante el experimento de sedimentación; en *D*, barridos de la absorbancia radial a 315 nm que muestra la cosedimentación de UCM44 en el mismo experimento; en *E*, igual que *C* pero añadiendo a la mezcla GDP (200 mM) y en *F*, barrido de la absorbancia radial del mismo experimento donde se observa la anulación de la cosedimentación del ligando.

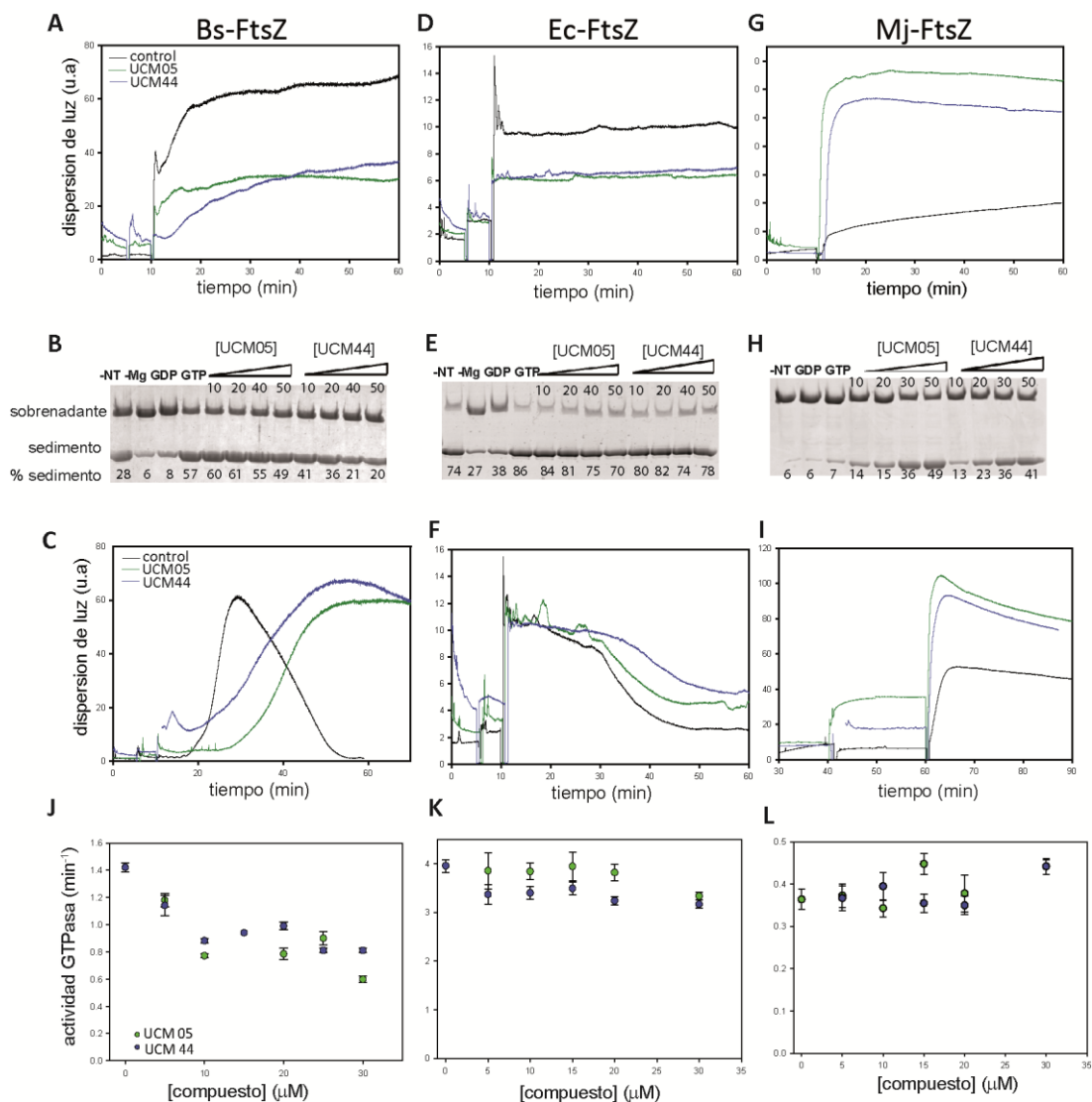
### 2.6.2. Modulación del ensamblaje de FtsZ por UCM05 y UCM44

Los ligandos UCM05 y UCM44 son capaces de reemplazar el nucleótido de FtsZ. Nuestros siguientes objetivos fueron conocer el efecto de los compuestos sobre el ensamblaje de FtsZ de dos especies bacterianas, *B.subtilis* (Gram-positiva) y *E.coli* (Gram-negativa), y de una arqueobacteria termófila (*M.jannaschii*); y buscar compuestos que inhiban selectivamente FtsZ sin afectar el ensamblaje de su proteína homóloga (tubulina), como en el caso de los análogos de GTP sustituidos en el carbono 8 (Lappchen et al., 2008).

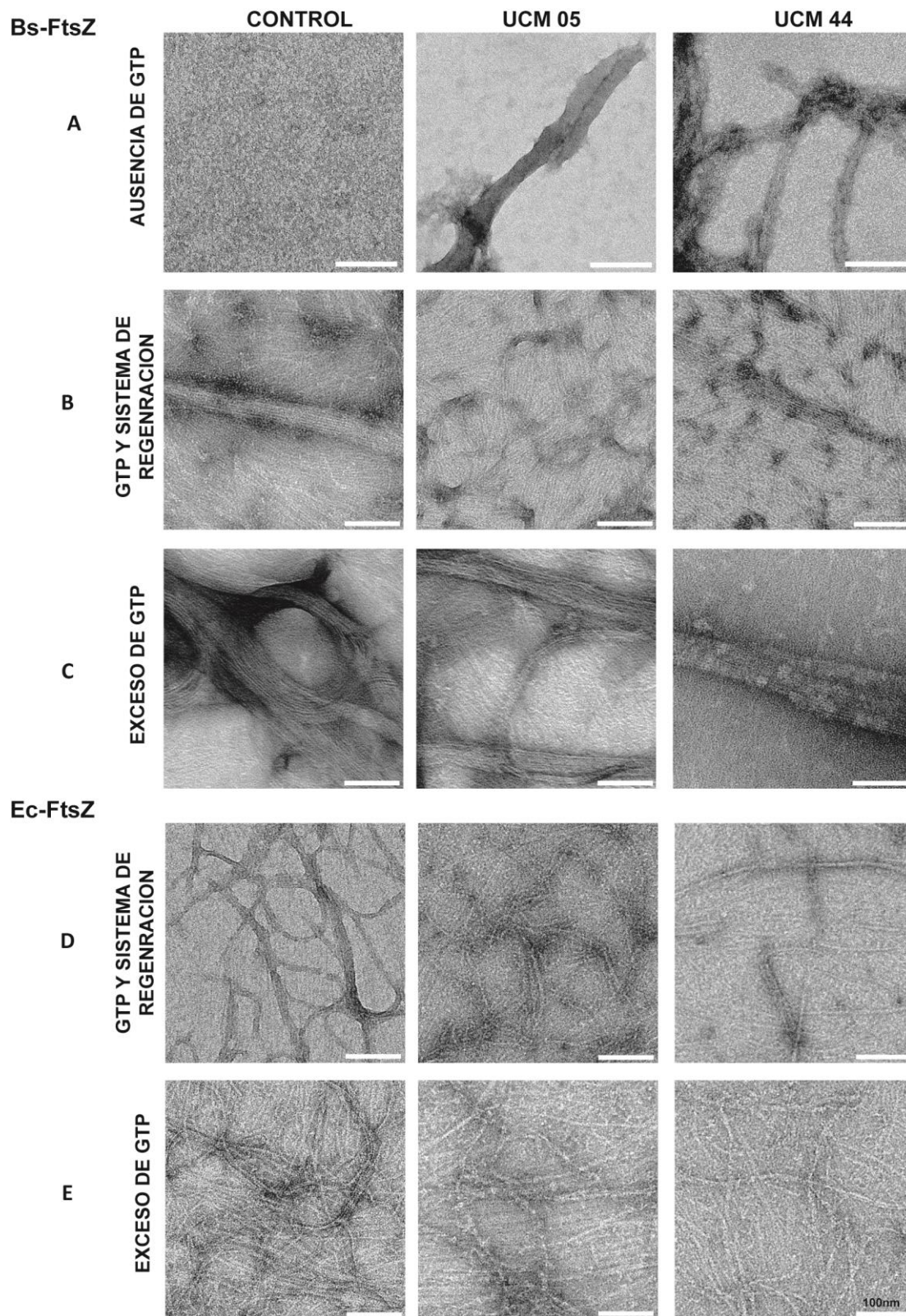
#### ➤ Modulación del ensamblaje de FtsZ de *B.subtilis* y *E.coli*

El análisis del efecto de los ligandos sobre el ensamblaje de Bs-FtsZ y Ec-FtsZ se llevó a cabo mediante experimentos de dispersión de luz, sedimentación y microscopía electrónica de los polímeros de FtsZ formados en presencia de los compuestos y además se determinaron posibles alteraciones de la actividad GTPasa de la proteína. En estos ensayos se usaron dos condiciones distintas: (i) se usó un sistema de regeneración de GTP (SR) que permitió usar concentraciones bajas y constantes de GTP (proporción GTP/GDP alta) para dar ventaja a los ligandos, y (ii) se realizaron los mismos experimentos pero con exceso de GTP y sin SR para evaluar el efecto de los compuestos sobre el desensamblaje de la proteína (por el agotamiento de GTP). En los experimentos, se usaron muestras de Bs-FtsZ (10  $\mu$ M) y Ec-FtsZ (12  $\mu$ M) en tampón Hepes pH 6.8 (2% de DMSO) (salvo que se indique lo contrario), a 25 y 30°C para Bs-FtsZ y Ec-FtsZ respectivamente.

Los resultados de los ensayos se muestran en la **Figura 29** y la microscopía electrónica en la **Figura 30**. En presencia de GTP (50 o 60  $\mu$ M para Bs-FtsZ y Ec-FtsZ, respectivamente) y SR, UCM05 y UCM44 (a 20  $\mu$ M ambos) disminuyen considerablemente la dispersión de luz y la sedimentación de los polímeros formados, respecto al control en ausencia de compuesto (**Figura 29A-B y tabla 5**). Mediante experimentos de microscopía electrónica se visualizó una reducción en la formación de los manojos característicos de Bs-FtsZ o el número de filamentos de Ec-FtsZ en estas condiciones (**Figura 30B y D**). En Bs-FtsZ el mismo experimento pero con exceso de GTP (1 mM) mostró que los compuestos reducen la velocidad de polimerización y despolimerización de la proteína en comparación con el control en ausencia de compuestos y que en ausencia de nucleótido (con 10 mM de magnesio) hay un pequeño incremento en la dispersión de luz (**Figura 29C**).



**Figura 29. Efecto de UCM05 y UCM44 en el ensamblaje y la actividad GTPasa de Bs-FtsZ, Ec-FtsZ y Mj-FtsZ.** Se muestran los experimentos de dispersión de luz de Bs-FtsZ (A), Ec-FtsZ (D) y Mj-FtsZ (G) con GTP y SR en presencia de UCM05 y UCM44 (líneas verde y azul respectivamente). En línea negra, un control en ausencia de compuesto. B, E y H corresponden a los experimentos de sedimentación de polímeros de Bs-FtsZ, Ec-FtsZ y Mj-FtsZ en las mismas condiciones pero con concentraciones crecientes de UCM05 y UCM44, se muestra porcentaje de polímeros sedimentados debajo de cada carril de los geles. Controles en ausencia de nucleótido y magnesio o presencia de 1mM GDP y GTP con SR se realizaron en el mismo experimento. El mismo experimento de dispersión de luz que en A, D y G pero en presencia de 1 mM de GTP para Bs-FtsZ (C), Ec-FtsZ (F) y Mj-FtsZ (I). En la parte inferior se muestran los ensayos de determinación de la actividad GTPasa de Bs-FtsZ (J), Ec-FtsZ (K) y Mj-FtsZ (L) variando la concentración de los compuestos.



**Figura 30.** Imágenes representativas de microscopía electrónica que muestran el efecto de UCM05 y UCM44 en el ensamblaje de Bs-FtsZ y Ec-FtsZ. Se muestran en la figura las condiciones experimentales en las que fueron realizados los ensayos: ausencia de nucleótido (A), presencia de nucleótido y sistema de regeneración de GTP (B y D) y en exceso de GTP (C y E).

Para observar si los compuestos inducen la formación de polímeros de Bs-FtsZ diferentes de los que se observan con GTP, se visualizaron muestras por tinción negativa de los experimentos donde se añadió un exceso de GTP y en aquellos donde no se añadió el nucleótido. En el primer caso no se observaron diferencias significativas respecto al control y en ambas muestras se observaron abundantes manojos de proteína (**Figura 30C**). En ausencia del nucleótido se visualizaron polímeros desordenados y agregados de la proteína muy diferente a los manojos característicos de Bs-FtsZ formados en presencia de GTP (**Figura 30A**).

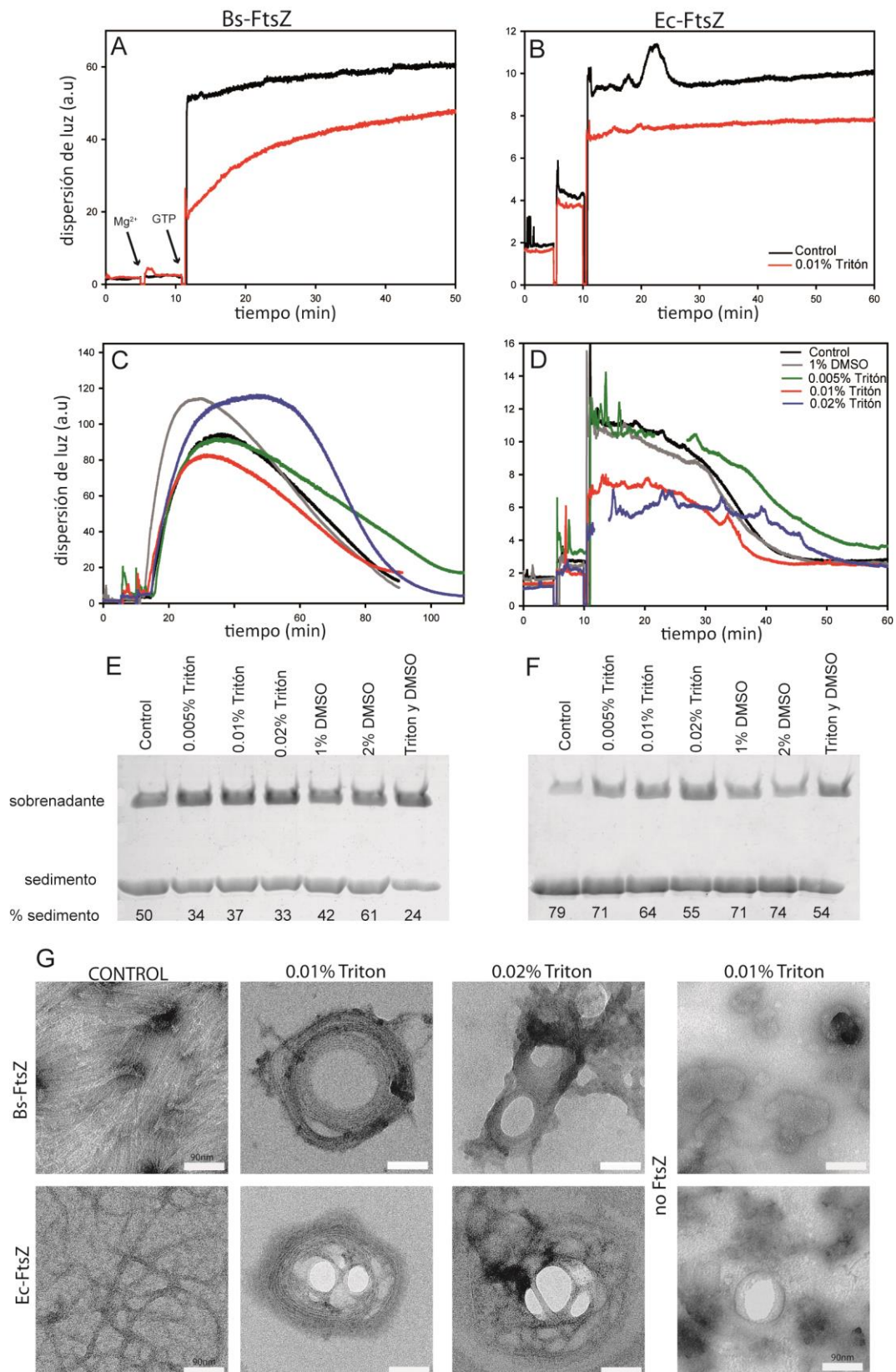
La determinación de la actividad GTPasa en muestras de (100  $\mu$ L) de Bs-FtsZ (9  $\mu$ M) o Ec-FtsZ (12  $\mu$ M) en presencia de distintas concentraciones de los compuestos no reveló resultados concluyentes. En el caso de Bs-FtsZ (**Figura 29J**) los compuestos reducen un 50% la actividad GTPasa de la proteína mientras que en Ec-FtsZ los compuestos no reducen significativamente la velocidad de hidrólisis de GTP respecto al control en presencia de los compuestos (menos del 20%) (**Figura 29K**). Como control del experimento, se determinó previamente por HPLC, que UCM05 no era hidrolizado por la proteína Bs-FtsZ.

Los resultados obtenidos sugieren que estos ligandos actúan como inhibidores del ensamblaje de Bs-FtsZ, disminuyendo las velocidades de ensamblaje y desensamblaje con exceso de GTP e induciendo la formación de polímeros desordenados de proteína en ausencia del nucleótido. Como se observó en los experimentos de ultracentrifugación analítica, los ligandos reemplazan al GTP en Bs-FtsZ e inducen la dimerización de la proteína, lo que sugiere que este podría ser el primer paso para la inhibición de FtsZ por los compuestos. En el caso de Ec-FtsZ solo se puede concluir que los ligandos ejercen un efecto inhibitor débil sobre el ensamblaje de la proteína.

➤ Efecto del Tritón X-100 sobre la polimerización de FtsZ

Recientemente se ha indicado que algunas moléculas que habían sido descritas como inhibidores de FtsZ (por ejemplo algunos compuestos fenólicos), realmente son inhibidores promiscuos que inducen la formación de coloides microscópicos o agregados (Anderson et al., 2012). En dicho trabajo se ha utilizado el detergente neutro, Tritón X-100 (0.01% v/v, muy cercano a la concentración crítica para la formación de micelas  $CMC \approx 0.02\%$  v/v) para evitar posibles agregados de los compuestos. Debido a esto, nos interesó estudiar el efecto de este detergente neutro sobre el ensamblaje de FtsZ de *B.subtilis* y *E.coli* y saber si era posible usarlo en nuestros experimentos para controlar la posible agregación de los ligandos en nuestro estudio.

Para determinar el efecto del Tritón X-100 sobre el ensamblaje de Bs-FtsZ (10  $\mu$ M) y Ec-FtsZ (12  $\mu$ M) se llevaron a cabo experimentos de dispersión de luz, sedimentación y visualización por microscopía electrónica de los polímeros formados por FtsZ. En los experimentos de dispersión de luz y sedimentación de polímeros observamos que Tritón X-100 (0.01 % v/v) inhibe la polimerización de Bs-FtsZ y Ec-FtsZ tanto con GTP y SR como en presencia de 1 mM de GTP (**Figura 31A-F**), siendo este efecto más notorio en presencia de DMSO (1%) (**Figura 31E-F**). Mediante tinción negativa, se visualizó además que el Tritón X-100 (0.01% y 0.02% v/v) induce la formación de condensados micelares de la proteína de ambas especies bacterianas, respecto a las típicas estructuras de manojos o filamentos simples (en Bs-FtsZ y Ec-FtsZ respectivamente) que se forman con GTP en ausencia del detergente (**Figura 31G**). Los resultados obtenidos nos hicieron descartar el Tritón X-100 porque altera el ensamblaje de la proteína. Estos resultados podrían explicarse si tenemos en cuenta que la proteína polimeriza sobre las micelas que forma el detergente ya que se sabe que una parte muy importante de las interacciones proteína-proteína de los polímeros de FtsZ ocurre en zonas hidrofóbicas (Huecas and Andreu, 2003; Nogales et al., 1998) y es muy posible que el detergente se una a dichas zonas y como consecuencia inhiba el ensamblaje de FtsZ.



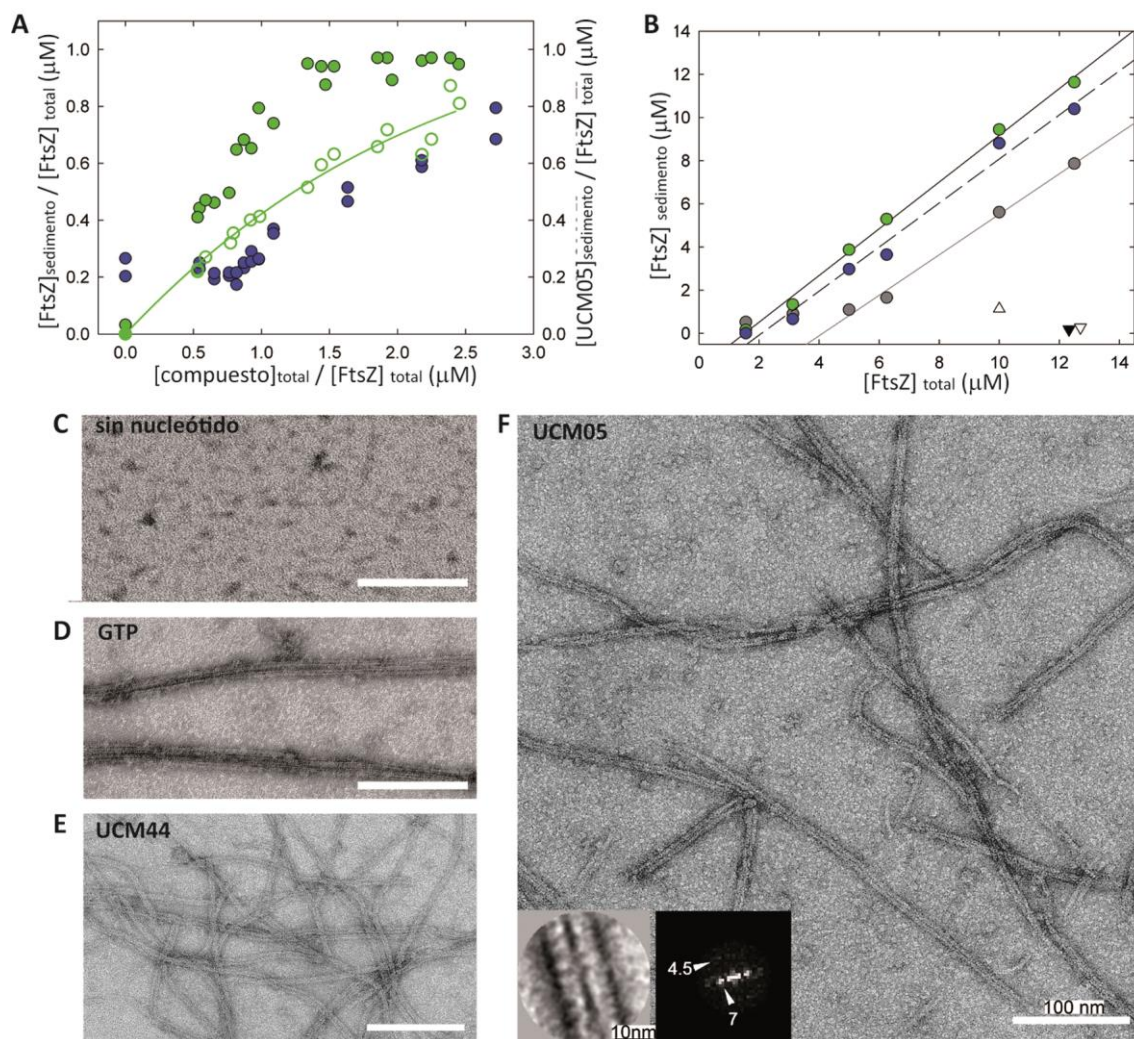
**Figura 31. Efectos del Tritón X-100 en el ensamblaje de Bs-FtsZ (10  $\mu$ M) y Ec-FtsZ (12  $\mu$ M).** Ensayos de dispersión de luz con Bs-FtsZ y Ec-FtsZ en presencia de GTP (50 o 60  $\mu$ M para Bs-FtsZ y Ec-FtsZ respectivamente) y sistema de regeneración de GTP (SR) (A y B) o en ausencia de SR y 1 mM de GTP (C y D). Sedimentación de polímeros de Bs-FtsZ (E) y Ec-FtsZ (F) en presencia de distintas concentraciones de Tritón X-100 o en ausencia del detergente y presencia de 1 mM de GTP (control). Se indica el porcentaje de FtsZ sedimentada debajo de cada carril de los geles. En G, imágenes de microscopía electrónica con tritón X-100 (0.01% o 0.02%) en presencia o ausencia de FtsZ.

➤ Ensamblaje inducido por ligando en FtsZ de *M.jannaschii*

Para conocer el efecto de los compuestos en el ensamblaje de apoMj-FtsZ, se realizaron los mismos experimentos que para la FtsZ de las especies bacterianas. En los ensayos se usaron muestras (50  $\mu$ L) de Mj-FtsZ (9  $\mu$ M) en tampón Mes pH 6.5 a 40°C.

UCM05 y UCM44 (ambos a 40  $\mu$ M), en presencia de GTP (100  $\mu$ M) y SR, aumentan significativamente la dispersión de luz y la sedimentación de los polímeros de FtsZ respecto a los controles sin compuesto (**Figura 29G y H**). Resultados similares se obtuvieron en presencia de 1 mM de GTP (**Figura 29I**) donde llamó la atención el notorio aumento de la dispersión de luz en ausencia de nucleótido (y con 10 mM de  $MgCl_2$ ) respecto al control en ausencia de los compuestos. Se determinó la actividad GTPasa de apoMj-FtsZ (9  $\mu$ M) con distintas concentraciones de los ligandos pero los compuestos no variaron significativamente la velocidad de hidrólisis de GTP en la solución de la proteína (**Figura 29L**). Por microscopía electrónica se visualizaron muestras de apoMj-FtsZ con los ligandos en las dos condiciones usadas para los ensayos de dispersión de luz de polímeros (presencia de GTP y SR o con 1 mM de GTP) no apreciándose cambios en la morfología de los polímeros respecto a los controles en ausencia de compuesto. Estos resultados sugieren que los ligandos podrían ser sustituyentes no hidrolizables de GTP en el ensamblaje de apoMj-FtsZ por lo que se procedió a caracterizarlos más en detalle.

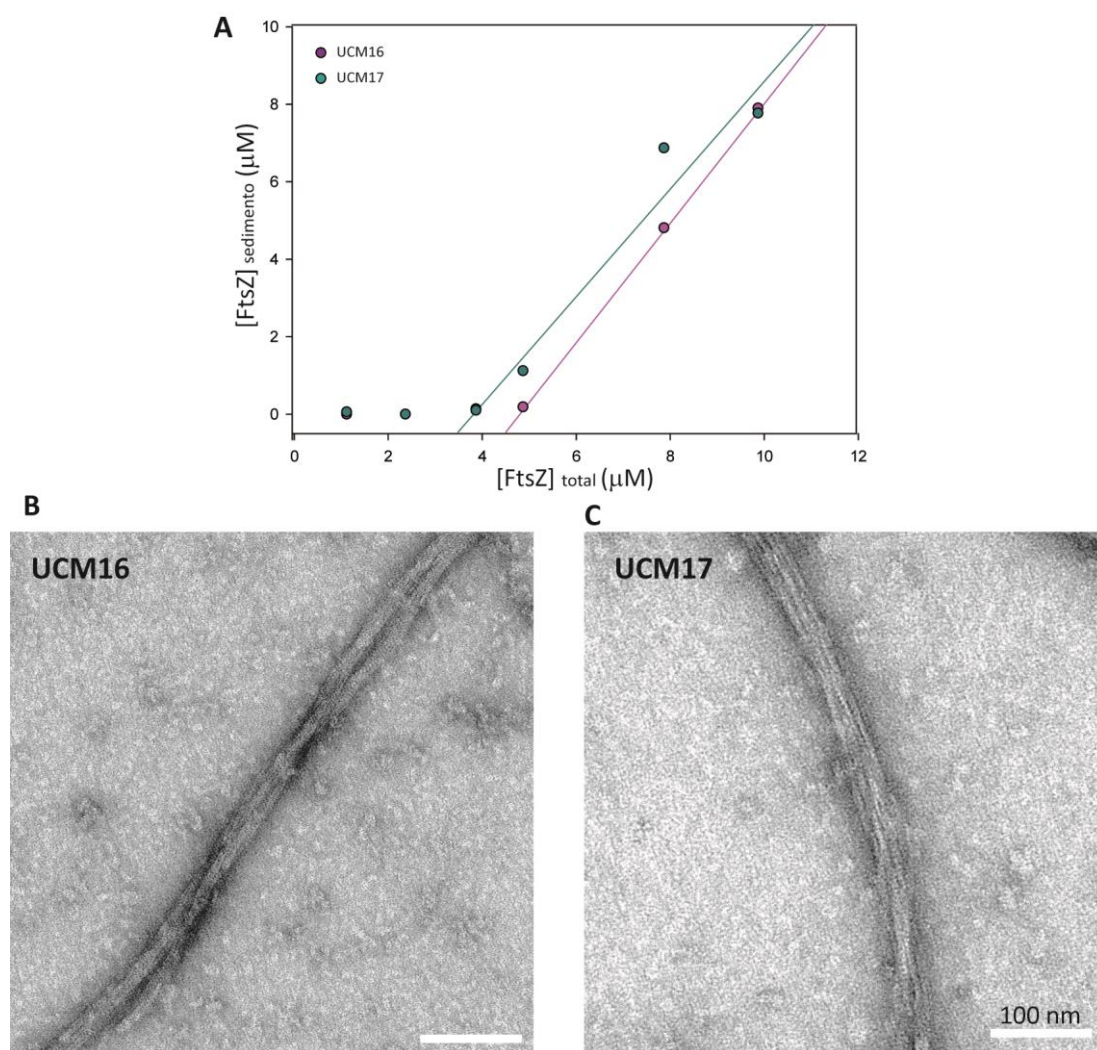
UCM05 y UCM44 inducen el ensamblaje de apoMj-FtsZ en ausencia de nucleótido y con 10 mM de  $MgCl_2$ . Para determinar el tipo de ensamblaje de FtsZ de *M.jannaschii* en presencia de estos compuestos, se tituló la proteína (9  $\mu$ M) con concentraciones crecientes de UCM05 y UCM44 (**Figura 32A**) de forma compatible con la unión de una molécula de UCM05 a una molécula de FtsZ. Debido a que los ligandos inducen la polimerización de apoMj-FtsZ se determinó su concentración crítica (Cr) de ensamblaje, siendo 1.5  $\mu$ M con UCM05 y 2.1  $\mu$ M con UCM44 y los resultados indicaron que el ensamblaje de la proteína en presencia de los compuestos sigue siendo de tipo cooperativa como con el GTP (**Figura 32B**). Ambos ligandos mostraron una polimerización más eficaz que la del nucleótido natural ya que su concentración crítica es menor que la que presenta el control con GTP (Cr = 4.1  $\mu$ M).



**Figura 32. UCM05 y UCM44 inducen el ensamblaje de apoMj-FtsZ.** En A, sedimentación de polímeros de FtsZ en presencia de distintas concentraciones de UCM05 (círculos verde llenos) y UCM44 (círculos azules llenos). En círculos verdes vacíos, se muestra la cosedimentación de UCM05 con FtsZ y la línea verde es el mejor ajuste de una isoterma de unión  $1.4 \pm 0.3$  moléculas de UCM05 por molécula de FtsZ (afinidad aparente de  $(6.9 \pm 2.0) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ ); en B, determinación de la concentración crítica de Mj-FtsZ en presencia de UCM05 (verde), UCM44 (azul) y GTP (gris). Las líneas indican la regresión lineal por mínimos cuadrados. Se muestran controles con 1 mM de GDP (triángulo lleno) y en ausencia de ligando o nucleótido (triángulos invertidos). Debajo, imágenes obtenidas por microscopía electrónica de muestras de apoMj-FtsZ ( $9 \mu\text{M}$ ) en ausencia de nucleótido (C) o presencia de GTP (D), UCM44 (E) y UCM05 (F). La figura F contiene dos imágenes insertas, a la izquierda la imagen promedio de 179 segmentos alineados de los polímeros de FtsZ formados en presencia de UCM05 y a la derecha su difractograma calculado. Con UCM44 los resultados obtenidos fueron similares.

UCM05 y UCM44 inducen la formación de estructuras poliméricas ordenadas de apoMj-FtsZ y se identificaron filamentos, los cuales no se tiene constancia de haber sido observados con anterioridad en ningún otro estudio y difieren de los típicos manojos de filamentos inducidos en presencia de GTP (**Figura 32C-F**). Los filamentos, cuya anchura es de aproximadamente 15 nm, presentan dos bandas claras a lo largo del eje longitudinal con mayor densidad de proteína y una banda oscura (menos densa) en la mitad. Estas características se aprecian mejor en la proyección de la imagen promedio (**inserto en la Figura**

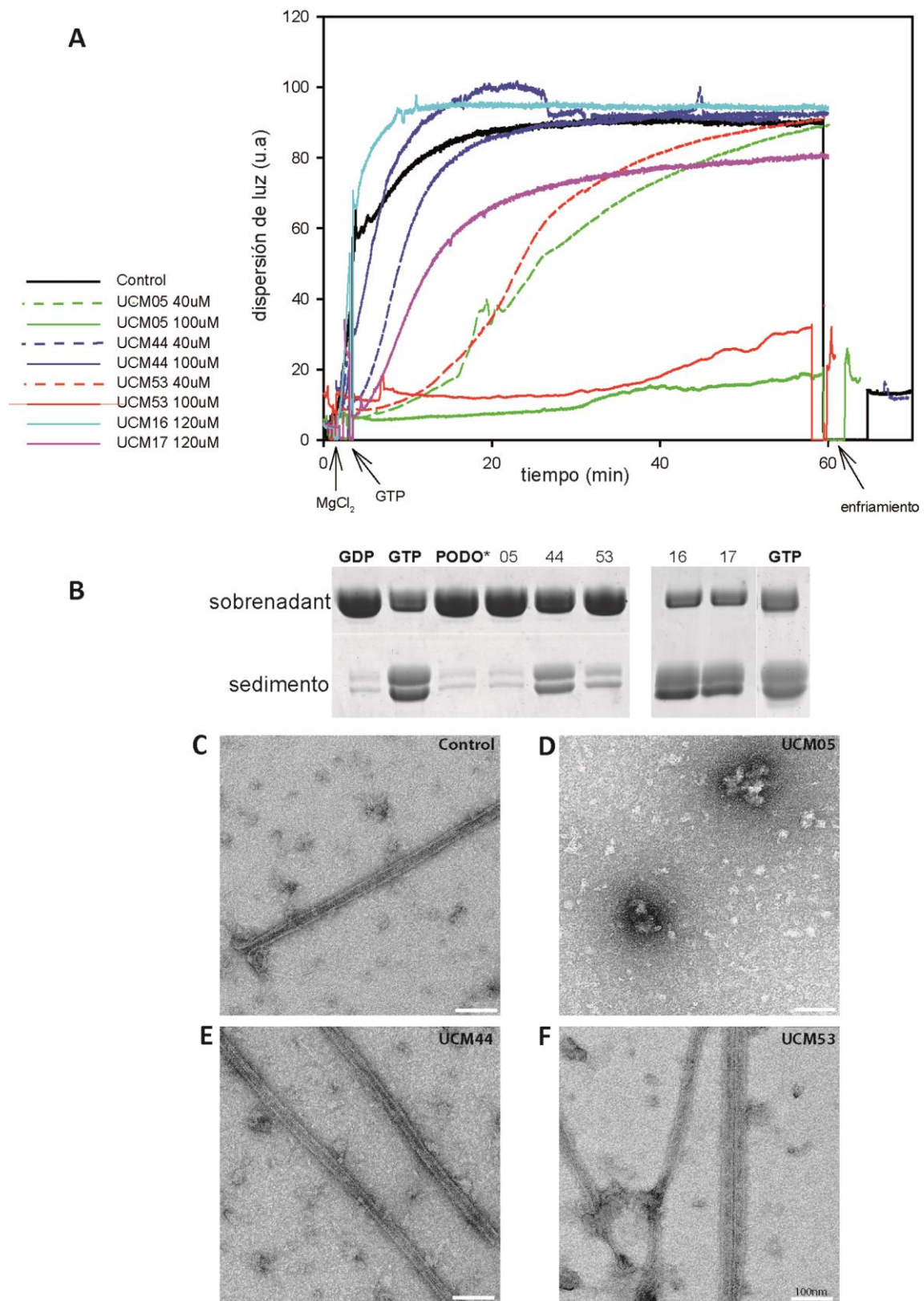
**32F).** El procesado de la imagen fue llevado a cabo por el Dr. Rafael Nuñez Rodriguez del IEM-CSIC. El patrón de difracción calculado a partir de la imagen, es compatible con dos tipos de estructura polimérica: (i) un par de protofilamentos espaciados lateralmente  $\approx 7$  nm o (ii) la imagen en proyección de tubos huecos formados por entre 5 y 7 monómeros por vuelta y con  $\approx 8.5$  nm de diámetro interior y  $\approx 12-13.5$  nm de diámetro exterior muy cercano al ancho de  $\approx 15$  nm observado. La tinción negativa de apoMj-FtsZ en presencia de los fragmentos de UCM05, UCM16 y UCM17, mostró resultados parecidos pero la estructura de los polímeros formados es diferente (**Figura 33**).



**Figura 33. Los fragmentos de UCM05, UCM16 y UCM17 inducen el ensamblaje de apoMj-FtsZ.** En A, determinación de la concentración crítica de ensamblaje por sedimentación de FtsZ ( $9 \mu\text{M}$ ) formados con UCM16 ( $120 \mu\text{M}$ ) y UCM17 ( $120 \mu\text{M}$ ) en círculos violeta y cian respectivamente. Los valores de concentración crítica obtenidos fueron  $4.88 \pm 0.01$  g/L con UCM16 y  $4.02 \pm 0.54$  g/L con UCM17. Las líneas corresponden al ajuste lineal por mínimos cuadrados. En B, micrografías electrónicas de los polímeros formados en presencia de UCM16 o en C, con UCM17.

## 2.7. Efecto de los compuestos sobre el ensamblaje de tubulina

Conociendo el efecto de los compuestos sobre el ensamblaje de FtsZ, nuestro siguiente objetivo fue analizar cuáles eran sus efectos sobre su proteína homóloga eucariota, la tubulina. En los experimentos se usó UCM05 y dos de sus análogos, UCM44 y UCM53. Para ello, se hicieron experimentos de dispersión de luz, sedimentación y visualización por microscopía electrónica de los microtubulos que forma la proteína. Se emplearon muestras (100  $\mu\text{L}$ ) de tubulina (15  $\mu\text{M}$ ) en tampón GAB con 2% DMSO, 6 mM de  $\text{MgCl}_2$  a 37°C y distintas concentraciones de los compuestos. Los ensayos de dispersión de luz de polímeros indicaron que ninguno de los ligandos en estudio (UCM05, UCM44, UCM53, UCM16 o UCM17, todos a 40  $\mu\text{M}$ ) inhibe el ensamblaje de tubulina aunque UCM05 y UCM53 (ambos a 40  $\mu\text{M}$ ) afectan ligeramente la dinámica de ensamblaje de la tubulina (**Figura 34A y Tabla 5**). Concentraciones más altas UCM05 y UCM53 (100  $\mu\text{M}$ ) reducen significativamente la formación de polímeros de tubulina (**Figura 34A y 34B**), e incluso UCM05 impide completamente la formación de microtubulos respecto a un control con GTP (1 mM) (**Figura 34C y D**). Por el contrario, UCM44 a altas concentraciones no tiene gran efecto sobre la polimerización de tubulina, permitiendo su correcto ensamblaje y la formación de microtubulos; al igual que ocurre con los fragmentos UCM16 y UCM17.

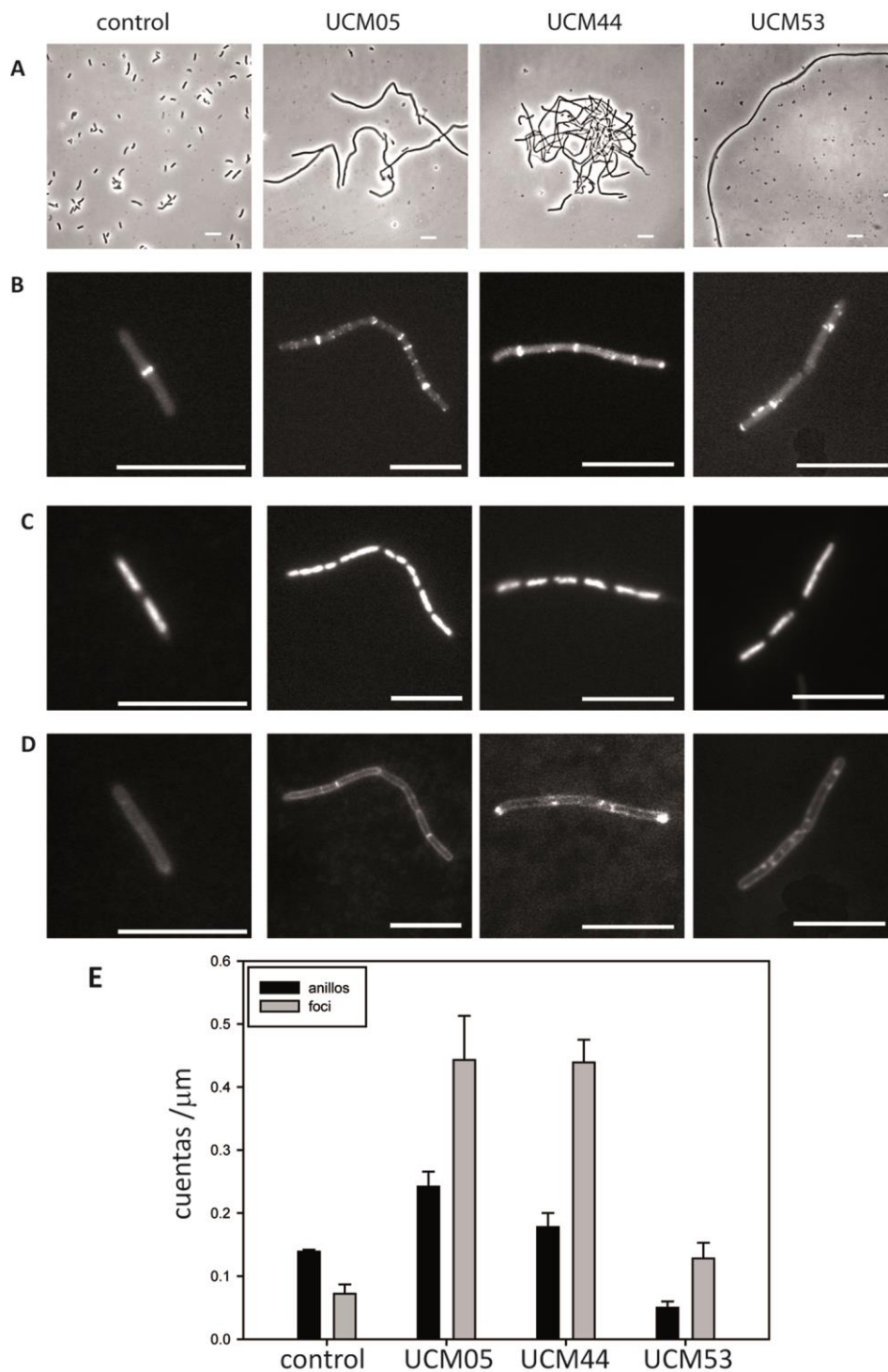


**Figura 34. Efecto de los compuestos UCM sobre el ensamblaje de microtubulos de tubulina.** A, ensayos de dispersión de luz de tubulina con 1 mM de GTP y ausencia de compuesto (línea negra) o en presencia de 40 o 100  $\mu$ M de UCM05 (línea verde punteada y lisa respectivamente), 40 o 100  $\mu$ M de UCM44 (líneas azules), 40 o 100  $\mu$ M de UCM53 (líneas rojas), 120  $\mu$ M de UCM16 (línea cian) y 120  $\mu$ M de UCM17 (línea violeta). B, Ensayos de sedimentación de tubulina en presencia de GDP (1 mM), GTP (1 mM), podofilotoxina (Inhibidor de la formación de microtubulos, 50  $\mu$ M) y 100  $\mu$ M de los compuestos. Debajo, micrografías electrónicas de muestras con 1 mM de GTP (C) o 100  $\mu$ M de UCM05 (D), UCM44 (E) y UCM53 (F).

## 2.8. Inhibición de la división celular y actividad antibacteriana de los ligandos UCM05, UCM44 y UCM53

Los efectos de los compuestos sobre las células bacterianas se analizaron en base a varios parámetros: (i) inhibición del crecimiento bacteriano mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria del compuesto (MIC), (ii) presencia de filamentos de células indivisas de *B.subtilis* y (iii) defectos en la formación del anillo Z. La selectividad antibacteriana de los compuestos se determinó en base a la inhibición del crecimiento (IC50) de células eucarióticas normales y tumorales.

Mediante microscopía de contraste de fases se observó que los compuestos inducían la filamentación de células de *B.subtilis* 168 a concentraciones inferiores a sus MIC (**Figura 35A**). Como control del experimento, se determinó por HPLC la concentración de UCM05 en el medio de cultivo a las 2 y a las 4 horas, observándose como UCM05 no se hidrolizaba y 18 horas después continuaba presente en el medio (60%). Observaciones del anillo Z en células de *B.subtilis* Su570 (Strauss et al., 2012), que contienen como única FtsZ la quimera fluorescente FtsZ::GFP, revelaron que UCM05 y UCM44 causan la deslocalización de la proteína de la zona central hacia la formación de numerosos *foc* de FtsZ esparcidos en la célula. Dicha situación origina un defecto en la formación del anillo Z y, por ende, la aparición de células incapaces de dividirse (**Figura 35 B y C**). A diferencia de UCM05 y UCM44, en presencia de UCM53 se observaron menos *foc* de FtsZ-GFP en la mayoría de las células por lo que su efecto es diferente. Además en las células donde se marcó el nucleóide el compuesto, se vió que UCM53 parece inducir descondensación del ADN bacteriano (**Figura 35C**). En presencia de todos los compuestos se observaron agregados de membrana en el interior celular (**Figura 35D**) cuyas causas aún nos son desconocidas. Finalmente, como se observa en la **Figura 35E**, todos los compuestos incrementan el número de *foc* de FtsZ en la célula respecto a un control en ausencia de compuesto. UCM05 y UCM44 incrementan también la formación de estructuras tipo anillo, mientras que con UCM53 estas se ven reducidas respecto al control.



**Figura 35. Efectos *in vivo* de UCM05, UCM44 y UCM53 sobre células de *B. subtilis*.** A, imágenes de microscopía de contraste de fases de células de *B. subtilis* 168 incubadas durante 2 horas a 37 °C con UCM05 (50  $\mu\text{M}$ ), UCM44 (12  $\mu\text{M}$ ) o UCM53 (12  $\mu\text{M}$ ). El control mostrado equivale al mismo experimento en ausencia de compuesto. B, imágenes de microscopía de fluorescencia de células de *B. subtilis* SU570 incubadas durante 1 hora a 30°C con UCM05 (40  $\mu\text{M}$ ), UCM44 (12  $\mu\text{M}$ ) o UCM53 (12  $\mu\text{M}$ ) donde se observa la localización de FtsZ-GFP. C, igual que B pero en presencia del colorante DAPI para observar la localización del nucleóide; y D, marcaje de membrana plasmática con el colorante FM4-64. Las barras de escala corresponden a 10  $\mu\text{m}$ . E, conteo de anillos y foci de FtsZ por  $\mu\text{m}$  en un control sin compuesto ( $0.139 \pm 0.003$  anillos/ $\mu\text{m}$ ;  $0.072 \pm 0.015$  foci/ $\mu\text{m}$ ), o presencia de UCM05 ( $0.242 \pm 0.024$  anillos/ $\mu\text{m}$ ;  $0.443 \pm 0.079$  foci/ $\mu\text{m}$ ), UCM44 ( $0.178 \pm 0.022$  anillos/ $\mu\text{m}$ ;  $0.439 \pm 0.036$  foci/ $\mu\text{m}$ ) y UCM53 ( $0.050 \pm 0.010$  anillos/ $\mu\text{m}$ ;  $0.128 \pm 0.025$  foci/ $\mu\text{m}$ ).

La Dra. Emilia Cercenado del Servicio de Microbiología del Hospital General Gregorio Marañón determinó el perfil antimicrobiano de los inhibidores sobre un panel de patógenos que incluían bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (**Tabla 6**). El efecto sobre la inhibición del crecimiento bacteriano en todas las cepas analizadas fue mayor con UCM53 y los valores de MIC siguieron sistemáticamente el orden UCM05 > UCM44 > UCM53. Los tres compuestos fueron activos frente a cepas Gram-positivas sensibles y resistentes a antibióticos y menos activos frente a bacterias patógenas Gram-negativas como *Acinetobacter baumannii* o *Escherichia cloacae* (resistentes a antibióticos) y *Pseudomonas aeruginosa*. UCM53 fue activo además sobre cepas resistentes a meticilina de *Staphylococcus aureus* (MRSA) y resistentes a levofloxacina de *Enterococcus faecalis*, aunque tuvo un efecto débil sobre cepas de *Streptococcus pneumoniae*.

**Tabla 6. Inhibición del crecimiento celular bacteriano por los compuestos UCM**

Microorganismo	MIC (mg/L) <sup>a</sup>		
	UCM05	UCM44	UCM53
<i>B.subtilis</i> 168 <sup>b</sup>	64	16	4
<i>S. aureus</i> meticilina-S ATCC 29213	32	16	8
<i>S. aureus</i> meticilina-R 12160636	32	16	8
<i>E. faecium</i> ampicilina-R y levofloxacina-R 12160560	64	32	4
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	64	32	2
<i>E. faecalis</i> levofloxacina-R 12165475	64	32	4
<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619	64	32	32
<i>S. pneumoniae</i> penicilina-S 12161018	64	64	32
<i>S. pneumoniae</i> penicilina-R 12159853	64	64	32
<i>A. baumannii</i> multi-R 12159796	64	64	32
<i>P. aeruginosa</i> ATCC27853	128	64	64
<i>P. aeruginosa</i> imipenem-R 12161227	128	64	64
<i>E. cloacae</i> multi-R 12161389	128	128	128
<i>E.coli</i> ATCC 35218	128	128	128
<i>K. pneumoniae</i> -ESBL <sup>c</sup> ATCC 700603	128	128	128

Se muestra la concentración mínima inhibitoria de crecimiento bacteriano (MIC) determinada por el método de microdilución, salvo *B.subtilis* 168<sup>b</sup> cuyas MIC fueron calculadas a partir del método de macrodilución. Las cepas no-ATCC empleadas son cepas aisladas clínicamente susceptibles (S) o resistentes (R) a antibióticos y usadas para el tratamiento de las infecciones producidas por estos patógenos. <sup>c</sup>ESBL: extended-spectrum beta-lactamase.

Las determinaciones del efecto de los compuestos sobre células de mamífero (IC50) las llevó a cabo la Dra. Isabel Barasoain del CIB-CSIC. Todos los compuestos inhibieron el crecimiento de células de mamífero (IC50) a concentraciones que parcialmente se solapaban con los valores de inhibición del crecimiento bacteriano (MIC) (**tabla 7**). Sin embargo su selectividad antibacteriana (definida como la relación entre la IC50 y la MIC) mejoró de forma creciente siguiendo el orden UCM05 < UCM44 < UCM53. En UCM53 los valores de IC50 en líneas normales no cancerígenas (HUVEC, IMR90, MDCK, 3T3) y líneas tumorales (A549,3T3-SV40, Hs578T, A2780, HeLa) llegaron a ser 12 veces mayor que la MIC en *S.aureus* y entre 8-47 veces mayor que en *E.faecalis* (**tabla 8**). Una inspección del efecto de los compuestos sobre la formación de microtubulos citoplásmicos en células A549 no mostró despolimerización de estos ni acumulación de células en el estado mitótico (fase G2/M del ciclo celular) como sucede típicamente con inhibidores de microtúbulos (**figura 36**). De esta forma se puede concluir que la inhibición observada de crecimiento celular no es específica de la tubulina en las células eucariotas.

**Tabla 7. Inhibición del crecimiento de células de mamífero**

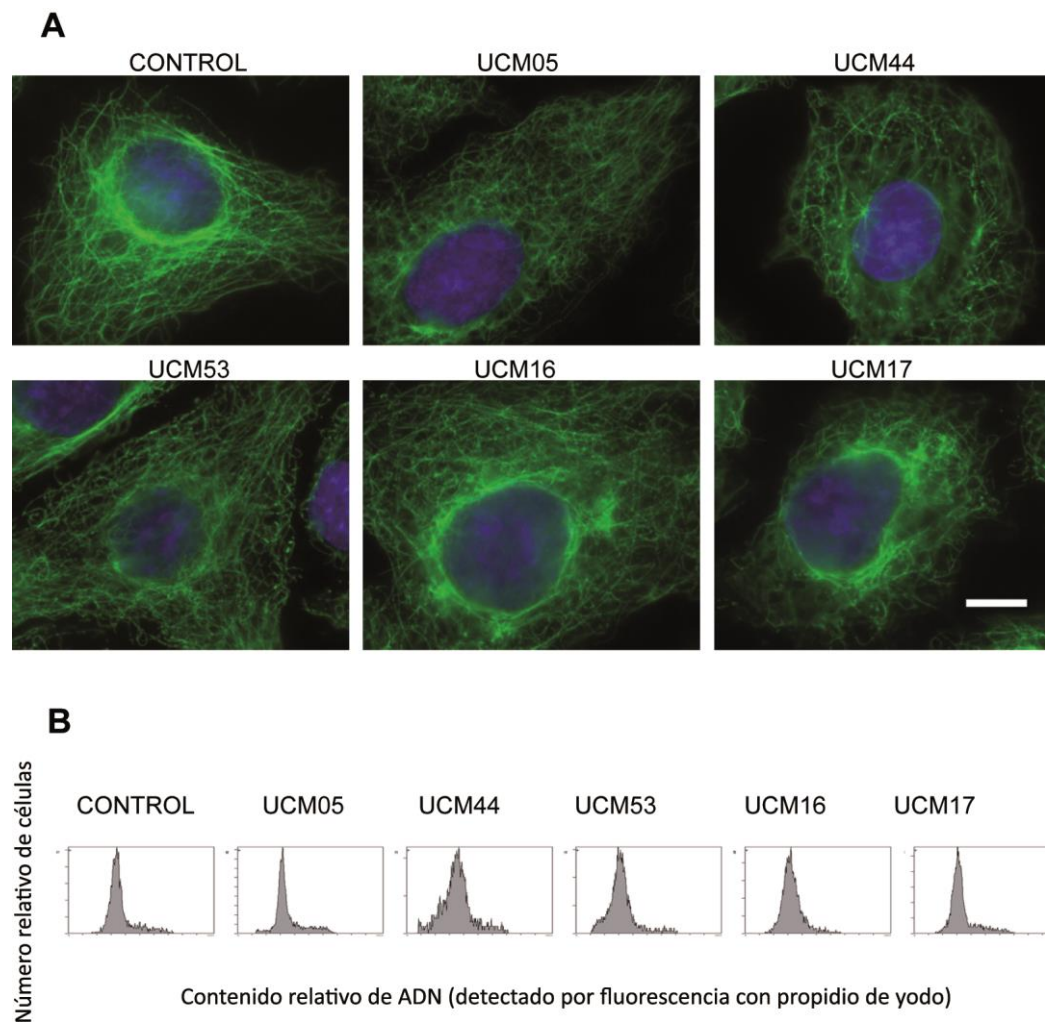
Línea celular	IC50 (μM)					
	UCM05	UCM44	UCM53	UCM16	UCM17	TAXOL
<b>HUVEC</b> (endotelial)	30 ± 9	44 ± 4	50 ± 1	50 ± 7	40 ± 5	0.0010 ± 0.0002
<b>IMR90</b> (fibrobalsto de pulmón)	50 ± 10	150 ± 11	137 ± 13	70 ± 14	80 ± 9	0.015 ± 0.005
<b>A549</b> (carcinoma de pulmón)	28 ± 7	80 ± 7	50 ± 5	100 ± 23	85 ± 8	0.0095 ± 0.0015
<b>MDCK</b> (epitelio de riñón)	40 ± 2	190 ± 20	200 ± 15	100 ± 10	100 ± 8	0.026 ± 0.001
<b>3T3</b> (fibroblasto embrión.)	17 ± 4	33 ± 7	50 ± 1	no det.	no det.	0.0004 ± 0.0001
<b>3T3-SV40</b> (fibroblastos transf.)	22 ± 1	46 ± 1	60 ± 3	no det.	no det.	0.0085 ± 0.0015
<b>Hs578T</b> (carcinoma de mama)	25 ± 3	77 ± 9	166 ± 14	107 ± 7	80 ± 3	0.010 ± 0.003
<b>A2780</b> (carcinoma de ovario)	2.7 ± 0.8	29 ± 9	36 ± 3	7 ± 1	10 ± 1	0.005 ± 0.001
<b>HeLa</b> (carcinoma de cervix)	11 ± 1	48 ± 2	94 ± 11	36 ± 3	11 ± 1	0.0016 ± 0.0001

Se muestra la concentración de los compuestos que inhiben el 50% del crecimiento celular (IC50) de líneas celulares normales (HUVEC, IMR90, MDCK, 3T3) y líneas celulares tumorales (A549, 3T3-SV40, Hs57T, A2780, HeLa). Como control se muestra los resultados en ausencia de compuesto y presencia de taxol (inhibidor principal del crecimiento de células cancerígenas).

Tabla 8. Índice de selectividad antimicrobiano

Línea celular	IC50 (línea celular) / MIC (patógenos bacterianos) <sup>a</sup>			
	UCM05 ( <i>S.aureus</i> ) <sup>b</sup>	UCM44 ( <i>S.aureus</i> ) <sup>b</sup>	UCM53 ( <i>S.aureus</i> ) <sup>b</sup>	UCM53 ( <i>E.faecalis</i> ) <sup>c</sup>
<b>HUVEC</b> (endotelial)	0.4	1	3	12
<b>IMR90</b> (fibrobalsto de pulmón)	0.7	4	8	32
<b>A549</b> (carcinoma de pulmón)	0.4	2	3	12
<b>MDCK</b> (epitelio de riñón)	0.6	5	12	47
<b>3T3</b> (fibroblasto embrion.)	0.2	1	3	12
<b>3T3-SV40</b> (fibroblastos transf.)	0.3	1	3	14
<b>Hs578T</b> (carcinoma de mama)	0.4	2	10	38
<b>A2780</b> (carcinoma de ovario)	0.1	1	2	8
<b>HeLa</b> (carcinoma de cervix)	0.2	1	5	22

<sup>a</sup>Relación entre la concentración de los compuestos que inhiben el 50% del crecimiento celular (IC50) y la concentración mínima inhibitoria del crecimiento de los patógenos de <sup>b</sup>*S.aureus* resistentes a metilina MR 12160636 y <sup>c</sup>*E.faecalis* ATCC 29212. Se usan las mismas unidades para calcular el valor.



**Figura 36. Efecto *in vivo* de los compuestos UCM sobre la formación de microtúbulos citoplásmicos.** A, Efecto de los compuestos UCM sobre la red de microtubulos de células A549 (carcinoma humano de pulmón) en interfase. Las células se incubaron durante 24 horas en ausencia de compuesto (usando como vehículo 0.5% de DMSO) o en presencia de 100  $\mu$ M de UCM05, UCM44, UCM53, UCM16 o UCM17. Posteriormente las células se tiñeron con un anticuerpo monoclonal anti-  $\alpha$ -tubulina y un anticuerpo secundario conjugado con fluoresceína. El DNA se tiñó con Hoeschst 33342. La escala mostrada en las imágenes corresponde a 10  $\mu$ m. B, Las gráficas indican el efecto de los compuestos sobre el ciclo celular de células A549, incubadas 20 horas en ausencia de compuesto (con DMSO) o presencia de 100  $\mu$ M de cada compuesto UCM.

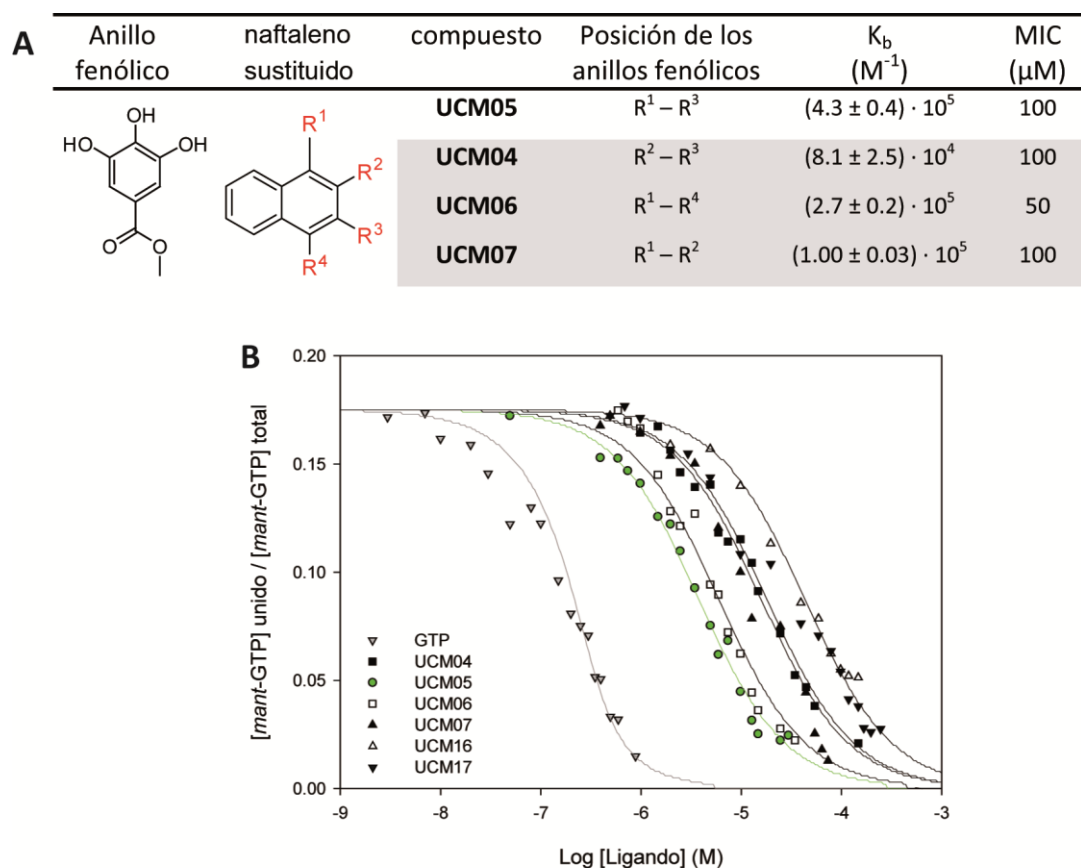
### 3. Optimización de inhibidores

En el apartado anterior se mostró que el compuesto UCM05 se une con afinidad media al sitio del nucleótido de Bs-FtsZ ( $K_b = (4.3 \pm 0.4) \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ ), afecta a la polimerización de la proteína y es activo frente a células de *B.subtilis* (MIC = 100  $\mu\text{M}$ )(Figura 37). La actividad antimicrobiana de UCM05 se extiende a *S.aureus* y *E.faecalis* resistentes a antibióticos (Tabla 6), revelando su potencial como posible antibiótico. Dichas características nos permitieron identificarlo como un nuevo compuesto activo (*hit*), por lo que nuestro siguiente objetivo fue la modificación del ligando para mejorar la afinidad al sitio del nucleótido, la actividad antimicrobiana y la especificidad frente a FtsZ; así como determinar las características químicas mínimas de un inhibidor de este tipo.

#### 3.1. Análisis de las afinidades y actividad antimicrobiana de los ligandos modificados

Como parte de la colaboración establecida, el laboratorio UCM modificó químicamente el compuesto UCM05 (Artola et al., 2013 en preparación). Una vez sintetizados los compuestos llevamos a cabo la determinación de su solubilidad en tampón Hepes pH 6.8, sus afinidades de unión mediante el ensayo de competición de *mant*-GTP y sus concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) sobre el crecimiento de células de *B.subtilis* 168. Los resultados de todos los compuestos se recogen en la Tabla 10 al final de este capítulo. Por conveniencia se analizará separadamente cada uno de los tipos de modificaciones realizadas.

A la vez que se realizó el primer cribado (ver apartado 2.1.3), observamos que el cambio en la posición de los dos anillos fenólicos sobre el grupo naftaleno (UCM04, UCM06 y UCM07) o la eliminación de los anillos fenólicos (fragmentos UCM16 y UCM17) no conlleva a un aumento en la afinidad de los compuestos por Bs-FtsZ ni mejoran los valores de MIC del ligando de referencia, salvo UCM06 que presentó una pequeña mejora de la MIC (Figura 37). Por ello el siguiente paso fue la síntesis de compuestos con distintas modificaciones químicas en tres subunidades susceptibles: el núcleo central de naftaleno de la molécula, los enlaces de éster usados como espaciadores y los anillos de galato.

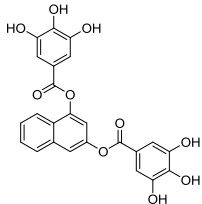
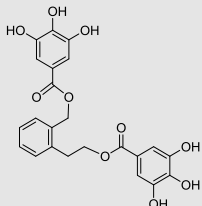
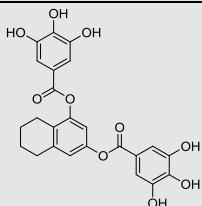
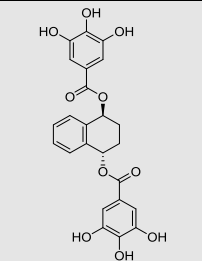
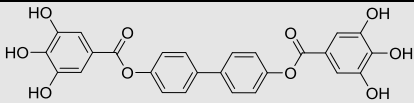
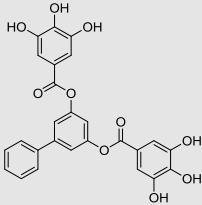
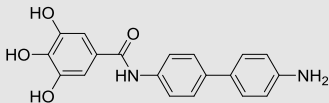
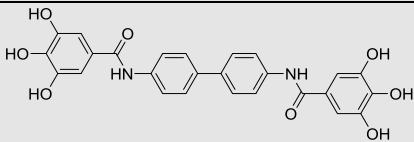


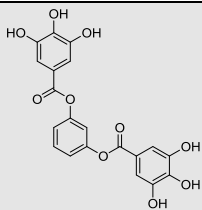
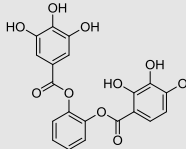
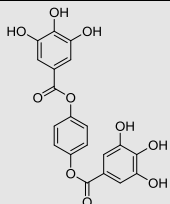
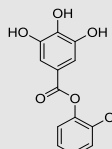
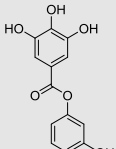
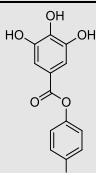
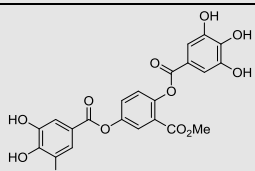
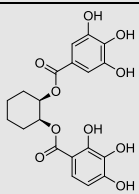
**Figura 37. Cambios en la posición de unión de los anillos fenólicos al núcleo central de naftaleno.** A. Estructura de los compuestos provenientes de UCM05 donde se ha variado la posición de unión de los anillos fenólicos al grupo naftaleno. En la tabla se indican las posiciones de unión, las constantes de afinidad al sitio del nucleótido y la concentración mínima inhibitoria del crecimiento de células de *B.subtilis* 168. B. Curvas de desplazamiento de mant-GTP por los compuestos modificados: UCM04 (cuadrados llenos negros), UCM05 (círculos verdes), UCM06 (cuadrados vacíos negros). Se muestran a modo de comparación los desplazamientos con los fragmentos de UCM05, UCM16 (triángulos vacíos negros) y UCM17 (triángulos invertidos negros) y con GTP (gris) (Figura 21).

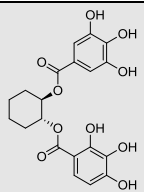
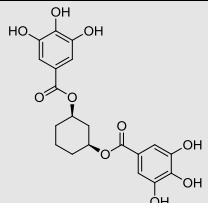
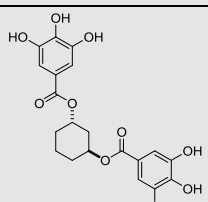
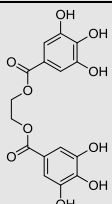
### 3.1.1. Sustitución del núcleo de naftaleno del ligando

La molécula de UCM05 está compuesta por un núcleo central sobre la que se unen los anillos fenólicos. Se sintetizaron distintos compuestos donde se eliminó o sustituyó el núcleo central de naftaleno por distintos grupos químicos como tetrahidroxinaftaleno, bifenilo, fenilo, ciclohexano y etilo. Así mismo, en varios de estos compuestos se sintetizaron ambos enantiómeros (cis o trans) y se añadieron grupos accesorios (**Figura 38**). Salvo uno de los compuestos donde se reemplazó el grupo naftaleno por bifenilo (UCM64), ninguna de las demás modificaciones dieron lugar a compuestos con mejor afinidad de unión al sitio de nucleótido de Bs-FtsZ o mejor actividad antimicrobiana respecto a UCM05, lo que indica que el anillo de naftaleno es el núcleo central más favorable de la molécula entre los probados. Así mismo la solubilidad de los compuestos donde el naftaleno se reemplazó por grupos fenilo, bifenilo o ciclohexano se vio disminuida en nuestro tampón experimental (**tabla 10**).

Figura 38

Compuesto	Estructura Química	$K_b$ ( $M^{-1}$ )	MIC ( $\mu M$ )
UCM05		$(4.3 \pm 0.4) \cdot 10^5$	100
UCM56		$(9.4 \pm 1.2) \cdot 10^4$	>100
UCM22		$(1.2 \pm 0.3) \cdot 10^5$	100
UCM72		$(1.8 \pm 0.1) \cdot 10^5$	100
UCM23		$(1.8 \pm 0.6) \cdot 10^5$	12-25
UCM64		$(1.20 \pm 0.12) \cdot 10^6$	40
UCM49		$\sim 7.0 \cdot 10^5$	>200
UCM50		$\sim 7.0 \cdot 10^5$	>150

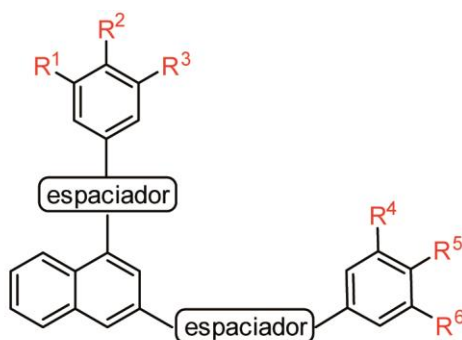
Compuesto	Estructura Química	$K_b$ ( $M^{-1}$ )	MIC ( $\mu M$ )
UCM24		$(3.5 \pm 6.8) \cdot 10^3$	>400
UCM25		$(1.2 \pm 0.1) \cdot 10^4$	>400
UCM26		$(1.2 \pm 0.2) \cdot 10^4$	>200
UCM30		$\leq 100$	>200
UCM31		$\leq 100$	>200
UCM32		$\sim 2.5 \cdot 10^3$	>200
UCM71		$(5.9 \pm 0.6) \cdot 10^4$	>100
UCM27		$(3.1 \pm 0.5) \cdot 10^4$	400

Compuesto	Estructura Química	$K_b$ ( $M^{-1}$ )	MIC ( $\mu M$ )
UCM28		$(1.7 \pm 0.3) \cdot 10^4$	>500
UCM37		$(1.1 \pm 0.1) \cdot 10^4$	>400
UCM38		$(1.9 \pm 0.2) \cdot 10^4$	>200
UCM70		$\sim 2.1 \cdot 10^5$	>40

**Figura 38. Cambios en el núcleo de naftaleno de UCM05.** Se muestran las estructuras químicas de los compuestos sintetizados donde se ha reemplazado el núcleo de naftaleno de UCM05 por los grupos 1etil-2propil benceno (UCM56), tetrahidroinaftaleno (UCM22 y UCM72), bifenilo (UCM23, UCM64, UCM49, UCM50), fenilo (UCM24, UCM25, UCM26, UCM30, UCM31, UCM32 y UCM71), ciclohexano (UCM27, UCM28, UCM37 y UCM38) y etilo (UCM70). En las dos últimas columnas, la constante de afinidad de unión al sitio del nucleótido obtenidas por el método de competición con *mant*-GTP y la concentración mínima inhibitoria (MIC) del crecimiento de *B.subtilis* 168.

### 3.1.2. Cambios en los espaciadores de la molécula

Con el objetivo de reemplazar el grupo éster, el espaciador en la molécula de UCM05, que une los anillos fenólicos al grupo naftaleno, se sintetizaron compuestos donde el espaciador se sustituyó por un grupo amida (UCM51 y UCM74), un grupo sulfonamida (UCM75 y UCM76) o por un grupo etileno (UCM73); y a su vez se reemplazaron algunos de los hidroxilos del anillo de galato por cloro (**Figura 39**). Los compuestos con dichas modificaciones redujeron la afinidad por el sitio del nucleótido de Bs-FtsZ en comparación con UCM05 y en general el cambio en los espaciadores disminuyó la solubilidad de estos compuestos en nuestro tampón experimental (**Tabla 10**). Es de destacar UCM74 que con un espaciador diferente (NHCO) mantiene una buena afinidad de unión al sitio del nucleótido de Bs-FtsZ y mejora la actividad antibacteriana respecto de UCM05.

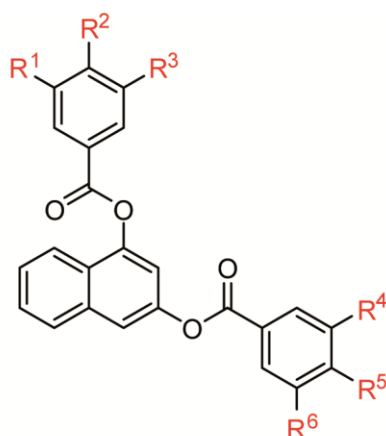


Compuesto	espaciador	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>	R <sup>5</sup>	R <sup>6</sup>	K <sub>b</sub> (M <sup>-1</sup> )	MIC (μM)
<b>UCM05</b>	OCO	OH	OH	OH	OH	OH	OH	$(4.3 \pm 0.4) \cdot 10^5$	100
<b>UCM51</b>	NHCO	OH	OH	OH	OH	OH	OH	$(4.0 \pm 0.9) \cdot 10^4$	>50
<b>UCM73</b>	CH=CH	OH	OH	OH	OH	OH	OH	$\sim 1.3 \cdot 10^5$	>20
<b>UCM74</b>	NHCO	Cl	OH	H	Cl	OH	H	$(3.2 \pm 1.7) \cdot 10^5$	25
<b>UCM75</b>	NHSO <sub>2</sub>	Cl	OCH <sub>3</sub>	H	Cl	OCH <sub>3</sub>	H	$\sim 7.1 \cdot 10^5$	>5
<b>UCM76</b>	NHSO <sub>2</sub>	Cl	OH	H	Cl	OH	H	$(4.7 \pm 0.8) \cdot 10^4$	>200

**Figura 39. Cambios en el espaciador de la molécula de UCM05.** Se muestran los espaciadores que reemplazan el naftaleno de la molécula parental (amida, sulfonamida y etileno) y las posiciones donde se han modificado algunos grupos hidroxilos. En las dos últimas columnas, la constante de afinidad de unión al sitio del nucleótido obtenidas por el método de competición con *mant*-GTP y la concentración mínima inhibitoria (MIC) del crecimiento de *B.subtilis* 168.

### 3.1.3. Eliminación de grupos hidroxilo del ligando de referencia

Para estudiar la influencia de los grupos hidroxilo en los anillos fenólicos, se llevó a cabo una reducción en su número y modificaciones en su posición de unión (**Figura 40**). Todos los compuestos donde se eliminaron grupos hidroxilo mejoraron la afinidad de unión al sitio del nucleótido de Bs-FtsZ y el valor de MIC tanto en células de *B.subtilis* como en la mayoría de patógenos probados (**Tabla 9**) respecto a UCM05 y solo UCM40 mantuvo el mismo valor de MIC. La eliminación de un grupo hidroxilo no mejora notablemente la K<sub>b</sub> de los compuestos pero la eliminación de dos de estos grupos (uno de cada anillo fenólico) aumenta la afinidad de unión de algunos de ellos (UCM43 y UCM44) considerablemente respecto al ligando de referencia. A partir de aquí, las eliminaciones de más hidroxilos de la molécula no mejoran más la afinidad de unión sino que la mantienen en el mismo rango (compuestos UCM61 y UCM62). De acuerdo con estos resultados, identificamos la importancia de los hidroxilos en posiciones R<sup>1</sup>, R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> ya que los compuestos donde están presentes son los que presentan mayor afinidad de unión al sitio del nucleótido y mejor actividad antimicrobiana de esta serie de ligandos. Aunque no se puede elucidar fácilmente la relación entre la actividad antimicrobiana y la eliminación de hidroxilos de la molécula, los compuestos con dos hidroxilos (UCM62 y UCM63) presentan los mejores valores de MIC frente a todas las cepas bacterianas en las que se probaron (**Tabla 9**).



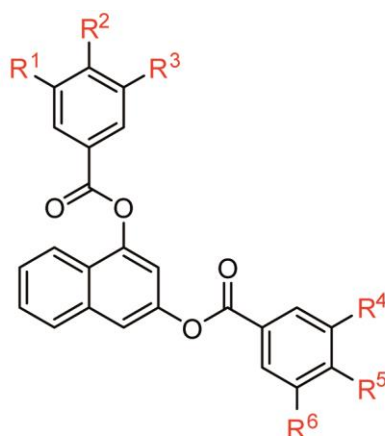
Compuesto	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>	R <sup>5</sup>	R <sup>6</sup>	K <sub>b</sub> (M <sup>-1</sup> )	MIC (μM)
<b>UCM05</b>	OH	OH	OH	OH	OH	OH	$(4.3 \pm 0.4) \cdot 10^5$	100
<b>UCM39</b>	OH	OH	OH	OH	H	OH	$(8.3 \pm 0.9) \cdot 10^5$	50
<b>UCM40</b>	OH	H	OH	OH	OH	OH	$(7.3 \pm 1.5) \cdot 10^5$	100
<b>UCM41</b>	OH	OH	H	OH	OH	OH	$(8.6 \pm 0.6) \cdot 10^5$	25
<b>UCM42</b>	OH	OH	OH	OH	OH	H	$(6.9 \pm 0.2) \cdot 10^5$	50
<b>UCM43</b>	OH	OH	H	OH	H	OH	$(1.10 \pm 0.07) \cdot 10^6$	>50
<b>UCM44</b>	OH	H	OH	OH	OH	H	$(1.5 \pm 0.3) \cdot 10^6$	25
<b>UCM45</b>	OH	H	OH	OH	H	OH	$(6.0 \pm 0.7) \cdot 10^5$	25
<b>UCM46</b>	OH	OH	H	OH	OH	H	$(5.1 \pm 0.2) \cdot 10^5$	50
<b>UCM66</b>	H	OH	H	OH	OH	OH	$(4.9 \pm 0.3) \cdot 10^5$	>50
<b>UCM67</b>	OH	OH	OH	H	OH	H	$(6.9 \pm 0.7) \cdot 10^5$	50
<b>UCM68</b>	OH	H	H	OH	OH	OH	$(7.8 \pm 0.8) \cdot 10^5$	50
<b>UCM69</b>	OH	OH	OH	OH	H	H	$(5.0 \pm 0.4) \cdot 10^5$	50
<b>UCM59</b>	OH	H	OH	OH	H	H	$(6.8 \pm 0.9) \cdot 10^5$	20
<b>UCM60</b>	OH	H	OH	H	OH	H	$(4.4 \pm 0.6) \cdot 10^5$	>50
<b>UCM61</b>	OH	H	H	OH	OH	H	$(1.5 \pm 0.2) \cdot 10^6$	20
<b>UCM57</b>	OH	H	H	OH	H	H	$(6.5 \pm 0.6) \cdot 10^5$	10
<b>UCM58</b>	H	OH	H	H	OH	H	$(5.8 \pm 0.1) \cdot 10^5$	>50
<b>UCM62</b>	OH	H	H	H	OH	H	$(1.2 \pm 0.2) \cdot 10^6$	5
<b>UCM63</b>	H	OH	H	OH	H	H	$(6.6 \pm 0.8) \cdot 10^5$	10
<b>UCM33</b>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	$\leq 3.5 \cdot 10^3$	>200
<b>UCM34</b>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OH	OH	OH	$(6.8 \pm 1.2) \cdot 10^5$	100
<b>UCM35</b>	OH	OH	OH	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	$(6.1 \pm 1.9) \cdot 10^5$	100

**Figura 40. Eliminación de grupos hidroxilo y metoxilación de UCM05.** Se muestran las posiciones donde se han eliminado hidroxilos o sustituido por metoxilos en la molécula parental. La intensidad en el fondo de la tabla se relaciona con la eliminación de 1, 2, 3 o 4 hidroxilos de UCM05. En las dos últimas columnas, la constante de afinidad de unión al sitio del nucleótido obtenidas por el método de competición con *mant*-GTP y la concentración mínima inhibitoria (MIC) del crecimiento de *B.subtilis* 168. Nótese que se exploraron todas las posibles construcciones de hidroxilos excepto en el caso de los compuestos con 3 hidroxilos. Los compuestos análogos de UCM05 con hidroxilos en posición orto presentaron dificultades en su síntesis.

Los compuestos en los que se metilaron los grupos hidroxilo presentaron bajas constantes de afinidad de unión al sitio del nucleótido y valores de MIC peores que UCM05. En aquellos casos donde se sustituyen todos los hidroxilos por metoxilos en uno de los anillos fenólicos, los compuestos retienen parte de la afinidad de unión de la molécula de partida (UCM34 y UCM35); la cual se pierde casi por completo cuando se sustituyen todos los hidroxilos de la molécula (UCM33). La solubilidad de los compuestos en el tampón experimental en general se vio disminuida conforme se eliminaron grupos hidroxilo de la molécula o se sustituyeron por grupos metoxilo (**Tabla 10**).

#### 3.1.4. Sustitución de hidroxilos por cloro

Aquellos compuestos donde se reemplazó alguno de los hidroxilos por cloro en uno de los anillos fenólicos (UCM54, UCM55 y UCM56) o en ambos (UCM53) incrementaron la afinidad de los compuestos por Bs-FtsZ y los valores de MIC frente a *B.subtilis* respecto al compuesto parental UCM05 (que carece de sustituyentes cloro). UCM53 mejoró notablemente la actividad antimicrobiana frente a *B.subtilis* 168 (MIC = 13  $\mu$ M) y frente a MRSA USA300 y Mu50 (**Figura 41y Tabla 9**). Dicha combinación de sustituyentes de hidroxilos y cloro en el mismo anillo fenólico nos permitió identificar compuestos con altas afinidades de unión ( $K_b = 1.1 - 1.3 \cdot 10^{-6} M^{-1}$ ) que mejoran las que presenta UCM05. Los compuestos con dos sustituyentes de cloro en solo uno de los anillos fenólicos (UCM47 o UCM48) prácticamente no presentaron variación en la afinidad de unión al sitio del nucleótido aunque disminuyen los valores de MIC para *B.subtilis* 168. En general, la solubilidad de los compuestos con sustituciones de cloro se vio disminuida en el tampón experimental (**Tabla 10**).

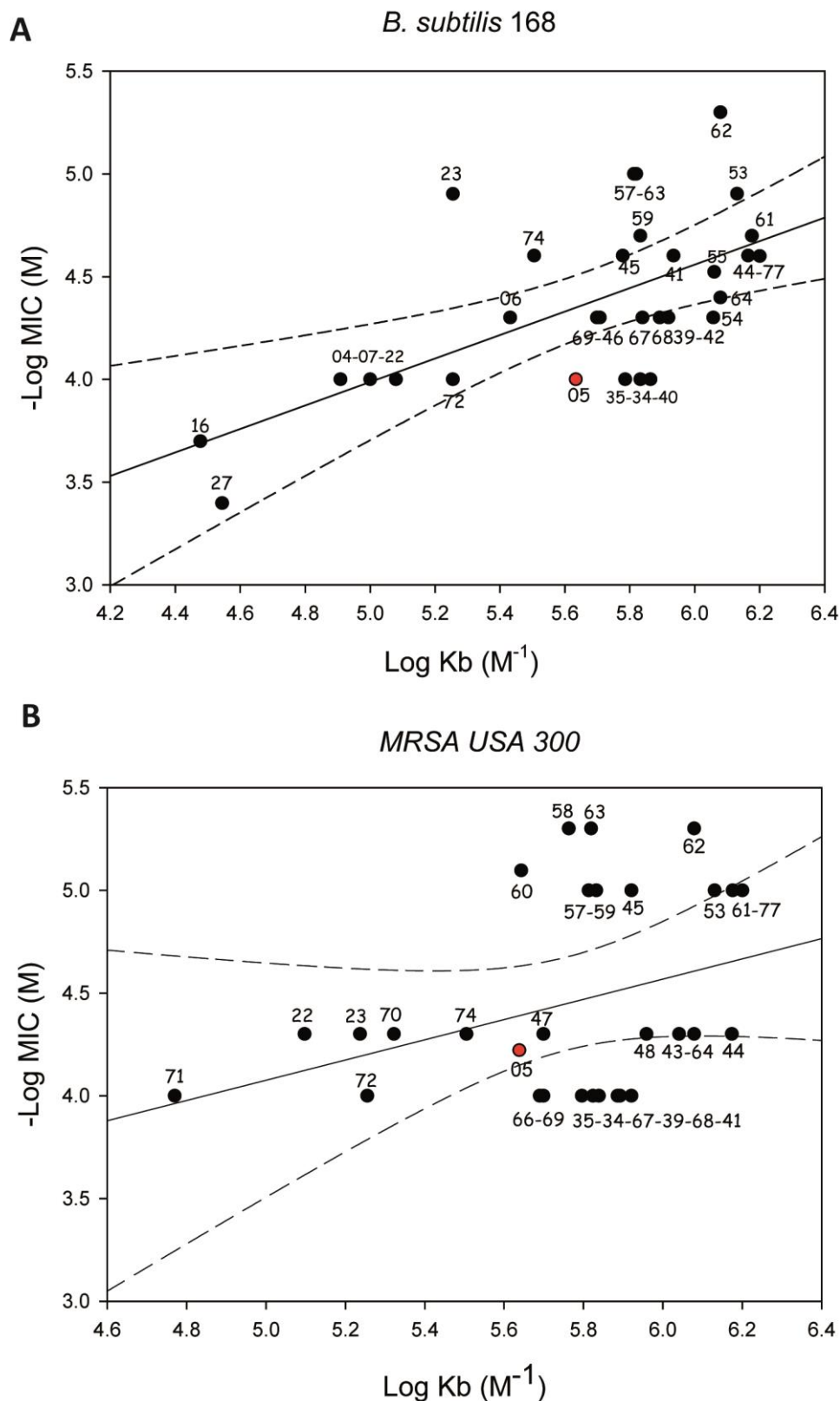


Compuesto	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>	R <sup>5</sup>	R <sup>6</sup>	K <sub>b</sub> (M <sup>-1</sup> )	MIC (μM)
UCM05	OH	OH	OH	OH	OH	OH	(4.3 ± 0.4) · 10 <sup>5</sup>	100
UCM47	Cl	Cl	H	OH	OH	OH	~ 5 · 10 <sup>5</sup>	>15
UCM48	OH	OH	OH	Cl	Cl	H	~ 9 · 10 <sup>5</sup>	>15
UCM53	Cl	OH	H	Cl	OH	H	(1.30 ± 0.02) · 10 <sup>6</sup>	13
UCM54	Cl	OH	H	OH	OH	OH	(1.1 ± 0.1) · 10 <sup>6</sup>	50
UCM55	OH	OH	OH	Cl	OH	H	(1.1 ± 0.1) · 10 <sup>6</sup>	30
UCM77	OH	H	OH	Cl	OH	H	(1.3 ± 0.2) · 10 <sup>6</sup>	25

**Figura 41. Adiciones de cloro a la molécula de UCM05.** Se muestran las posiciones donde se han añadido cloros a la molécula parental. En las dos últimas columnas, la constante de afinidad de unión al sitio del nucleótido obtenidas por el método de competición con *mant*-GTP y la concentración mínima inhibitoria (MIC) del crecimiento de *B.subtilis* 168.

### 3.2. Actividad antimicrobiana, afinidad de unión y perfil microbiológico

Con un gran número de los compuestos modificados se observó una correlación entre su actividad antimicrobiana y su afinidad por el sitio del nucleótido de la proteína, donde un descenso en los valores de MIC se correlacionaron de forma significativa con el aumento de afinidad de unión al sitio del nucleótido de Bs-FtsZ (**Figura 42A**) y menos claramente en el caso de Sa-FtsZ (**Figura 42B**). En general los compuestos que presentaron buenos valores de MIC, inhibieron el crecimiento de bacteria patógenas Gram-positivas como MRSA (MIC = 5-50 μM) y *Listeria monocytogenes* (MIC = 5-100 μM), y los compuestos UCM53, UCM57, UCM59 y UCM61-63 también inhibieron el crecimiento de *Enterococcus faecalis* (MIC < 100 μM). Sin embargo ninguno de ellos inhibió el crecimiento de bacterias Gram-negativas como *Pseudomonas aeruginosa* o *E.coli* (MIC > 100 μM) (**Tabla 9**).



**Figura 42.** Correlación entre las constantes de afinidad de unión de los compuestos al sitio del nucleótido de Bs-FtsZ (Kb) y su actividad antimicrobiana (MIC) frente a *B. subtilis* 168 (A) y *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA) (B). Las constantes de afinidad al sitio de unión se determinaron mediante el método de desplazamiento de *mant*-GTP y los valores de MIC se obtuvieron a partir de ensayos de microdilución (ver Métodos). Nótese que en B la correlación es interespecífica ya que son las constantes de afinidad por el sitio del nucleótido de Bs-FtsZ y la actividad antimicrobiana frente a células de *S. aureus*.

Como se comentó anteriormente, UCM05 inhibe la división celular de *B.subtilis* e induce su filamentación ya que causa un defecto en la formación del anillo Z. Para detectar si este fenotipo también lo presentaban células incubadas con los compuestos derivados de UCM05, se analizó la aparición de filamentación de células de *B.subtilis* 168 en presencia de todos ellos. Observamos claramente la filamentación con UCM62, UCM74 y UCM77, y sin embargo en otros compuestos con mayor Kb y mejor valor de MIC este fenotipo no estuvo tan claro. La explicación a este resultado reside en que algunos compuestos tienen un efecto bactericida (UCM54, UCM55, UCM57, UCM59, UCM61 y UCM63) y lisan la mayoría de las células del cultivo que los contienen que no llegan a formar filamentos (Tabla 9).

**Tabla 9. Perfil antimicrobiano de los compuestos UCM**

Compuesto	MIC (mg/L)						MIC y filamentación ( $\mu$ M)	
	MRSA USA300 <sup>a</sup>	MRSA Mu50 <sup>b</sup>	<i>E. faecalis</i> <sup>c</sup>	<i>L. monoc.</i> <sup>d</sup>	<i>P. aerug.</i> <sup>e</sup>	<i>E. coli</i> <sup>f</sup>	<i>B. subtilis</i> 168 <sup>g</sup>	Filamentación <i>B.subtilis</i> 168
<b>UCM05</b>	28	37	>46	23	>46	>46	100	25
<b>UCM43</b>	22	22	>43	43	>43	>43	>50	12
<b>UCM44</b>	22	22	43	22	>43	>43	15	>50
<b>UCM48</b>	24	24	>48	24	>48	>48	>15	-
<b>UCM53</b>	4.7	4.7	4.7	2.3	>47	>47	13	13
<b>UCM54</b>	28	47	>47	23	>47	>47	50	NO
<b>UCM55</b>	28	47	>47	23	>47	>47	30	NO
<b>UCM57</b>	4.6	4.6	23	4.6	>46	>46	10	NO
<b>UCM59</b>	4.2	4.2	21	4.2	>42	>42	20	NO
<b>UCM61</b>	4.2	4.2	21	4.2	>42	>42	20	NO
<b>UCM62</b>	2.0	2.0	20	2	>40	>40	5	5
<b>UCM63</b>	2.0	2.0	20	2	>40	>40	10	NO
<b>UCM74</b>	23	23	23	23	>46	>46	25	25
<b>UCM77</b>	4.5	4.5	>45	4.5	>45	>45	25	12.5

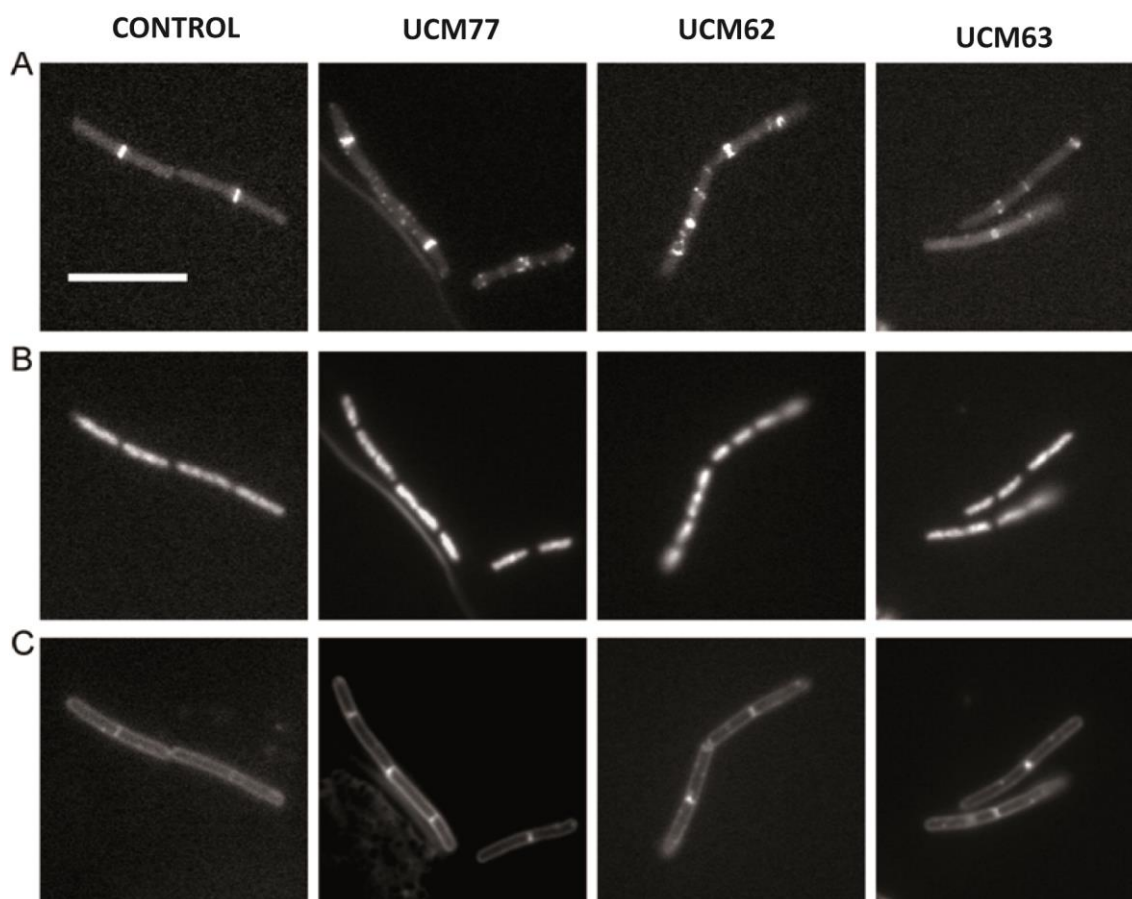
Se muestran los compuestos UCM seleccionados en base a su constante de afinidad de unión al sitio de Bs-FtsZ, los valores de inhibición de crecimiento (MIC) de distintos patógenos y la concentración a la que inducen la filamentación de células de *B.subtilis* 168. Los distintos patógenos sobre los que se probaron los compuestos fueron: <sup>a</sup> cepas clínicamente aisladas de *S.aureus* resistentes a meticilina y provenientes del Instituto Pasteur de Francia ATCC Nr: BAA-1556 (MRSA USA 300) o <sup>b</sup> resistentes a meticilina, kanamicina y ampicilina ATCC 700699 (MRSA Mu50); cepas secuenciadas de <sup>c</sup> *Enterococcus faecalis* resistente a gentamicina y vancomicina V583 ATCC 700802, <sup>d</sup> *Listeria monocytogenes*, <sup>e</sup> *Pseudomonas aeruginosa* resistente a inipenem y <sup>f</sup> *Escherichia coli*, UT189 proveniente de una infección de cistitis. <sup>g</sup> inhibición de la división células de *B.subtilis* 168 sobre las que se lleva a cabo la observación de filamentación. El perfil microbiológico se determinó en Artola et al., en preparación.

UCM05 induce la deslocalización de FtsZ hacia la formación de numerosos *focidistribuidos* por la célula (**Figura 35**). Repitiendo el experimento y usando la misma la cepa de *B.subtilis* (Su570, con FtsZ-GFP como única fuente de FtsZ), se observó que los compuestos UCM57, UCM62, UCM63, UCM74 y UCM77 también inducen la deslocalización de FtsZ, alterando la correcta formación del anillo Z en la mitad celular y por lo tanto evitando la división celular bacteriana (algunos ejemplos en **Figura 43A**). En presencia de los compuestos observamos una ligera descondensación del nucleóide ya que este es de mayor longitud que el del control sin compuesto (**Figura 43B**) y además algunos de los ligandos como UCM63 tienen un efecto sobre la membrana celular ya que se distinguen algunos agregados intracelulares que podrían ser sitios de inicio de la división celular que finalmente no llega a producirse (**Figura 43C**). Estos resultados apuntan a estos compuestos como inhibidores funcionales de FtsZ *in vivo* sin que podamos descartar interacción con otros componentes celulares aún no identificados.

Como resumen, se identificaron nuevos compuestos inhibidores derivados del compuesto activo (UCM05) con modificaciones en los hidroxilos de la molécula, bien por una reducción en su número (UCM43-44, UCM57, UCM59 y UCM61-63) o un reemplazo de estos por grupos cloro (UCM47-48 y UCM53-55) los cuales presentaron mayor afinidad de unión al sitio del nucleótido de Bs-FtsZ ( $K_d \leq 1.5 \mu\text{M}$ ) y una buena actividad antibacteriana frente a células de *B.subtilis* y MRSA ( $\text{MIC} < 30 \mu\text{M}$ ).

### 3.3. Selectividad de los inhibidores de FtsZ frente a tubulina

Para conocer el efecto de los compuestos sobre el ensamblaje de FtsZ y tubulina, se realizó un primer cribado de inhibición mediante pruebas de sedimentación en presencia de cada uno de los compuestos a  $25 \mu\text{M}$  para FtsZ y  $100 \mu\text{M}$  en el caso de tubulina (**Tabla 10**). La diferencia de concentración se debe a que hemos observado que los compuestos son más solubles en presencia de tubulina, posiblemente por su capacidad de unir ligandos apolares. A partir de este experimento se seleccionaron los compuestos UCM57 y UCM59, que inhibieron el ensamblaje de Bs-FtsZ más de un 40% a la vez que permitieron el correcto ensamblaje de la tubulina eucariota (**Tabla 10**) y UCM62 y UCM63, el primero con una alta constante de afinidad ( $K_b = (1.2 \pm 0.2) \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ ) y buena actividad antimicrobiana ( $\text{MIC} (B.subtilis) = 5 \mu\text{M}$ ) y el segundo por ser, junto con UCM62, el inhibidor más efectivo frente al crecimiento de cepas patógenas ( $\text{MIC} (\text{MRSA USA300 y MRSA Mu50}) = 5 \mu\text{M}$ ) (**Tabla 9**).

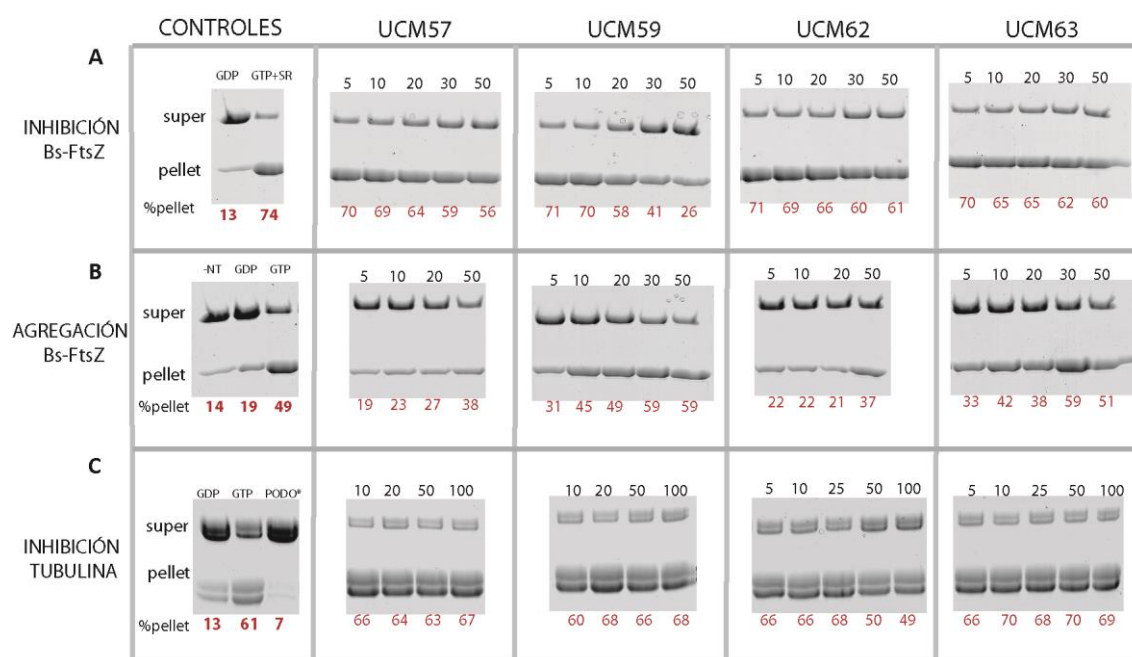


**Figura 43. Efecto de los compuestos modificados sobre la actividad de FtsZ *in vivo*.** Imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia de células de *B. subtilis* SU570 incubadas durante 1 hora con UCM77 (6  $\mu\text{M}$ ), UCM62 (2.5  $\mu\text{M}$ ) o UCM63 (2.5  $\mu\text{M}$ ). Las células control se han tratado igualmente pero no se les ha añadido compuesto. En A, imágenes del marcaje FtsZ-GFP; en B, tinción del nucleóide con DAPI y en C, tinción de la membrana plasmática con FM4-64. Cada imagen se ha observado en el canal de fluorescencia respectivo y la barra de la imagen se corresponde a una escala de 10  $\mu\text{m}$ .

Para ver el efecto de estos ligandos sobre el ensamblaje de Bs-FtsZ (9  $\mu\text{M}$ ) en tampón Hepes pH 6.8, los compuestos se probaron a varias concentraciones (5-50  $\mu\text{M}$ ) y en dos condiciones distintas: (i) en presencia de GTP (50  $\mu\text{M}$ ) y sistema de regeneración, lo que permitió observar el efecto inhibitorio de los compuestos sobre la proteína y (ii) en ausencia de nucleótido para ver la posible inducción en el ensamblaje o formación de agregados de la proteína en presencia de los compuestos. Se valoró también el efecto inhibitorio sobre el ensamblaje de tubulina (15  $\mu\text{M}$ ) en tampón GAB con 0.1 mM de GTP.

Como puede observarse en la **figura 44A**, el ensamblaje de Bs-FtsZ disminuye al aumentar la concentración de los compuestos. Observamos que los compuestos probados a sus concentraciones de inhibición del crecimiento bacteriano, MIC (10  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$  para UCM57, UCM59, UCM62 y UCM63) solo inhiben ligeramente el ensamblaje de FtsZ, salvo UCM59 donde se efecto inhibitorio fue más claro (disminución de 16% del sedimento

respecto al control sin compuesto) (**figura 44C**). Los experimentos llevados a cabo en ausencia de nucleótido mostraron que todos los compuestos aumentan la fracción de proteína sedimentada, siendo el efecto más notorio con UCM59 (**figura 44B**). Muestras de Bs-FtsZ con los compuestos se visualizaron por microscopía electrónica y se observó que los ligandos induce la formación de estructuras poliméricas amorfas muy similares a las observadas con UCM05 (**figura 30A**). Como resumen, los compuestos alteran el ensamblaje normal de la proteína bacteriana FtsZ, reemplazando el nucleótido y posiblemente perturbando la asociación entre los monómeros proteicos lo que conduciría a la formación de polímeros desordenados no funcionales.



**Figura 44. Efecto del incremento de concentración de los compuestos UCM57, UCM59, UCM62 y UCM63 sobre el ensamblaje de Bs-FtsZ y tubulina.** En la *fila A*, ensamblaje de FtsZ con GTP y sistema de regeneración (SR), en la *fila B*, agregación de FtsZ inducida por los ligandos y en *C*, ensamblaje de tubulina en presencia de GTP. Se incluyen controles en ausencia de nucleótido o presencia de GDP, GTP o GTP y SR como corresponda. Para tubulina se incluye un control con podofilotoxina (inhibidor del ensamblaje de microtubulos). El porcentaje de polímeros sedimentados se indica debajo de cada carril, así como la concentración de compuesto usado en cada caso.

Tabla 10. Características principales de los compuestos UCM

COMPUESTO	SOLUBILIDAD	$K_b$ ( $M^{-1}$ ) <i>mant-GTP</i> BsFtsZ	$\Delta G^0$ (Kcal/mol)	Desplaza $^3H$ -GTP BsFtsZ	% Inhibición ensamblaje BsFtsZ	MIC ( $\mu M$ , 18h) <i>B.subtilis</i>	Filamenta ( $\mu M$ , 2h) <i>B.subtilis</i>	MIC ( $\mu M$ , 18h) <i>E.coli</i>	% Inhibición ensamblaje Tubulina
UCM 02	$\geq 100\mu M$	no desplaza a 200 $\mu M$	-	-	0	>200	-	-	0
UCM 03	80 $\mu M$	no desplaza a 100 $\mu M$	-	-	0	>200	-	-	0
UCM 04	$\geq 40\mu M$	$(8.1 \pm 2.5) \times 10^4$	$-6.7 \pm 0.2$	100% a 40 $\mu M$	0	100	25	>200	0
UCM 05	50 $\mu M$	$(4.3 \pm 0.4) \times 10^5$	$-7.7 \pm 0.1$	100% a 50 $\mu M$	0	100	25	>200	98
UCM 06	40 $\mu M$	$(2.7 \pm 0.2) \times 10^5$	$-7.4 \pm 0.03$	64% a 20 $\mu M$	4	50	25	>200	0
UCM 07	$\geq 60\mu M$	$(1.0 \pm 0.03) \times 10^5$	$-6.2 \pm 0.02$	100% a 30 $\mu M$	1	100	50 (marginal)	>200	0
UCM 08	120 $\mu M$	no desplaza a 120 $\mu M$	-	-	0	>200	-	-	0
UCM 09	$\approx 40\mu M$	no desplaza a 100 $\mu M$	-	21% a 90 $\mu M$	0	> 200	-	-	0
UCM 10	$\geq 400\mu M$	no desplaza a 400 $\mu M$	-	-	0	>200	-	-	1
UCM 11	$\geq 500\mu M$	no desplaza a 500 $\mu M$	-	-	0	>200	-	-	0
UCM 12	$\geq 500\mu M$	no desplaza a 450 $\mu M$	-	-	0	>200	-	-	0
UCM 14	10 $\mu M$	no desplaza a 10 $\mu M$	-	-	2	50	25-50 (débil)	>200	0
UCM 15	170 $\mu M$	no desplaza a 150 $\mu M$	-	-	0	> 200	-	-	0

COMPUESTO	SOLUBILIDAD	$K_b$ ( $M^{-1}$ ) <i>mant-GTP</i> BsFtsZ	$\Delta G^0$ (Kcal/mol)	Desplaza $^3H$ -GTP BsFtsZ	% Inhibición ensamblaje BsFtsZ	MIC ( $\mu M$ , 18h) <i>B.subtilis</i>	Filamenta ( $\mu M$ , 2h) <i>B.subtilis</i>	MIC ( $\mu M$ , 18h) <i>E.coli</i>	% Inhibición ensamblaje Tubulina
UCM 16	$\geq 120\mu M$	$(3.0 \pm 0.9) \times 10^4$	$-6.1 \pm 0.2$	100% a $120\mu M$	0	200	100	>200	0
UCM 17	$\geq 120\mu M$	$(3.9 \pm 1.3) \times 10^4$	$-6.2 \pm 0.2$	100% a $120\mu M$	0	>250	200 (marginal)	>200	0
UCM 19	$\geq 220\mu M$	no desplaza a $220\mu M$	-	-	1	>200	-	-	0
UCM 20	$100\mu M$	$\sim 5.79 \times 10^3$	$\sim -5.13$	21% a $120\mu M$	0	>400	-	>200	0
UCM 22	$50\mu M$	$(1.2 \pm 0.3) \times 10^5$	$-6.9 \pm 0.2$	55% a $50\mu M$	0	100	50	>200	40
UCM23	$20\mu M$	$(1.8 \pm 0.6) \times 10^5$	$-7.1 \pm 0.2$	24% a $20\mu M$	0	12-25	25	>200	14
UCM 24	$350\mu M$	$(3.5 \pm 6.8) \times 10^3$	$-6.2 \pm 0.1$	63% a $350\mu M$	5	>400	-	>200	0
UCM 25	$\geq [400]\mu M$	$(1.2 \pm 0.1) \times 10^4$	$-5.6 \pm 0.1$	79% a $400\mu M$	0	>400	-	>200	0
UCM 26	$30\mu M$	$(1.2 \pm 0.2) \times 10^4$	$-5.6 \pm 0.1$	40% a $30\mu M$	0	>200	-	>200	0
UCM 27	$\geq 450\mu M$	$(3.1 \pm 0.5) \times 10^4$	$-6.1 \pm 0.1$	83% a $450\mu M$	0	400 (1/2inhib)	-	>200	0
UCM 28	$\geq 450\mu M$	$(1.7 \pm 0.3) \times 10^4$	$-5.8 \pm 0.1$	82% a $200\mu M$	0	>500	-	>200	0
UCM 30	$\geq 120\mu M$	$\leq 100$	$\geq -2.72$	15% a $120\mu M$	0	> 200	-	>200	22

COMPUESTO	SOLUBILIDAD	$K_b$ ( $M^{-1}$ ) <i>mant-GTP</i> BsFtsZ	$\Delta G^0$ (Kcal/mol)	Desplaza $^3H$ -GTP BsFtsZ	% Inhibición ensamblaje BsFtsZ	MIC ( $\mu M$ ,18h) <i>B.subtilis</i>	Filamenta ( $\mu M$ ,2h) <i>B.subtilis</i>	MIC ( $\mu M$ ,18h) <i>E.coli</i>	% Inhibición ensamblaje Tubulina
UCM 31	$\geq 120\mu M$	$\leq 100$	$\geq -2.72$	11% a $120\mu M$	0	$> 200$	-	-	50
UCM 32	$\geq 450\mu M$	$\approx 2.5 \times 10^3$	$\approx -4.64$	45% a $200\mu M$	0	$>200$	-	$>200$	0
UCM 33	$\approx 5-10\mu M$	$\leq 3.5 \times 10^3$	$\geq -4.82$	13% a $5\mu M$	0	$>200$	-	-	3.5
UCM 34	$\approx 5-10\mu M$	$(6.8 \pm 1.2) \times 10^5$	$-7.9 \pm 0.1$	41% a $5\mu M$	6	100	25-50 (cortotiempo)	$>200$	13
UCM 35	$\approx 5-10\mu M$	$(6.1 \pm 1.9) \times 10^5$	$-7.9 \pm 0.2$	19% a $5\mu M$	5	100	25-50 (cortotiempo)	$>200$	0
UCM 37	$\geq 400\mu M$	$(1.1 \pm 0.1) \times 10^4$	$-5.5 \pm 0.04$	89% a $400\mu M$	0	$>400$	-	-	4
UCM 38	$\geq 500\mu M$	$(1.9 \pm 0.2) \times 10^4$	$-5.8 \pm 0.03$	55% a $500\mu M$	0	$>200$	-	-	57
UCM 39	$50\mu M$	$(8.3 \pm 0.9) \times 10^5$	$-8.1 \pm 0.1$	53% a $50\mu M$	5	50	15-25 (muy débil)	$> 50$	0
UCM 40	$80\mu M$	$(7.3 \pm 1.5) \times 10^5$	$-8 \pm 0.1$	55% a $80\mu M$	0	100	25 (muy débil)	$> 100$	53
UCM 41	$50\mu M$	$(8.6 \pm 0.6) \times 10^5$	$-8.1 \pm 0.04$	10% a $50\mu M$	4	25	12 (débil)	$> 50$	61
UCM 42	$50\mu M$	$(6.9 \pm 0.2) \times 10^5$	$-7.9 \pm 0.01$	59% a $50\mu M$	0	50	12	$> 50$	0
UCM 43	$20\mu M$	$(1.1 \pm 0.07) \times 10^6$	$-8.2 \pm 0.04$	58% a $20\mu M$	7	$>50$	12 (muy débil)	$> 50$	18
UCM 44	$30\mu M$	$(1.5 \pm 0.3) \times 10^6$	$-8.4 \pm 0.1$	100% a $30\mu M$	23	25	15	$> 50$	19

COMPUESTO	SOLUBILIDAD	$K_b$ ( $M^{-1}$ ) <i>mant-GTP</i> BsFtsZ	$\Delta G^0$ (Kcal/mol)	Desplaza $^3H$ -GTP BsFtsZ	% Inhibición ensamblaje BsFtsZ	MIC ( $\mu M$ ,18h) <i>B.subtilis</i>	Filamenta ( $\mu M$ ,2h) <i>B.subtilis</i>	MIC ( $\mu M$ ,18h) <i>E.coli</i>	% Inhibición ensamblaje Tubulina
UCM 45	30 $\mu M$	$(6.0 \pm 0.7) \times 10^5$	$-7.9 \pm 0.1$	100% a 30 $\mu M$	38	25	no a 12 $\mu M$ (mata)	> 50	20
UCM 46	50 $\mu M$	$(5.1 \pm 0.2) \times 10^5$	$-7.8 \pm 0.02$	42% a 50 $\mu M$	10	50	15-25 (débil)	> 50	0
UCM 47	5 $\mu M$	$\approx 5 \times 10^5$	$\approx -7.7$	60% a 5 $\mu M$	6	>15	-	-	15
UCM 48	5 $\mu M$	$\approx 9 \times 10^5$	$\approx -8.1$	40% a 5 $\mu M$	5	>15	-	-	0
UCM 49	30 $\mu M$	$\approx 7 \times 10^5$	$\approx -7.9$	27% a 30 $\mu M$	12	>200	-	-	0
UCM 50	> 5 $\mu M$	$\approx 7 \times 10^5$	$\approx -7.9$	10% a 5 $\mu M$	14	>150	-	-	14
UCM 51	15 $\mu M$	$(4 \pm 0.9) \times 10^4$	$-6.3 \pm 0.2$	-	11	>50	-	>50	0
UCM 53	10 $\mu M$	$(1.3 \pm 0.02) \times 10^6$	$-8.3 \pm 0.01$	-	19	13	13	>50	81
UCM 54	20 $\mu M$	$(1.1 \pm 0.1) \times 10^6$	$-8.2 \pm 0.03$	-	21	50	NO	>50	0
UCM 55	30 $\mu M$	$(1.1 \pm 0.1) \times 10^6$	$-8.2 \pm 0.03$	-	20	30	NO	>50	11
UCM 56	100 $\mu M$	$(9.4 \pm 1.2) \times 10^4$	$-6.8 \pm 0.1$	-	13	>100	-	>200	0
UCM 57	1 $\mu M$	$(6.5 \pm 0.6) \times 10^5$	$-7.9 \pm 0.1$	-	46	10	NO	-	1
UCM 58	1 $\mu M$	$(5.8 \pm 0.1) \times 10^5$	$-7.9 \pm 0.1$	-	18	>50	-	-	0

COMPUESTO	SOLUBILIDAD	$K_b$ ( $M^{-1}$ ) <i>mant-GTP</i> BsFtsZ	$\Delta G^0$ (Kcal/mol)	Desplaza $^3H$ -GTP BsFtsZ	% Inhibición ensamblaje BsFtsZ	MIC ( $\mu M$ ,18h) <i>B.subtilis</i>	Filamenta ( $\mu M$ ,2h) <i>B.subtilis</i>	MIC ( $\mu M$ ,18h) <i>E.coli</i>	% Inhibición ensamblaje Tubulina
UCM 59	$\leq 1\mu M$	$(6.8 \pm 0.9) \times 10^5$	$-7.9 \pm 0.1$	-	46	20	NO	-	0
UCM 60	$1\mu M$	$(4.4 \pm 0.6) \times 10^5$	$-7.7 \pm 0.1$	-	46	>50	-	-	0
UCM 61	$1\mu M$	$(1.5 \pm 0.2) \times 10^6$	$-8.4 \pm 0.1$	-	34	20	NO	-	94
UCM 62	$1\mu M$	$(1.2 \pm 0.2) \times 10^6$	$-8.3 \pm 0.1$	-	21	5	5 (débil)	-	23
UCM 63	$1\mu M$	$(6.6 \pm 0.8) \times 10^5$	$-7.9 \pm 0.05$	-	26	10	NO	-	0
UCM 64	$\approx 10\mu M$	$(1.2 \pm 0.12) \times 10^6$	$-8.3 \pm 0.1$	-	16	40	40 (muy débil)	-	1
UCM 66	$\approx 10\mu M$	$(4.9 \pm 0.3) \times 10^5$	$-7.8 \pm 0.1$	-	19	>50	-	-	0
UCM 67	$\approx 5\mu M$	$(6.9 \pm 0.7) \times 10^5$	$-8 \pm 0.1$	-	14	50	NO	-	86
UCM 68	$\approx 5\mu M$	$(7.8 \pm 0.8) \times 10^5$	$-8 \pm 0.04$	-	52	50	NO	-	99
UCM 69	$\approx 3\mu M$	$(5 \pm 0.4) \times 10^5$	$-7.8 \pm 0.1$	-	13	50	25 (débil)	-	17
UCM 70	$\geq 15\mu M$	$\approx 2.1 \times 10^5$	-7.26	-	14	>40	-	-	25
UCM 71	$\geq 15\mu M$	$(5.9 \pm 0.6) \times 10^4$	$-6.5 \pm 0.1$	-	22	>100	-	-	0
UCM 72	$\geq 15\mu M$	$(1.8 \pm 0.1) \times 10^5$	$-7.2 \pm 0.1$	-	15	100	50 (débil)	-	0

COMPUESTO	SOLUBILIDAD	$K_b$ ( $M^{-1}$ ) <i>mant</i> -GTP BsFtsZ	$\Delta G^0$ (Kcal/mol)	Desplaza $^3H$ -GTP BsFtsZ	% Inhibición ensamblaje BsFtsZ	MIC ( $\mu M$ , 18h) <i>B.subtilis</i>	Filamenta ( $\mu M$ , 2h) <i>B.subtilis</i>	MIC ( $\mu M$ , 18h) <i>E.coli</i>	% Inhibición ensamblaje Tubulina
UCM 73	< 1 $\mu M$	$\approx 1.3 \times 10^5$	-6.97	-	15	>20	-	-	100
UCM 74	7 $\mu M$	$(3.2 \pm 1.7) \times 10^5$	$-7.5 \pm 0.5$	-	9	25	25 (débil)	-	0
UCM 75	< 1 $\mu M$	$\approx 7.1 \times 10^5$	-7.98	-	12	>5	-	-	67
UCM 76	> 100 $\mu M$	$(4.7 \pm 0.8) \times 10^4$	$-6.4 \pm 0.1$	-	21	>200	-	-	0
UCM 77	< 1 $\mu M$	$(1.3 \pm 0.2) \times 10^6$	$-8.3 \pm 0.1$	-	52	25	12.5 (débil)	-	41
Ac GÁLICO	200 $\mu M$	no desplaza a 200 $\mu M$	-	-	13	>200	-	>200	
1,3 DHN	$\geq 400\mu M$	no desplaza a 400 $\mu M$	-	-	15	>200	-	>400	
EGCG	$\geq 140\mu M$	$(8.9 \pm 2.5) \times 10^3$	$-5.4 \pm 0.2$	79% a 120 $\mu M$	12	>500	-	>250	
GTP		<b><math>(3.3 \pm 0.8) \times 10^7</math></b>	<b><math>-10.2 \pm 0.1</math></b>	92% a 980nM	<b>0</b>	--	--	--	0

En la tabla se muestra la solubilidad de los distintos compuestos en tampón Hepes pH 6.8, las constantes de afinidad calculadas a partir del método de desplazamiento del *mant*-GTP (excepto los compuestos que no desplazan el ligando fluorescente a su máxima solubilidad) o en  $^3H$ -GTP (solo para algunos compuestos) ( $K_b$ ), el cambio de energía libre de unión ( $\Delta G^0$ ) calculada a partir de la  $K_b$ , MIC y filamentación sobre *B.subtilis* 168 y en algunos compuestos se determinó la MIC sobre *E.coli*. Los porcentajes de inhibición del ensamblaje de Bs-FtsZ y tubulina se calcularon como se indicó en la **ecuación 13** (ver Materiales y Métodos). el caso de Bs-FtsZ todos los compuestos se probaron a 25  $\mu M$  y para los controles el porcentaje de proteína sedimentada en presencia de GTP y GDP fue  $78.2 \pm 7\%$  y  $25.9 \pm 7\%$  respectivamente. En los ensayos de inhibición con tubulina los compuestos se probaron a 100 $\mu M$ , salvo UCM51 que por su baja solubilidad en DMSO se probó a 20 $\mu M$ , y el porcentaje de proteína sedimentada en presencia de GTP y GDP fue  $59.4 \pm 3\%$  y  $9.5 \pm 3\%$  respectivamente.

## **B. Exploración del sitio de unión de PC190723 entre los dominios estructurales de FtsZ**

PC190723 es un compuesto sintético derivado de la difluoro-metoxibenzamida (Haydon et al., 2008; Stokes et al., 2013) que se une a FtsZ e inhibe eficazmente la división celular bacteriana. Es activo frente a dosis letales de cepas de *S.aureus* resistentes a meticilina en modelos animales, lo que permitió validar a FtsZ como una diana antibacteriana (Haydon et al., 2008). La estructura cristalográfica del complejo PC190723-FtsZ de *S.aureus* fue resuelta recientemente (Elsen et al., 2012; Matsui et al., 2012; Tan et al., 2012) mostrando cómo el compuesto se aloja en una cavidad entre los dominios N y C terminal de FtsZ permitiéndole así modular la flexibilidad y el ensamblaje de la proteína (Andreu et al., 2010; Martin-Galiano et al., 2010).

La identificación de este nuevo sitio de unión de ligandos en FtsZ nos condujo a su exploración mediante dos aproximaciones diferentes. La primera consistió en estudiar el efecto de los fragmentos de PC190723 sobre el ensamblaje de la proteína de *B.subtilis* y *E.coli* para identificar entre otras cosas la parte principal de la molécula; y a su vez se realizó un estudio sobre uno de sus análogos descritos, el 8J (Adams et al., 2011). Nuestro segundo objetivo se centró en la búsqueda de ligandos fluorescentes derivados de PC190723, 8J o de alguno de sus fragmentos que pudiera facilitar el desarrollo de un nuevo método de cribado de compuestos que se unieran a este sitio, de forma análoga al método de competición de *mant*-GTP para ligandos que se unen al sitio del nucleótido.

### **1. Efectos de PC190723 y sus fragmentos sobre el ensamblaje y la actividad GTPasa de FtsZ**

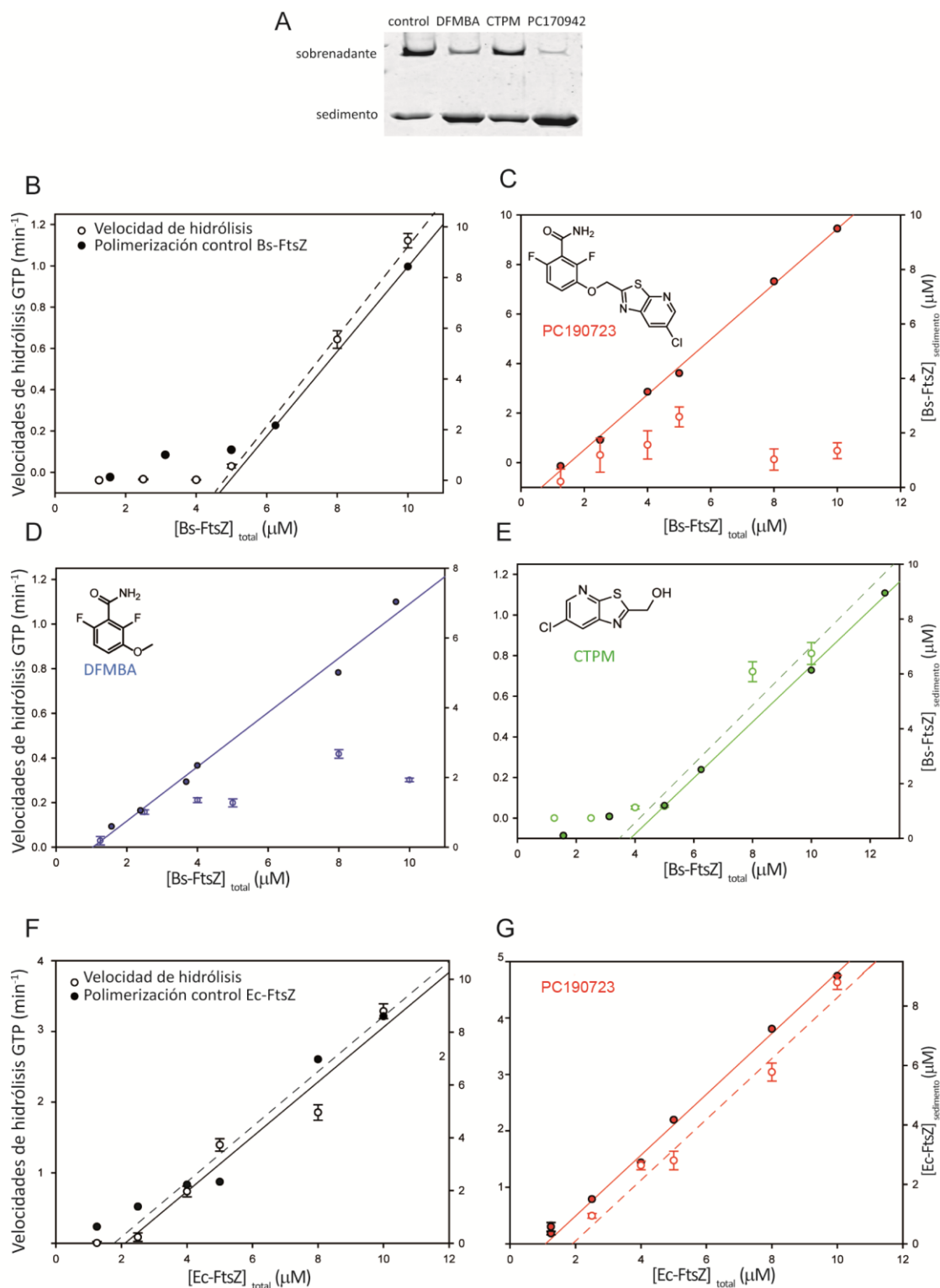
#### **1.1. PC190723 y sus fragmentos modulan el ensamblaje y la actividad GTPasa de Bs-FtsZ**

Previamente habíamos observamos cómo PC190723 induce el ensamblaje de FtsZ de *B.subtilis* disminuyendo su concentración crítica de ensamblaje ( $Cr = 0.65 \pm 0.13 \mu\text{M}$ ) respecto a un control en ausencia de compuesto ( $Cr = 4.95 \pm 0.43 \mu\text{M}$ ), formando filamentos y manojos estables (Andreu et al., 2010). Experimentos *in vivo*, mostraron que el compuesto, además, inhibe la citoquinesis bacteriana deslocalizando FtsZ de la mitad celular hacia la formación de

*foci* dispersos en la célula (Adams et al., 2011; Haydon et al., 2008). PC170942 modula la actividad GTPasa de la proteína, lo cual fue confirmado durante este trabajo obteniéndose una velocidad de hidrólisis de GTP de Bs-FtsZ (10  $\mu\text{M}$ ) en presencia de PC190723 (15  $\mu\text{M}$ ) de  $0.28 \pm 0.3 \text{ min}^{-1}$ , bastante inferior comparada con la del control en ausencia del compuesto,  $1.12 \pm 0.3 \text{ min}^{-1}$  (**Tabla 11**).

Como se comentó en la Introducción, FtsZ presenta un ensamblaje de tipo cooperativo que requiere una concentración mínima de monómeros (concentración crítica) para que se inicie la polimerización. Su ensamblaje depende de la unión de GTP y su actividad GTPasa se activa a la vez que se forman los polímeros de la proteína, existiendo una correlación directa entre ambas (**Figura 45B y F**). En presencia de PC190723 se pierde la relación entre la velocidad de hidrólisis de GTP y la polimerización de Bs-FtsZ (**Figura 45C**), debido a la inhibición de la actividad GTPasa y a la disminución de la concentración crítica (**Tabla 11**).

En base a estos resultados se quiso analizar el efecto de los fragmentos de PC190723: 2,6-difluoro-3-metoxibenzamida (DFMBA) y 6-cloro [1,3]tiazolo[5,4-b]piridina-2-il metanol (CTPM) sobre el ensamblaje y la actividad GTPasa de la proteína. Mediante un ensayo de sedimentación comparativo se había confirmado que el PC190723 (15  $\mu\text{M}$ ) incrementa el ensamblaje de Bs-FtsZ (10  $\mu\text{M}$ ) respecto a un control en ausencia de compuesto. Resultados similares se obtuvieron con DFMBA pero a mayor concentración (4 mM) mientras que CTPM (1 mM) no pareció tener un efecto significativo (**Figura 45A**). La determinación de la actividad GTPasa de la proteína en presencia de los compuestos mostró que el fragmento de benzamida (4 mM) parece ser la parte activa de la molécula de PC190723 reteniendo parte de su efecto inhibitorio, reduciendo la concentración crítica de Bs-FtsZ e inhibiendo la actividad GTPasa (**Figura 45D**). Por su parte, el fragmento clorado (1 mM) sólo tuvo efectos muy ligeros sobre actividad GTPasa de la proteína y se conserva la correlación Cr vs. actividad GTPasa (**Figura 45E**) como en el control sin compuesto.



**Figura 45. Efecto de PC190723 y sus fragmentos sobre el ensamblaje y la actividad GTPasa de Bs-FtsZ y Ec-FtsZ en Hepes pH 6.8 a 25°C.** El efecto de los compuestos sobre el ensamblaje de FtsZ se realizó mediante ensayos de sedimentación de polímeros de la proteína. A-E experimentos en Bs-FtsZ, el efecto de DFMBBA, CTPM y PC190723 (PC) sobre el ensamblaje de FtsZ; el primer carril un control con GTP (2 mM). Las siguientes gráficas muestran la relación entre la sedimentación de polímeros de Bs-FtsZ y la velocidad de hidrólisis de la proteína en presencia de GTP (2 mM) y ausencia de compuesto (B) o presencia de 15  $\mu$ M de PC (C), 4 mM de DFMBBA (D) y 1 mM de CTPM (E). F-G experimentos en Ec-FtsZ que muestran la correlación actividad GTPasa vs. Concentración crítica en presencia de GTP (2 mM) y ausencia de compuesto (F) o presencia de 15  $\mu$ M de PC (G).

Se sabe que PC190723 tiene especificidad frente a FtsZ de distintas especies bacterianas (Haydon et al., 2008). Las FtsZ de las especies susceptibles (Gram-positivas) tienen una valina en la posición 307 que está sustituida por residuos polares grandes en las especies no susceptibles (Gram-negativas). Para comprobar esta especificidad del compuesto, se estudió la correlación entre la actividad GTPasa y la polimerización de FtsZ en una especie no susceptible. PC190723 aumentó inespecíficamente la actividad GTPasa de la proteína de la especie no susceptible (*E.coli*) a la vez que indujo un desensamblaje más rápido de los polímeros formados (Andreu et al., 2010). Sin embargo la correlación entre la velocidad de hidrólisis de GTP y la concentración crítica de Ec-FtsZ se mantiene en presencia de PC190723 (15  $\mu\text{M}$ ) (Figura 45G), como ocurre con un control en ausencia de compuesto (Figura 45F). De esta forma, comprobamos que FtsZ de la especie no susceptible es solo es afectada ligeramente por la interacción con PC190723.

**Tabla 11. Efecto de PC190723 y sus fragmentos sobre el ensamblaje y la actividad GTPasa de FtsZ**

COMPUESTO	Bs-FtsZ		Ec-FtsZ	
	Cr ( $\mu\text{M}$ )	Velocidad de hidrólisis de GTP ( $\text{min}^{-1}$ )	Cr ( $\mu\text{M}$ )	Velocidad de hidrólisis de GTP ( $\text{min}^{-1}$ )
CONTROL	4.95 $\pm$ 0.43	1.12 $\pm$ 0.03	1.95 $\pm$ 0.06	2.90 $\pm$ 0.10
PC190723 (15 $\mu\text{M}$ )	0.65 $\pm$ 0.13	0.28 $\pm$ 0.30	1.10 $\pm$ 0.18	4.31 $\pm$ 0.12
DFMBA (4 mM)	1.06 $\pm$ 0.23	0.30 $\pm$ 0.01	ND	ND
CTPM (1 mM)	3.85 $\pm$ 0.12	0.81 $\pm$ 0.05	ND	ND
DFMBA-NBD (200 $\mu\text{M}$ )	3.04 $\pm$ 0.38	0.42 $\pm$ 0.03	1.16 $\pm$ 0.31	2.79 $\pm$ 0.04

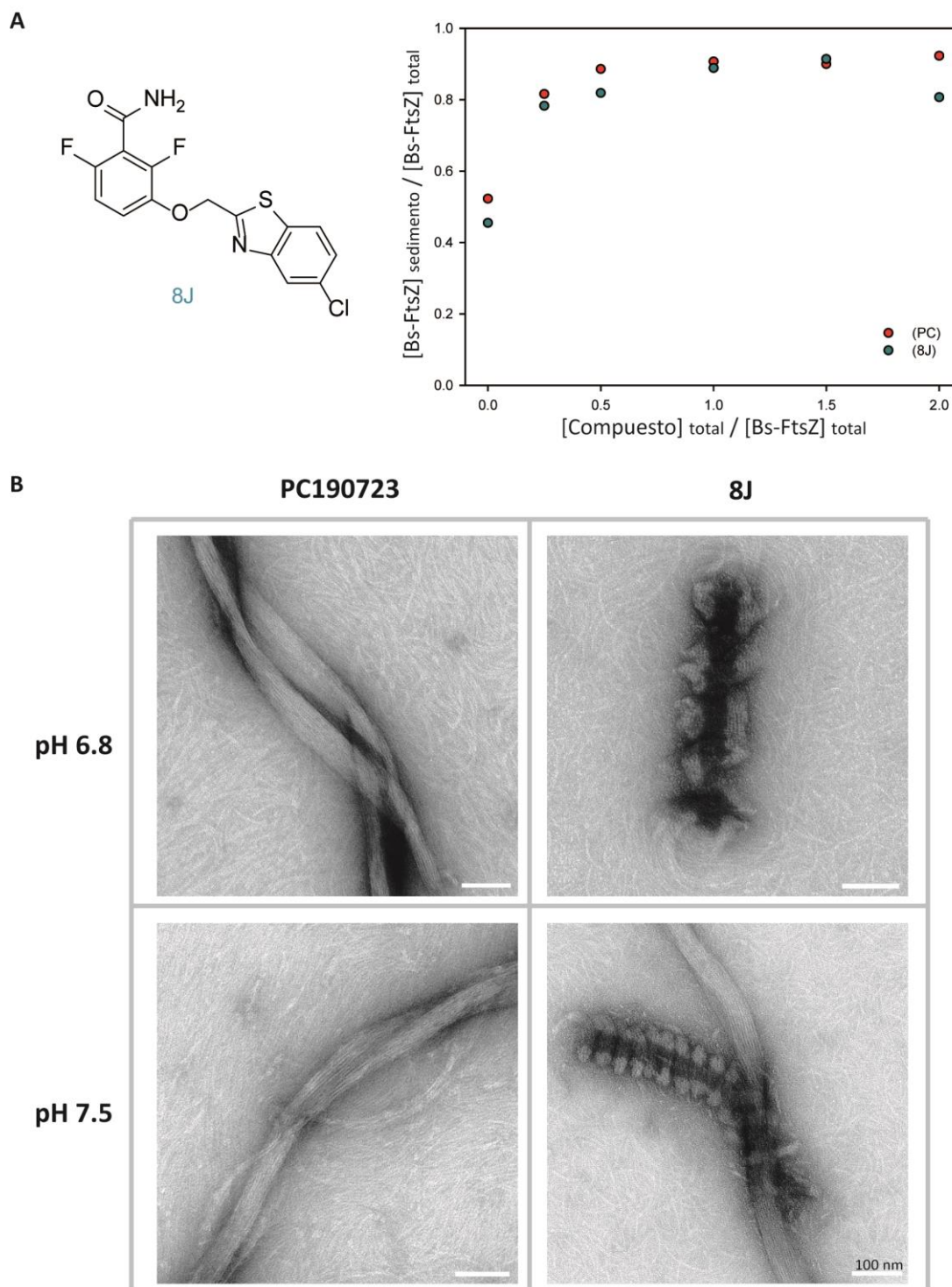
En la tabla se indican la concentración crítica (Cr) y velocidad de hidrólisis de GTP de Bs-FtsZ (10  $\mu\text{M}$ ) y Ec-FtsZ (10  $\mu\text{M}$ ) en presencia de los ligandos a las concentraciones indicadas. Como control, muestras de Bs-FtsZ o Ec-FtsZ en presencia de GTP. Algunos datos no fueron determinados (ND). Se muestran también los resultados obtenidos con un análogo del fragmento DFMBA que lleva acoplado un fluoróforo (DFMBA-NBD) y cuyos resultados se contarán posteriormente.

Con los resultados obtenidos hasta el momento, se ha comprobado como PC190723 es un compuesto activo sobre Bs-FtsZ, inhibe la actividad GTPasa de la proteína e induce su ensamblaje. Respecto a sus fragmentos, DFMBA es la parte primordial de la molécula que conserva los efectos de PC190723 pero a mayor concentración.

## 1.2. Comparación de los efectos sobre el ensamblaje de FtsZ de PC190723 y 8J

El derivado de benzamida 8J es un análogo muy cercano de PC190723 que fue descrito como un inhibidor de la división celular bacteriana *in vivo* e *in vitro*. 8J induce una deslocalización de FtsZ de la mitad celular hacia la formación de *foci* dispersos de proteína, inhibiendo la división celular y consecuentemente el crecimiento bacteriano (MIC = 0.25 µg / mL<sup>-1</sup>). La característica principal del compuesto y que lo diferenció de su análogo PC190723 es que aquellas células que podían dividirse en su presencia, lo hacían de forma diferente ya que el anillo Z ensamblaba helicoidalmente. Experimentos *in vitro* mostraron además que el compuesto inhibe la actividad GTPasa de Bs-FtsZ (Adams et al., 2011). Sin embargo, en este trabajo los autores no pudieron observar la formación de manojos de polímeros de FtsZ *in vitro*.

Al disponer del compuesto 8J en nuestra colaboración con el laboratorio UCM mediante síntesis del compuesto, procedimos a analizar una breve comparación bioquímica de las similitudes o diferencias con su análogo PC190723 (una solubilidad de 15 µM en Hepes pH 6.8 semejante a PC190723). Comprobamos el efecto de 8J sobre la inhibición del crecimiento de células de *B.subtilis*, así como la formación de *foci* de FtsZ dispersos en células. Titulaciones de Bs-FtsZ (10 µM) en tampón Hepes pH 6.8 y 2 mM de GTP, mostraron que concentraciones crecientes de ambos compuestos inducen de forma muy similar el ensamblaje de la proteína (**Figura 46A**). Cuando visualizamos por microscopía electrónica muestras de Bs-FtsZ (10 µM) en tampón Hepes a dos pH diferentes, 6.8 y 7.5 con 2 mM de GTP y 15 µM de ambos compuestos (**Figura 46B**) observamos que PC190723 a pH 6.8 y 7.5 forma los manojos característicos de Bs-FtsZ descritos con anterioridad (Andreu et al., 2010). Sorprendentemente 8J forma manojos helicoidales. A pH 7.5 este efecto se aprecia mejor y se pueden observar manojos de proteína girados hasta 10 veces sobre el mismo eje. Dejando constancia de lo observado, nos preguntamos si este resultado podría estar relacionado con la rotación helicoidal del anillo Z detectado en la células de *B.subtilis* en presencia del compuesto (Adams et al., 2011).



**Figura 46. Comparación del efecto de PC190723 y su análogo 8J sobre el ensamblaje y la morfología de polímeros de Bs-FtsZ.** A, estructura química de 8J y titulación de Bs-FtsZ en presencia de concentraciones crecientes de PC190723 (puntos rojos) y 8J (puntos azules); B, micrografías electrónicas de Bs-FtsZ (10  $\mu$ M) en presencia de 15  $\mu$ M de PC190723 u 8J en tampón Hepes a pH 6.8 o 7.5.

## 2. Sondas fluorescentes del sitio de unión de PC190723

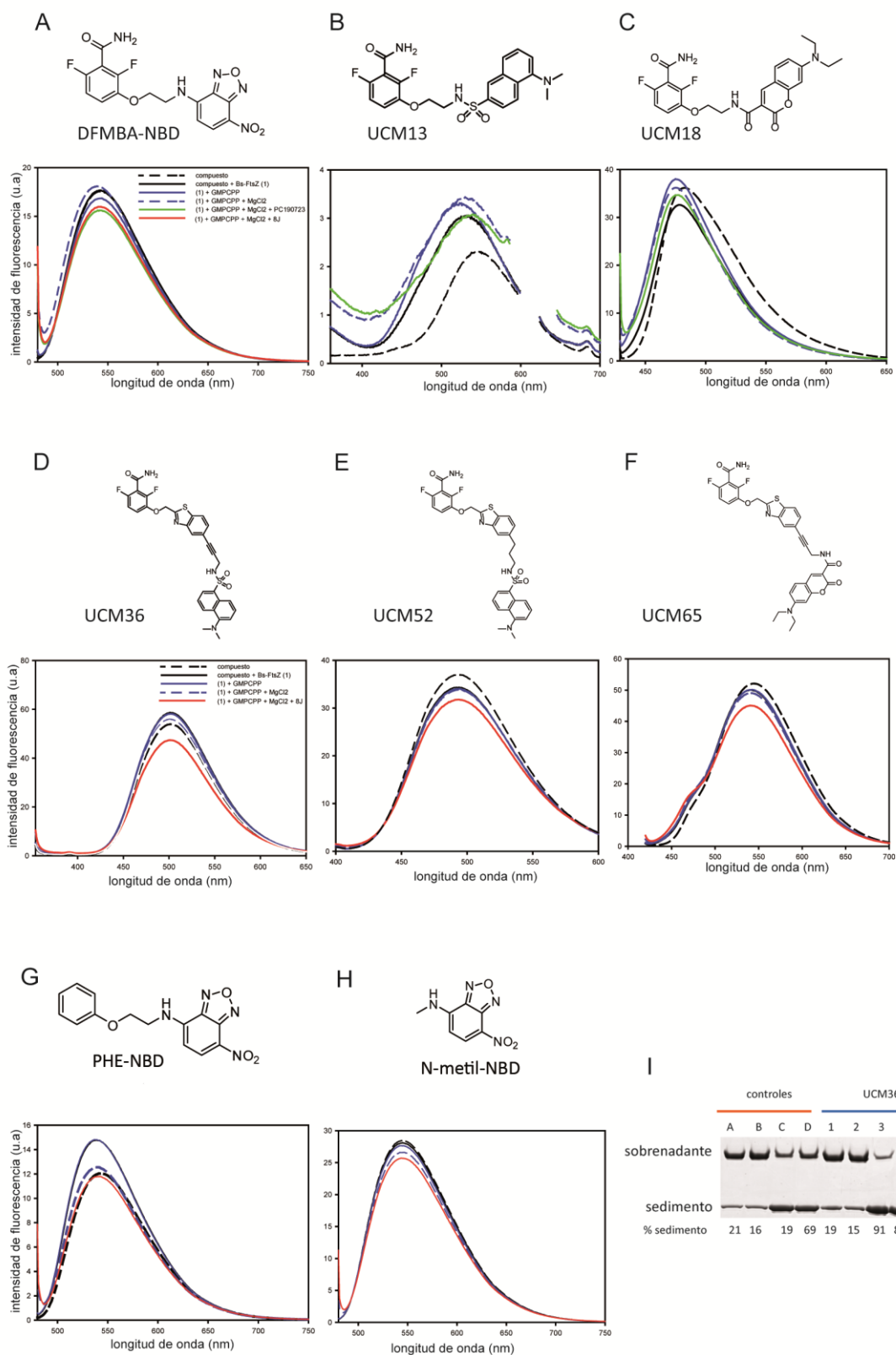
Las características del PC190723 lo hacen un compuesto no solo interesante para el desarrollo de antibióticos, sino también una importante herramienta para la exploración de su sitio de unión, que permita la búsqueda de nuevos compuestos efectivos y que no necesariamente estén químicamente relacionados.

### 2.1. Diseño de sondas fluorescentes al sitio de PC190723

Una aproximación a la búsqueda de nuevos compuestos que se unan al sitio de PC190723 sería el desarrollo de un método que permitiera el cribado y la determinación de la afinidad de dichos ligandos. De forma análoga a la sonda fluorescente que se une al sitio del nucleótido de FtsZ, *mant*-GTP, nuestro objetivo consistió en la búsqueda de ligandos derivados del PC170923 acoplados a distintos fluoróforos, en los que se diera un cambio en su anisotropía o intensidad de fluorescencia entre sus formas libre y unida a la proteína.

En el laboratorio UCM se sintetizaron 6 compuestos derivados de la DFMBA o del 8J, a los que se añadió 3 fluoróforos diferentes: 4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol (NBD), dansilo o cumarina. Los derivados de la DFMBA fueron DFMBA-NBD, UCM13 con el grupo dansilo y UCM18, con la cumarina como fluoróforo. Los derivados fluorescentes de 8J fueron UCM36 y UCM52, ambos con el grupo dansilo acoplado, pero con distinto espaciador de unión al fluoróforo, y UCM65 con el grupo cumarina (**Figura 47**).

Para determinar si la fluorescencia de estos ligandos cambiaba al unirse a los monómeros o a los polímeros de FtsZ se registraron espectros de emisión de fluorescencia de cada compuesto (10  $\mu$ M) en presencia de Bs-FtsZ (10  $\mu$ M) en tampón Hepes pH 6.8 a 25°C, y excitando en el máximo de cada compuesto (**Tabla 12**). Los espectros de emisión se hicieron en varias condiciones partiendo de una solución del compuesto con 2% de DMSO a la que se añadió consecutivamente la proteína, GMPCPP (0.1 mM), MgCl<sub>2</sub> (10 mM) y PC u 8J (10  $\mu$ M). Tras cada adición se registró un espectro de emisión. Como se aprecia en la **Figura 47A-F**, UCM13 fue el único compuesto que aumentó su intensidad de fluorescencia en presencia de la proteína, y junto con DFMBA-NBD presentó un desplazamiento en su máximo de emisión que podría deberse a la unión a esta.



**Figura 47. Características fluorescentes de compuestos derivados de DFMBBA y 8J.** Se representan las estructuras químicas y espectros de emisión de fluorescencia de los derivados de DFMBBA-NBD (A), UCM13 (B), UCM18 (C); derivados de 8J: UCM36 (D), UCM52(E) UCM65 (F) y controles de DFMBBA-NBD: PHE-NBD (G) y N-metil-NBD (H). I, ensayo de sedimentación de polímeros de Bs-FtsZ (10 mM) en tampón Hepes pH 6.8 a 25°C; en presencia de 10 mM de MgCl<sub>2</sub> (A), 0.1 mM de GMPCPP (B), MgCl<sub>2</sub> y GMPCPP (C) y MgCl<sub>2</sub>, GMPCPP y 10 μM de 8J (D). En los carriles 1-4, lo mismo que en A-D pero en presencia de 10 μM de UCM36. Debajo de cada carril del gel, se indica el porcentaje de polímeros en cada ensayo.

Si el compuesto se ha unido a la proteína, la adición de PC190723 a los derivados fluorescentes de la DFMBA (DFMBA-NBD, UCM13 y UCM18) u 8J a sus derivados fluorescentes (UCM36, UCM52 y UCM65) deberían desplazar el ligando a su forma libre lo que conllevaría una disminución en su intensidad de fluorescencia a los valores en los que el ligando está en solución. La adición de PC u 8J (como corresponde a cada ligando fluorescente) no mostró en ninguno de los casos una disminución significativa de la intensidad de fluorescencia.

Para descartar una posible unión de los ligandos sin cambios grandes en la intensidad de fluorescencia se procedió a determinar la anisotropía. Las medidas de anisotropía e intensidad de fluorescencia se realizaron sobre la misma muestra. Como puede observarse en la **Tabla 13**, solo DFMBA-NBD y UCM13 aumentan la anisotropía en presencia de Bs-FtsZ, GMPCPP y magnesio; y únicamente DFMBA-NBD reduce su anisotropía a los niveles basales tras la adición de su análogo PC190723, lo que indicaría que está siendo desplazado del sitio de unión quedándose en su forma libre. Se realizaron los mismos experimentos con los fragmentos de DFMBA-NBD: N-metil-NBD y PHE-NBD y tampoco se apreciaron cambios en la intensidad de fluorescencia (**Figura 47G-H**).

**Tabla 12. Longitudes de onda de excitación y emisión de los compuestos fluorescentes.**

COMPUESTO	Longitud de onda máxima de excitación ( $\lambda_{exc.}$ )	Longitud de onda máxima de emisión ( $\lambda_{emi.}$ )
DFMBA-NBD N-METIL-NBD PHE-NBD	474 nm	543 nm
UCM13	306 nm	536 nm
UCM18	422 nm	488 nm
UCM36	345 nm	502 nm
UCM52	352 nm	494 nm
UCM65	409 nm	542 nm

Al contrario, UCM13 mantiene su anisotropía y no es desplazado por la presencia de PC190723, tal vez por estar formando agregados de FtsZ, y UCM18 y UCM52 presentan altos valores de anisotropía cuando están en su forma libre posiblemente por agregación de los mismos, mientras que en UCM36 y UCM65 no hay variación significativa de la anisotropía tras la adición de ninguno de los componentes (**Tabla 13**).

Se analizó el efecto de estos compuestos sobre el ensamblaje de Bs-FtsZ y únicamente UCM36 y DFMBA-NBD (**figura 47-I**) inducen polimerización en presencia de magnesio y GMPCPP respecto a un control en ausencia de compuesto. Este resultado es similar al que se obtuvo con PC190723 (Andreu et al., 2010).

Tabla 13. Anisotropía de los compuestos fluorescentes derivados de benzamidas

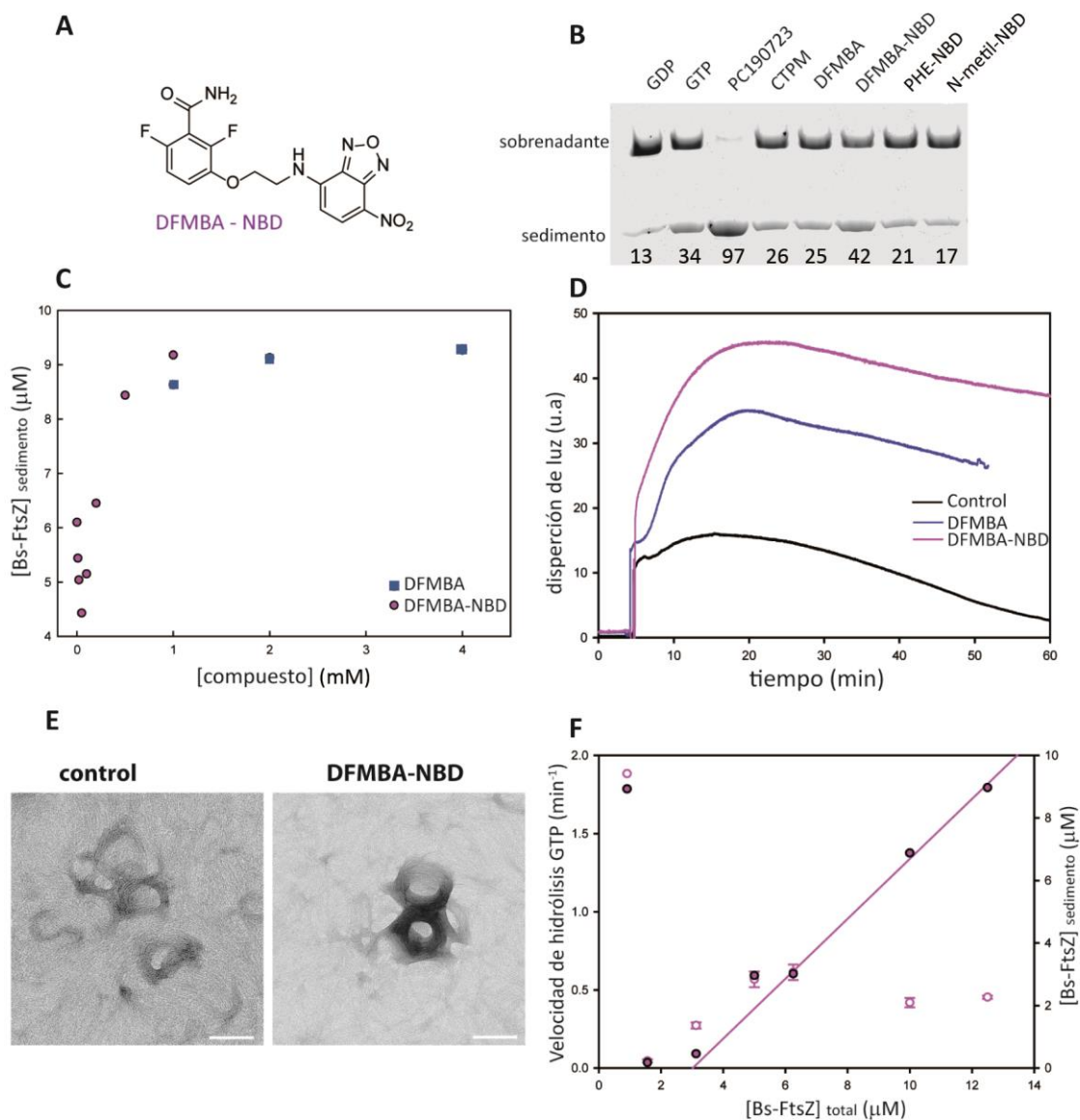
	ANISOTROPÍA (r)					
	DFMBA-NBD	UCM13	UCM18	UCM36	UCM52	UCM65
<b>compuesto</b>	0.026 ± 0.001	0.012	0.125	0.083	0.154	0.017
<b>+ BsFtsZ</b>	0.034 ± 0.001	0.036	0.133	0.085	0.164	0.017
<b>+ GMPCPP</b>	0.035 ± 0.001	0.049	0.139	0.086	0.171	0.016
<b>+ MgCl<sub>2</sub></b>	0.086 ± 0.004	0.115	0.149	0.084	0.188	0.022
<b>+ PC190723/8J</b>	0.036 ± 0.002	0.151	0.106	0.079	0.158	0.032
<b>compuesto + GMPCPP</b>	0.026 ± 0.001	0.012	0.100	0.077	0.150	0.020
<b>compuesto + MgCl<sub>2</sub></b>	0.034 ± 0.001	0.036	0.120	0.077	0.170	0.020
<b>compuesto + PC/8J</b>	0.035 ± 0.001	0.049	0.110	0.075	0.150	0.040
<b>mezcla sin Bs-FtsZ</b>	0.086 ± 0.004	0.115	0.140	0.077	0.160	0.050

La reacción se inició en una dilución de 10  $\mu$ M de los compuestos en tampón Hepes pH 6.8 a 25°C y las medidas de anisotropía se hicieron excitando los compuestos a sus máximas longitudes de onda (**tabla 12**). Se determinó la anisotropía sobre una muestra con tampón a la que se añadió consecutivamente Bs-FtsZ (10  $\mu$ M), GMPCPP (0.1 mM), MgCl<sub>2</sub> (10 mM) Y PC190723 o 8J (ambos a 10  $\mu$ M), como corresponda. Se realizaron también controles en ausencia de proteína registrándose la anisotropía de muestras independientes de los compuestos y en presencia de cada uno o todos los componentes del experimento.

## 2.2. Caracterización de DFMBA-NBD como sonda fluorescente del sitio de unión de PC190723

Siendo la DFMBA el fragmento principal de PC190723 y disponiendo de su derivado con el grupo fluorescente (DFMBA-NBD) (**Figura 48A**) se procedió a realizar una comparación bioquímica de ambos. En todos los experimentos se usó Bs-FtsZ (10  $\mu$ M) en tampón Hepes pH 6.8 a 25 °C. Un experimento previo de sedimentación de polímeros de Bs-FtsZ en presencia de PC190723 y sus derivados (CTPM, DFMBA, DFMBA-NBD) (20  $\mu$ M) (**Figura 48B**) había mostrado que después del PC190723, el análogo fluorescente de DFMBA fue el que más indujo la polimerización de Bs-FtsZ respecto a un control en ausencia de compuesto y 2 mM de GTP, mientras que los fragmentos control de DFMBA-NBD, el 7-nitro-N-(2-fenoxi-etil)-2,1,3-benzoxadiazol-4-amina(PHE-NBD) y el N-metil-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-amina (N-metil-NBD) no tuvieron efecto sobre la polimerización de la proteína. Titulaciones de DFMBA y DFMBA-NBD indicaron como ambos ligandos inducen la polimerización de Bs-FtsZ a concentraciones similares (**Figura 48C**), pero experimentos de dispersión de luz en presencia de ambos compuestos (500  $\mu$ M) mostraron que DFMBA-NBD tiene un mayor efecto sobre el ensamblaje de la proteína respecto a un control en ausencia de compuesto y con 2 mM de GTP (**Figura 48D**). Por microscopía electrónica no se observó variación en la morfología de los polímeros de Bs-FtsZ ni en la cantidad aparente de los mismos en presencia de DFMBA-NBD (10  $\mu$ M) y GMPCPP respecto a un control en ausencia de compuesto (**Figura 48E**). Al igual que DFMBA, su análogo fluorescente disminuyó la concentración crítica y la velocidad de hidrólisis

de GTP de Bs-FtsZ (**Tabla 12**) por lo que se perdió la correlación Cr vs. actividad GTPasa respecto al control en ausencia de compuesto (**Figura 48F**). En la especie no susceptible (*E. coli*) DFMBBA-NBD no tuvo ningún efecto sobre la actividad GTPasa (**Tabla 11**).

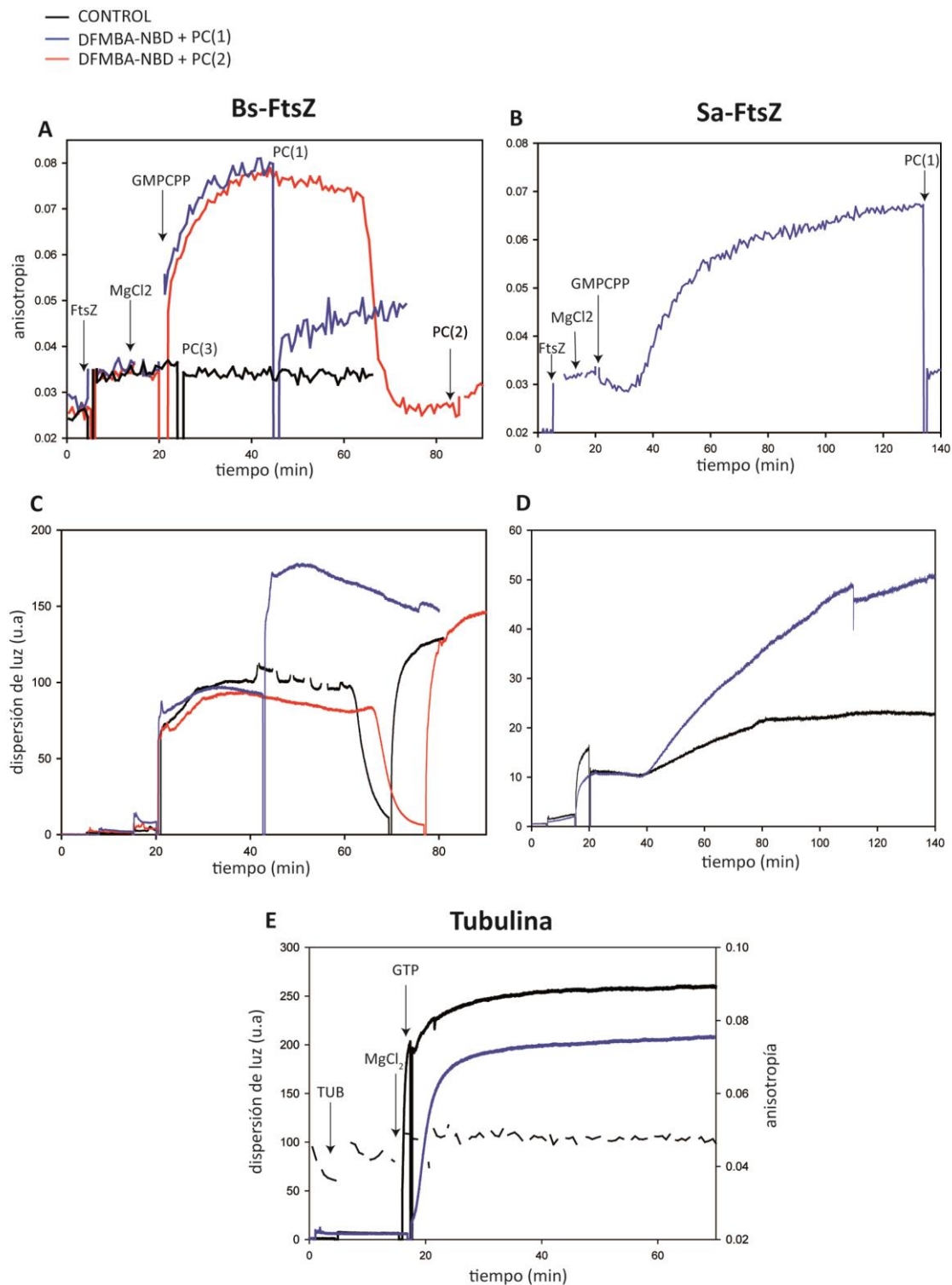


**Figura 48. El análogo fluorescente de DFMBBA tiene efecto sobre el ensamblaje y la actividad GTPasa de Bs-FtsZ.** A, estructura química de DFMBBA-NBD. B, ensayo de sedimentación comparativa con PC190723 y sus derivados, se muestran controles con GDP (1 mM), GTP (2 mM) y los fragmentos de DFMBBA-NBD. C, titulación de DFMBBA (cuadrados azules) y DFMBBA-NBD (puntos violetas). D, experimento de dispersión de luz de polímeros de Bs-FtsZ (10  $\mu\text{M}$ ) en presencia de DFMBBA (línea azul), DFMBBA-NBD (línea violeta) y un control en ausencia de compuesto y presencia de GTP (línea negra). E, micrografías electrónicas de los polímeros de Bs-FtsZ formados con GMPCPP en ausencia de compuesto (control) o en presencia de DFMBBA-NBD. F, disminución de la concentración crítica (círculos llenos) y la actividad GTPasa (círculos vacíos) de Bs-FtsZ en presencia de DFMBBA-NBD respecto a un control con GTP (figura 45B).

Los resultados encontrados previamente indicaban que el derivado de DFMBBA con el fluoróforo NBD, se une a Bs-FtsZ en condiciones de polimerización de la proteína (cuando está presente el GMPCPP y el magnesio) aumentando su anisotropía alrededor de cuatro veces respecto a su forma libre ( $R_{\text{libre}} = 0.026 \pm 0.001$ ,  $R_{\text{unida}} = 0.086 \pm 0.004$ ). La adición de PC190723 y 8J hacen que el fluoróforo disminuya su anisotropía prácticamente a los valores registrados en su forma libre ( $R = 0.036 \pm 0.002$ ) lo que indica que el derivado de DFMBBA se estaría uniendo al sitio de PC190723 de Bs-FtsZ (**Tabla 13**).

Como se indicó al inicio de este apartado, PC190723 no tiene un efecto significativo sobre el ensamblaje de Ec-FtsZ y se une posiblemente de una forma diferente (Andreu et al., 2010). Para comprobar si esto se podía extrapolar al ligando fluorescente DFMBBA-NBD se realizaron los mismos experimentos de dispersión de luz y de anisotropía en esta especie no susceptible de PC190723. Los resultados indicaron que el ligando no varía su anisotropía en presencia de la proteína (**Tabla 14**).

Finalmente se realizaron medidas de la anisotropía frente al tiempo y ensayos de dispersión de luz de Bs-FtsZ y Sa-FtsZ en presencia de DFMBBA-NBD (10  $\mu\text{M}$ ) (**Figura 49**). En todos los casos se partió del compuesto en tampón Hepes pH 6.8 para Bs-FtsZ y Mes pH 6.5 para Sa-FtsZ en presencia de un 2% de DMSO. Tras atemperar estas muestras a 25°C directamente en el espectrofluorímetro durante 5 minutos, se añadió 10  $\mu\text{M}$  de FtsZ, tras 15 minutos 10 o 6 mM de  $\text{MgCl}_2$  (para Bs-FtsZ y Sa-FtsZ respectivamente) y finalmente a los 20 minutos de incubación se inició la polimerización añadiendo 0.1 mM de GMPCPP. En los ensayos con Bs-FtsZ el experimento se realizó 3 veces y añadió PC190723: (i) añadiendo PC cuando FtsZ estaba polimerizada, PC(1); (ii) tras el desensamblaje de FtsZ por completa hidrólisis del nucleótido, PC(2) y (iii) al inicio, cuando FtsZ es todavía monomérica, PC(3). El experimento en Bs-FtsZ mostró como efectivamente existía un pequeño aumento de la anisotropía del fluoróforo cuando se añadía la proteína, y dicha anisotropía aumentaba significativamente cuando se añadía a la mezcla el magnesio y el nucleótido (**figura 49A, línea roja**). Es decir, el aumento de la anisotropía está acoplado a la polimerización de Bs-FtsZ (**figura 49C, línea roja**), puesto que al desensamblar la proteína por agotamiento del GTP del medio, los valores de anisotropía experimentan una disminución simultánea. Cuando se añade el PC190723 se observa un descenso en el valor de anisotropía tanto en la forma ensamblada (PC (1)) como desensamblada (PC (2)) como resultado del desplazamiento de fluoróforo. Existe, sin embargo, un incremento en el ensamblaje de Bs-FtsZ debido al efecto estabilizante del compuesto (Andreu et al., 2010) (**figura 49AyC, línea azul y roja**).



**Figura 49. Relación entre la variación de anisotropía de la sonda fluorescente DFMBA-NBD y el ensamblaje de Bs-FtsZ y Sa-FtsZ.** A y C muestran la variación de la anisotropía frente al tiempo y los ensayos de dispersión de luz de Bs-FtsZ en presencia de DFMBA-NBD. El tiempo en el que se añaden los distintos componentes es el mismo y se indica en A. La línea negra muestra un control en ausencia de GMPCPP (A) y sin compuesto (C), la línea azul representa la muestra en la que se añade PC190723 en condiciones de polimerización de FtsZ (PC(1)) y la línea roja cuando se añade en condiciones de despolimerización de FtsZ (PC(2)). B y D muestran ensayos de dispersión de luz y variaciones de la anisotropía frente al tiempo de Sa-FtsZ en presencia de DFMBA-NBD. La equivalencia de las líneas es igual que para los experimentos con Bs-FtsZ. E, un control de dispersión de luz realizado con tubulina en presencia de GTP (línea negra) o GTP y DFMBA-NBD (línea azul). La anisotropía se muestra en línea negra discontinua.

El ligero aumento de anisotropía registrada al añadir la proteína y en ausencia de GMPCPP y  $MgCl_2$ , podría indicar una posible unión del fluoróforo al monómero de FtsZ. Para comprobarlo se añadió PC190723 (PC(3)) a la muestra en condiciones de no ensamblaje y se observó que la anisotropía no disminuía a los valores iniciales indicando que se trata de una unión inespecífica (**figura 49A, línea negra**). Estos resultados están de acuerdo con que este compuesto se une más al polímero que al monómero que FtsZ (Andreu et al., 2010). Los resultados en Sa-FtsZ fueron semejantes a los vistos con FtsZ de *B.subtilis* en cuanto a la variación de la anisotropía (**figura 49B y D**) observándose que esta también está ligada a la polimerización de la proteína. La adición de PC190723 en la forma polimerizada de la proteína también llevó a una disminución en los valores de anisotropía (**Tabla 14**).

Los ensayos de dispersión de luz de Bs-FtsZ en presencia de la sonda se registraron a longitudes de onda de emisión y excitación de 450 nm, zona donde no absorbe el fluoróforo; mientras que para el registro de anisotropía se usaron longitud de onda de emisión y excitación características de DFMBA-NBD (**Tabla 12**). Para controlar que las variaciones de anisotropía no se deben a una interferencia de luz polarizada dispersada por los polímeros de proteína y que puedan afectar a las medidas realizadas con la sonda, se realizó el mismo experimento con tubulina (cuya dispersión de luz es muy alta cuando forma microtubulos). Para ello, muestras de 10  $\mu M$  de DFMBA-NBD se incubaron 5 minutos a 37°C en tampón GAB, a los 5 minutos se añadió la proteína (15  $\mu M$ ), tras 15 minutos más se añadió 6 mM de  $MgCl_2$  y a los 20 minutos 0.9 mM de GTP. El registro de la dispersión de luz (**Figura 49E**) mostró un aumento en el ensamblaje de la proteína (formación de microtubulos) mientras que las medidas de anisotropía no variaron (**Figura 49E**), lo que indica que la unión de la sonda es específica para FtsZ y su medida no se ve afectada por interferencia de luz dispersa.

Con los resultados que tenemos hasta el momento podemos decir que hemos encontrado una sonda fluorescente derivada de PC190723, que se une a su sitio de unión y que nos permite registrar, además de variaciones de anisotropía, el ensamblaje de la proteína. También resulta ser un ligando específico que se une a FtsZ de las especies sensibles a PC190723, como se ha comprobado durante este trabajo.

**Tabla 14. Anisotropía de DFMBBA-NBD y sus fragmentos en presencia de FtsZ de distintos experimentos.**

Proteína	ANISOTROÍA DE DFMBBA-NBD		ANISOTROÍA N-metil-NBD	ANISOTROÍA PHE-NBD
	Sa-FtsZ	Ec-FtsZ	Bs-FtsZ	Bs-FtsZ
<b>compuesto</b>	0.025	0.024	0.014	0.067
<b>+ FtsZ</b>	0.013	0.031	0.016	0.087
<b>+ GMPCPP</b>	0.032	0.029	0.017	0.112
<b>+ MgCl<sub>2</sub></b>	0.065	0.029	0.017	0.115
<b>+ PC190723</b>	0.036	0.023	0.019	0.081

Se muestran los valores de anisotropía de DFMBBA-NBD (10  $\mu$ M) con Sa-FtsZ y Ec-FtsZ; y de los fragmentos de DFMBBA-NBD: N-metil-NBD y PHE-NBD a modo de control para los experimentos realizados en Bs-FtsZ. El registro se hizo en las mismas condiciones explicadas en la tabla 10.

## DISCUSIÓN



## DISCUSIÓN

### 1. Las diferencias en el reconocimiento molecular de los derivados de GTP en posición 8 y su posible mecanismo de inhibición del ensamblaje de FtsZ

Los análogos de GTP con sustituciones en el carbono 8 inhiben la polimerización y actividad GTPasa de Ec-FtsZ mientras que permiten el ensamblaje de la tubulina eucariota (Lappchen et al., 2008), lo cual podría ser utilizado como base para dar origen a una nueva generación de antibióticos. Sin embargo, aún no se ha esclarecido porqué estos nucleótidos modificados inhiben el ensamblaje de la proteína. Partiendo de estas premisas y sabiendo que el sitio del nucleótido de FtsZ de las distintas especies está muy conservado (Oliva et al., 2004) se esperaba que el efecto y unión de los análogos de GTP sustituidos en el C8 en FtsZ de las distintas especies fuera similar. No siendo así, el estudio de las posibles diferencias aporta información para el diseño racional de nuevos compuestos inhibidores de FtsZ que se unan al sitio del nucleótido de la proteína.

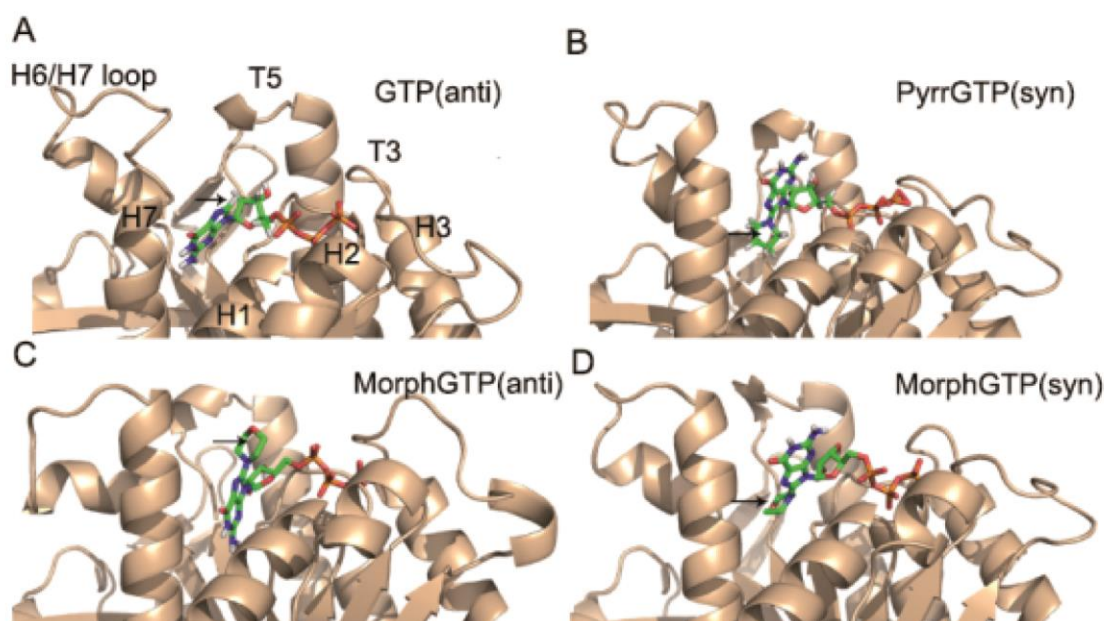
Los análogos de GTP del estudio (MorphGTP, PyrrGTP, BrGTP y MeOGTP) reemplazan el nucleótido unido a FtsZ de una especie bacteriana, *B.subtilis*, y de una arqueobacteria, *M.jannaschii*, con un rango de afinidades de entre  $10^6$  y  $10^8$   $M^{-1}$ , y alguno de ellos tiene una afinidad de unión muy cercana a la delGTP. Las afinidades de unión determinadas cumplieron dos características importantes: (i) fueron similares para FtsZ de ambas especies lo que es compatible con la conservación estructural del sitio de unión del nucleótido en proteínas de distintos organismos y (ii) alcanzaron valores altos lo cual es un requisito para el desarrollo de ligandos hacia potenciales fármacos (Schon et al., 2011; Wells and McClendon, 2007). Sin embargo, estos ligandos cargados negativamente presentan la desventaja de carecer de actividad antibacteriana, posiblemente por no pasar la pared celular (Lappchen, 2008. Tesis).

Se ha demostrado que los ligandos tienen la capacidad de inhibir la polimerización de FtsZ de especies bacterianas y observamos que la intensidad de inhibición correlaciona con la afinidad por el sitio de unión. Sorprendentemente, MorphGTP no inhibe la polimerización de FtsZ de la arqueobacteria *M.jannaschii* induce su ensamblaje hacia la formación de unos polímeros diferentes, es decir, hay una correlación inversa entre su capacidad inhibitoria y la afinidad de unión. Esto indicó diferencias en la forma de unión de los ligandos a FtsZ de

bacterias y arqueobacterias, posiblemente por diferencias en la interfaz de asociación de los monómeros consecutivos durante la formación de protofilamentos.

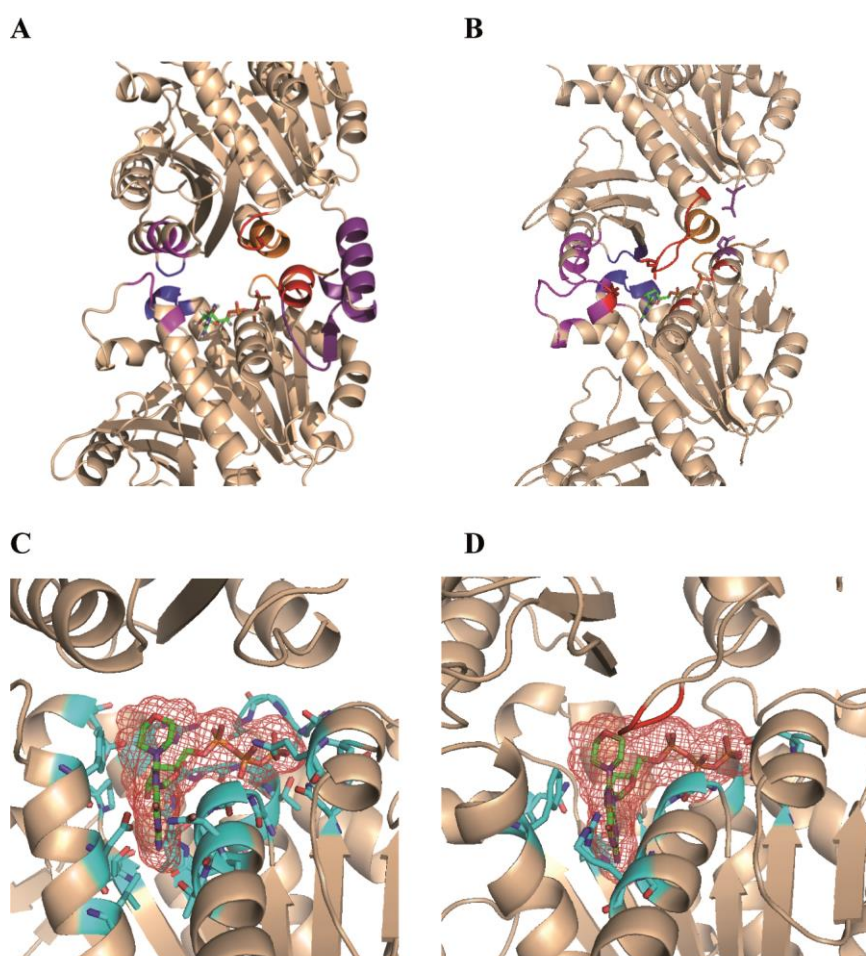
Los resultados de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) obtenidos durante la colaboración con el grupo de Jesús Jiménez Barbero (CIB-CSIC), permitieron establecer la conformación geométrica “anti” y “syn” de los nucleótidos en su estado libre, el epítipo de unión de los ligandos a ambas proteínas y la conformación de los ligandos en su forma unida a FtsZ de *M.jannaschii* y *B.subtilis* (**Figuras 17 y 18, Tabla 4**). Mediante métodos de modelado molecular observamos que el GTP se une en su forma “anti” a los monómeros de Mj-FtsZ manteniendo la conformación que tiene en su estado libre (**Figura 50A**) y el modelo del complejo es similar a la estructura cristalográfica descrita previamente (PDB 1W5A). PyrrGTP adopta una conformación “syn” manteniendo la que presenta en su estado libre (**Figura 50B**) y MorphGTP pasa de tener una conformación “syn” en solución a unirse a Mj-FtsZ en sus formas “anti” y “syn” (**Figura 50C y D**).

Las simulaciones de dinámica molecular muestran que el PyrrGTP y el MorphGTP sufren grandes reajustes hasta acomodarse en el sitio del nucleótido debido a que poseen grandes reajustes hasta acomodarse en el sitio del nucleótido debido a que poseen sustituyentes voluminosos como parte de su estructura química. En el modelo, la conformación “anti” del MorphGTP presenta mejores interacciones intermoleculares con la proteína y se observa que la parte de la molécula común con el nucleótido establece uniones débiles entre su fosfato gamma y el bucle T3 de FtsZ, de igual forma que ocurre con el GTP. La conformación que adopta este ligando en su forma unida a la proteína es similar a la que adopta el GTP en FtsZ y se asemeja bastante a la estructura cristalográfica del complejo FtsZ de *Aquifex aeolicus* con MorphGTP (PDB 2R75) (Lappchen et al., 2008). En la estructura cristalográfica del complejo, el anillo de morfolino, en ángulo de 55° respecto al plano de la guanina, se encuentra orientado hacia el exterior del sitio del nucleótido y además, la densidad electrónica de este grupo es menor a la del resto de la molécula lo que indica cierta flexibilidad. En el caso de Bs-FtsZ, el PyrrGMP es reconocido por la proteína en su conformación “syn” al igual que en su estado libre, pero MorphGMP sólo se une a FtsZ en su conformación “anti” (diferente a la conformación que tiene en su estado libre).



**Figura 50.** Posiciones de unión de los análogos de GTP con sustituciones en el carbono 8 a Mj-FtsZ en el sitio de unión del nucleótido. Se muestra la estructura del sitio de unión del nucleótido de Bs-FtsZ, obtenido a partir de simulaciones de dinámica molecular con GTP (A), PyrrGTP (B), MorphGTP en configuración anti (C) y syn (D).

El análisis de la unión de los análogos de GTP a dímeros de Mj-FtsZ se realizó mediante ajuste molecular y simulaciones de dinámica molecular en base a la estructura cristalográfica del dímero de Mj-FtsZ con GTP unido (**figura 51A**). Los resultados mostraron que los ligandos tanto en su conformación “anti” como en su conformación “syn” se acomodan en la interfaz de asociación entre los monómeros de la proteína e inducen cambios de tamaño, de forma e incluso en la superficie electrostática de la misma (**figura 51C**). Se comprobó además que los dos monómeros no se aproximan durante el tiempo en el que se llevaron a cabo las simulaciones de dinámica molecular. Con lo anterior se concluye que la inhibición del ensamblaje de la proteína no está relacionada con la conformación “anti” y “syn” en la que se unen los ligandos y se propone que debe existir una reestructuración en la superficie de contacto monómero – monómero de la proteína en presencia de los análogos C8. Este reajuste podría ser debido a (i) cambios electrostáticos como los observados con el MorphGTP o debidos a la orientación de los grupos guanina hacia la interfaz, o (ii) pequeños desplazamientos del extremo N-terminal de la hélice H7 o el bucle T3 en FtsZ debido a la interacción con los ligandos. Si esto fuera así, sugerimos que el efecto del MorphGTP sobre el ensamblaje de Mj-FtsZ podría ser debido a que este ligando genera un reajuste en la superficie de contacto de los monómeros de la proteína inactivando su función y conduciendo a la formación de polímeros curvados anómalos similares a los formados en presencia de GDP (Huecas et al., 2008) y a aquellos relacionados con los mutantes del dominio C-terminal G320V y H288A de Mj-FtsZ (Martin-Galiano et al., 2010).



**Figura 51. Modelo de unión de los C8 derivados a Mj-FtsZ y Bs-FtsZ.** *A*, estructura del dímero de Mj-FtsZ con GTP unido (PDB 1W5A); se muestran los contactos proteína-proteína en color naranja y morado. *B*, estructura del dímero de Bs-FtsZ (PDB 2VXY) modelado por homología con la estructura cristalográfica de filamentos de Sa-FtsZ (PDB 3VO8; reemplazando el GDP por GTP); también se indican los contactos entre ambos monómeros en color. *C*, Dímero de Mj-FtsZ (*A*) con MorphGTP en su conformación anti. El ligando se encuentra englobado en una malla roja y los contactos que establece con la proteína se señalan con barras magenta. *D*, se muestra una superposición del MorphGTP en su conformación anti en el modelo del dímero de Bs-FtsZ (*B*); en rojo se muestran los aminoácidos principales del bucle T7 (Ile207, Asn208) del monómero superior de FtsZ que interactúan con el MorphGTP.

En Bs-FtsZ el ajuste molecular se realizó sobre la estructura cristalográfica de un dímero de la proteína (PDB 2VXY) modelado por homología utilizando la estructura del filamento de Sa-FtsZ (PDB 3VO8, cambiando el GDP por GTP) (**figura 51B**). Los resultados indican que los análogos de GTP sustituidos en C8 no caben dentro de la interfaz de los monómeros de Bs-FtsZ (**figura 51D**), por lo que interfieren con la interacción proteína – proteína y con ello inhiben el ensamblaje de FtsZ.

Los estudios realizados con los análogos de GTP han demostrado que existen diferencias en el sitio de unión del nucleótido entre las FtsZ de bacterias y arqueobacterias. La exploración de este sitio de unión resulta relevante no sólo para optimizar este tipo de ligandos, sino para tener un mejor conocimiento de la actividad de la proteína. Aunque se ha hecho un estudio en profundidad de la unión de los análogos de nucleótido a FtsZ, aún queda mucho por saber del mecanismo estructural de la inhibición del ensamblaje de FtsZ por parte de estos compuestos. Respecto a la optimización de compuestos análogos de GTP, es necesario reconducir la síntesis hacia la obtención de compuestos que atraviesen la pared bacteriana (no siendo el caso de los compuestos en estudio) y que presenten una buena actividad antimicrobiana.

## **2. El inhibidor de la división celular bacteriana PC170942 se une fuera del sitio del nucleótido de FtsZ**

Sabiendo el efecto de algunos compuestos análogos del GTP sobre el ensamblaje de FtsZ, nuestro siguiente paso fue la búsqueda de compuestos químicamente diferentes al nucleótido que pudieran reemplazar al GTP en su sitio de unión e inhibieran la función de la proteína. Se han descrito en la literatura muchos compuestos sintéticos de pequeño tamaño que funcionan como inhibidores de la citoquinesis bacteriana (Sass and Brotz-Oesterhelt, 2013; Schaffner-Barbero et al., 2012; Vollmer, 2006). Uno de estos compuestos fue PC170942, obtenido a partir de un cribado para la identificación de inhibidores de la división celular bacteriana, basado en la activación del factor  $\sigma^F$  durante la esporulación de *B.subtilis* y cuyas mutaciones de resistencia mapearon alrededor del sitio de unión de GTP (Stokes et al., 2005). Hemos observado que *in vitro*, este compuesto inhibe un 50% la actividad GTPasa de FtsZ y su efecto está ligado a una reducción del ensamblaje de Bs-FtsZ ya que impide la formación de polímeros de la proteína. *In vivo*, el compuesto impide la división de células de *B.subtilis* e induce a su filamentación. En nuestro ensayo de competición con *mant*-GTP el compuesto no se unió al sitio del nucleótido de Bs-FtsZ, el compuesto es muy poco soluble lo que podría interferir con la medida de unión si la interacción con el sitio fuera muy débil. Sin embargo esto es improbable ya que en los experimentos *in vitro* se detectaron correctamente los efectos del compuesto a baja concentración. Como se ha comentado, la activación de la actividad GTPasa de FtsZ está ligada a su polimerización y el sitio de unión del nucleótido se completa cuando la proteína ensambla (Oliva et al., 2004). PC170942 afecta la actividad GTPasa de la proteína y consecuentemente su ensamblaje. Si el compuesto no se une al sitio del nucleótido, las únicas posibilidades para explicar su efecto serían que bien se estuviera uniendo a un sitio cercano de la interfaz de polimerización afectando el ensamblaje, o bien se

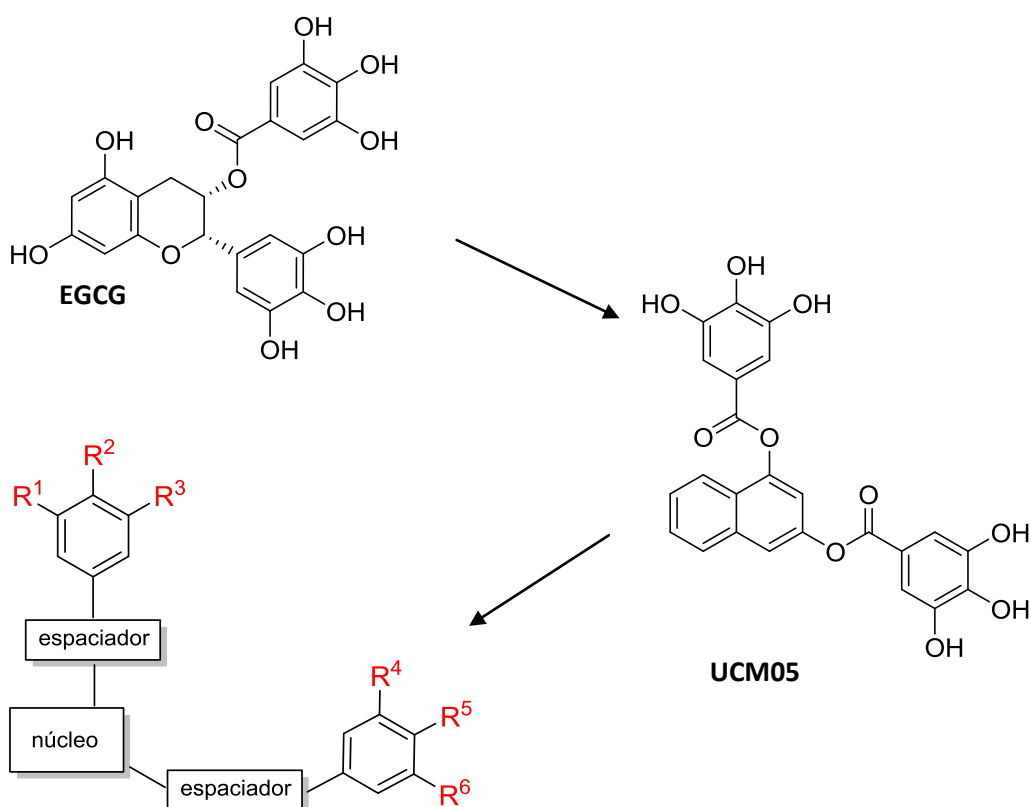
alojara en un sitio alejado pero su unión provocara un efecto alostérico sobre la interfaz de polimerización. Así pues, PC170942 podría ser un interesante inhibidor del ensamblaje de Bs-FtsZ que posiblemente se una a un nuevo sitio aún no descrito en la interfaz de asociación de los monómeros de FtsZ. Para nuestro estudio de ligandos que se unan al sitio de nucleótido, PC170942 es periférico pero hemos dejado constancia de los resultados obtenidos esperando poder investigar este tipo de inhibidores de FtsZ más en detalle.

### 3. Inhibidores polifenólicos de FtsZ

Los compuestos polifenólicos constituyen una clase de metabolitos secundarios que abundan en alimentos derivados de fuentes vegetales (Wood et al., 2001). Los polifenoles comprenden un amplio rango de sustancias dentro de los que se encuentran los flavonoides, isoflavonoides, antraquinonas, antocianidinas y resveratrol entre otros. Este tipo de ligandos poseen una gran capacidad antioxidante, de hecho, el contenido de compuestos fenólicos y flavonoides está relacionado directamente con la actividad antioxidante del organismo que los contiene (Benedec et al., 2013). Durante los últimos años, también han pasado a ser objeto de estudio debido a sus propiedades antimicrobianas sobre algunas especies del género *Achillea* (Benedec et al., 2013; Kotan et al., 2010; Kundakovic et al., 2005), bacterias Gram-positivas (*Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*) e incluso por sus efectos antifúngicos contra *Candida albicans* (Jobim et al., 2013).

Varios fenoles y polifenoles han sido descritos previamente en la literatura como inhibidores de FtsZ, dentro de los que encontramos la viriditoxina, zantrinas 1 y 4, totarol, curcumina, ácido caféico y ácido clorogénico, aunque de la mayoría de estos compuestos no se conoce su sitio de unión a la proteína (Schaffner-Barbero et al., 2012). Ensayos realizados en FtsZ de *E.coli* mostraron como la curcumina inhibe el ensamblaje y la actividad GTPasa de la proteína y se une a FtsZ con una constante de disociación,  $K_d = 7.3 \pm 1.8 \mu\text{M}$  (Kaur et al., 2010; Rai et al., 2008). El ácido caféico y el ácido clorogénico (probados a concentraciones de 100  $\mu\text{M}$ ) también impiden el ensamblaje y reducen la actividad GTPasa de FtsZ como se describe (Hemaiswarya et al., 2011). Sin embargo, en nuestros ensayos de desplazamiento de *mant*-GTP y  $^3\text{H}$ -GTP ninguno de estos ligandos se unió al sitio del nucleótido de Bs-FtsZ. Sería necesario analizar el efecto de los ligandos sobre el ensamblaje y la actividad GTPasa de Bs-FtsZ para comprobar si actúan de igual manera que sobre Ec-FtsZ.

Continuando con nuestro estudio y a partir de un cribado de compuestos sintéticos de la biblioteca del laboratorio UCM se encontraron varios ligandos que interactuaban con la FtsZ de *B.subtilis*. Todos ellos fueron derivados del (-)-epigallocatequina-3-galato (EGCG) que es la principal catequina polifenólica presente en el té verde. A partir del EGCG se sintetizó el compuesto UCM05 por una reacción de esterificación donde se sustituyó el núcleo central por un anillo de naftaleno (Puig et al., 2008; Turrado et al., 2012) (**Figura 52**). Las modificaciones de UCM05 en su núcleo central, en sus espaciadores y en sus brazos de galato dieron origen a los distintos compuestos ensayados en esta Tesis que se sintetizaron con el fin de optimizar el ligando para mejorar la afinidad al sitio del nucleótido, la actividad antimicrobiana y la especificidad frente a nuestra diana bacteriana.



**Figura 52.** Esquema de modificaciones de EGCG, UCM05 y sus derivados. La modificación del núcleo central de EGCG dio origen a UCM05 y modificaciones sistemáticas del mismo en su núcleo, sus espaciadores o en sus dos anillos fenólicos dieron origen a los distintos compuestos UCM ensayados.

#### 4. UCM05 y UCM44 reemplazan al nucleótido unido a Bs-FtsZ

El método de desplazamiento de *mant*-GTP permite la medida indirecta de la unión de compuestos que se unen al sitio de GTP de FtsZ aunque estos ligandos tengan una estructura química diferente a los nucleótidos (Schaffner-Barbero et al., 2010). La determinación de las constantes de unión al sitio del nucleótido de un primer grupo de ligandos mostró que UCM05 es el compuesto más afín con una  $K_b$  de  $(4.30 \pm 0.04) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  y sus fragmentos principales UCM16 y UCM17 retienen parte de esta afinidad ( $(3.0 \pm 0.9) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  y  $(3.9 \pm 1.3) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  respectivamente). El fragmento parental, EGCG y los fragmentos secundarios de UCM05 pierden prácticamente por completo su afinidad al sitio del nucleótido en Bs-FtsZ.

Para una primera caracterización de la unión de UCM05 a FtsZ, se sintetizaron dos nuevos análogos que presentaban mayor afinidad de unión al sitio del nucleótido: UCM44 y UCM53 ( $(1.5 \pm 0.3) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$  y  $(1.3 \pm 0.2) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$  respectivamente). El método de *mant*-GTP se validó con ensayos radiactivos empleando  $^3\text{H}$ -GTP con el que se obtuvieron constantes de afinidad similares. Los experimentos de espectroscopía de absorción diferencial y ultracentrifugación analítica permitieron medir la unión directa de los compuestos al sitio de unión de GTP; UCM44 presentó una estequiometría de unión a la proteína de 1:1. Además se mostró que los compuestos inducen a la dimerización de la proteína, lo que resulta importante a la hora de valorar el efecto de los ligandos sobre el ensamblaje de FtsZ (que se discutirá más adelante).

Teniendo la certeza de la unión de los compuestos a la proteína de forma excluyente con el nucleótido, la hipótesis más sencilla es que la interacción se produzca en el mismo sitio del nucleótido, aunque tampoco se podría descartar una inhibición alostérica. Por ello nos planteamos analizar los posibles modos de unión de los compuestos a Bs-FtsZ mediante ajuste molecular y simulaciones de dinámica molecular. Cuando UCM05 y UCM44 se sometieron al ajuste molecular y a las simulaciones de dinámica molecular en el receptor, se observó que al igual que ocurre con el GDP, los ligandos oscilan dentro del sitio del nucleótido. Durante los 100 ns estos se estabilizaban y se acomodan en el sitio en dos posiciones diferentes. En la primera, los anillos de naftaleno establecen contacto con las hélices H7 y H5 presentes en el bolsillo hidrofóbico del sitio del nucleótido de la proteína, y en la segunda, el naftaleno se localiza en una región más profunda del bolsillo del nucleótido interactuando con los bucles T1, T4 y T5 de FtsZ (**Figura 20 y Anexo 3**). Aun así, no se pueden descartar otros modos de unión del ligando a la proteína que se diferencien de los propuestos en el modelo; aunque siendo tan similares las interacciones ligando – receptor a las observadas con el GDP, el

modelo muestra el mecanismo potencial de inhibición de los compuestos. Nuestro modelo tampoco aclara las posibles diferencias en el modo de unión de los ligando a Bs-FtsZ y Mj-FtsZ que pudiera esclarecer los distintos efectos de los compuestos sobre el ensamblaje de ambas proteínas (como se discutirá posteriormente), ya que la unión de los compuestos al sitio del nucleótido de los monómeros de Bs-FtsZ y Mj-FtsZ es prácticamente idéntica. Pensamos que las diferencias del efecto ejercido por los ligandos sobre el ensamblaje de ambas proteínas podría deberse a que estos se unen a la interfaz de polimerización de los filamentos de FtsZ de forma distinta y alteren su dinámica de ensamblaje.

## 5. UCM05 y UCM44 alteran el ensamblaje de FtsZ

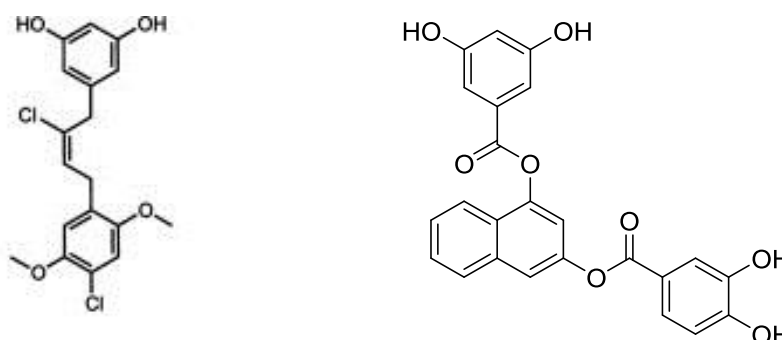
UCM05 y UCM44 modifican el ensamblaje de FtsZ de *B.subtilis*. En condiciones en las que se facilita la interacción del ligando con el sitio del nucleótido (baja concentración de GTP) los compuestos se comportan como inhibidores de la polimerización de la proteína, reduciendo significativamente la dispersión de luz de los polímeros y más débilmente la fracción de proteína sedimentada; además inducen la formación de polímeros desordenados o agregados de FtsZ. En exceso de GTP, los compuestos disminuyen la actividad GTPasa de la proteína (50%) y estabilizan los polímeros de Bs-FtsZ reduciendo la relación polimerización / despolimerización. Nos preguntamos por qué los compuestos tenían un efecto tan débil en los experimentos de sedimentación de polímeros de FtsZ comparado con el efecto del GTP y llegamos a la conclusión de que esto es debido a que los ligandos tienen menor afinidad de unión por el sitio del nucleótido que su competidor (GTP). Con concentraciones de 50  $\mu$ M de UCM05 y 50  $\mu$ M de GTP solo un 1.4 % de moléculas de FtsZ se encuentran unidas a UCM05. En base a lo encontrado concluimos que los compuestos actúan como inhibidores del ensamblaje de Bs-FtsZ y además considerando los resultados obtenidos por ultracentrifugación analítica especulamos que el primer paso para que los compuestos actúen como inhibidores del ensamblaje de Bs-FtsZ es la inducción a la dimerización de la proteína. El efecto de los ligandos sobre el ensamblaje de FtsZ de *E.coli* es más débil que el encontrado en Bs-FtsZ. Tanto en condiciones en las que se favorece la unión del ligando a la proteína como en exceso de GTP, los ligandos se comportan como inhibidores débiles sobre el ensamblaje de FtsZ de esta especie posiblemente al no ser lo suficientemente afines para ejercer su efecto.

Estos compuestos sin embargo tuvieron efectos muy diferentes sobre el ensamblaje de FtsZ de la arqueobacteria *M.jannaschii*. UCM05 y UCM44 se comportan claramente como inductores de la polimerización de la proteína y este efecto se puede ver incluso en ausencia

de GTP. En ausencia de GTP y presencia de magnesio, los compuestos inducen la formación de estructuras ordenadas muy características. El análisis de imágenes de estos polímeros obtenidas por microscopía electrónica es compatible con la formación de dos tipos de estructuras: (i) un par de protofilamentos o; (ii) la imagen en proyección de tubos huecos formados por de 5 a 7 monómeros por vuelta (cuyo valor es muy cercano al ancho de  $\sim 15$  nm observado) que son diferentes de los filamentos (manojos) que forma la proteína con GTP en las mismas condiciones. Observamos que UCM05 y UCM44 inducen un ensamblaje de tipo cooperativo de la proteína con una concentración crítica que se reduce a la mitad respecto al control con GTP.

UCM05 y UCM44 inducen el ensamblaje de Mj-FtsZ y se unen al sitio del nucleótido de FtsZ. Las posibles causas de la diferencia entre el efecto que se observa en FtsZ de las especies bacterianas y la de la arqueobacteria no están muy claras, pero la unión de los ligandos a Mj-FtsZ debe inducir algún cambio conformacional de la proteína, que difiere del inducido por GTP que permita la formación de este tipo de estructuras poliméricas (tal vez ocurra algo parecido a lo que ocurre con los C8 derivados). Si esto fuera así indicaría que la unión de los compuestos a Bs-FtsZ tendría consecuencias más drásticas sobre la dinámica de ensamblaje de la proteína que impedirían la formación de polímeros ordenados conduciendo a la formación de estructuras desordenadas.

Los resultados obtenidos indican que estos ligandos reemplazan al GTP de su sitio de unión a FtsZ. Esto está apoyado por la reciente descripción del compuesto hemi-crisofaentina (Keffer et al., 2013) (**figura 53**), un fragmento sintético de la crisofaentina A descrito como inhibidor de FtsZ (Plaza et al., 2010). La hemi-crisofaentina está compuesta de un anillo de benceno y un anillo fenólico separados por un espaciador. Los hidroxilos del anillo fenólico del compuesto se disponen en las mismas posiciones que en UCM44, por lo que resulta interesante comparar ambos ligandos. Como se ha comprobado en nuestro laboratorio, la hemi-crisofaentina se une al sitio del nucleótido de Bs-FtsZ con una  $K_b = 1.5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$  (un orden de magnitud por debajo de UCM44) y tiene actividad antimicrobiana frente a un amplio panel de bacterias Gram-positivas. *In vitro*, el compuesto reduce la actividad GTPasa y la polimerización de la proteína, mientras que *in vivo* altera la localización de FtsZ y por consiguiente la formación del anillo Z (Keffer et al., 2013).



**Figura 53.** Estructura química de la hemi-crisofaentina (a la izquierda) y del compuestos UCM44 (a la derecha).

Siendo la tubulina una proteína estructuralmente homóloga a FtsZ, y sabiendo que los derivados de GTP sustituidos en el carbono 8 inhiben selectivamente nuestra diana bacteriana frente a tubulina, otro de nuestros objetivos fue conocer el efecto de los ligandos UCM sobre el ensamblaje *in vitro* de la tubulina. Mediante los experimentos de dispersión de luz de microtúbulos de tubulina, observamos que UCM05, sus fragmentos UCM16 y UCM17 y sus análogos UCM44 y UCM53 no inhiben el ensamblaje de la proteína a las concentraciones en que tienen efecto sobre FtsZ. En los ensayos en los que se probaron altas concentraciones de UCM05 y UCM53 observamos que los ligandos inhiben la polimerización y formación de microtubulos, pero aún así no podemos descartar ninguno de estos como compuestos activos (hits) ya que bajas concentraciones de los compuestos muestran efecto inhibitorio sobre FtsZ, actividad antimicrobiana y selectividad frente a FtsZ.

## 6. UCM05, UCM44 y UCM53 como inhibidores de la división celular bacteriana

Mediante experimentos *in vivo* se ha demostrado que UCM05, UCM44 y UCM53 inhiben la división celular bacteriana y tienen actividad antimicrobiana frente a patógenos Gram-positivos (resistentes a antibióticos). Los valores de MIC indican que UCM53 mejora la actividad antimicrobiana frente a células de *B.subtilis* (MIC = 13  $\mu$ M) en casi 7 veces respecto a UCM05. UCM44 y UCM53, son además activos frente a cepas de *S.aureus* resistentes a meticilina (MRSA) (MIC<sub>MRSA</sub> = 18  $\mu$ M). Los tres compuestos sin embargo son poco activos frente a patógenos Gram-negativos lo cual se podría explicar porque estos contienen una membrana externa impermeable que sirve como barrera para muchas moléculas pequeñas. Estos ligandos podrían atravesar la membrana externa a través de porinas (por difusión pasiva)

o por bombas de eflujo cuyas mutaciones están a menudo presentes en bacterias resistentes a antibióticos (O'Shea y Moser, 2008).

El efecto de pequeñas moléculas inhibitoras de FtsZ se ha estudiado mediante la observación de la actividad de la proteína *in vitro* e *in vivo* (Adams et al., 2011; Beuria et al., 2005; Domadia et al., 2007; Jaiswal et al., 2007; Margalit et al., 2004; Wang et al., 2003). *In vivo*, el efecto de inhibidores sobre la actividad de FtsZ se puede analizar, además de por la determinación de la MIC, mediante dos observaciones fenotípicas: (i) filamentación celular ya que las células no pueden dividirse y (ii) deslocalización de FtsZ. En nuestro caso, los compuestos UCM inducen la filamentación de células de *B.subtilis* 168 a concentraciones inferiores a sus MIC respecto a un control sin compuesto y dicho efecto resultó más notorio con UCM44. Cuando visualizamos células con FtsZ marcada con fluorescencia (FtsZ-GFP) observamos que UCM05 y UCM44 deslocalizan la proteína desde la mitad celular hacia *foci* dispersos. Además el marcaje del nucleóide indicó que algunos compuestos alteran su tamaño (UCM05 y UCM44) y otros (UCM53) inducen su descondensación. Los compuestos parecen formar agregados en la membrana plasmática o próximos a esta, lo que podría ser interpretado como sitios de septación que se han iniciado pero han sido abortados.

Recientemente se ha descrito el potencial de membrana ( $\Delta\Psi$ ) como un factor clave para la localización de distintas proteínas que intervienen en la división celular bacteriana y que se unen a la membrana plasmática (Foss et al., 2013; Strahl and Hamoen, 2010). Algunos ionóforos como la vialomicina o la carbonil cianido m-clorofenilhidrazona (CCCP) disipan rápidamente el potencial de membrana de células de *B.subtilis* y causan la deslocalización de MinC y MinD (proteínas necesarias para la correcta localización de anillo Z), FtsA (que ancla FtsZ a la membrana plasmática) y Soj (proteína importante en la segregación cromosómica) (Strahl and Hamoen, 2010). Estos resultados podrían sugerir que los compuestos en estudio podrían también actuar como disipadores del potencial de membrana alterando la unión de FtsZ a la membrana y la localización del anillo Z, por lo que la proteína formaría *foci* dispersos en la célula. Los ligandos podrían alterar también la segregación cromosómica lo que causaría posiblemente una alteración del nucleóide que es otro de los fenotipos que se observan en presencia de los compuestos UCM. Sin embargo, en estos estudios (Foss et al., 2013; Strahl and Hamoen, 2010) no se ha observado un patrón de deslocalización de FtsZ como el que observamos con los compuestos UCM.

El efecto de los compuestos sobre la membrana también puede deberse a su naturaleza química, ya que se sabe que algunos compuestos fenólicos y sus metabolitos

desestabilizan y debilitan la membrana externa de bacterias Gram-negativa (Alakomi *et al.*, 2007 y Nohynek *et al.*, 2006). Estudios con FM 4-64 han mostrado que cuando hay una disminución de la FtsZ celulares posible detectar invaginaciones y vesículas más pequeñas que las observadas con la resolución del microscopio de fluorescencia, visualizándose *foci* de membrana muy brillantes (Pogliano *et al.*, 1999) que podrían corresponder a los agregados de membrana que observamos en presencia de los compuestos.

Finalmente, se estudió el efecto de UCM05, UCM44 y UCM53 sobre la formación de microtúbulos *in vivo*. Los microtúbulos forman una red tridimensional en el interior de las células eucariotas que interconecta con otras estructuras del citoesqueleto, siendo su función más característica la formación del huso mitótico. Muchos compuestos como la colchicina, el taxol o las epotilonas son capaces de unirse a la tubulina e inhibir o estabilizar su polimerización (Wilson and Jordan, 2004), lo que conlleva a una pérdida en las propiedades dinámicas del huso mitótico, causando el bloqueo del ciclo celular en la fase G2/M, y la apoptosis de las células cancerígenas (Alberti, 2013; Pasquier and Kavallaris, 2008).

UCM05, UCM44 y UCM53 inhiben el crecimiento de células de mamífero (IC50) a concentraciones que solapan parcialmente con los valores de inhibición del crecimiento bacteriano (MIC) (**tabla 9**), lo que indicaría en principio una baja selectividad frente a nuestra diana. Sin embargo, el índice de selectividad de los compuestos (IC50 en células normales y cancerígenas / MIC en cepas MRSA) mejora siguiendo el orden UCM05 < UCM44 < UCM53 (**tabla 8**). UCM53 mejora además la selectividad en cepas MRSA (hasta 12 veces) y en *E.faecalis* (de 8-47 veces) respecto a UCM05 por lo que resultó ser el ligando con más selectividad frente a FtsZ que a tubulina. Ninguno de estos ligandos despolimerizan los microtubulos citoplasmáticos de células A549 ni inhiben el ciclo celular en fase G2/M. Resultados similares se obtienen con los fragmentos de UCM05 (UCM16 y UCM17). Aun así, sabemos que la citotoxicidad de UCM05 es baja en modelos animales (> 70 mg/Kg en dosis diarias) (Puig *et al.*, 2009) lo que sugiere que aunque el ligando tenga baja selectividad a altas concentraciones, aun puede seguir la fase de optimización para la búsqueda de nuevos compuestos que actúen sobre nuestra diana bacteriana.

## 7. Optimización de inhibidores de la serie UCM05

En este estudio hemos encontrado un compuesto activo, UCM05, que se une al sitio del nucleótido de Bs-FtsZ, inhibiendo su ensamblaje y con actividad antimicrobiana frente a un amplio panel de bacterias patógenas. UCM05 *in vivo* deslocaliza FtsZ en células de *B.subtilis* hacia la formación de numerosos *foci* dispersos en la célula, lo que conlleva una alteración del nucleóide y una posible agregación de la membrana plasmática. Los experimentos llevados a cabo con tubulina, indican que el compuesto tiene además una selectividad alta frente a nuestra diana bacteriana. UCM05 ejerció un efecto contrario en el ensamblaje de Mj-FtsZ respecto a Bs-FtsZ lo que recuerda al efecto del MorphGTP (compuesto derivado de GTP) sobre el ensamblaje de apoMj-FtsZ. Podría ser que al igual que MorphGTP, UCM05 se una al sitio del nucleótido y altere de alguna forma la interfaz de polimerización lo que conduciría a la formación de polímeros diferentes a los observados en presencia de GTP.

La energía libre de unión de nuestro compuesto activo UCM05,  $\Delta G^\circ = -7.70 \pm 0.05 \text{ Kcal M}^{-1}$ , es bastante inferior a los valores típicos de un compuesto “cabeza de serie”,  $\Delta G^\circ = -12 \text{ a } -16 \text{ Kcal M}^{-1}$ , por lo que para su optimización será necesario mejorar los valores de afinidad a rangos superiores ( $\mu\text{M} \rightarrow \text{nM}$ ) (Carbonell and Freire, 2005; Ohtaka and Freire, 2005; Sarver et al., 2007). Sabiendo que para el diseño de nuevos inhibidores antibacterianos es necesario optimizar la afinidad del ligando al receptor (Wells and McClendon, 2007), se llevó a cabo la determinación de la constante de afinidad de los compuestos al sitio de unión del nucleótido de Bs-FtsZ como primer ensayo. Además, otro de los objetivos de este trabajo fue el estudio de la relación estructura – actividad antimicrobiana en células de *B.subtilis* de los compuestos polifenólicos derivados de UCM05.

El estudio de nuevas modificaciones del ligando de referencia se inició con la síntesis de compuestos con modificaciones importantes en la molécula: espaciadores y núcleo de naftaleno. Los espaciadores que unen los anillos fenólicos al núcleo de naftaleno son grupos éster que en general son fácilmente hidrolizables. Todos los compuestos donde el grupo éster se reemplazó por otro grupo químico (amida, sulfonamida o etileno) reducen la afinidad de unión por el sitio del nucleótido de la proteína hasta en un orden de magnitud (como en el caso de UCM76), aunque alguno mejoró su actividad antimicrobiana con una reducción significativa en los valores de MIC que llegan a ser hasta 20 veces menor que en UCM05 (**figura 39**). La explicación más probable a la mejora de la actividad antimicrobiana de estos ligandos podría no estar relacionada con el cambio de espaciador, sino tal vez con que algunos de los

compuestos tengan otra diana alternativa a FtsZ (por ello su baja afinidad de unión al sitio del nucleótido en nuestros ensayos). Un resultado semejante se obtiene cuando se reemplaza el grupo naftaleno por otro grupo químico, salvo en el caso de los compuestos UCM23 y su análogo UCM64 donde se reemplazó el naftaleno por el grupo bifenilo (**figura 38**).

Los fragmentos de UCM05 y aquellos compuestos donde sólo se cambia la posición de los anillos fenólicos sobre el núcleo de naftaleno no presentan mejor afinidad de unión al sitio del nucleótido de Bs-FtsZ ni mejoran los valores de MIC del compuesto original, indicando que las posiciones R<sup>1</sup> y R<sup>3</sup> del anillo de naftaleno presentes en UCM05 son adecuadas para la optimización química del compuesto (**figura 37**). Manteniendo las posiciones de unión de los anillos fenólicos al núcleo principal de la molécula y eliminando sistemáticamente hidroxilos se obtienen compuestos que aumentan la afinidad de unión al sitio de GTP en Bs-FtsZ respecto a UCM05. Esta aproximación nos permitió identificar los hidroxilos en posiciones R<sup>1</sup>, R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> como los principales de la molécula por lo que deben ser mantenidos para las futuras modificaciones de la estructura química. Así, los compuestos donde se mantienen hidroxilos en posiciones R<sup>1</sup>, R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> (UCM44 y UCM61) son los que presentan mayor afinidad de unión y mejor actividad antimicrobiana de esta serie de ligandos (**figura 40**). Compuestos donde se combinan grupos hidroxilo y un sustituyente de cloro en uno o ambos anillos fenólicos de la molécula (UCM53-55 y UCM77) mantienen los valores de Kb en el orden de  $\mu\text{M}$  mientras que estos valores disminuyen cuando se sustituyen dos hidroxilos de un anillo fenólico por grupos cloro (UCM47-48) (**figura 41**). Todas las modificaciones donde se reemplazan hidroxilos por sustituyentes de cloro mejoran hasta 7 veces los valores de MIC (13-50  $\mu\text{M}$ ) respecto a UCM05, pero conllevan una pérdida en solubilidad, ya que los hidroxilos ayudan a la solubilidad de los ligandos en el disolvente acuoso (**tabla 10**). Los compuestos que presentaron mejor relación entre su afinidad por el sitio del nucleótido y su actividad antimicrobiana frente a células de *B.subtilis* en comparación con UCM05, fueron aquellos en los que se realizaron modificaciones en sus grupos hidroxilo, bien eliminándolos o reemplazándolos por cloro. De esta forma, se seleccionaron los siguientes compuestos para posteriores estudios: UCM43, UCM44, UCM48, UCM53-55, UCM57, UCM59, UCM61-63 y UCM77. También se continuó con el estudio del compuesto UCM74 para ver la influencia del espaciador dentro de la estructura química del compuesto.

Actualmente uno de los mayores esfuerzos se centra en el descubrimiento de compuestos antibacterianos eficaces contra patógenos resistentes a antibióticos causantes de muchas infecciones nosocomiales en países desarrollados (Gould et al., 2012)), o bacterias patógenas Gram-negativas (que actualmente no se estén tratando con ningún antibiótico eficaz (Silver, 2011)). La determinación de la MIC de los compuestos seleccionados sobre un panel de patógenos Gram-negativos y Gram-positivos indicó que existe una relación directa entre la eliminación de hidroxilos de la molécula y la disminución en los valores de MIC tanto en MRSA como en otras bacterias Gram-positivas resistentes a antibióticos (*Enterococcus faecalis* y *Listeria monocytogenes*). Estos valores de MIC son inferiores a los que presenta la molécula de referencia (UCM05) y decrecen desde 50  $\mu$ M en aquellos compuestos donde solo se ha eliminado un hidroxilo, hasta llegar a un valor de 5  $\mu$ M en compuestos donde se han eliminado 4 hidroxilos de la molécula (**Tabla 10**). Resultados semejantes se obtienen en aquellos compuestos donde se ha introducido el grupo cloro en su estructura química, aunque no hay una relación concreta entre el número de cloros introducidos y la disminución en los valores de MIC frente a los distintos patógenos.

Dentro de la optimización de los ligandos en base a su relación estructura – actividad, se ha observado que la afinidad de los ligandos tiene relación con parámetros como el valor de MIC en las distintas especies. Este valor de MIC hace referencia a la selectividad del compuesto frente a la diana de estudio y normalmente correlaciona con la afinidad de unión del ligando al receptor (Bohm et al., 1999). En nuestro estudio se observó efectivamente una correlación entre las constantes de afinidad de unión de los compuestos al sitio del nucleótido de Bs-FtsZ y la MIC de inhibición de células de *B.subtilis* 168 y MRSA USA 300 (**Figura 42**). Esta representación indica el camino hacia donde seguir la optimización de los ligandos y los resultados muestran que se ha optimizado el ligando de referencia (UCM05) hacia compuestos con mayor afinidad y mejores valores de MIC. Sin embargo, se observa cómo algunos compuestos se desvían de la correlación (UCM23, UCM57, UCM59, UCM62, UCM63 y UCM74) lo cual podría deberse a que actúan sobre otra diana distinta FtsZ.

La visualización *in vivo* del efecto de los compuestos sobre de la filamentación y alteración de la localización de FtsZ mostraron que algunos compuestos se comportaban como bactericidas o no tenían un efecto muy claro sobre la filamentación de células de *B.subtilis* (UCM43, UCM54-55, UCM57, UCM59, UCM61-63, UCM74 y UCM77). Sugerimos que dicho efecto puede ser debido a que los ligandos lisan la bacteria antes de que ésta se crezca lo suficiente como para poder visualizar la filamentación, al contrario de lo que ocurre con los

compuestos no bactericidas que inducen filamentación de células de *B.subtilis* concentraciones inferiores a sus MIC (**tabla 9**).

Al igual que UCM05, la mayoría de compuestos (UCM44, UCM53, UCM57, UCM62-63, UCM74 y UCM77) deslocalizan FtsZ de la mitad celular hacia *foci* dispersos en toda la célula. Algunos de los compuestos (UCM53, UCM62, UCM63 y UCM77) parecen descondensar el nucleóide bacteriano y todos ellos afectan la membrana plasmática de las células de *B.subtilis*, induciendo la aparición de *foci* en zonas localizadas(**figura 43**).

La selectividad de compuestos sobre una diana específica es un parámetro difícil de conseguir especialmente en aquellos compuestos que presentan dianas pertenecientes a proteínas funcional y estructuralmente relacionadas (Kawasaki and Freire, 2011) como lo son FtsZ y tubulina. Por ello se analizó el efecto de los compuestos sobre la actividad de ambas proteínas. Los compuestos modificados son más efectivos inhibiendo el ensamblaje de Bs-FtsZ respecto a UCM05. En condiciones que se da ventaja al competidor (bajas concentraciones de GTP) UCM57, UCM59, UCM62 y UCM63 inhiben el ensamblaje de Bs-FtsZ (efecto más notorio en UCM59) y en ausencia de nucleótido los compuestos inducen la formación de polímeros desordenados o agregados de proteína. Además, estos compuestos a concentraciones en las que inhiben FtsZ, no inhiben la polimerización de la tubulina eucariota, por lo que los ligandos se unen selectivamente a nuestra diana bacteriana.

Modificaciones sistemáticas de la estructura química de los inhibidores nos ha permitido un análisis extenso de la relación estructura – actividad de numerosos compuestos derivados de UCM05. Dentro de la serie de compuestos modificados hemos encontrado:

- Compuestos que mejoraron la afinidad de UCM05 por el sitio del nucleótido de Bs-FtsZ como UCM44 y UCM61 con  $K_b = 1.5 \mu\text{M}$  y  $\Delta G^\circ \sim -8.4 \text{ Kcal M}^{-1}$  donde se han ganado  $-0.7 \text{ Kcal M}^{-1}$  respecto al ligando de referencia. En cualquier caso los valores de  $K_b$  y  $\Delta G^\circ$  aún están lejos de los valores promedio de compuestos “cabeza de serie”.
- Compuestos que mejoran notablemente la actividad antimicrobiana respecto a UCM05 como UCM62 que presenta una MIC (MRSA y *B.subtilis*) de  $5 \mu\text{M}$ . Sin embargo estos valores de MIC siguen siendo altos en comparación con el PC190723, el compuesto más activo que se une a FtsZ y que presenta una MIC (MRSA) en torno a  $1.5 \mu\text{M}$  por lo que aún es necesario encontrar compuestos con mejor actividad antimicrobiana.

- Compuestos que mejoran la selectividad por FtsZ frente a tubulina, ya que hemos encontrados ligandos que inhibiendo hasta un 50% el ensamblaje de Bs-FtsZ no inhiben más del 20% el ensamblaje de tubulina.

## **8. Los ligandos que se unen al sitio de PC190723 alteran la relación entre el ensamblaje y la actividad GTPasa de FtsZ**

Aparte del sitio del nucleótido, existe otro sitio de unión de ligandos a FtsZ conocido como sitio de PC190723 (PC), cuya descripción detallada se encuentra en la Introducción. La exploración de este nuevo sitio de unión de ligandos a FtsZ, se llevo a cabo caracterizando bioquímicamente el efecto de PC190723, sus fragmentos (DFMBA y CTPM), un fragmento fluorescente de DFMBA (DFMBA-NBD) y un análogo 8J sobre el ensamblaje y actividad GTPasa de FtsZ de *B.subtilis* y de *E.coli*.

La polimerización de FtsZ y la velocidad de hidrólisis de GTP son efectos que van claramente acoplados ya que el sitio de GTP se encuentra en la interfaz axial entre dos moléculas de proteína consecutivas en el filamento (Nogales et al., 1998) de forma que la hidrólisis del nucleótido ocurre durante el ensamblaje de FtsZ. Esto fue comprobado en nuestros experimentos control donde observamos que en presencia de GTP existe una correlación entre la concentración crítica de ensamblaje y la actividad GTPasa de FtsZ de dos especies bacteriana, *B.subtilis* y de *E.coli*.

Cuando examinamos el efecto de PC190723 sobre la especie susceptible al compuesto *B.subtilis* observamos que éste disminuye hasta 4 veces la concentración crítica de polimerización y se inhibe la hidrólisis de GTP respecto a un control sin PC, perdiéndose la correlación entre ambos parámetros. Por homología del sitio de unión de Bs-FtsZ con el Sa-FtsZ esperamos resultados similares con Sa-FtsZ. PC190723 no alteró la correlación ente el ensamblaje y la actividad GTPasa de FtsZ de la especie no susceptible (*E.coli*), aunque aumenta inespecíficamente la velocidad de hidrólisis respecto al control en ausencia de compuesto. Estos resultados concuerdan con que la FtsZ de organismos resistentes al compuesto presenta una valina en posición 307 en lugar de arginina o histidina presente en la FtsZ de especies susceptibles al compuesto (Haydon et al., 2008). En un principio se postulo que PC no encajaría bien en su sitio de unión en FtsZ de especies no susceptibles (Haydon et al., 2008); pero como se ha indicado, el compuesto modifica la actividad GTPasa de la proteína, lo cual podría indicar una unión inespecífica o menos productiva al sitio de unión de PC190723 (Andreu et al., 2010)

Debido al efecto del PC sobre FtsZ, y siendo el único compuesto descrito con potente actividad anti infecciosa frente a cepas de *S.aureus* resistentes a meticilina (MRSA) (Haydon et al., 2008), se ha intentado optimizar el ligando para mejorar sus efectos tanto *in vitro* como *in vivo*. Recientemente, un compuesto modificado de PC190723, el 8J, ha mostrado ser más activo en la inhibición de algunas células bacterianas (Adams et al., 2011). Nuestros experimentos mostraron que el análogo 8J ejerce el mismo efecto sobre el ensamblaje de Bs-FtsZ que PC y es de esperar que 8J disminuya la concentración crítica de ensamblaje y la actividad GTPasa de la proteína. Un rasgo característico que diferencia el efecto de ambos compuestos sobre el ensamblaje de Bs-FtsZ es el tipo de polímeros de proteína que se forman en presencia de los compuestos. Como se describió, PC induce el ensamblaje de Bs-FtsZ en manojos y filamentos simples que suelen coexistir en la misma muestra (Andreu et al., 2010) y a veces presentan un leve giro sobre su eje longitudinal; sin embargo aunque con 8J siguen formándose manojos semejantes a los de PC, predominan unos tipos de manojos helicoidales donde se llegan a observar hasta 10 vueltas consecutivas (**figura 40**). Se desconoce a qué puede deberse las diferencias encontradas entre ambos ligandos pero se podrían sugerir dos posibilidades no necesariamente excluyentes. La primera estaría relacionada con la estructura química de ambos compuestos: el fragmento de tiazolpiridina de PC contiene un nitrógeno que en la molécula 8J es carbono. Debido a que este fragmento se localiza en la hendidura hidrofóbica entre la hélice H7 y el subdominio C-terminal interaccionando con distintos aminoácidos (Elsen et al., 2012; Matsui et al., 2012; Tan et al., 2012) podría suceder que la interacción de ambos compuestos sea diferente y por ende su efecto sobre el ensamblaje de los polímeros de Bs-FtsZ. En segundo lugar, sabemos que la división celular en presencia de 8J conduce a la deslocalización de FtsZ y una alteración en el anillo Z que presenta un ensamblaje helicoidal variando la forma del septo de división (Adams et al., 2011) lo que podría quizás estar relacionado con la formación de estos manojos helicoidales presentes en los ensayos de FtsZ *in vitro*.

PC170942 tiene dos partes distintas representadas por el fragmento de benzamida con dos grupos fluor (difluorometoxi-benzamida, DFMBA) y un fragmento heterocíclico clorado (tiazolpiridina, CTPM). El fragmento DFMBA tiene el mismo efecto que PC190723 pero a mayores concentraciones, ya que reduce la concentración crítica de ensamblaje y la actividad GTPasa de Bs-FtsZ, mientras que CTPM prácticamente no tiene efecto sobre el ensamblaje y la actividad GTPasa de la proteína. Estos resultados sugieren que DFMBA se une al sitio de PC, es el principal fragmento de la molécula y posiblemente su unión a la proteína sea la causa posible de los efectos de PC y sus derivados (8J y DFMBA-NBD).

## **9. DFMBA-NBD funciona como una sonda fluorescente que se une al sitio de PC190723 en los polímeros de FtsZ**

Uno de los objetivos de este trabajo era facilitar el desarrollo de un método de fluorescencia análogo al que describimos previamente para detectar ligandos que se unen al sitio del nucleótido (Schaffner-Barbero et al., 2010) y que en este caso nos permitiera detectar compuestos que se unan al sitio del PC190723. Las medidas de anisotropía de compuestos derivados de PC190723 marcados fluorescentemente, mostraron que DFMBA-NBD y UCM13 se unen a Bs-FtsZ, pero la adición de PC sólo desplaza de su sitio de unión a DFMBA-NBD, como se comprobó por la disminución de su anisotropía.

DFMBA-NBD se une aparentemente al sitio de PC190723 y tiene efectos similares a los de su fragmento parental (DFMBA) sobre el ensamblaje y la actividad GTPasa de Bs-FtsZ; más aun, como se ha comprobado en este trabajo el fragmento fluorescente resultó ser más activo que DFMBA en la inducción al ensamblaje de la proteína. Mediante registros de anisotropía frente al tiempo se demostró además que este fragmento fluorescente sólo se une a FtsZ de organismos susceptibles (Bs-FtsZ y Sa-FtsZ), y no tiene efecto en FtsZ de organismos resistentes (Ec-FtsZ), lo que nos sirvió para demostrar que el ligando se une al sitio de PC190723 específicamente.

La sonda se une a la hendidura entre los dominos N- y C-terminal del polímero de Bs-FtsZ y no en el monómero. Esto apoya el mecanismo estructural propuesto para el interruptor de ensamblaje de FtsZ ya que debe existir un cambio conformacional entre la forma monomérica y polimérica de la proteína que genere un espacio donde pueden acomodarse ligandos que se unan al sitio del PC190723. DFMBA-NBD se une a forma abierta de FtsZ aumentando su anisotropía y el desensamblaje de FtsZ (forma cerrada), libera la sonda llevando los valores de anisotropía a los basales.

Clásicamente la actina, proteína del citoesqueleto eucariota, se marca específicamente en el residuo Cys-374 con el grupo fluorescente N-(1-pirenil) yodoacetamida (Kouyama and Mihashi, 1981), lo que permite seguir la polimerización e interacción de la proteína con otros ligandos mediante fluorescencia. En este trabajo describimos una nueva sonda fluorescente, DFMBA-NBD, que se une a los polímeros de FtsZ de las especies susceptibles en el sitio de PC190723. La caracterización de esta sonda nos ha permitido identificarla como una herramienta útil para seguir la polimerización de FtsZ de especies susceptibles a PC190723, ya que la sonda se une a la forma ensamblada de FtsZ y la variación la anisotropía está ligada a la polimerización de la proteína.

Aún estamos en los primeros pasos para el desarrollo de un método de fluorescencia que permita detectar y medir la afinidad de unión de nuevos ligandos que se unan al sitio de PC190723. Para estudios futuros será necesario estabilizar los polímeros de FtsZ para mantener constantes los sitios de unión y poder así determinar la afinidad intrínseca de la sonda por FtsZ y la de las posibles moléculas competidoras.



## **CONCLUSIONES**



## CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos durante este trabajo podemos concluir:

### Respecto de los derivados de GTP sustituidos en el carbono 8 (C8 derivados):

1. Los C8 derivados se unen al sitio de unión del nucleótido e inhiben el ensamblaje de FtsZ de *B.subtilis* y *M.jannaschii*. En Bs-FtsZ la afinidad de los ligandos correlaciona con su capacidad para inhibir la polimerización de la proteína mientras que en Mj-FtsZ esta correlación es inversa.
2. Existen diferencias en el epítipo de unión de los C8 derivados a ambas proteínas que indican un modo de reconocimiento distinto por parte de Mj-FtsZ y Bs-FtsZ.
3. Las diferencias en el efecto inhibitorio de los C8 derivados en FtsZ de *M.jannaschii* no se deben a la conformación geométrica (anti o syn) en la que los ligandos se unen a la proteína.
4. El modelo obtenido por ajuste molecular y dinámica molecular de estos ligandos unidos al sitio del nucleótido propone que la inhibición del ensamblaje de FtsZ se debe a un reajuste en la superficie de contacto monómero - monómero de la proteína cuando se unen los ligandos.

### Respecto de la búsqueda de inhibidores de FtsZ que se unan al sitio del nucleótido:

5. Se ha obtenido un compuesto proveniente de un cribado virtual que se une al sitio del nucleótido de Bs-FtsZ pero que carece de actividad antibacteriana. Ninguno de los compuestos probados descritos como inhibidores de FtsZ previamente en la literatura se unieron al sitio del nucleótido de Bs-FtsZ
6. El compuesto PC170942 es un inhibidor del ensamblaje y la actividad GTPasa de Bs-FtsZ que no se une al sitio del nucleótido, sino posiblemente en un sitio cercano de la interfaz de asociación de los monómeros de la proteína.
7. En una biblioteca interna se han identificado los compuestos polifenólicos UCM05, UCM44 y UCM53 que se unen al sitio de unión del nucleótido de FtsZ con afinidad media y reemplazan el regulador natural de la proteína. Los inhibidores modifican el ensamblaje de FtsZ lo que conlleva a la inhibición funcional de los filamentos

que forma la proteína. En Mj-FtsZ los ligandos inducen el ensamblaje de polímeros diferentes a los que se forman en presencia de GTP.

8. UCM05, UCM44 y UCM53 inhiben el ensamblaje del anillo Z, inducen la filamentación de células de *B.subtilis* y deslocalización de FtsZ desde la mitad celular hacia depósitos de proteína dispersos impidiendo la división celular bacteriana. Los ligandos tienen actividad antimicrobiana frente a patógenos Gram-positivos. UCM53 es además activo frente a cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA) y de *Enterococcus faecalis* resistentes a levofloxacino.
9. Los compuestos identificados son inhibidores específicos de FtsZ frente a la tubulina eucariota a las concentraciones en que inhiben el crecimiento bacteriano.

#### **Respecto de la optimización química de UCM05:**

10. Se han identificado nuevos inhibidores de FtsZ, a partir de modificaciones de la estructura química de UCM05, que tienen mayor afinidad de unión por el sitio del nucleótido y mejor actividad antimicrobiana que el ligando de referencia. Las modificaciones que mejor resultado tienen son aquellas donde se mantiene el núcleo central de naftaleno, la posición de unión de los anillos fenólicos al naftaleno en posiciones 1 y 3 y los hidroxilos en posiciones 1-meta, 3-meta y 3-para. Los compuestos que además tienen sustituciones de cloro en alguno de los anillos fenólicos son los que tienen los mejores valores de afinidad de unión y actividad antimicrobiana entre toda la serie de modificaciones.
11. Los compuestos identificados inhiben el ensamblaje de FtsZ lo que conduce a la inhibición funcional de la proteína y a un bloqueo de la división celular bacteriana. Estos derivados polifenólicos mantienen también la selectividad sobre FtsZ no afectando al ensamblaje de la tubulina eucariota.

#### **Respecto de la exploración del sitio de PC190723:**

12. El ligando PC190723, su fragmento difluorometoxibenzamida y su análogo 8J se unen a FtsZ de la especie susceptible estabilizando el ensamblaje de la proteína. PC190723 y su fragmento además disminuyen la actividad GTPasa de FtsZ.
13. Difluorometoxibenzamida es el fragmento principal de la molécula de PC190723, mientras que el fragmento tiazol-piridina no es activo sobre FtsZ.

14. 8J induce la formación de polímeros de Bs-FtsZ helicoidales diferentes a los que se forman en presencia de PC190723.

**Desarrollo de una sonda fluorescente para detectar y caracterizar la unión de compuestos que se unan específicamente al sitio de PC190723:**

15. DFMBBA-NBD se une al sitio de PC190723 en FtsZ de las especies susceptibles. Este derivado de difluorometoxibenzamida estabiliza el ensamblaje y disminuye la actividad GTPasa de Bs-FtsZ.
16. Se identificó DFMBBA-NBD como una sonda fluorescente que se une a la forma ensamblada de FtsZ y la variación de sus valores de anisotropía está ligada a la polimerización de la proteína.
17. Los resultados obtenidos indican que es posible desarrollar un método de fluorescencia para detectar y caracterizar la unión de compuestos al sitio de PC190723 usando la sonda fluorescente identificada.
18. La unión de la sonda al sitio de PC190723 de FtsZ apoya el mecanismo estructural propuesto para el interruptor de ensamblaje de FtsZ.

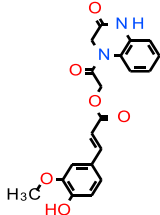
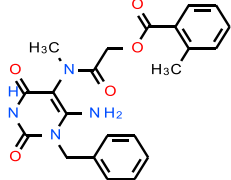
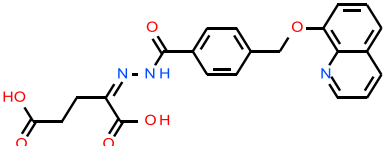
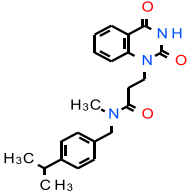
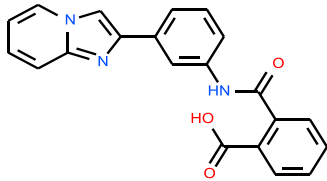
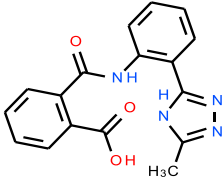
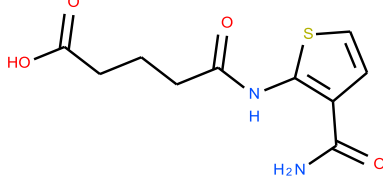
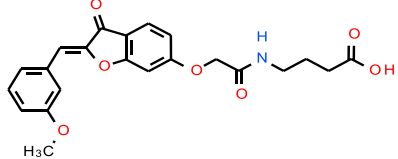
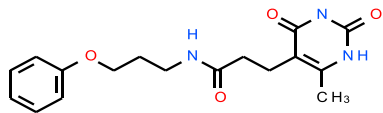
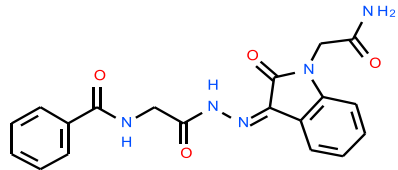
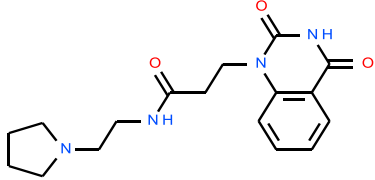
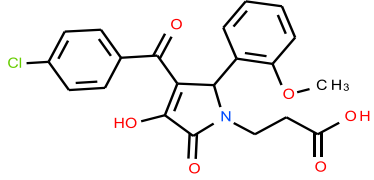


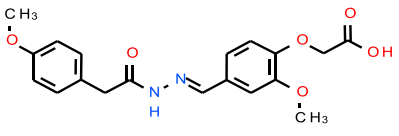
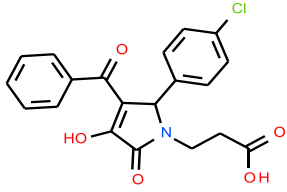
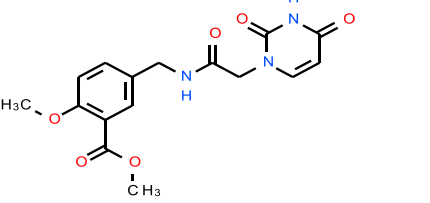
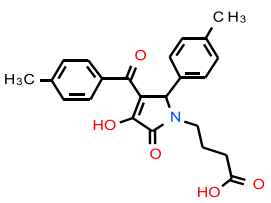
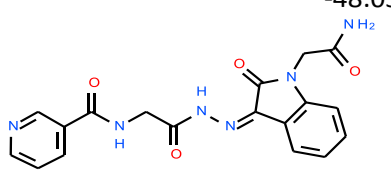
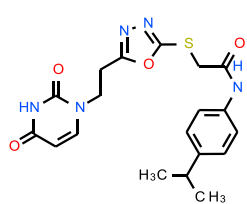
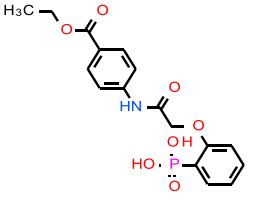
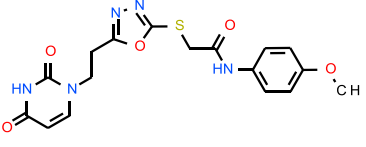
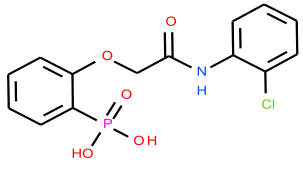
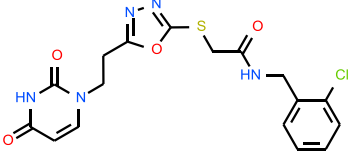
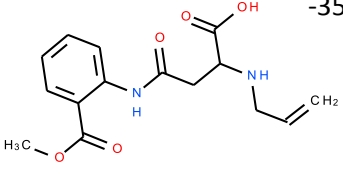
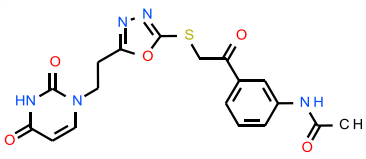
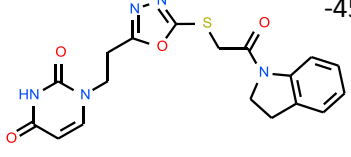
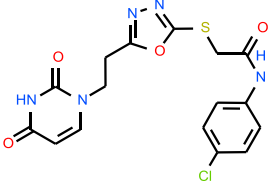
## **ANEXOS**

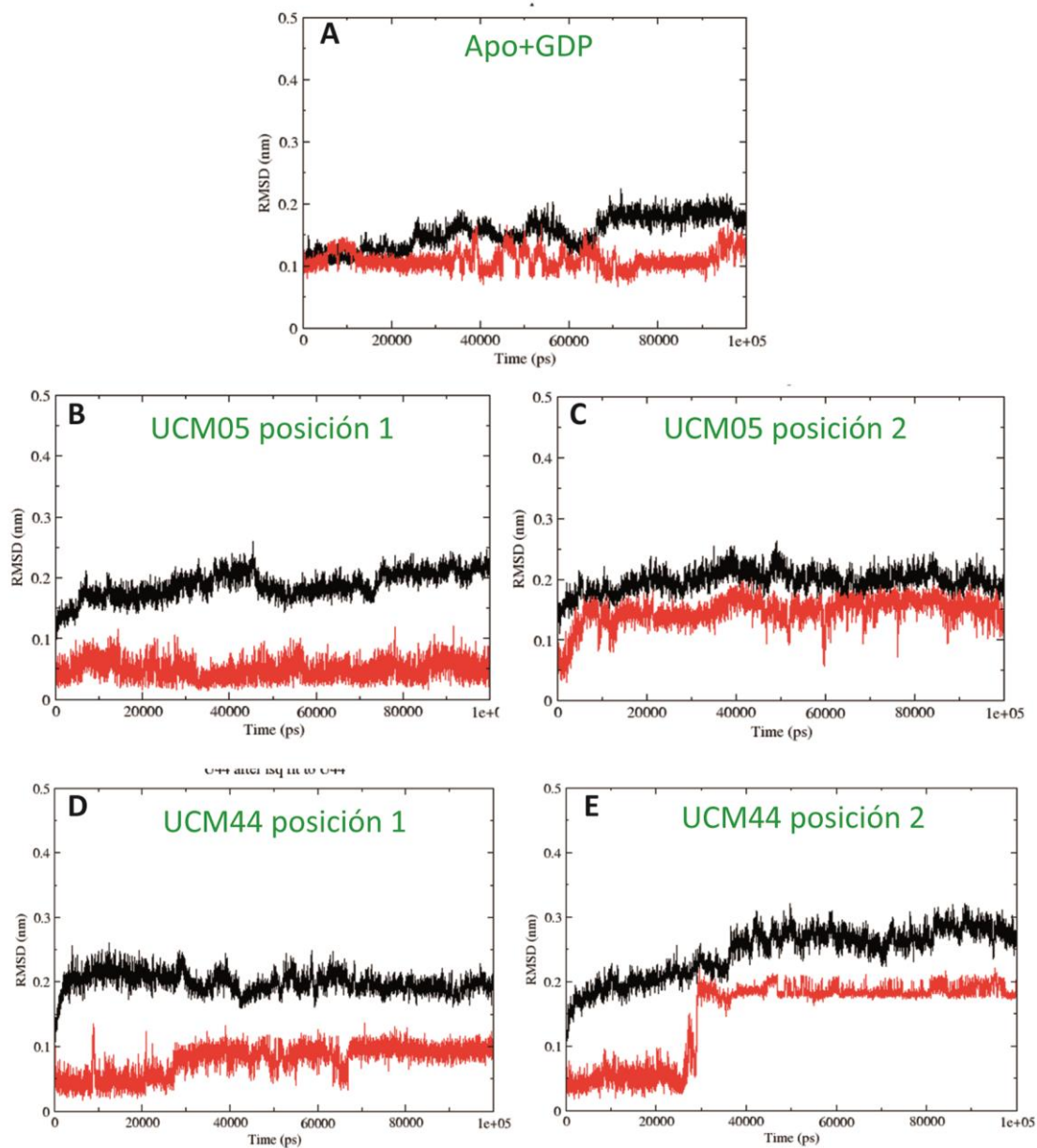


## ANEXOS

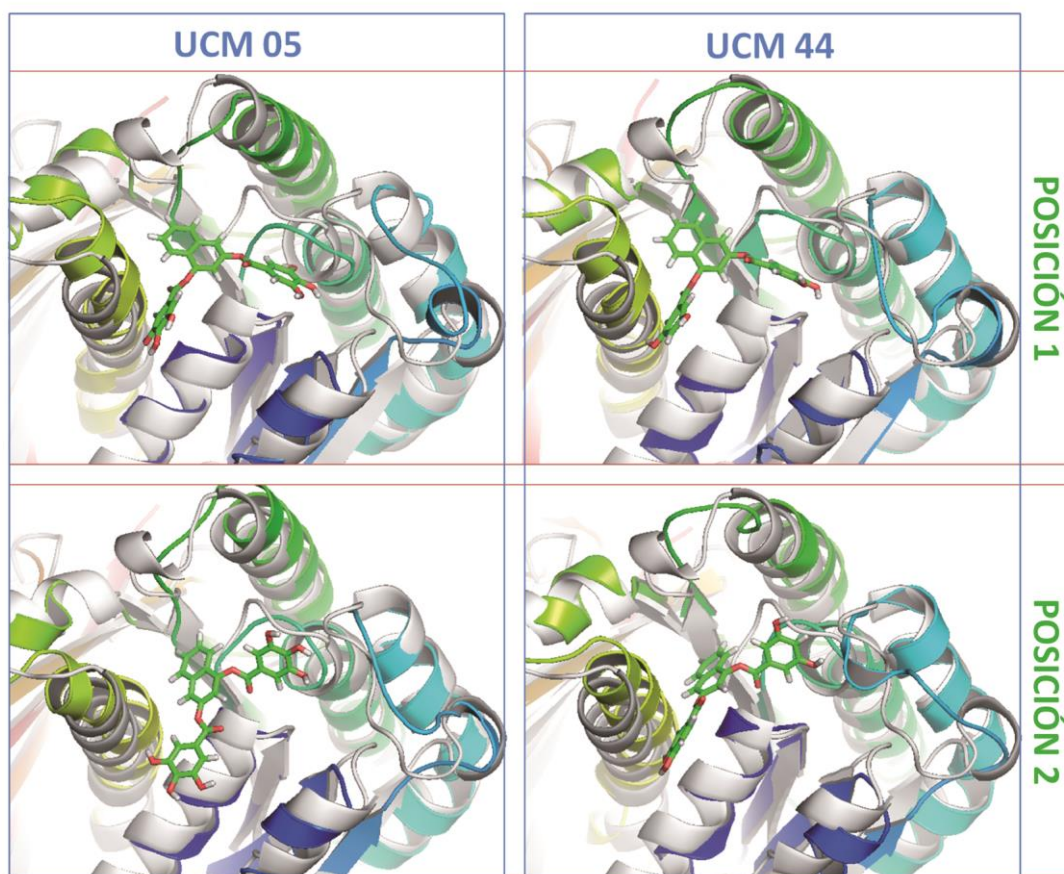
**ANEXO 1. Compuestos que provienen del cribado virtual.** Estructura química de los compuestos provenientes de cribado virtual y una estimación de la energía de unión al sitio de GTP calculada con el método ICM

COMPUESTO	Energía de unión Kcal / Mol	COMPUESTO	Energía de unión Kcal / Mol
<b>Enamine 1</b> 	-37.06	<b>Enamine 9</b> 	-40.32
<b>Enamine 2</b> 	-41.34	<b>Enamine 10</b> 	-43.48
<b>Enamine 3</b> 	-46.41	<b>Enamine 11</b> 	-43.44
<b>Enamine 4</b> 	-44.88	<b>IBS 1</b> 	-40.93
<b>Enamine 5</b> 	-40.18	<b>IBS 2</b> 	-43.83
<b>Enamine 6</b> 	-38.83	<b>IBS 3</b> 	-41.95

COMPUESTO	Energía de unión Kcal / Mol	COMPUESTO	Energía de unión Kcal / Mol
<b>Enamine 7</b> 	-41.88	<b>IBS 4</b> 	-42.4
<b>Enamine 8</b> 	-40.24	<b>IBS 5</b> 	-42.2
<b>IBS 6</b> 	-48.03	<b>LIFE 4</b> 	-47.98
<b>IBS 7</b> 	-42.36	<b>LIFE 5</b> 	-47.82
<b>IBS 8</b> 	-37.88	<b>LIFE 6</b> 	-47.13
<b>LIFE 2</b> 	-35.9	<b>LIFE 7</b> 	-56.39
<b>LIFE 3</b> 	-45.35	<b>LIFE 8</b> 	-43.92



**Anexo 2. Flexibilidad del sitio del nucleótido de Bs-FtsZ en presencia de UCM05 y UCM44.** Se muestran los valores de RMSD registrados en las simulaciones de dinámica molecular en presencia de los ligandos (rojo) respecto de una referencia (negro). En presencia de GDP (A) la desviación de los valores de RMSD registrados indicaron una oscilación del ligando alrededor del sitio de nucleótido (hasta 1Å). En presencia de UCM05 (B y C) y UCM44 (D yE) se encontraron dos posibles modos de unión a FtsZ. En ambos casos se registraron oscilaciones de los ligandos (0.5 – 1.5Å) y de la proteína (1.5-2.5Å).



**Anexo 3. Imágenes representativas de la dinámica molecular realizada a partir de los dos posibles modos de unión de UCM05 y UCM44 a Bs-FtsZ.** En color se indican las interacciones del ligando con el receptor. En gris, la superposición de la estructura cristalográfica de GDP unido a Bs-FtsZ.

## BIBLIOGRAFÍA

Aarsman, M.E., Piette, A., Fraipont, C., Vinkenvleugel, T.M., Nguyen-Disteche, M., and den Blaauwen, T. (2005). Maturation of the Escherichia coli divisome occurs in two steps. *Mol Microbiol* 55, 1631-1645.

Adachi, S., Hori, K., and Hiraga, S. (2006). Subcellular positioning of F plasmid mediated by dynamic localization of SopA and SopB. *J Mol Biol* 356, 850-863.

Adams, D.W., Wu, L.J., Czaplewski, L.G., and Errington, J. (2011). Multiple effects of benzamide antibiotics on FtsZ function. *Mol Microbiol* 80, 68-84.

Addinall, S.G., Bi, E., and Lutkenhaus, J. (1996). FtsZ ring formation in fts mutants. *J Bacteriol* 178, 3877-3884.

Adler, H.I., Fisher, W.D., Cohen, A., and Hardigree, A.A. (1967). MINIATURE escherichia coli CELLS DEFICIENT IN DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 57, 321-326.

Alberti, C. (2013). Taxane- and epothilone-based chemotherapy: from molecule cargo cytoskeletal logistics to management of castration-resistant prostate carcinoma. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 17, 1658-1664.

Anderson, D.E., Kim, M.B., Moore, J.T., O'Brien, T.E., Sorto, N.A., Grove, C.I., Lackner, L.L., Ames, J.B., and Shaw, J.T. (2012). Comparison of small molecule inhibitors of the bacterial cell division protein FtsZ and identification of a reliable cross-species inhibitor. *ACS Chem Biol* 7, 1918-1928.

Andreu, J.M. (2007). Large scale purification of brain tubulin with the modified Weisenberg procedure. *Methods Mol Med* 137, 17-28.

Andreu, J.M., and Barasoain, I. (2001). The interaction of baccatin III with the taxol binding site of microtubules determined by a homogeneous assay with fluorescent taxoid. *Biochemistry* 40, 11975-11984.

Andreu, J.M., Oliva, M.A., and Monasterio, O. (2002). Reversible unfolding of FtsZ cell division proteins from archaea and bacteria. Comparison with eukaryotic tubulin folding and assembly. *J Biol Chem* 277, 43262-43270.

Andreu, J.M., Schaffner-Barbero, C., Huecas, S., Alonso, D., Lopez-Rodriguez, M.L., Ruiz-Avila, L.B., Nunez-Ramirez, R., Llorca, O., and Martin-Galiano, A.J. (2010). The antibacterial cell division inhibitor PC190723 is an FtsZ polymer-stabilizing agent that induces filament assembly and condensation. *J Biol Chem* 285, 14239-14246.

Ausmees, N., Kuhn, J.R., and Jacobs-Wagner, C. (2003). The bacterial cytoskeleton: an intermediate filament-like function in cell shape. *Cell* 115, 705-713.

Aussel, L., Barre, F.X., Aroyo, M., Stasiak, A., Stasiak, A.Z., and Sherratt, D. (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.

- Aylett, C.H., Lowe, J., and Amos, L.A. (2011). New insights into the mechanisms of cytomotive actin and tubulin filaments. *Int Rev Cell Mol Biol* 292, 1-71.
- Beck, B.D. (1979). Polymerization of the bacterial elongation factor for protein synthesis, EF-Tu. *Eur J Biochem* 97, 495-502.
- Begg, K.J., Dewar, S.J., and Donachie, W.D. (1995). A new *Escherichia coli* cell division gene, *ftsK*. *J Bacteriol* 177, 6211-6222.
- Benedec, D., Vlase, L., Oniga, I., Mot, A.C., Damian, G., Hanganu, D., Duma, M., and Silaghi-Dumitrescu, R. (2013). Polyphenolic Composition, Antioxidant and Antibacterial Activities for Two Romanian Subspecies of *Achillea distans* Waldst. et Kit. ex Willd. *Molecules* 18, 8725-8739.
- Bernhardt, T.G., and de Boer, P.A. (2004). Screening for synthetic lethal mutants in *Escherichia coli* and identification of EnvC (YibP) as a periplasmic septal ring factor with murein hydrolase activity. *Mol Microbiol* 52, 1255-1269.
- Bernhardt, T.G., and de Boer, P.A. (2005). SlmA, 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., Santra, M.K., and Panda, D. (2005). Sanguinarine blocks cytokinesis in bacteria by inhibiting FtsZ assembly and bundling. *Biochemistry* 44, 16584-16593.
- Bi, E., and Lutkenhaus, J. (1993). Cell division inhibitors Sula and MinCD prevent formation of the FtsZ ring. *J Bacteriol* 175, 1118-1125.
- Bi, E.F., and Lutkenhaus, J. (1991). FtsZ ring structure associated with division in *Escherichia coli*. *Nature* 354, 161-164.
- Bork, P., Sander, C., and Valencia, A. (1992). An ATPase domain common to prokaryotic cell cycle proteins, sugar kinases, actin, and hsp70 heat shock proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 7290-7294.
- Bramkamp, M., Emmins, R., Weston, L., Donovan, C., Daniel, R.A., and Errington, J. (2008). A novel component of the division-site selection system of *Bacillus subtilis* and a new mode of action for the division inhibitor MinCD. *Mol Microbiol* 70, 1556-1569.
- Buddelmeijer, N., and Beckwith, J. (2002). Assembly of cell division proteins at the *E. coli* cell center. *Curr Opin Microbiol* 5, 553-557.
- Buddelmeijer, N., and Beckwith, J. (2004). A complex of the *Escherichia coli* cell division proteins FtsL, FtsB and FtsQ forms independently of its localization to the septal region. *Mol Microbiol* 52, 1315-1327.
- Buey, R.M., Calvo, E., Barasoain, I., Pineda, O., Edler, M.C., Matesanz, R., Cerezo, G., Vanderwal, C.D., Day, B.W., Sorensen, E.J., *et al.* (2007). Cyclostreptin binds covalently to microtubule pores and luminal taxoid binding sites. *Nat Chem Biol* 3, 117-125.
- Busiek, K.K., Eraso, J.M., Wang, Y., and Margolin, W. (2012). The early divisome protein FtsA interacts directly through its 1c subdomain with the cytoplasmic domain of the late divisome protein FtsN. *J Bacteriol* 194, 1989-2000.

- Camberg, J.L., Hoskins, J.R., and Wickner, S. (2009). ClpXP protease degrades the cytoskeletal protein, FtsZ, and modulates FtsZ polymer dynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A* *106*, 10614-10619.
- Carbonell, T., and Freire, E. (2005). Binding thermodynamics of statins to HMG-CoA reductase. *Biochemistry* *44*, 11741-11748.
- Cordell, S.C., Robinson, E.J., and Lowe, J. (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., Baty, L.T., and Williams, R.C., Jr. (1987). Mg<sup>2+</sup> dependence of guanine nucleotide binding to tubulin. *J Biol Chem* *262*, 17278-17284.
- Chen, J.C., and Beckwith, J. (2001). FtsQ, FtsL and FtsI require FtsK, but not FtsN, for co-localization with FtsZ during *Escherichia coli* cell division. *Mol Microbiol* *42*, 395-413.
- Chen, J.C., Weiss, D.S., Ghigo, J.M., and Beckwith, J. (1999). Septal localization of FtsQ, an essential cell division protein in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* *181*, 521-530.
- Chen, Y., and Erickson, H.P. (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., and Erickson, H.P. (2011). Conformational changes of FtsZ reported by tryptophan mutants. *Biochemistry* *50*, 4675-4684.
- Cho, H., McManus, H.R., Dove, S.L., and Bernhardt, T.G. (2011). Nucleoid occlusion factor SlmA is a DNA-activated FtsZ polymerization antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A* *108*, 3773-3778.
- Chung, K.M., Hsu, H.H., Yeh, H.Y., and Chang, B.Y. (2007). Mechanism of regulation of prokaryotic tubulin-like GTPase FtsZ by membrane protein EzrA. *J Biol Chem* *282*, 14891-14897.
- Dajkovic, A., Mukherjee, A., and Lutkenhaus, J. (2008). Investigation of regulation of FtsZ assembly by SulA and development of a model for FtsZ polymerization. *J Bacteriol* *190*, 2513-2526.
- Dajkovic, A., Pichoff, S., Lutkenhaus, J., and Wirtz, D. (2010). Cross-linking FtsZ polymers into coherent Z rings. *Mol Microbiol* *78*, 651-668.
- Daniel, R.A., Harry, E.J., and Errington, J. (2000). Role of penicillin-binding protein PBP 2B in assembly and functioning of the division machinery of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* *35*, 299-311.
- de Boer, P., Crossley, R., and Rothfield, L. (1992). The essential bacterial cell-division protein FtsZ is a GTPase. *Nature* *359*, 254-256.
- de Boer, P.A. (2010). Advances in understanding *E. coli* cell fission. *Curr Opin Microbiol* *13*, 730-737.
- de Boer, P.A., Crossley, R.E., and Rothfield, L.I. (1988). Isolation and properties of minB, a complex genetic locus involved in correct placement of the division site in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* *170*, 2106-2112.

- de Boer, P.A., Crossley, R.E., and Rothfield, L.I. (1989). A division inhibitor and a topological specificity factor coded for by the minicell locus determine proper placement of the division septum in *E. coli*. *Cell* *56*, 641-649.
- de Ines, C., Leynadier, D., Barasoain, I., Peyrot, V., Garcia, P., Briand, C., Renner, G.A., and Temple, C., Jr. (1994). Inhibition of microtubules and cell cycle arrest by a new 1-deaza-7,8-dihydropteridine antitumor drug, CI 980, and by its chiral isomer, NSC 613863. *Cancer Res* *54*, 75-84.
- de Pereda, J.M., Leynadier, D., Evangelio, J.A., Chacon, P., and Andreu, J.M. (1996). Tubulin secondary structure analysis, limited proteolysis sites, and homology to FtsZ. *Biochemistry* *35*, 14203-14215.
- Den Blaauwen, T., Buddelmeijer, N., Aarsman, M.E., Hameete, C.M., and Nanninga, N. (1999). Timing of FtsZ assembly in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* *181*, 5167-5175.
- den Blaauwen, T., de Pedro, M.A., Nguyen-Disteche, M., and Ayala, J.A. (2008). Morphogenesis of rod-shaped sacculi. *FEMS Microbiol Rev* *32*, 321-344.
- Diaz, J.F., and Andreu, J.M. (1993). Assembly of purified GDP-tubulin into microtubules induced by taxol and taxotere: reversibility, ligand stoichiometry, and competition. *Biochemistry* *32*, 2747-2755.
- Diaz, J.F., and Buey, R.M. (2007). Characterizing ligand-microtubule binding by competition methods. *Methods Mol Med* *137*, 245-260.
- Domadia, P., Swarup, S., Bhunia, A., Sivaraman, J., and Dasgupta, D. (2007). Inhibition of bacterial cell division protein FtsZ by cinnamaldehyde. *Biochem Pharmacol* *74*, 831-840.
- Donovan, J.W. (1973). Ultraviolet difference spectroscopy--new techniques and applications. *Methods Enzymol* *27*, 497-525.
- Durand-Heredia, J., Rivkin, E., Fan, G., Morales, J., and Janakiraman, A. (2012). Identification of ZapD as a cell division factor that promotes the assembly of FtsZ in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* *194*, 3189-3198.
- Durand-Heredia, J.M., Yu, H.H., De Carlo, S., Lesser, C.F., and Janakiraman, A. (2011). Identification and characterization of ZapC, a stabilizer of the FtsZ ring in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* *193*, 1405-1413.
- Ebersbach, G., Galli, E., Moller-Jensen, J., Lowe, J., and Gerdes, K. (2008). Novel coiled-coil cell division factor ZapB stimulates Z ring assembly and cell division. *Mol Microbiol* *68*, 720-735.
- Ebersbach, G., and Gerdes, K. (2004). Bacterial mitosis: partitioning protein ParA oscillates in spiral-shaped structures and positions plasmids at mid-cell. *Mol Microbiol* *52*, 385-398.
- Elsen, N.L., Lu, J., Parthasarathy, G., Reid, J.C., Sharma, S., Soisson, S.M., and Lumb, K.J. (2012). Mechanism of action of the cell-division inhibitor PC190723: modulation of FtsZ assembly cooperativity. *J Am Chem Soc* *134*, 12342-12345.

- Erickson, H.P. (2001). The FtsZ protofilament and attachment of ZipA--structural constraints on the FtsZ power stroke. *Curr Opin Cell Biol* *13*, 55-60.
- Erickson, H.P. (2007). Evolution of the cytoskeleton. *Bioessays* *29*, 668-677.
- Erickson, H.P., Anderson, D.E., and Osawa, M. (2010). FtsZ in bacterial cytokinesis: cytoskeleton and force generator all in one. *Microbiol Mol Biol Rev* *74*, 504-528.
- Errington, J., Daniel, R.A., and Scheffers, D.J. (2003). Cytokinesis in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* *67*, 52-65, table of contents.
- Feucht, A., Lucet, I., Yudkin, M.D., and Errington, J. (2001). Cytological and biochemical characterization of the FtsA cell division protein of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* *40*, 115-125.
- Foss, M.H., Eun, Y.J., Grove, C.I., Pauw, D.A., Sorto, N.A., Rensvold, J.W., Pagliarini, D.J., Shaw, J.T., and Weibel, D.B. (2013). Inhibitors of bacterial tubulin target bacterial membranes. *Medchemcomm* *4*, 112-119.
- Galli, E., and Gerdes, K. (2010). Spatial resolution of two bacterial cell division proteins: ZapA recruits ZapB to the inner face of the Z-ring. *Mol Microbiol* *76*, 1514-1526.
- Gamba, P., Veening, J.W., Saunders, N.J., Hamoen, L.W., and Daniel, R.A. (2009). Two-step assembly dynamics of the *Bacillus subtilis* divisome. *J Bacteriol* *191*, 4186-4194.
- Gerdes, K., Moller-Jensen, J., and Bugge Jensen, R. (2000). Plasmid and chromosome partitioning: surprises from phylogeny. *Mol Microbiol* *37*, 455-466.
- Glass, J.I., Lefkowitz, E.J., Glass, J.S., Heiner, C.R., Chen, E.Y., and Cassell, G.H. (2000). The complete sequence of the mucosal pathogen *Ureaplasma urealyticum*. *Nature* *407*, 757-762.
- Glockner, F.O., Kube, M., Bauer, M., Teeling, H., Lombardot, T., Ludwig, W., Gade, D., Beck, A., Borzym, K., Heitmann, K., *et al.* (2003). Complete genome sequence of the marine planctomycete *Pirellula* sp. strain 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 8298-8303.
- Goehring, N.W., and Beckwith, J. (2005). Diverse paths to midcell: assembly of the bacterial cell division machinery. *Curr Biol* *15*, R514-526.
- Goehring, N.W., Gonzalez, M.D., and Beckwith, J. (2006). Premature targeting of cell division proteins to midcell reveals hierarchies of protein interactions involved in divisome assembly. *Mol Microbiol* *61*, 33-45.
- Goffin, C., and Ghuyssen, J.M. (1998). Multimodular penicillin-binding proteins: an enigmatic family of orthologs and paralogs. *Microbiol Mol Biol Rev* *62*, 1079-1093.
- Goley, E.D., Yeh, Y.C., Hong, S.H., Fero, M.J., Abeliuk, E., McAdams, H.H., and Shapiro, L. (2011). Assembly of the *Caulobacter* cell division machine. *Mol Microbiol* *80*, 1680-1698.
- Gould, I.M., David, M.Z., Esposito, S., Garau, J., Lina, G., Mazzei, T., and Peters, G. (2012). New insights into methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) pathogenesis, treatment and resistance. *Int J Antimicrob Agents* *39*, 96-104.
- Gregory, J.A., Becker, E.C., and Pogliano, K. (2008). *Bacillus subtilis* MinC destabilizes FtsZ-rings at new cell poles and contributes to the timing of cell division. *Genes Dev* *22*, 3475-3488.

- Gueiros-Filho, F.J., and Losick, R. (2002). A widely conserved bacterial cell division protein that promotes assembly of the tubulin-like protein FtsZ. *Genes Dev* 16, 2544-2556.
- Gundogdu, M.E., Kawai, Y., Pavlendova, N., Ogasawara, N., Errington, J., Scheffers, D.J., and Hamoen, L.W. (2011). Large ring polymers align FtsZ polymers for normal septum formation. *EMBO J* 30, 617-626.
- Haeusser, D.P., Schwartz, R.L., Smith, A.M., Oates, M.E., and Levin, P.A. (2004). EzrA prevents aberrant cell division by modulating assembly of the cytoskeletal protein FtsZ. *Mol Microbiol* 52, 801-814.
- Hale, C.A., and de Boer, P.A. (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., Shiomi, D., Liu, B., Bernhardt, T.G., Margolin, W., Niki, H., and de Boer, P.A. (2011). Identification of *Escherichia coli* ZapC (YcbW) as a component of the division apparatus that binds and bundles FtsZ polymers. *J Bacteriol* 193, 1393-1404.
- Hamoen, L.W., Meile, J.C., de Jong, W., Noirot, P., and Errington, J. (2006). SepF, a novel FtsZ-interacting protein required for a late step in cell division. *Mol Microbiol* 59, 989-999.
- Harry, E., Monahan, L., and Thompson, L. (2006). Bacterial cell division: the mechanism and its precision. *Int Rev Cytol* 253, 27-94.
- Harry, E.J., Rodwell, J., and Wake, R.G. (1999). Co-ordinating DNA replication with cell division in bacteria: a link between the early stages of a round of replication and mid-cell Z ring assembly. *Mol Microbiol* 33, 33-40.
- Haydon, D.J., Stokes, N.R., Ure, R., Galbraith, G., Bennett, J.M., Brown, D.R., Baker, P.J., Barynin, V.V., Rice, D.W., Sedelnikova, S.E., *et al.* (2008). An inhibitor of FtsZ with potent and selective anti-staphylococcal activity. *Science* 321, 1673-1675.
- Hemaiswarya, S., Soudaminikkutty, R., Narasumani, M.L., and Doble, M. (2011). Phenylpropanoids inhibit protofilament formation of *Escherichia coli* cell division protein FtsZ. *J Med Microbiol* 60, 1317-1325.
- Henriques, A.O., Glaser, P., Piggot, P.J., and Moran, C.P., Jr. (1998). Control of cell shape and elongation by the rodA gene in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 28, 235-247.
- Higashitani, A., Higashitani, N., and Horiuchi, K. (1995). A cell division inhibitor SulA of *Escherichia coli* directly interacts with FtsZ through GTP hydrolysis. *Biochem Biophys Res Commun* 209, 198-204.
- Hirota, Y., Jacob, F., Ryter, A., Buttin, G., and Nakai, T. (1968). On the process of cellular division in *Escherichia coli*. I. Asymmetrical cell division and production of deoxyribonucleic acid-less bacteria. *J Mol Biol* 35, 175-192.
- Hu, Z., Mukherjee, A., Pichoff, S., and Lutkenhaus, J. (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, J., Cao, C., and Lutkenhaus, J. (1996). Interaction between FtsZ and inhibitors of cell division. *J Bacteriol* *178*, 5080-5085.
- Huecas, S., and Andreu, J.M. (2003). Energetics of the cooperative assembly of cell division protein FtsZ and the nucleotide hydrolysis switch. *J Biol Chem* *278*, 46146-46154.
- Huecas, S., and Andreu, J.M. (2004). Polymerization of nucleotide-free, GDP- and GTP-bound cell division protein FtsZ: GDP makes the difference. *FEBS Lett* *569*, 43-48.
- Huecas, S., Llorca, O., Boskovic, J., Martin-Benito, J., Valpuesta, J.M., and Andreu, J.M. (2008). Energetics and geometry of FtsZ polymers: nucleated self-assembly of single protofilaments. *Biophys J* *94*, 1796-1806.
- Huecas, S., Schaffner-Barbero, C., Garcia, W., Yebenes, H., Palacios, J.M., Diaz, J.F., Menendez, M., and Andreu, J.M. (2007). The interactions of cell division protein FtsZ with guanine nucleotides. *J Biol Chem* *282*, 37515-37528.
- Inoue, I., Ino, R., and Nishimura, A. (2009). New model for assembly dynamics of bacterial tubulin in relation to the stages of DNA replication. *Genes Cells* *14*, 435-444.
- Jaiswal, R., Beuria, T.K., Mohan, R., Mahajan, S.K., and Panda, D. (2007). Totarol inhibits bacterial cytokinesis by perturbing the assembly dynamics of FtsZ. *Biochemistry* *46*, 4211-4220.
- Jatoi, A., Ellison, N., Burch, P.A., Sloan, J.A., Dakhil, S.R., Novotny, P., Tan, W., Fitch, T.R., Rowland, K.M., Young, C.Y., *et al.* (2003). A phase II trial of green tea in the treatment of patients with androgen independent metastatic prostate carcinoma. *Cancer* *97*, 1442-1446.
- Jenkins, C., Samudrala, R., Anderson, I., Hedlund, B.P., Petroni, G., Michailova, N., Pinel, N., Overbeek, R., Rosati, G., and Staley, J.T. (2002). Genes for the cytoskeletal protein tubulin in the bacterial genus *Prostheco bacter*. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 17049-17054.
- Jennings, P.C., Cox, G.C., Monahan, L.G., and Harry, E.J. (2010). Super-resolution imaging of the bacterial cytokinetic protein FtsZ. *Micron*.
- Jensen, S.O., Thompson, L.S., and Harry, E.J. (2005). Cell division in *Bacillus subtilis*: FtsZ and FtsA association is Z-ring independent, and FtsA is required for efficient midcell Z-Ring assembly. *J Bacteriol* *187*, 6536-6544.
- Jobim, M.L., Santos, R.C., Dos Santos Alves, C.F., Oliveira, R.M., Mostardeiro, C.P., Sagrillo, M.R., de Souza Filho, O.C., Garcia, L.F., Manica-Cattani, M.F., Ribeiro, E.E., *et al.* (2013). Antimicrobial activity of Amazon *Astrocaryum aculeatum* extracts and its association to oxidative metabolism. *Microbiol Res*.
- Johnson, J.E., Lackner, L.L., and de Boer, P.A. (2002). Targeting of (D)MinC/MinD and (D)MinC/DicB complexes to septal rings in *Escherichia coli* suggests a multistep mechanism for MinC-mediated destruction of nascent FtsZ rings. *J Bacteriol* *184*, 2951-2962.
- Jones, C., and Holland, I.B. (1985). Role of the SulB (FtsZ) protein in division inhibition during the SOS response in *Escherichia coli*: FtsZ stabilizes the inhibitor Sula in maxicells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *82*, 6045-6049.

- Jung, H.K., Ishino, F., and Matsushashi, M. (1989). Inhibition of growth of *ftsQ*, *ftsA*, and *ftsZ* mutant cells of *Escherichia coli* by amplification of a chromosomal region encompassing closely aligned cell division and cell growth genes. *J Bacteriol* *171*, 6379-6382.
- Karimova, G., Dautin, N., and Ladant, D. (2005). Interaction network among *Escherichia coli* membrane proteins involved in cell division as revealed by bacterial two-hybrid analysis. *J Bacteriol* *187*, 2233-2243.
- Katis, V.L., Wake, R.G., and Harry, E.J. (2000). Septal localization of the membrane-bound division proteins of *Bacillus subtilis* DivIB and DivIC is codependent only at high temperatures and requires FtsZ. *J Bacteriol* *182*, 3607-3611.
- Kaur, S., Modi, N.H., Panda, D., and Roy, N. (2010). Probing the binding site of curcumin in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* FtsZ--a structural insight to unveil antibacterial activity of curcumin. *Eur J Med Chem* *45*, 4209-4214.
- Kawai, Y., Moriya, S., and Ogasawara, N. (2003). Identification of a protein, YneA, responsible for cell division suppression during the SOS response in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* *47*, 1113-1122.
- Kawasaki, Y., and Freire, E. (2011). Finding a better path to drug selectivity. *Drug Discov Today* *16*, 985-990.
- Keffer, J.L., Huecas, S., Hammill, J.T., Wipf, P., Andreu, J.M., and Bewley, C.A. (2013). Chrysophaentins are competitive inhibitors of FtsZ and inhibit Z-ring formation in live bacteria. *Bioorg Med Chem* *21*, 5673-5678.
- Kiekebusch, D., Michie, K.A., Essen, L.O., Lowe, J., and Thanbichler, M. (2012). Localized dimerization and nucleoid binding drive gradient formation by the bacterial cell division inhibitor MipZ. *Mol Cell* *46*, 245-259.
- Kodama, T., Fukui, K., and Kometani, K. (1986). The initial phosphate burst in ATP hydrolysis by myosin and subfragment-1 as studied by a modified malachite green method for determination of inorganic phosphate. *J Biochem* *99*, 1465-1472.
- 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.
- Kotan, R., Cakir, A., Dadasoglu, F., Aydin, T., Cakmakci, R., Ozer, H., Kordali, S., Mete, E., and Dikbas, N. (2010). Antibacterial activities of essential oils and extracts of Turkish *Achillea*, *Satureja* and *Thymus* species against plant pathogenic bacteria. *J Sci Food Agric* *90*, 145-160.
- Kouyama, T., and Mihashi, K. (1981). Fluorimetry study of N-(1-pyrenyl)iodoacetamide-labelled F-actin. Local structural change of actin protomer both on polymerization and on binding of heavy meromyosin. *Eur J Biochem* *114*, 33-38.
- Krol, E., van Kessel, S.P., van Bezouwen, L.S., Kumar, N., Boekema, E.J., and Scheffers, D.J. (2012). *Bacillus subtilis* SepF binds to the C-terminus of FtsZ. *PLoS One* *7*, e43293.
- Kundakovic, T., Stanojkovic, T., Juranic, Z., and Kovacevic, N. (2005). Cytotoxic and antioxidant activity of *Achillea alexandri-regis*. *Pharmazie* *60*, 319-320.

- Lackner, L.L., Raskin, D.M., and de Boer, P.A. (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. 291-320. Kluwer Academy / Plenum Publishers, New York.
- Lappchen, T., Pinas, V.A., Hartog, A.F., Koomen, G.J., Schaffner-Barbero, C., Andreu, J.M., Trambaiolo, D., Lowe, J., Juhem, A., Popov, A.V., *et al.* (2008). Probing FtsZ and tubulin with C8-substituted GTP analogs reveals differences in their nucleotide binding sites. *Chem Biol* *15*, 189-199.
- Lara, B., and Ayala, J.A. (2002). Topological characterization of the essential *Escherichia coli* cell division protein FtsW. *FEMS Microbiol Lett* *216*, 23-32.
- Larsen, R.A., Cusumano, C., Fujioka, A., Lim-Fong, G., Patterson, P., and Pogliano, J. (2007). Treadmilling of a prokaryotic tubulin-like protein, TubZ, required for plasmid stability in *Bacillus thuringiensis*. *Genes Dev* *21*, 1340-1352.
- Levin, P.A., Kurtser, I.G., and Grossman, A.D. (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., and Losick, R. (1996). Transcription factor Spo0A switches the localization of the cell division protein FtsZ from a medial to a bipolar pattern in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev* *10*, 478-488.
- Levin, P.A., Schwartz, R.L., and Grossman, A.D. (2001). Polymer stability plays an important role in the positional regulation of FtsZ. *J Bacteriol* *183*, 5449-5452.
- Li, Z., Trimble, M.J., Brun, Y.V., and Jensen, G.J. (2007). The structure of FtsZ filaments in vivo suggests a force-generating role in cell division. *EMBO J* *26*, 4694-4708.
- Lindas, A.C., Karlsson, E.A., Lindgren, M.T., Ettema, T.J., and Bernander, R. (2008). A unique cell division machinery in the Archaea. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 18942-18946.
- Lowe, J. (1998). Crystal structure determination of FtsZ from *Methanococcus jannaschii*. *J Struct Biol* *124*, 235-243.
- Lowe, J., and Amos, L.A. (1998). Crystal structure of the bacterial cell-division protein FtsZ. *Nature* *391*, 203-206.
- Lowe, J., and Amos, L.A. (1999). Tubulin-like protofilaments in Ca<sup>2+</sup>-induced FtsZ sheets. *EMBO J* *18*, 2364-2371.
- Lowe, J., and Amos, L.A. (2009). Evolution of cytomotive filaments: the cytoskeleton from prokaryotes to eukaryotes. *Int J Biochem Cell Biol* *41*, 323-329.
- Lutkenhaus, J. (2007). Assembly dynamics of the bacterial MinCDE system and spatial regulation of the Z ring. *Annu Rev Biochem* *76*, 539-562.

- Lutkenhaus, J., Pichoff, S., and Du, S. (2012). Bacterial cytokinesis: From Z ring to divisome. *Cytoskeleton (Hoboken)* 69, 778-790.
- Ma, X., Ehrhardt, D.W., and Margolin, W. (1996). Colocalization of cell division proteins FtsZ and FtsA to cytoskeletal structures in living *Escherichia coli* cells by using green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 12998-13003.
- Marcelo, F., Huecas, S., Ruiz-Avila, L.B., Cañada, F.J., Perona, A., Poveda, A., Martin-Santamaria, S., Jimenez-Barbero, J., Morreale, A., Jimenez-Barbero, J., Andreu, J.M. (201). Interaction of bacterial cell division protein FtsZ with C8-substituted guanine nucleotides inhibitors. A combined NMR, biochemical and molecular modeling perspective. *J. Am. Chem. Soc.* DOI:10.1021/ja05515r
- Margalit, D.N., Romberg, L., Mets, R.B., Hebert, A.M., Mitchison, T.J., Kirschner, M.W., and RayChaudhuri, D. (2004). Targeting cell division: small-molecule inhibitors of FtsZ GTPase perturb cytokinetic ring assembly and induce bacterial lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 11821-11826.
- Margolin, W. (2000a). Organelle division: Self-assembling GTPase caught in the middle. *Curr Biol* 10, R328-330.
- Margolin, W. (2000b). Themes and variations in prokaryotic cell division. *FEMS Microbiol Rev* 24, 531-548.
- Martin-Galiano, A.J., Buey, R.M., Cabezas, M., and Andreu, J.M. (2010). Mapping flexibility and the assembly switch of cell division protein FtsZ by computational and mutational approaches. *J Biol Chem* 285, 22554-22565.
- Matsui, T., Yamane, J., Mogi, N., Yamaguchi, H., Takemoto, H., Yao, M., and Tanaka, I. (2012). Structural reorganization of the bacterial cell-division protein FtsZ from *Staphylococcus aureus*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 68, 1175-1188.
- Mayer, F. (2003). Cytoskeletons in prokaryotes. *Cell Biol Int* 27, 429-438.
- Migocki, M.D., Freeman, M.K., Wake, R.G., and Harry, E.J. (2002). The Min system is not required for precise placement of the midcell Z ring in *Bacillus subtilis*. *EMBO Rep* 3, 1163-1167.
- Mingorance, J., Rueda, S., Gomez-Puertas, P., Valencia, A., and Vicente, M. (2001). *Escherichia coli* FtsZ polymers contain mostly GTP and have a high nucleotide turnover. *Mol Microbiol* 41, 83-91.
- Mohammadi, T., Ploeger, G.E., Verheul, J., Comvalius, A.D., Martos, A., Alfonso, C., van Marle, J., Rivas, G., and den Blaauwen, T. (2009). The GTPase activity of *Escherichia coli* FtsZ determines the magnitude of the FtsZ polymer bundling by ZapA in vitro. *Biochemistry* 48, 11056-11066.
- Mohammadi, T., van Dam, V., Sijbrandi, R., Vernet, T., Zapun, A., Bouhss, A., Diepeveen-de Bruin, M., Nguyen-Disteche, M., de Kruijff, B., and Breukink, E. (2011). Identification of FtsW as a transporter of lipid-linked cell wall precursors across the membrane. *EMBO J* 30, 1425-1432.

- Monahan, L.G., Robinson, A., and Harry, E.J. (2009). Lateral FtsZ association and the assembly of the cytokinetic Z ring in bacteria. *Mol Microbiol* 74, 1004-1017.
- Morlot, C., Zapun, A., Dideberg, O., and Vernet, T. (2003). Growth and division of *Streptococcus pneumoniae*: localization of the high molecular weight penicillin-binding proteins during the cell cycle. *Mol Microbiol* 50, 845-855.
- Mosyak, L., Zhang, Y., Glasfeld, E., Haney, S., Stahl, M., Seehra, J., and Somers, W.S. (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., Dai, K., and Lutkenhaus, J. (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., and Lutkenhaus, J. (1994). Guanine nucleotide-dependent assembly of FtsZ into filaments. *J Bacteriol* 176, 2754-2758.
- Mukherjee, A., and Lutkenhaus, J. (1998). Dynamic assembly of FtsZ regulated by GTP hydrolysis. *EMBO J* 17, 462-469.
- Mulder, E., and Woldringh, C.L. (1989). Actively replicating nucleoids influence positioning of division sites in *Escherichia coli* filaments forming cells lacking DNA. *J Bacteriol* 171, 4303-4314.
- Muller, P., Ewers, C., Bertsche, U., Anstett, M., Kallis, T., Breukink, E., Fraipont, C., Terrak, M., Nguyen-Disteche, M., and Vollmer, W. (2007). The essential cell division protein FtsN interacts with the murein (peptidoglycan) synthase PBP1B in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 282, 36394-36402.
- Nogales, E., Downing, K.H., Amos, L.A., and Lowe, J. (1998). Tubulin and FtsZ form a distinct family of GTPases. *Nat Struct Biol* 5, 451-458.
- Ohashi, T., Hale, C.A., de Boer, P.A., and Erickson, H.P. (2002). Structural evidence that the P/Q domain of ZipA is an unstructured, flexible tether between the membrane and the C-terminal FtsZ-binding domain. *J Bacteriol* 184, 4313-4315.
- Ohtaka, H., and Freire, E. (2005). Adaptive inhibitors of the HIV-1 protease. *Prog Biophys Mol Biol* 88, 193-208.
- Oliva, M.A., Cordell, S.C., and Lowe, J. (2004). Structural insights into FtsZ protofilament formation. *Nat Struct Mol Biol* 11, 1243-1250.
- Oliva, M.A., Halbedel, S., Freund, S.M., Dutow, P., Leonard, T.A., Veprintsev, D.B., Hamoen, L.W., and Lowe, J. (2010). Features critical for membrane binding revealed by DivIVA crystal structure. *EMBO J* 29, 1988-2001.
- Oliva, M.A., Trambaiolo, D., and Lowe, J. (2007). Structural insights into the conformational variability of FtsZ. *J Mol Biol* 373, 1229-1242.
- Oliveras, G., Blancafort, A., Urruticoechea, A., Campuzano, O., Gomez-Cabello, D., Brugada, R., Lopez-Rodriguez, M.L., Colomer, R., and Puig, T. (2010). Novel anti-fatty acid synthase compounds with anti-cancer activity in HER2+ breast cancer. *Ann N Y Acad Sci* 1210, 86-92.

- Osteryoung, K.W., and Nunnari, J. (2003). The division of endosymbiotic organelles. *Science* *302*, 1698-1704.
- Osteryoung, K.W., and Vierling, E. (1995). Conserved cell and organelle division. *Nature* *376*, 473-474.
- Pacheco-Gomez, R., Cheng, X., Hicks, M.R., Smith, C.J., Roper, D.I., Addinall, S., Rodger, A., and Dafforn, T.R. (2013). Tetramerization of ZapA is required for FtsZ bundling. *Biochem J* *449*, 795-802.
- Pasquier, E., and Kavallaris, M. (2008). Microtubules: a dynamic target in cancer therapy. *IUBMB Life* *60*, 165-170.
- Patrick, J.E., and Kearns, D.B. (2008). MinJ (YvjD) is a topological determinant of cell division in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* *70*, 1166-1179.
- Perez, A.R., Abanes-De Mello, A., and Pogliano, K. (2000). SpoIIB localizes to active sites of septal biogenesis and spatially regulates septal thinning during engulfment in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* *182*, 1096-1108.
- Peters, N.T., Dinh, T., and Bernhardt, T.G. (2011). A fail-safe mechanism in the septal ring assembly pathway generated by the sequential recruitment of cell separation amidases and their activators. *J Bacteriol* *193*, 4973-4983.
- Pichoff, S., and Lutkenhaus, J. (2002). Unique and overlapping roles for ZipA and FtsA in septal ring assembly in *Escherichia coli*. *EMBO J* *21*, 685-693.
- Plaza, A., Keffer, J.L., Bifulco, G., Lloyd, J.R., and Bewley, C.A. (2010). Chrysopaentins A-H, antibacterial bisdiarylbutene macrocycles that inhibit the bacterial cell division protein FtsZ. *J Am Chem Soc* *132*, 9069-9077.
- Pogliano, J., Osborne, N., Sharp, M.D., Abanes-De Mello, A., Perez, A., Sun, Y.L., and Pogliano, K. (1999). A vital stain for studying membrane dynamics in bacteria: a novel mechanism controlling septation during *Bacillus subtilis* sporulation. *Mol Microbiol* *31*, 1149-1159.
- Puig, T., Relat, J., Marrero, P.F., Haro, D., Brunet, J., and Colomer, R. (2008). Green tea catechin inhibits fatty acid synthase without stimulating carnitine palmitoyltransferase-1 or inducing weight loss in experimental animals. *Anticancer Res* *28*, 3671-3676.
- Puig, T., Turrado, C., Benhamu, B., Aguilar, H., Relat, J., Ortega-Gutierrez, S., Casals, G., Marrero, P.F., Urruticoechea, A., Haro, D., *et al.* (2009). Novel Inhibitors of Fatty Acid Synthase with Anticancer Activity. *Clin Cancer Res* *15*, 7608-7615.
- Rai, D., Singh, J.K., Roy, N., and Panda, D. (2008). Curcumin inhibits FtsZ assembly: an attractive mechanism for its antibacterial activity. *Biochem J* *410*, 147-155.
- RayChaudhuri, D., and Park, J.T. (1992). *Escherichia coli* cell-division gene *ftsZ* encodes a novel GTP-binding protein. *Nature* *359*, 251-254.
- Reeve, J.N., Mendelson, N.H., Coyne, S.I., Hallock, L.L., and Cole, R.M. (1973). Minicells of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* *114*, 860-873.

- Rico, A.I., Garcia-Ovalle, M., Palacios, P., Casanova, M., and Vicente, M. (2010). Role of *Escherichia coli* FtsN protein in the assembly and stability of the cell division ring. *Mol Microbiol* 76, 760-771.
- Rivas, G., Lopez, A., Mingorance, J., Ferrandiz, M.J., Zorrilla, S., Minton, A.P., Vicente, M., and Andreu, J.M. (2000). Magnesium-induced linear self-association of the FtsZ bacterial cell division protein monomer. The primary steps for FtsZ assembly. *J Biol Chem* 275, 11740-11749.
- Romberg, L., and Levin, P.A. (2003). Assembly dynamics of the bacterial cell division protein FtsZ: poised at the edge of stability. *Annu Rev Microbiol* 57, 125-154.
- Ruiz-Avila, L.B., Huecas, S., Artola, M., Vergonos, A., Ramirez-Aportela, E., Cercenado, E., Barasoain, I., Vazquez-Villa, H., Martin-Fontecha, M., Chacon, P., *et al.* (2013). Synthetic Inhibitors of Bacterial Cell Division Targeting the GTP-Binding Site of FtsZ. *ACS Chem Biol*.
- Samaluru, H., SaiSree, L., and Reddy, M. (2007). Role of SufI (FtsP) in cell division of *Escherichia coli*: evidence for its involvement in stabilizing the assembly of the divisome. *J Bacteriol* 189, 8044-8052.
- Sarver, R.W., Peevers, J., Cody, W.L., Ciske, F.L., Dyer, J., Emerson, S.D., Hagadorn, J.C., Holsworth, D.D., Jalaie, M., Kaufman, M., *et al.* (2007). Binding thermodynamics of substituted diaminopyrimidine renin inhibitors. *Anal Biochem* 360, 30-40.
- Sass, P., and Brotz-Oesterhelt, H. (2013). Bacterial cell division as a target for new antibiotics. *Curr Opin Microbiol*.
- Schaffner-Barbero, C., Gil-Redondo, R., Ruiz-Avila, L.B., Huecas, S., Lappchen, T., den Blaauwen, T., Diaz, J.F., Morreale, A., and Andreu, J.M. (2010). Insights into nucleotide recognition by cell division protein FtsZ from a mant-GTP competition assay and molecular dynamics. *Biochemistry* 49, 10458-10472.
- Schaffner-Barbero, C., Martin-Fontecha, M., Chacon, P., and Andreu, J.M. (2012). Targeting the assembly of bacterial cell division protein FtsZ with small molecules. *ACS Chem Biol* 7, 269-277.
- Scheffers, D.J. (2007). Cell wall growth during elongation and division: one ring to bind them? *Mol Microbiol* 64, 877-880.
- Scheffers, D.J., de Wit, J.G., den Blaauwen, T., and Driessen, A.J. (2002). GTP hydrolysis of cell division protein FtsZ: evidence that the active site is formed by the association of monomers. *Biochemistry* 41, 521-529.
- Schlieper, D., Oliva, M.A., Andreu, J.M., and Lowe, J. (2005). Structure of bacterial tubulin BtubA/B: evidence for horizontal gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 9170-9175.
- Schmidt, K.L., Peterson, N.D., Kustus, R.J., Wissel, M.C., Graham, B., Phillips, G.J., and Weiss, D.S. (2004). A predicted ABC transporter, FtsEX, is needed for cell division in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 186, 785-793.
- Schon, A., Lam, S.Y., and Freire, E. (2011). Thermodynamics-based drug design: strategies for inhibiting protein-protein interactions. *Future Med Chem* 3, 1129-1137.

- Schuck, P., Perugini, M.A., Gonzales, N.R., Howlett, G.J., and Schubert, D. (2002). Size-distribution analysis of proteins by analytical ultracentrifugation: strategies and application to model systems. *Biophys J* 82, 1096-1111.
- Sharp, M.D., and Pogliano, K. (2003). The membrane domain of SpoIIIE is required for membrane fusion during *Bacillus subtilis* sporulation. *J Bacteriol* 185, 2005-2008.
- Shen, B., and Lutkenhaus, J. (2009). The conserved C-terminal tail of FtsZ is required for the septal localization and division inhibitory activity of MinC(C)/MinD. *Mol Microbiol* 72, 410-424.
- Shih, Y.L., Le, T., and Rothfield, L. (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.
- Silver, L.L. (2011). Challenges of antibacterial discovery. *Clin Microbiol Rev* 24, 71-109.
- Singh, J.K., Makde, R.D., Kumar, V., and Panda, D. (2007). A membrane protein, EzrA, regulates assembly dynamics of FtsZ by interacting with the C-terminal tail of FtsZ. *Biochemistry* 46, 11013-11022.
- Stokes, N.R., Baker, N., Bennett, J.M., Berry, J., Collins, I., Czaplewski, L.G., Logan, A., Macdonald, R., Macleod, L., Peasley, H., *et al.* (2013). An improved small-molecule inhibitor of FtsZ with superior in vitro potency, drug-like properties, and in vivo efficacy. *Antimicrob Agents Chemother* 57, 317-325.
- Stokes, N.R., Sievers, J., Barker, S., Bennett, J.M., Brown, D.R., Collins, I., Errington, V.M., Foulger, D., Hall, M., Halsey, R., *et al.* (2005). Novel inhibitors of bacterial cytokinesis identified by a cell-based antibiotic screening assay. *J Biol Chem* 280, 39709-39715.
- Strahl, H., and Hamoen, L.W. (2010). Membrane potential is important for bacterial cell division. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 12281-12286.
- Strauss, M.P., Liew, A.T., Turnbull, L., Whitchurch, C.B., Monahan, L.G., and Harry, E.J. (2012). 3D-SIM super resolution microscopy reveals a bead-like arrangement for FtsZ and the division machinery: implications for triggering cytokinesis. *PLoS Biol* 10, e1001389.
- Stricker, J., Maddox, P., Salmon, E.D., and Erickson, H.P. (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.
- Sugimoto, S., Yamanaka, K., Nishikori, S., Miyagi, A., Ando, T., and Ogura, T. (2010). AAA+ chaperone ClpX regulates dynamics of prokaryotic cytoskeletal protein FtsZ. *J Biol Chem* 285, 6648-6657.
- Sun, Q., Yu, X.C., and Margolin, W. (1998). Assembly of the FtsZ ring at the central division site in the absence of the chromosome. *Mol Microbiol* 29, 491-503.
- Tadros, M., Gonzalez, J.M., Rivas, G., Vicente, M., and Mingorance, J. (2006). Activation of the *Escherichia coli* cell division protein FtsZ by a low-affinity interaction with monovalent cations. *FEBS Lett* 580, 4941-4946.

- Tan, C.M., Therien, A.G., Lu, J., Lee, S.H., Caron, A., Gill, C.J., Lebeau-Jacob, C., Benton-Perdomo, L., Monteiro, J.M., Pereira, P.M., *et al.* (2012). Restoring methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* susceptibility to beta-lactam antibiotics. *Sci Transl Med* 4, 126ra135.
- Tarry, M., Arends, S.J., Roversi, P., Piette, E., Sargent, F., Berks, B.C., Weiss, D.S., and Lea, S.M. (2009). The *Escherichia coli* cell division protein and model Tat substrate SufI (FtsP) localizes to the septal ring and has a multicopper oxidase-like structure. *J Mol Biol* 386, 504-519.
- Tavale, S.S., and Sobell, H.M. (1970). Crystal and molecular structure of 8-bromoguanosine and 8-bromoadenosine, two purine nucleosides in the syn conformation. *J Mol Biol* 48, 109-123.
- Teather, R.M., Collins, J.F., and Donachie, W.D. (1974). Quantal behavior of a diffusible factor which initiates septum formation at potential division sites in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 118, 407-413.
- Thanbichler, M., and Shapiro, L. (2006). MipZ, a spatial regulator coordinating chromosome segregation with cell division in *Caulobacter*. *Cell* 126, 147-162.
- Tormo, A., Fernandez-Cabrera, C., and Vicente, M. (1985). The *ftsA* gene product: a possible connection between DNA replication and septation in *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol* 131, 239-244.
- Trachtenberg, S. (1998). Mollicutes-wall-less bacteria with internal cytoskeletons. *J Struct Biol* 124, 244-256.
- Turrado, C., Puig, T., Garcia-Carceles, J., Artola, M., Benhamu, B., Ortega-Gutierrez, S., Relat, J., Oliveras, G., Blancafort, A., Haro, D., *et al.* (2012). New synthetic inhibitors of fatty acid synthase with anticancer activity. *J Med Chem* 55, 5013-5023.
- Uehara, T., and Bernhardt, T.G. (2011). More than just lysins: peptidoglycan hydrolases tailor the cell wall. *Curr Opin Microbiol* 14, 698-703.
- Uehara, T., Dinh, T., and Bernhardt, T.G. (2009). LytM-domain factors are required for daughter cell separation and rapid ampicillin-induced lysis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 191, 5094-5107.
- Uehara, T., Parzych, K.R., Dinh, T., and Bernhardt, T.G. (2010). Daughter cell separation is controlled by cytokinetic ring-activated cell wall hydrolysis. *EMBO J* 29, 1412-1422.
- van den Ent, F., Amos, L., and Lowe, J. (2001a). Bacterial ancestry of actin and tubulin. *Curr Opin Microbiol* 4, 634-638.
- van den Ent, F., Amos, L.A., and Lowe, J. (2001b). Prokaryotic origin of the actin cytoskeleton. *Nature* 413, 39-44.
- van den Ent, F., and Lowe, J. (2000). Crystal structure of the cell division protein FtsA from *Thermotoga maritima*. *EMBO J* 19, 5300-5307.
- van den Ent, F., Moller-Jensen, J., Amos, L.A., Gerdes, K., and Lowe, J. (2002). F-actin-like filaments formed by plasmid segregation protein ParM. *EMBO J* 21, 6935-6943.

- Vaughan, S., Wickstead, B., Gull, K., and Addinall, S.G. (2004). Molecular evolution of FtsZ protein sequences encoded within the genomes of archaea, bacteria, and eukaryota. *J Mol Evol* 58, 19-29.
- Vitha, S., McAndrew, R.S., and Osteryoung, K.W. (2001). FtsZ ring formation at the chloroplast division site in plants. *J Cell Biol* 153, 111-120.
- Vollmer, W. (2006). The prokaryotic cytoskeleton: a putative target for inhibitors and antibiotics? *Appl Microbiol Biotechnol* 73, 37-47.
- Vollmer, W. (2008). Targeting the bacterial Z-ring. *Chem Biol* 15, 93-94.
- Wang, J., Galgoci, A., Kodali, S., Herath, K.B., Jayasuriya, H., Dorso, K., Vicente, F., Gonzalez, A., Cully, D., Bramhill, D., *et al.* (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, X., Huang, J., Mukherjee, A., Cao, C., and Lutkenhaus, J. (1997). Analysis of the interaction of FtsZ with itself, GTP, and FtsA. *J Bacteriol* 179, 5551-5559.
- Weart, R.B., Nakano, S., Lane, B.E., Zuber, P., and Levin, P.A. (2005). The ClpX chaperone modulates assembly of the tubulin-like protein FtsZ. *Mol Microbiol* 57, 238-249.
- Wells, J.A., and McClendon, C.L. (2007). Reaching for high-hanging fruit in drug discovery at protein-protein interfaces. *Nature* 450, 1001-1009.
- Wilson, L., and Jordan, M.A. (2004). New microtubule/tubulin-targeted anticancer drugs and novel chemotherapeutic strategies. *J Chemother* 16 Suppl 4, 83-85.
- Wood, E., Crosby, R.M., Dickerson, S., Frye, S.V., Griffin, R., Hunter, R., Jung, D.K., McDonald, O.B., McNutt, R., Mahony, W.B., *et al.* (2001). A prodrug approach to the design of cRaf1 kinase inhibitors with improved cellular activity. *Anticancer Drug Des* 16, 1-6.
- Wu, L.J., and Errington, J. (1997). Septal localization of the SpoIIIE chromosome partitioning protein in *Bacillus subtilis*. *EMBO J* 16, 2161-2169.
- Wu, L.J., and Errington, J. (2003). RacA and the Soj-Spo0J system combine to effect polar chromosome segregation in sporulating *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 49, 1463-1475.
- Wu, L.J., Ishikawa, S., Kawai, Y., Oshima, T., Ogasawara, N., and Errington, J. (2009). Noc protein binds to specific DNA sequences to coordinate cell division with chromosome segregation. *EMBO J* 28, 1940-1952.
- Yan, K., Pearce, K.H., and Payne, D.J. (2000). A conserved residue at the extreme C-terminus of FtsZ is critical for the FtsA-FtsZ interaction in *Staphylococcus aureus*. *Biochem Biophys Res Commun* 270, 387-392.
- Yang, C.G., Barasoain, I., Li, X., Matesanz, R., Liu, R., Sharom, F.J., Yin, D.L., Diaz, J.F., and Fang, W.S. (2007). Overcoming tumor drug resistance with high-affinity taxanes: a SAR study of C2-modified 7-acyl-10-deacetyl cephalomannines. *ChemMedChem* 2, 691-701.
- Yang, J.C., Van Den Ent, F., Neuhaus, D., Brevier, J., and Lowe, J. (2004). Solution structure and domain architecture of the divisome protein FtsN. *Mol Microbiol* 52, 651-660.

Yu, X.C., and Margolin, W. (1999). FtsZ ring clusters in min and partition mutants: role of both the Min system and the nucleoid in regulating FtsZ ring localization. *Mol Microbiol* 32, 315-326.

Yu, X.C., Weihe, E.K., and Margolin, W. (1998). Role of the C terminus of FtsK in *Escherichia coli* chromosome segregation. *J Bacteriol* 180, 6424-6428.

Zhou, H., Schulze, R., Cox, S., Saez, C., Hu, Z., and Lutkenhaus, J. (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.



**PUBLICACIONES A LAS QUE HA DADO LUGAR ESTA TESIS DOCTORAL**

Andreu, J.M., Schaffner-Barbero, C., Huecas, S., Alonso, D., Lopez-Rodriguez, M.L., **Ruiz-Avila, L.B.**, Nunez-Ramirez, R., Llorca, O., and Martin-Galiano, A.J. (2010). The antibacterial cell division inhibitor PC190723 is an FtsZ polymer-stabilizing agent that induces filament assembly and condensation. *J Biol Chem* 285, 14239-14246.

Schaffner-Barbero, C., Gil-Redondo, R., **Ruiz-Avila, L.B.**, Huecas, S., Lappchen, T., den Blaauwen, T., Diaz, J.F., Morreale, A., and Andreu, J.M. (2010). Insights into nucleotide recognition by cell division protein FtsZ from a mant-GTP competition assay and molecular dynamics. *Biochemistry* 49, 10458-10472.

**Ruiz-Avila, L.B.**, Huecas, S., Artola, M., Vergonos, A., Ramirez-Aportela, E., Cercenado, E., Barasoain, I., Vazquez-Villa, H., Martin-Fontecha, M., Chacon, P., *et al.*(2013). Synthetic Inhibitors of Bacterial Cell Division Targeting the GTP-Binding Site of FtsZ. *ACS Chem. Biol.* 8,2072-2083

Marcelo,F., Huecas,S., **Ruiz-Avila,L.B.**, Cañada, F.J., Perona,A., Poveda,A., Martin-Santamaria,S., Jimenez-Barbero,J., Morreale,A., Jimenez-Barbero,J., Andreu,J.M. (201). Interaction of bacterial cell division protein FtsZ with C8-substituted guanine nucleotides inhibitors. A combined NMR, biochemical and molecular modeling perspective. *J.Am.Chem.Soc.* DOI:10.1021/ja05515r