

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



**PLEGAMIENTO Y ENSAMBLAJE DE LA PROTEÍNA DE
DIVISIÓN CELULAR FtSZ DE “Methanococcus jannaschii”**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

María Ángela Oliva Blanco

Bajo la dirección del doctor

José Manuel Andreu Morales

Madrid

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

PLEGAMIENTO Y ENSAMBLAJE
DE LA PROTEÍNA DE DIVISIÓN CELULAR FtsZ DE
Methanococcus jannaschii.

TESIS DOCTORAL
M^a Ángela Oliva Blanco
Madrid, 2005

Director de la Tesis: Jose Manuel Andréu Morales
CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
CSIC, Madrid

ÍNDICE GENERAL

Índice General	1
Índice de Figuras	4
Abreviaturas y Tampones	7
Introducción	11
1.- La división de las células procariotas.	11
1.1.- Genes implicados en el proceso de división.	12
1.2.- Ensamblaje del divisoma.	14
1.3.- Localización del anillo Z en el sitio de división.	20
1.4.- Estructura y dinámica del anillo Z.	23
2.- FtsZ.	25
2.1.- Distribución de FtsZ en procariotas y orgánulos eucariotas.	25
2.2.- FtsZ es una homóloga procariota de la tubulina eucariota.	26
2.3.- Ensamblaje y actividad enzimática de FtsZ.	28
Objetivos	32
Materiales y Métodos	34
1.- Mutagénesis de FtsZ.	34
1.1.- Construcción de los plásmidos que codifican para FtsZ y FtsZW319Y.	34
1.2.- Proteínas quiméricas FtsZ- β Tubulina.	36
1.3.- Caracterización de las proteínas resultantes.	38
1.3.1.- Inmunoelectroforesis de FtsZ y FtsZW319Y.	38
1.3.2.- Secuenciación del extremo amino terminal.	39
1.3.3.- Espectrometría de masas de desorción/ionización por láser asistida por matriz (MALDI-TOF).	40
2.- Expresión y purificación de las distintas proteínas.	40
2.1.- Expresión de las distintas construcciones en <i>E.coli</i> .	40
2.2.- Purificación de las distintas proteínas.	41
2.2.1.- Método I: Cromatografía de afinidad.	42
2.2.2.- Método II: Precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y cromatografía de intercambio iónico.	43
2.2.3.- Método III: Cromatografía de afinidad en condiciones desnaturalizantes.	44
3.- Determinaciones de proteína y nucleótido.	46
3.1.- Cálculo de la concentración de proteína.	46

3.1.1.- Método I: Absorción en 6M GdmCl.	46
3.1.2.- Método II: Extracción del nucleótido unido a la proteína.	47
3.2.- Determinación del contenido en GTP y GDP de las proteínas.	48
4.- Dicroísmo circular.	49
4.1.- Espectros de dicroísmo.	50
4.2.- Curvas de desnaturalización.	50
4.3.- Disociación del nucleótido.	51
5.- Ensamblaje y actividad GTPasa.	52
5.1.- Polimerización de FtsZ.	52
5.2.- Actividad GTPasa.	53
5.3.- Contenido de nucleótido en el polímero.	53
6.- Microscopía electrónica.	54
6.1.- Preparación de muestras y microscopía.	54
6.2.- Procesamiento de imágenes.	54
7.- Cristalografía.	55
7.1.- Selección de condiciones de cristalización.	55
7.2.- Optimización de condiciones.	56
7.3.- Obtención de mapas de difracción.	57
7.4.- Resolución de la estructura.	58
7.5.- Determinación de la estructura del sitio activo de FtsZ.	59
8.- Reactivos.	59
Resultados	61
1.- Plegamiento de FtsZ.	61
1.1.- FtsZ, FtsZ-(His) ₆ y las proteínas mutantes FtsZW319Y, FtsZW319Y-(His) ₆ .	61
1.1.1.- Descripción de las proteínas FtsZ empleadas.	61
1.1.2.- Estabilidad y plegamiento de estas proteínas.	63
1.2.- Proteínas quiméricas de FtsZ y tubulina.	67
2.- Ensamblaje y actividad GTPasa.	71
2.1.- Ensamblaje reversible y dependiente de nucleótido de FtsZ de <i>Methanococcus jannaschii</i> .	72
2.2.- Activación de GTPasa por el ensamblaje en tampón con K ⁺ e inhibición por Na ⁺ .	78
2.3.- Inhibición de la GTPasa en el mutante FtsZW319Y-(His) ₆ .	80
3.- Estructura de los polímeros de FtsZ.	82
3.1.- Estructuras polimórficas de ensamblaje de FtsZ.	82
3.2.- Estructura del doble filamento de FtsZ.	84
3.3.- Polímeros formados por las quimeras FtsZ/tubulina.	86

4.- Estructuras cristalográficas de FtsZMj y su protofilamento.	87
4.1.- Estructura de FtsZW319Y.	89
4.2.- Estructura del Protofilamento de Apo-FtsZ.	90
Discusión	97
1.- Estabilidad y plegamiento de la proteína procariota FtsZ en comparación con su homóloga eucariota tubulina.	97
2.- Análisis de los elementos estructurales que forman parte de los contactos axiales y laterales en FtsZ y tubulina.	99
3.- Las quimeras FtsZ/tubulina adquieren características del plegamiento de su homóloga eucariota según acumula en su estructura bucles de tubulina.	102
4.- Ensamblaje dinámico de FtsZ inducido por la unión de nucleótido.	106
5.- El ensamblaje en ausencia de hidrólisis de nucleótido: efecto de cambios en las condiciones de ensamblaje y la mutación W319Y.	108
6.- La estructura básica en el polímero de FtsZ es un filamento doble.	109
7.- Alteraciones en el ensamblaje de FtsZ debido a la acumulación de segmentos de tubulina.	112
8.- FtsZ y Tubulina forman el mismo protofilamento.	113
9.- Accesibilidad del sitio de unión de nucleótido en el protofilamento de FtsZ.	114
10.- El interruptor de la GTPasa y el ciclo funcional de FtsZ	116
Conclusiones	119
Bibliografía	123
Anexo	145

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURAS

Introducción

Figura 1:	La división en bacterias.	12
Figura 2:	Agrupación <i>dcw</i> .	13
Figura 3:	Proteínas del divisoma.	14
Figura 4:	Ensamblaje del divisoma como un complejo multiproteico.	19
Figura 5:	Localización del anillo Z en bacterias bacilares.	21
Figura 6:	Estructuras del dímero de tubulina y el modelo de dímero de FtsZ.	27
Figura 7:	Estructuras y mapas topológicos del sitio de unión de nucleótido en tubulina y EF-Tu.	27
Figura 8:	Sitio activo en el modelo de filamento de FtsZ.	29
Figura 9:	Polímeros GTP y GDP formados por FtsZMj.	30

Material y Métodos

Figura 10:	Mutagénesis para eliminar la cola de histidinas.	36
Figura 11:	Expresión de FtsZ en <i>E.coli</i> BL21(DE3), pLysS.	41
Figura 12:	Cristales y mapas de difracción de FtsZW319Y y Apo-FtsZ.	58

Resultados

Figura 13:	Estructura primaria y terciaria de FtsZMj.	62
Figura 14:	Alineamientos del segmento β S9 de FtsZs.	63
Figura 15:	Espectros de dicroísmo circular y curvas de desnaturalización de FtsZ-(His) ₆ , FtsZ, FtsZW319Y-(His) ₆ , FtsZW319Y.	65
Figura 16:	Unión de nucleótido por FtsZMj renaturalizada.	67
Figura 17:	Alineamientos basados en la estructura secundaria y estructuras terciarias de FtsZMj y Tubulina.	68
Figura 18:	Espectros de dicroísmo circular y curvas de desnaturalización de tubulina, FtsZ-(His) ₆ y las quimeras.	70
Figura 19:	Curso de tiempo del ensamblaje de 12.5 μ M de FtsZ (en tampón MesK, 55°C), seguido mediante dispersión de luz a 90°.	73
Figura 20:	Ciclado de 12.5 μ M de FtsZ (en tampón MesK, 55°C) seguido mediante dispersión de luz a 90°.	74
Figura 21:	Ensamblaje de FtsZ a distintas concentraciones de Mg ²⁺ .	75
Figura 22:	Micrografías electrónicas representativas de los distintos polímeros formados por FtsZMj en tinción negativa.	77
Figura 23:	Concentración crítica y curso de tiempo de ensamblaje de FtsZMj.	78

Figura 24:	Monitorización del ensamblaje de 12.5 μ M de FtsZ-(His) ₆ y FtsZ en tampón MesNa, 55°C.	79
Figura 25:	Monitorización del ensamblaje de 12.5 μ M de FtsZW319Y-(His) ₆ .	81
Figura 26:	Procesado de imagen de las láminas formadas por FtsZW319Y-(His) ₆ y de los filamentos formados por FtsZMj y FtsZEc.	85
Figura 27:	Micrografías de los polímeros formados por las quimeras.	87
Figura 28:	Superposición del sitio de unión de nucleótido de las distintas estructuras de FtsZMj.	90
Figura 29:	Diagrama de cintas de la estructura cristalográfica Apo-FtsZMj.	92
Figura 30:	Superposición de los dímeros de FtsZ y tubulina.	92
Figura 31:	Dímeros de FtsZ y tubulina: accesibilidad del nucleótido.	93
Figura 32:	Detalle del sitio activo de FtsZMj comparado con el de α -tubulina.	95

Discusión

Figura 33:	Alineamientos de las secuencias de α y β tubulina y FtsZMj basados en su estructura.	99
Figura 34:	Distintas vistas en diagrama de cintas de β -tubulina incluyendo las inserciones sobre el núcleo común de FtsZ/tubulina.	101
Figura 35:	Imágenes bidimensionales promedio de inmunocomplejos de CCT:FtsZ con el Anticuerpo anti-CCT δ .	105
Figura 36:	Contactos laterales entre dos moléculas de FtsZ en un filamento grueso	110
Figura 37:	Modelo simplificado del mecanismo de interacción de FtsZ en un filamento doble, comparado con el de tubulina en microtúbulos.	111
Figura 38:	Estructuras del dímero α,β -tubulina	114
Figura 39:	Ciclo de actividad GTPasa de FtsZ	118

TABLAS

Material y Métodos

Tabla 1:	Coeficientes de extinción del nucleótido y los aminoácidos F, Y, W.	47
Tabla 2:	Datos relevantes de las distintas proteínas con las que se ha trabajado.	47

Resultados

Tabla 3	Valores de los ajustes de las curvas de plegamiento de las distintas proteínas	66
Tabla 4:	Actividad GTPasa y GMPCPPasa de FtsZMj.	80
Tabla 5:	Estructuras de los polímeros formados por FtsZMj.	83
Tabla 6:	Contactos longitudinales en el protofilamento de FtsZMj.	94
Tabla 7:	Datos cristalográficos y estadística de los datos de rayos X.	96

Discusión

Tabla 8:	Elementos de estructura secundaria de tubulina	101
----------	--	-----

ABREVIATURAS Y TAMPONES**ABREVIATURAS**

Abreviatura	Significado
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosín trifosfato
ATPasa	Actividad hidrolítica de ATP
BSA	Albúmina de suero bovino.
dATP	Desoxi adenosín trifosfato
Da	Dalton, unidad de masa atómica.
DC	Dicroísmo circular
dCTP	Desoxi citosín trifosfato
dGTP	Desoxi guanosín trifosfato
DO	Densidad óptica
dTTP	Desoxi timín trifosfato
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético.
FtsZ _{Mj}	FtsZ de <i>Methanococcus jannaschii</i>
FtsZ _{Ec}	FtsZ de <i>Escherichia coli</i>
GdmCl	Cloruro de Guanidinio
GDP	Guanosín difosfato
GFP	Proteína verde fluorescente.
GMPCPP	Guanosín-[(α,β)-metileno]-trifosfato

GMPCPPasa	Actividad hidrolítica de GMPCPP
GTP	Guanosín trifosfato
GTPasa	Actividad hidrolítica de GTP
Hepes	Ácido (N-[2-hidroxietil]piperacín-N'-[etanosulfónico]
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
IPTG	Isopropil β -D-tiogalactopiranosido
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
MALDI-TOF	Espectrometría de masas de desorción/ionización por láser asistida por matriz
Mes	Ácido 2-[N-morfolino]-etanosulfónico
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
PDB	Banco de datos de proteínas.
PEG	Polietilen glicol
Pipes	Ácido piperacín-N,N'-bis[2-etanosulfónico].
SDS	Dodecil sulfato sódico.
TBA	Fosfato de tetrabutilamonio.
TCEP	Tris-(2-carboxietil)-fosfina
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
Tween 20	Monolaurato de polioxietilensorbitano

TAMPONES

<i>Tampón</i>	<i>Composición</i>
Tampón TAE	40mM Tris-acetato, 1mM EDTA, pH 8.5
Tampón de transferencia	48mM Tris-HCl, 39mM Glicina, 0.0375% SDS, 20% metanol, pH8.9.
Tampón de bloqueo	50mM Tris-HCl, 0.9% NaCl, 1% Tween 20, 10% BSA, pH 7.9.
Tampón de lavado	50mM Tris-HCl, 0.9% NaCl, 1% Tween 20, pH 7.9.
Tampón A	50mM Tris-HCl, 300mM NaCl, pH 8.0.
Tampón B	50mM Tris-HCl, 300mM NaCl, 1M Imidazol, pH 5.8.
Tampón C	20mM Tris-HCl, 1mM NaN ₃ , 1mM EDTA, pH 8.0.
Tampón A2	50mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0.
Tampón B2	50mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 1M KCl, pH 8.0.
Tampón A3	50mM K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ , 1mM EDTA, 0.8M (NH ₄) ₂ SO ₄ , pH 7.5.
Tampón B3	50mM K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ , 1mM EDTA, pH 7.5.
Tampón A4	50mM Tris-HCl, 6M Urea, pH 7.0.
Tampón B4	50mM Tris-HCl, 6M Urea, 1M Imidazol, pH 7.0.
Tampón R	50mM Tris-HCl, 100mM NaCl, pH 7.0
Tampón C4	20mM Tris-HCl, 1mM NaN ₃ , 1mM EDTA, pH 7.5.
Tampón F	0.2M K ₂ HPO ₄ , 0.1N CH ₃ -COOH, 4mM TBA, pH 6.7.
Tampón D	20mM Tris-HCl, pH 7.9
Tampón CD	20mM Pipes-KOH, 5mM DTT, pH 7.5
Tampón CR	20mM Pipes-KOH, 5mM DTT, 8M GdmCl, pH 7.5
Tampón DN	20mM Pipes-KOH, 2mM TCEP, pH 7.5.

Tampón MesK	50mM Mes-KOH. 50mM KCl, 1mM EDTA, pH 6.5
Tampón MesNa	50mM Mes-NaOH. 50mM NaCl, 1mM EDTA, pH 6.5

INTRODUCCIÓN

1.- LA DIVISIÓN DE LAS CÉLULAS PROCARIOTAS

En los últimos 10 años se han producido grandes avances en el conocimiento de la célula bacteriana que han permitido dejar atrás ideas sobre la simplicidad de su biología. Siempre se ha considerado el citoesqueleto como una estructura típicamente eucariota que implicaba una clara diferencia con las células procariotas. Pero en poco tiempo y gracias a estudios estructurales y bioquímicos, se han encontrado proteínas procariotas homólogas a todas las pertenecientes al citoesqueleto eucariota (tubulina, actina y filamentos intermedios). FtsZ, proteína bacteriana implicada en el proceso de división, fue la primera descrita como homóloga de tubulina, ya que ambas presentaban un plegamiento similar (Löwe *et al.*, 1998; Nogales *et al.*, 1998b). Seguidamente otras proteínas también implicadas en la división bacteriana, FtsA, MreB, Mbl y ParM, se han descrito como homólogas de actina (van den Ent y Löwe, 2000; van den Ent *et al.*, 2001; Jones *et al.*, 2001; Carballido-López y Errington, 2003; van den Ent *et al.*, 2002). Y recientemente se ha identificado una proteína homóloga a los filamentos intermedios, CreS (Ausmees *et al.*, 2003).

Por otro lado, el proceso de división de la célula bacteriana ya no es a través de un mecanismo sencillo de fisión binaria, sino que implica la acción conjunta y coordinada de distintas proteínas. Aproximadamente al mismo tiempo que finaliza la replicación de ADN bacteriano, se inicia el proceso de división (Den Blaauwen *et al.*, 1999). Las proteínas implicadas en este proceso intervienen en la localización y formación del plano de división, en la separación del ADN (cromosoma y plásmidos) entre las dos células hijas evitando el fraccionamiento del material genético, en la síntesis de nuevo material de membrana y pared celular para formar los dos nuevos polos celulares, y en la constricción.

1.1- Genes implicados en el proceso de división

El ciclo vegetativo de los procariotas incluye la división mediante fisión binaria, proceso en el que la célula, una vez que ha alcanzado un tamaño determinado, duplica su cromosoma en dos compartimentos subcelulares y posteriormente divide su citoplasma entre las dos copias del cromosoma mediante invaginación de la envuelta celular en el sitio de división (figura 1).

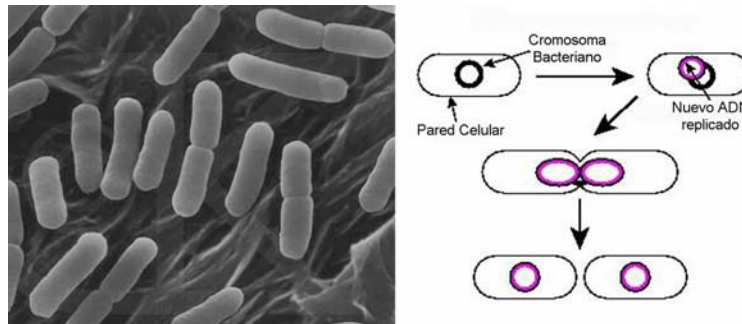


Figura 1: La división en bacterias. A la izquierda se muestran células de *E. coli*, cepa 0157:H7, en división (obtenida de www.emc.maricopa.edu). A la derecha se muestra un esquema de la replicación del cromosoma bacteriano y división de la bacteria en dos células hijas (obtenido de www.science.sin.edu).

La mayor parte de las proteínas que intervienen en este proceso fueron identificadas a partir de sus genes (Hirota *et al.*, 1968) mediante el aislamiento de mutantes letales condicionados a la temperatura. Estos mutantes adoptan formas filamentosas, debido a la imposibilidad de completar el proceso de división, en condiciones no permisivas. Los genes se agruparon dentro de una familia denominada *fts* (*filament-forming temperature sensitive*) (Donachie y Begg, 1990), que incluye genes directamente relacionados con la división celular como *ftsA*, *ftsB*, *ftsE*, *ftsI*, *ftsK*, *ftsL*, *ftsN*, *ftsQ*, *ftsW*, *ftsX* y *ftsZ* y otros que hasta el momento no se ha visto que presenten un papel tan directo en la división como *ftsH*, *ftsJ* y *ftsY* (Gill y Salmond, 1990; Ogura *et al.*, 1991; Caldas *et al.*, 2000; Fischer *et al.*, 2002).

En bacilos, muchos de los genes implicados en la división, incluidos *ftsL*, *ftsI*, *ftsW*, *ftsQ*, *ftsA* y *ftsZ* se encuentran localizados junto con genes que codifican para la síntesis de peptidoglicano (genes de las familias *mur* (mureína), *ddl* (alanina ligasa) y *mra* (transferasa)) y para la biosíntesis de lípidos (*envA*), en la agrupación *dcw* (*division and cell wall*), que se localiza en la región 2.5min

en el cromosoma de *E. coli* (Ayala *et al.*, 1994). El orden en el que aparecen los genes en esta agrupación está altamente conservado, siendo los genes *ftsZ* (al final de la agrupación) y *mraZ-mraW* (al principio) los más conservados (figura 2A), mientras que el ordenamiento de los otros genes es más variable, viéndose una relación entre la organización éstos y la forma de la bacteria (Tamames *et al.*, 2001). En *E. coli*, la organización transcripcional de este agrupamiento es compleja, pero se sabe que la transcripción se realiza en una sola dirección (Mengin-Lecreux *et al.*, 1998), existiendo un promotor inicial por encima del gen *mraZ*, varios promotores internos y un único terminador transcripcional por debajo del gen *envA* (Vicente *et al.*, 1998), lo que favorecería la expresión de proteínas implicadas en la división y en la síntesis de pared celular a partir de un único promotor. El análisis de parejas de genes en muchos genomas ha demostrado que la conservación del orden de los genes es un indicador de la interacción entre proteínas (Dandekar *et al.*, 1998). La regulación de la expresión de los genes de este agrupamiento viene determinada por varias proteínas (Vicente *et al.*, 1998); además se ha visto que el gen que más se transcribe es *ftsZ* porque existen promotores extras a partir de los cuales se puede inducir su expresión (Flardh *et al.*, 1998) (figura 2B).

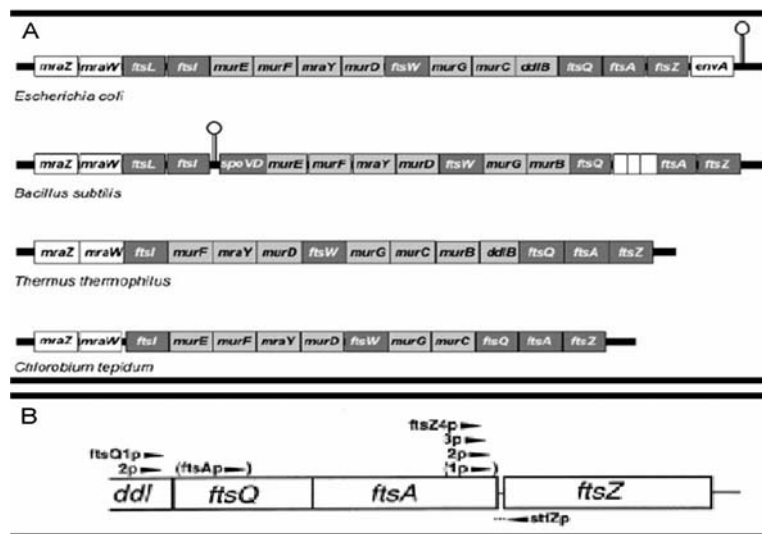


Figura 2: Agrupación *dcw*. (A) Representación esquemática de la agrupación *dcw* de distintas especies bacterianas. Los genes *fts* aparecen en gris oscuro, los genes que codifican para la síntesis de mureína aparecen en gris claro. Las horquillas representan terminadores transcripcionales (extraído de Mingorance *et al.*, 2004). (B) Ampliación del agrupamiento *ftsQAZ*, donde las flechas indican la posición de promotores (*ftsZ*1p, 2p, 3p y 4p; *ftsA*p y *ftsQ*1p, 2p) a partir de los cuales se puede transcribir el gen *ftsZ* (figura adaptada de Nanninga, 1998).

1.2.- Ensamblaje del divisoma

El divisoma es el conjunto de proteínas que se localizan en el sitio de división e intervienen en la formación de las dos células hijas. FtsZ parece ser el primer componente del divisoma, ya que ninguna de las otras proteínas es capaz de localizar en el sitio, en su ausencia (figura 3). FtsZ ensambla en la cara interna de la membrana citoplásmica en una estructura en forma de anillo denominada anillo Z (Bi y Lutkenhaus, 1991), que constituye el armazón sobre el que serán reclutadas el resto de las proteínas que intervienen en el proceso de división y podría proporcionar la fuerza necesaria para que se produzca la constricción (Romberg y Levin, 2003).

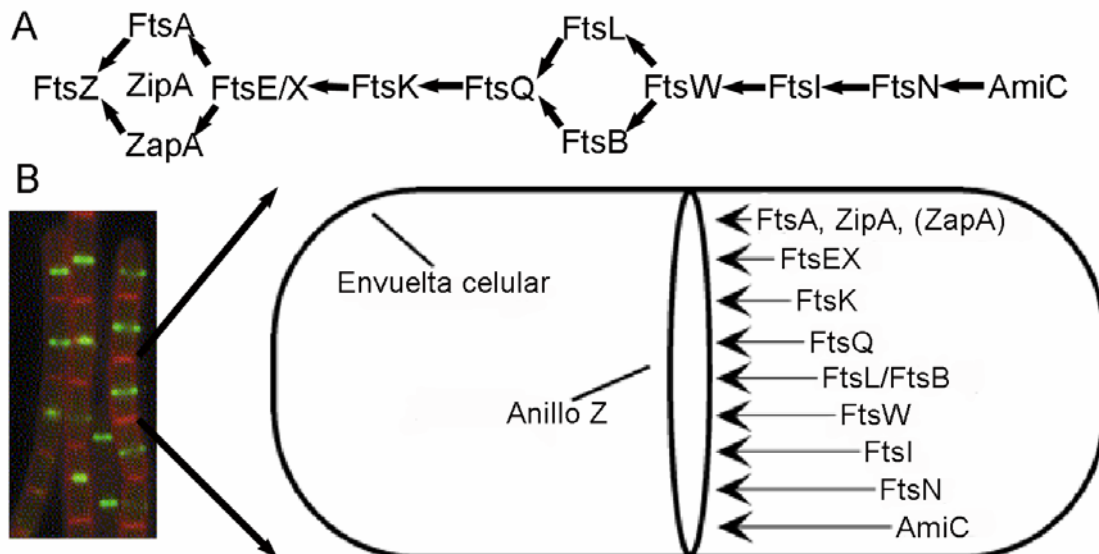


Figura 3: Proteínas del divisoma. (A) Esquema lineal del reclutamiento de proteínas al sitio de división en *E. coli*. **(B)** Formación y visualización del anillo Z en *B. subtilis*, mediante la fusión FtsZ-GFP (verde) y la tinción de la membrana con el agente FM4-64 (rojo) (extraído de Ben-Yehuda y Losick, 2002), y modelo de reclutamiento de las proteínas al septo en *E. coli* (extraído de Schmidt *et al.*, 2004): en primer lugar se produce el ensamblaje de FtsZ para formar el anillo Z, seguidamente FtsA, ZipA y ZapA se unen directamente a FtsZ. Una vez que FtsA y/o ZipA se han unido al anillo, el resto de las proteínas se unen en el orden descendente indicado.

Estudios de localización realizados en mutantes de *E. coli* han revelado que las proteínas que intervienen en la división se sitúan en el septo en un orden determinado, de modo que la ubicación de una proteína en concreto depende de el emplazamiento previo de otra u otras (Buddelmeijer y Beckwith, 2002; Errington *et al.*, 2003). Una vez formado el divisoma tiene lugar la citoquinesis,

proceso en el que la membrana citoplásmica, la capa de mureína (peptidoglicano) y la membrana externa se constriñen de forma coordinada en el medio de la célula para formar los polos de las nuevas células. Las proteínas que constituyen el divisoma desarrollan distintas funciones como (i) modular el estado de ensamblaje de FtsZ (FtsA, ZipA, ZapA); (ii) conectar el anillo Z a la membrana citoplásmica (FtsA, ZipA); (iii) coordinar la septación con la segregación cromosómica (FtsK); (iv) sintetizar peptidoglicano de la pared celular (FtsI, FtsW); y (v) hidrolizar peptidoglicano para separar las dos células hijas (AmiC, EnvC) (Weiss, 2004). También existen otras proteínas que son necesarias en el proceso de división, pero cuya función se desconoce hasta la fecha (FtsE, FtsX, FtsQ, FtsL, FtsB (YgbQ) y FtsN).

Tras la formación del anillo Z en *E. coli* se observa la localización de FtsA (Addinall y Lutkenhaus, 1996; Ma *et al.*, 1996) y ZipA (Hale y de Boer, 1997). Estas dos proteínas se sitúan en la misma región (Pichoff y Lutkenhaus, 2002) interaccionando con el dominio C-terminal de FtsZ (Hale y de Boer, 1997; Yan *et al.*, 2000; Mosyak *et al.*, 2000; Haney *et al.*, 2001) y estabilizando el anillo Z (Pichoff y Lutkenhaus, 2002), pero su ubicación en el sitio de división es independiente de la presencia o ausencia de la otra (Hale y de Boer, 1999). FtsA es una proteína de unos 45 KDa, altamente conservada y distribuida entre las bacterias, que pertenece a la superfamilia de las ATPasas y es homóloga a la actina eucariota (van den Ent y Löwe, 2000). Es imprescindible para el reclutamiento de otras proteínas como FtsI o FtsN (Corbin *et al.*, 2004) y también participa en la unión del anillo Z a la membrana (Pichoff y Lutkenhaus, 2005). ZipA es una proteína de membrana (Ohashi *et al.*, 2002) de unos 36KDa cuya estructura primaria se encuentra poco conservada en los organismos procariotas (Raychaudhuri, 1999). Se cree que puede estabilizar los polímeros de FtsZ (Hale *et al.*, 2000; Raychaudhuri, 1999) y colaborar en el anclaje del anillo Z a la membrana.

Seguidamente se localiza el complejo FtsE + FtsX. Ambas proteínas están organizadas en un operón junto a FtsY, receptor de SRP (partícula de reconocimiento de señal), pero no existe una relación estructural o funcional

entre ellas (de Leeuw *et al.*, 1999). FtsE es una proteína que une ATP y tiende a dimerizar asociándose a la cara interna de la membrana citoplasmática a través de FtsX (proteína integral de membrana) (de Leeuw *et al.*, 1999), juntas forman un complejo que presenta una gran homología con las proteínas de la superfamilia de transportadores ABC (permeasas) (de Leeuw *et al.*, 1999; Schmidt *et al.*, 2004), pero todavía no se ha descrito que función pueden desarrollar en el proceso de división.

FtsK llega al sitio de división tras la unión del complejo FtsEX (Begg *et al.*, 1995; Yu *et al.*, 1998). Es una proteína multifuncional de unos 146 KDa formada por un dominio N-terminal, que es esencial en para el reclutamiento del siguiente complejo (FtsQ-L-B), varias regiones transmembrana y un dominio C-terminal, que es una traslocasa de ADN dependiente de ATP (Dorazi y Dewar, 2000). Este dominio C-terminal está implicado en el desplazamiento del ADN cromosómico fuera de la región en la que se está formando el septo durante la división (Corre y Louarn, 2002; Lau *et al.*, 2003; Espeli *et al.*, 2003) e interviene en la resolución del dímero del cromosoma induciendo el cambio en el estado catalítico de las recombinasas XerC y XerD y el posicionamiento de la región dif (región en la que se separan las dos copias de cromosoma) (Aussel *et al.*, 2002; Massey *et al.*, 2004; Steiner *et al.*, 1999).

FtsQ (DivIB), FtsL y FtsB (YgbQ, DivIC) se localizan en el sitio de división tras FtsK (Buddelmeier *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 1999) y son tres proteínas que comparten una topología similar. Constan de un dominio N-terminal citoplásmico muy corto (Buddelmeijer y Beckwith, 2002; Errington *et al.*, 2003), seguido de un dominio transmembrana similar al de FtsN o FtsI (Carson *et al.*, 1991) y un dominio potencialmente periplásmico donde, al menos en FtsL y FtsB, aparece una estructura en forma de cremallera de leucinas (Daniel *et al.*, 1998). Su función es desconocida pero es esencial en la división celular (Chen *et al.*, 1999). En *E. coli* la localización de FtsL y FtsB en el sitio de división es mutuamente dependiente y requiere de FtsQ (Ghigo *et al.*, 1999; Buddelmeijer y Beckwith, 2002) y aunque inicialmente se pensaba que FtsQ se localizaba en el sitio de división en ausencia de FtsL y FtsB (Chen *et al.*, 1999; Buddelmeijer *et*

al., 2002), estudios recientes muestran que las tres proteínas podrían interaccionar antes de situarse en el sitio de división (Buddelmeijer y Beckwith, 2004) como ocurre en *B. subtilis* (Daniel *et al.*, 1998; Daniel y Errington, 2000; Katis *et al.*, 2000) y en *S. pneumoniae* (Noirclerc-Savoye *et al.*, 2005).

FtsW es reclutada al sitio de división una vez localizado el complejo FtsQ/B/L (Wang *et al.*, 1998). Es una proteína de unos 46 KDa que pertenece a la familia SEDS (*Shape, Elongation, Division, Sporulation*), en la que también se incluye SpoVE (implicada en la esporulación) y RodA (implicada en el crecimiento celular), con las que FtsW presenta un 30% de identidad (Ikeda *et al.*, 1989). Se desconoce el mecanismo de acción de estas proteínas, pero parece que trabajan en coordinación con las proteínas PBP de clase B para catalizar la polimerización de peptidoglicano (Henriques *et al.*, 2002). FtsW consta de unos extremos N y C-terminal localizados en el citoplasma y relacionados con la adquisición de la conformación de la proteína durante su plegamiento (Pastoret *et al.*, 2004), 10 segmentos transmembranales y un bucle largo en el periplasma (Lara y Ayala, 2002; Gerard *et al.*, 2002) implicado en el reclutamiento de FtsI y en el ensamblaje del peptidoglicano en el septo (Weiss *et al.*, 1997; Pastoret *et al.*, 2004).

FtsI (PBP-3), es una proteína de unos 64 KDa, en la que la mayor parte, excepto la región N-terminal que sirve de anclaje a la membrana, se localiza en el espacio periplásmico (Bowler y Spratt, 1989). Es una DD-transpeptidasa esencial para la formación del sáculo de mureína en el septo y la síntesis de peptidoglicanos unidos a partir de intermediarios lipídicos (Adam *et al.*, 1997; Goffin y Ghuysen, 1998). Además se ha visto que el gen se co-transcribe con *ftsW* (Hara *et al.*, 1997), constituyendo la única pareja de proteínas de división que muestran una correlación perfecta (Margolin, 2000).

La localización de FtsN depende de la actividad de FtsI (Dai *et al.*, 1996; Addinall *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1998) y aunque se desconoce su función, se ha visto que se une a la mureína durante la división celular (Ursinus *et al.*, 2004).

AmiC es la última proteína, descrita hasta el momento, que forma parte del divisoma (Heidrich *et al.*, 2001; Bernhardt y de Boer, 2003). Es una N-

acetilmuramil-L-alanina amidasa transmembranal, una enzima periplásmica encargada de degradar uniones de la pared celular durante su invaginación tras ser exportada hacia el periplasma a través de un sistema Tat (transporta proteínas que han adquirido un cierto grado de estructura terciaria y presentan un péptido señal eliminable en su extremo N-terminal que contiene una secuencia conservada de dobles argininas) (Bernhardt y de Boer, 2003; Ize *et al.*, 2003).

Recientemente se han descrito otras proteínas, ZapA, EzrA y EnvC, relacionadas con el proceso de división y regulación del ensamblaje de FtsZ, pero que no parecen ser esenciales pues el bloqueo de su expresión no es letal para la célula. ZapA es una proteína citoplasmática de unos 12 KDa que probablemente forme un dímero *in vivo* (Low *et al.*, 2004). Se descubrió en *B. subtilis*, y aunque estudios *in vitro* han demostrado que se une a FtsZ favoreciendo la asociación lateral de filamentos (Gueiros-Filho y Losick 2002; Low *et al.*, 2004), todavía no se ha estudiado su localización en la célula y se desconoce su funcionalidad *in vivo*. EzrA es una proteína que se ancla a la membrana a través de una α -hélice (Haeusser *et al.*, 2004) y que se describió por primera vez en *B. subtilis* como un regulador negativo de la formación del anillo Z (Levin *et al.*, 1999). EzrA es capaz de inhibir el ensamblaje de FtsZ, pero incapaz de desensamblar los polímeros formados previamente (Haeusser *et al.*, 2004). EnvC es una proteína que se secreta al espacio periplásmico donde actúa sobre la mureína a través de su actividad hidrolítica, lo que ha llevado a pensar que puede intervenir en la constricción de la membrana externa y separación de las dos células hijas (Bernhardt y de Boer, 2004).

En el caso de *B. subtilis* la localización de las proteínas de división es interdependiente, es decir, la eliminación de cualquiera de las proteínas que forman el divisoma, impide el ensamblaje de las demás en el sitio de división. Sugiriendo que tanto el ensamblaje como el reclutamiento se producen de forma cooperativa (Errington *et al.*, 2003). Estudios recientes en *E. coli* muestran que el reclutamiento de las distintas proteínas al sitio de división es más complejo de lo que se esperaba ya que todas las proteínas son capaces de interaccionar

consigo mismas, muchas de las proteínas de división interaccionan con al menos una de las otras proteínas del divisoma y varias proteínas pueden interaccionar con múltiples proteínas del divisoma (Di Lallo *et al.*, 2003). Además hay que tener en cuenta que: (i) el anillo es una estructura transitoria, en el sentido de que se forma cuando la célula se tiene que dividir y desensambla tras la división; (ii) la mayor parte de las proteínas del septo se unen a la membrana de modo que se incrementa su concentración local favoreciendo interacciones débiles; (iii) no existen moléculas suficientes de las distintas proteínas para formar anillos continuos con todas ellas (20-40 moléculas de FtsQ por célula (Carson *et al.*, 1991), 100 moléculas por célula de FtsI (Dougherty *et al.*, 1996), etc); (iv) FtsQ, FtsL y FtsB son reclutadas al sitio de división como un complejo, independientemente de que FtsQ también pueda localizar en el anillo sin FtsL y FtsB (Buddelmeijer y Beckwith, 2004; Goehring *et al.*, 2005); y (v) FtsE y FtsX también podrían formar un complejo en el sitio de división (De Leeuw *et al.*, 1999). Todos estos resultados apoyan la hipótesis de formación de un complejo multiproteico (figura 4) en el que las interacciones entre las distintas proteínas deben ser más complejas que el orden lineal de reclutamiento descrito inicialmente en *E. coli* (figura 3A).

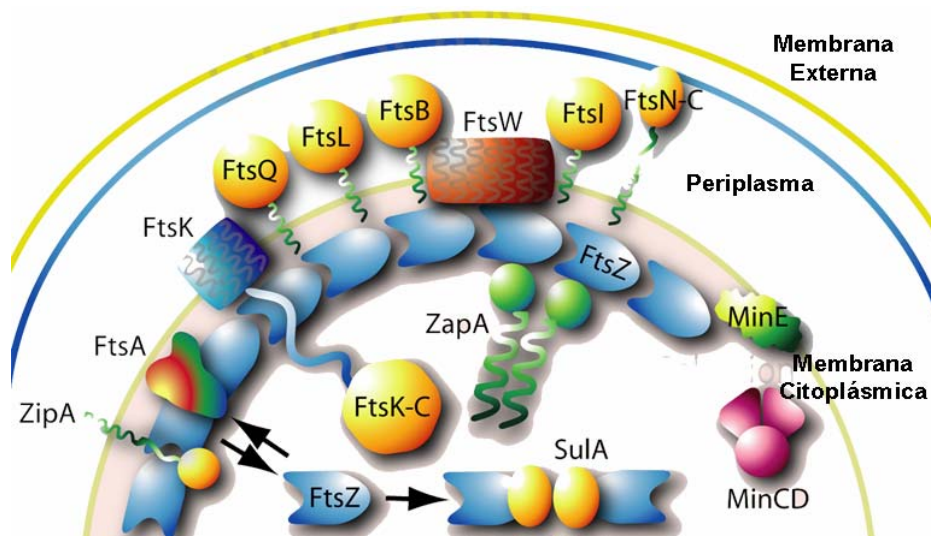


Figura 4: Ensamblaje del divisoma como un complejo multiproteico. Primeramente se produce el ensamblaje del anillo Z en la cara interna de la membrana citoplásmica. FtsZ interacciona con las proteínas FtsA y ZipA a través de su extremo C-terminal. El orden de reclutamiento de las siguientes proteínas es como se describe en la figura 3A, siendo la mayoría de ellas proteínas transmembranales, pero la disposición final de las proteínas en la estructura es desconocida (cedida por el Dr. Jan Löwe).

También existe la posibilidad de que realmente se formen dos complejos proteicos. Por un lado se ha visto que las interacciones entre estas proteínas se pueden agrupar en: (i) interacciones tempranas, en las que participarían FtsZ, FtsA, ZipA y FtsK; y (ii) interacciones tardías, en las que participarían FtsW, FtsN y FtsI y fuera de estos grupos quedarían FtsL y FtsQ (Di Lallo *et al.*, 2003). Por otro se ha visto que la división se produce en dos tiempos: (i) en un primer tiempo se forma el anillo Z en el sitio de división celular de forma más o menos simultánea con la terminación de la replicación del ADN y según va formándose el anillo son reclutadas ZipA, FtsA y ZapA; (ii) en un segundo tiempo y tras 17 minutos FtsQ, FtsW, FtsI y FtsN ensamblarían en 1 a 3 minutos y de forma simultánea. La localización del complejo FtsEX y FtsK no estaría todavía clara (Aarsman *et al.*, 2005).

1.3.- Localización del anillo Z en el sitio de división

Durante el ciclo celular la coordinación entre la replicación del ADN, la segregación del cromosoma y la división celular deben de ser precisas para asegurar una herencia estable del material genético. La regulación temporal requiere de la coordinación entre la replicación y segregación del ADN y la septación; la regulación espacial requiere el correcto emplazamiento del septo de división entre las dos copias del cromosoma que se está segregando.

En células bacilares como *E. coli* o *B. subtilis* la localización del anillo Z en el centro de la célula viene determinada por dos sistemas que inhiben el ensamblaje de FtsZ: la oclusión por el nucleoide y el sistema Min (figura 5A).

FtsZ está en la célula a una concentración suficiente para polimerizar en el sitio de división, pero la acción del nucleoide (cromosoma bacteriano) impide su ensamblaje. Aunque en un principio sólo se observó la inhibición de la división en las proximidades del sitio de replicación y segregación de los nucleoides, sin ser señalado ningún factor en concreto (Mulder y Woldringh, 1989), posteriormente se ha visto que la concentración local de ADN y el estado de replicación del cromosoma son factores bastante importantes en este sistema de regulación (Margolin, 2001; Harry, 2001). Recientemente se ha descrito una

proteína (Noc) que media en el mecanismo de oclusión por el nucleoide en *B. subtilis* (Wu y Errington, 2004), aunque se desconoce como bloquea el ensamblaje del anillo Z.

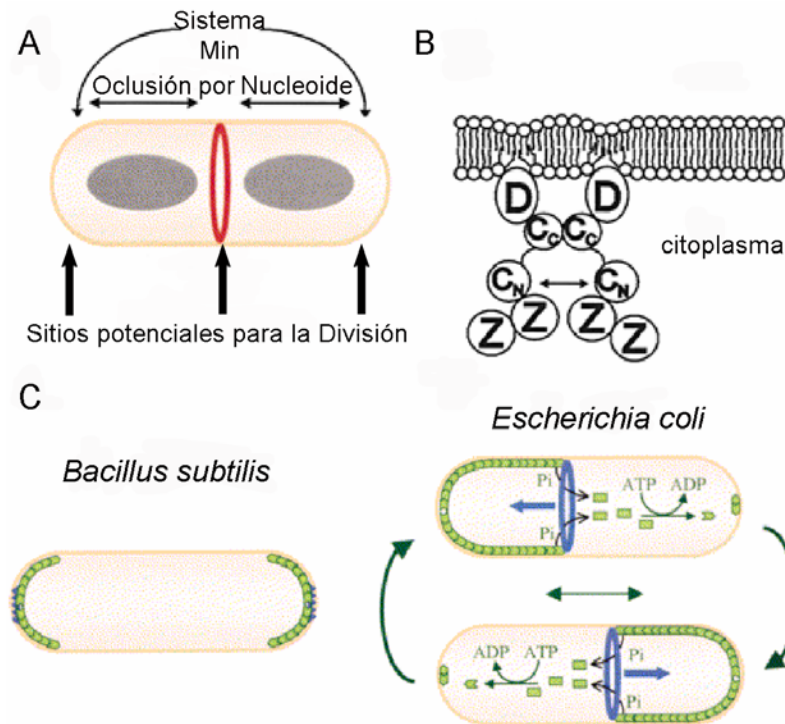


Figura 5: Localización del anillo Z en bacterias bacilares. (A) Papel que desempeña el nucleoide y el sistema Min. La presencia de las dos copias del cromosoma bloquea la división en sus proximidades, permitiendo la formación del anillo Z en el centro celular o en los polos, mientras el sistema Min actúa impidiendo la localización del anillo Z en los polos, por lo que finalmente FtsZ sólo puede polimerizar en el centro de la bacteria. **(B)** Bloqueo de la división en los polos a través de la acción de las proteínas MinC y MinD. El dominio C-terminal de MinC (C_C) permite tanto la dimerización de la proteína como su asociación con MinD (D), que se asocia con la membrana. A través del dominio N-terminal (C_N), MinC impide la polimerización de FtsZ (Z). **(C)** Mecanismo de acción del sistema Min en *B. subtilis* y *E. coli*. En el primer caso el complejo MinD forma filamentos (verde) que quedan retenidos en los polos de la célula por la proteína DivIVA (azul). En el segundo MinD (verde) polimeriza en presencia de ATP formando filamentos con los que un anillo de MinE (azul) interacciona, estimulando la hidrólisis de ATP y la liberación de los monómeros de MinD de la membrana hacia el citoplasma, donde una vez intercambiado el ADP por ATP puede volver a polimerizar, esta vez en el polo opuesto. En ambos casos MinC está unida a MinD como se muestra en el apartado B. (Figura extraída de Autret y Errington, 2001).

Aunque la inhibición de la división en el centro de la bacteria durante la replicación del cromosoma está asegurada por la acción del nucleoide, existen otros dos sitios potenciales para el ensamblaje de FtsZ: los polos celulares, donde el nucleoide, debido a su baja densidad, no tiene capacidad de inhibir la formación de anillos Z. En esta zona es el sistema Min es el encargado de

realizar esta función. La acción del sistema Min sobre la localización del anillo Z ha sido estudiada sobre dos modelos celulares: *E. coli*, donde requiere la acción coordinada de las proteínas MinC, MinD y MinE; y *B. subtilis*, donde MinC y MinD actúan junto con DivIVA.

En *E. coli*, MinC actúa como regulador de la división celular inhibiendo el ensamblaje de FtsZ (figura 5B) (Hu *et al.*, 1999). MinC carece de especificidad en su localización y es necesaria la presencia de las otras dos proteínas, MinD y MinE para proporcionar la especificidad topológica en su función. MinD es una ATPasa de membrana que actúa reclutando a las otras dos proteínas, MinC y MinE (Raskin y de Boer, 1997; Hu y Lutkenhaus, 1999; Raskin y de Boer, 1999; Rowland *et al.*, 2000). MinE es el factor topológico que asegura que el proceso de inhibición de la división se produzca sólo en los polos, ya que en su ausencia se produce una inhibición general de la división celular (de Boer, P.A. *et al.*, 1992).

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. 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 lado a lado (Fu *et al.*, 2001; Hale *et al.*, 2001), 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. MinE, en presencia de fosfolípidos de membrana activa la ATPasa de MinD induciendo la liberación del complejo MinCD (Hu y Lutkenhaus, 2001; Hale *et al.*, 2001), que rápidamente vuelve a ensamblar en el polo opuesto, donde MinE vuelve a inducir la liberación del complejo MinCD que de nuevo vuelve a ensamblar en el otro polo, de modo que se produce una oscilación de polo a polo con una periodicidad de 20 a 90 segundos (Raskin y deBoer, 1999a, 1999b). En cada ciclo celular se producen múltiples oscilaciones por lo que el periodo de tiempo que MinCD está ausente de un polo antes de la siguiente oscilación es breve y la concentración local de MinC en la mitad de la bacteria muy baja. De esta manera MinC inhibe el ensamblaje de FtsZ en los dos polos

celulares sin inhibir la formación del anillo Z en la mitad de la célula (Meinhardt y de Boer, 2001; Howard *et al.*, 2001; Kruse, 2002).

Las proteínas Min no se encuentran distribuidas al azar en las zonas polares sino que se ha visto que están organizadas en amplias estructuras en forma de espiral que recorren la célula. La oscilación se puede interpretar como: (i) una redistribución dinámica de las proteínas Min a través de la estructura helicoidal que recorre la célula de polo a polo, de modo que se producen concentraciones locales mayores en uno u otro polo; (ii) la estructura helicoidal localizada en el polo opuesto de la célula es utilizado como el molde para la incorporación de MinD durante la oscilación (Shih *et al.*, 2003).

En *B subtilis*, donde no existe MinE ni ninguna proteína homóloga, el complejo MinCD es secuestrado en los polos celulares por DivIVA (Marston *et al.*, 1998). El resultado neto al igual que en el caso de *E.coli* es la existencia de una concentración mínima de MinCD en el centro de la célula a lo largo del tiempo (Howard, 2004) que permite la formación del anillo Z y ensamblaje del septosoma (figura 5C).

1.4.- Estructura y dinámica del anillo Z

La visualización del anillo Z *in vivo* se ha realizado mediante inmunolocalización por microscopía electrónica (Bi y Lutkenhaus, 1991), fluorescencia con fusiones de FtsZ con la proteína fluorescente verde (GFP) (Ma *et al.*, 1996; Ma *et al.*, 1997; Sun y Margolin, 1998) e inmunofluorescencia (Addinall *et al.*, 1996). Aunque en todos estos casos se puede determinar la localización del anillo Z durante la división, estas técnicas no permiten describir su estructura. Hasta la fecha tampoco la microscopía electrónica ha permitido la localización y visualización del anillo Z.

Distintas teorías han surgido sobre la estructura del anillo Z. Por un lado y basándose en la homología de FtsZ con la proteína eucariota tubulina (Nogales *et al.*, 1998b) y en experimentos bioquímicos y de microscopía electrónica realizados *in vitro*, se estableció que el anillo debía estar constituido por protofilamentos que podrían agruparse en estructuras de mayor orden mediante

la creación de distintas interacciones laterales (Erickson, 1995; Löwe y Amos, 1999). Este dato junto con las estimaciones del número de moléculas de FtsZ por célula presentes en *E. coli* (oscila entre 3200 (Rueda *et al.*, 2003) y 15000 (Lu *et al.*, 1998)) permitió plantear la hipótesis de un anillo Z formado por un polímero de unas 40µm de longitud que podría rodear la circunferencia de una bacteria de unas 0.6µm de diámetro, unas 20 veces. O bien, formar pequeños polímeros asociados en la cara interna de la membrana (Lu *et al.*, 2000).

Estudios *in vivo* realizados posteriormente mediante FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*) mostraron que sólo aproximadamente el 30% de las moléculas de FtsZ formaban parte del anillo Z, lo que indicaría que el anillo Z no debe de dar más de una o a lo sumo dos vueltas a la circunferencia de la célula (Stricker *et al.*, 2002). Estos experimentos también mostraron que el anillo no es una estructura estática, sino que se encuentra en equilibrio dinámico (Stricker *et al.*, 2002), ya que se producía un intercambio rápido entre moléculas del anillo y moléculas del citoplasma con un tiempo medio de intercambio de 8-9 segundos tanto en *E. coli* como en *B. subtilis* (Anderson *et al.*, 2004). Pero estos no son los únicos resultados que han mostrado la dinamicidad del anillo Z, ya que también se ha visto que en células que van a esporular el anillo Z se transforma en una espiral que nace en la mitad de la célula y se dirige a los polos donde eventualmente es reemplazada por un nuevo anillo Z (Ben-Yehuda y Losick, 2002) (figura 6).

El resto de las moléculas de FtsZ que no forman parte del anillo forman una hélice que presenta un movimiento oscilatorio lento cada 30-60 segundos dependiente de la proteína MinD. Se ha hipotetizado que esta estructura helicoidal formaría parte del citosqueleto de células que no están en división y constituiría un reservorio de monómeros de proteína para el rápido intercambio observado en el anillo (Thanedar y Margolin, 2004).

A pesar de los avances realizados todavía se desconoce cuál es la estructura *in vivo* del anillo Z, probablemente debido a: (i) el anillo es una estructura transitoria y presenta una gran dinamicidad (Stricker *et al.*, 2002; Anderson *et al.*, 2004); (ii) el anillo que se forma es probable que sea una

estructura fina y/o discontinua (Stricker *et al.*, 2002); (iii) el aglomeramiento macromolecular del citosol bacteriano dificulta la visualización del anillo mediante microscopía electrónica (Zimmerman y Trach, 1991). También se desconoce el mecanismo por el cual se inicia y forma este anillo y el proceso mediante el cual se produce la constricción de la membrana.

2.- FtsZ

2.1.-Distribución de FtsZ en procariotas y orgánulos eucariotas

FtsZ está altamente conservada y distribuida entre los procariotas y por el momento sólo se ha visto que se encuentre ausente en miembros de la familia Chlamydiaceae (microorganismos de ciclo biológico parásito intracelular) (Brown y Rockey, 2000; Read *et al.*, 2000), en dos especies de bacterias de vida libre *Ureoplasma uralyticum* (especie de micoplasma) (Glass *et al.*, 2000) y *Rhodopirellula baltica* (familia Planctomycetaceae) (Glockner *et al.*, 2003), y en el filo Crenarchaeota (Natale *et al.*, 2000; Kawarabayasi *et al.*, 2001; She *et al.*, 2001; Fitz-Gibbon *et al.*, 2002; Vaughan *et al.*, 2004).

En eucariotas también se han identificado homólogos de FtsZ. Está presente en cloroplastos de algunas algas y plantas superiores (Mori *et al.*, 2001; Vitha *et al.*, 2001) y en mitocondrias de las algas *Mallomonas splendens* y *Cyanidioschyzon merolae* (Beech *et al.*, 2000; Takahara *et al.*, 2000).

Puesto que los cloroplastos surgieron a partir de cianobacterias (McFadden, 1999) y dado que el gen *ftsZ* se transfirió al núcleo eucariota, hoy en día el ADN de plantas incluye 2 familias distintas de FtsZ (FtsZ1 y FtsZ2) con varios miembros cada una (KieSSLing *et al.*, 2000; Stokes y Osteryoung, 2003; Rensing *et al.*, 2004). Tanto FtsZ1 como FtsZ2 intervienen en la división localizándose en el estroma del cloroplasto (Osteryoung y Vierling, 1995; Fujiwara y Yoshida, 2001; McAndrew *et al.*, 2001; Vitha *et al.*, 2001), ambas son necesarias ya que parecen no poseer funciones redundantes (Osteryoung *et al.*, 1998; Osteryoung y McAndrew, 2001; Stokes y Osteryoung, 2003) y se ha sugerido que pueden co-ensamblar (Vitha *et al.*, 2003). Recientemente también se ha descrito la presencia de FtsZ en el citoplasma de células del musgo

Physcomitrella patens (KieSSLing *et al.*, 2004) y se ha especulado sobre una posible función de unión entre la división del cloroplasto y la de la propia célula.

Las mitocondrias provienen de α -proteobacterias y al igual que los cloroplastos se dividen antes de que lo haga la célula. Las mitocondrias en hongos, plantas y animales carecen de homólogos de FtsZ lo que sugiere que se ha perdido durante la evolución en eucariotas (Kiefel *et al.*, 2004). Todas las proteínas identificadas relacionadas con la división de mitocondrias están asociadas a la membrana externa, donde el proceso está mediado por la dinamina (Gao *et al.*, 2003; Miyagishima *et al.*, 2001; Nishida *et al.*, 2003), que a su vez también se ha visto que interviene en la división de cloroplastos (Miyagishima *et al.*, 2003). La división de la membrana interna (donde se ha localizado FtsZ) es menos conocida (Nishida *et al.*, 2004) e incluso se ha propuesto que no es necesaria la presencia de componentes asociados a la membrana interna para que se produzca su división (Shaw y Nunnari, 2002).

2.2.- FtsZ es una homóloga procariota de la tubulina eucariota

Estudios de secuencia mostraron que a pesar de ser una GTPasa, FtsZ presentaba una homología muy baja (menor al 10-18%) respecto a tubulina, aunque esta homología se localizaba en determinadas regiones altamente conservadas como la secuencia de unión de nucleótido [GGGTG(ST)G] (Erickson, 1995; de Pereda, *et al.*, 1996). Posteriormente, con la resolución de la estructura cristalográfica de FtsZ de *Methanococcus jannaschii* a 2.8Å (Löwe y Amos, 1998) y del dímero $\alpha\beta$ tubulina en láminas de zinc a 3.7Å (Nogales *et al.*, 1998a) se constató la gran homología estructural entre ambas proteínas (figura 6).

A lo largo de los siguientes apartados de la tesis, en concordancia con los resultados obtenidos, se explicaran cuáles son las características estructurales de estas dos proteínas así como las semejanzas y diferencias encontradas en el análisis de las estructuras tridimensionales.

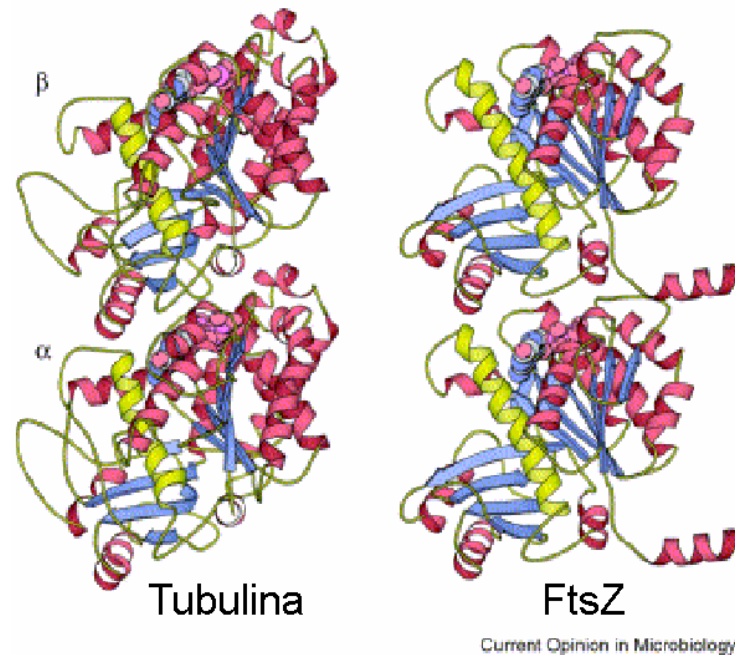


Figura 6: Estructuras del dímero de tubulina y el modelo de dímero de FtsZ. La estructura tridimensional del dímero de FtsZ muestra un plegamiento similar a la del heterodímero de tubulina (subunidad α en la parte inferior y β en la parte superior). (extraído de Van den Ent, F., *et al*, 2001).

La determinación de las estructuras de estas dos proteínas también permitió destacar diferencias en el modo de unión de nucleótido observado en otras GTPasa como EF-Tu, p21 (ras) o α -transducina: (i) el bucle P de las GTPasas se reemplaza por los bucles T1 y T4 (donde se encuentra la secuencia de unión de nucleótido) en FtsZ y tubulina (figura 7); (ii) las zonas equivalentes a los elementos *switch I* (bucle T2) y *switch II* (bucle T3) en FtsZ y tubulina no interaccionan con el nucleótido de la misma forma debido a una topología inversa; (iii) a diferencia de estas GTPasas donde se emplean 5 segmentos en la unión del nucleótido, FtsZ y tubulina emplean un total de 7 segmentos. Por ello se agruparon dentro de un grupo denominado como GTPasas atípicas (Nogales *et al.*, 1998b).

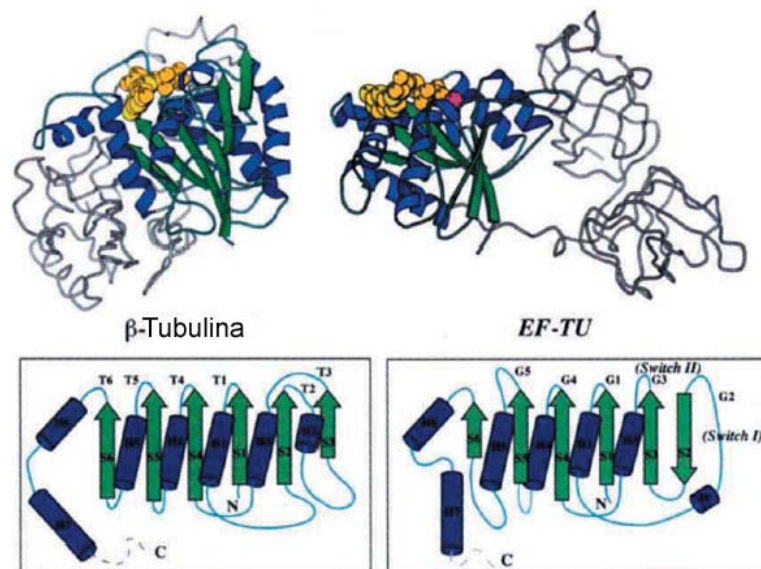


Figura 7: Estructuras y mapas topológicos del sitio de unión de nucleótido de tubulina y EF-Tu. En la parte superior se muestran las estructuras tridimensionales de ambas proteínas, en las que se han resaltado las regiones implicadas en la unión del nucleótido. Estas regiones aparecen numeradas en los mapas topológicos de cada proteína mostrados en la parte inferior. El bucle P corresponde con el bucle G2 en EF-Tu. Obtenida de Nogales *et al.*, 1998b.

2.3.- Ensamblaje y actividad enzimática de FtsZ

FtsZ es una proteína que une nucleótidos de guanina (RayChaudhuri y Park, 1992; Mukherjee *et al.*, 1993) y presenta un ensamblaje dinámico asociado a la hidrólisis de GTP (Mukherjee y Lutkenhaus, 1998). Es una GTPasa, aunque el mutante FtsZ84 (G105S, Bi y Lutkenhaus, 1991) puede desarrollar una actividad ATPasa dependiente de Mg^{2+} (RayChaudhuri y Park, 1994).

In vitro FtsZ asocia en oligómeros (Sossong *et al.*, 1999) mediante un proceso isodésmico (mecanismo de asociación no cooperativo en el que la adición de cada subunidad al oligómero tiene la misma afinidad que las anteriores), inducido por Mg^{2+} y dependiente de la concentración de proteína y de la fuerza iónica (Rivas *et al.*, 2000). También ensambla formando polímeros mediante un proceso cooperativo (Mukherjee y Lutkenhaus, 1998; Mukherjee y Lutkenhaus, 1999; White *et al.*, 2000; Huecas y Andreu, 2003; Caplan y Erickson, 2003), en el cual primero se forma el núcleo de la polimerización (nucleación) y seguidamente el crecimiento del polímero de forma cooperativa a

partir de ese núcleo (elongación). Se trata de sistemas en los que se observa una concentración crítica por debajo de la cual toda la proteína existe como una mezcla de unidades menor a la que constituye el núcleo. Al igual que lo observado en la oligomerización, el Mg^{2+} también tiene un papel relevante en la polimerización y en el comportamiento dinámico de los polímeros (Mukherjee y Lutkenhaus, 1999), ya que aunque la proteína puede unir nucleótido en ausencia de Mg^{2+} , no puede hidrolizarlo (Mukherjee *et al.*, 1993; Mukherjee *et al.*, 1998). Este ión Mg^{2+} está coordinado con los fosfatos β y γ del GTP como ocurre con las GTPasas típicas (Löwe y Amos, 1998; Bourne *et al.*, 1991). Se puede sustituir por Ca^{2+} durante el ensamblaje (Yu y Margolin, 1997), pero el comportamiento dinámico de los polímeros se ve reducido (Mukherjee y Lutkenhaus, 1999).

Las estructuras formadas durante el ensamblaje cooperativo de FtsZ son muy variadas. Dependiendo de las condiciones de ensamblaje se ha observado la formación de filamentos, filamentos anchos, láminas, tubos, hélices y mini-anillos (Bramhill y Thompson, 1994; Mukherjee y Lutkenhaus, 1994; Erickson *et al.*, 1996; Mukherjee y Lutkenhaus, 1998; Trusca *et al.*, 1998; Löwe y Amos, 1999 y 2000; Lu *et al.*, 2000). Estos polímeros desensamblan rápidamente cuando el GTP es hidrolizado (Mukherjee y Lutkenhaus, 1998) y los factores que influyen en la velocidad de hidrólisis también influyen en la estabilidad de los polímeros de modo que conforme disminuye la velocidad de hidrólisis, disminuye la dinámica de los polímeros y éstos se mantienen ensamblados durante más tiempo (Yu y Margolin, 1997; Mukherjee y Lutkenhaus, 1998; Mukherjee y Lutkenhaus, 1999).

La hidrólisis del nucleótido unido a la molécula de FtsZ que se incorpora al polímero se produce inmediatamente tras la polimerización (Scheffers y Driessen, 2002) debido a la formación del sitio activo (Scheffers *et al.*, 2002). No sólo el Mg^{2+} sino también cationes monovalentes como el K^{+} o el Na^{+} (Lu *et al.*, 1998) tienen una función muy importante en el desarrollo de la actividad GTPasa (Mukherjee *et al.*, 1998; Lu *et al.*, 1998; Sossong *et al.*, 1999). En el caso de las GTPasas clásicas como Ras es necesaria la colaboración de la proteína

activadora de nucleótido (GAP) para que se produzca la hidrólisis (Scheffzek *et al.*, 1997). En los polímeros de FtsZ la hidrólisis se activa por el contacto axial entre monómeros de modo que residuos del bucle T7 (D209 y D212 en *E. coli*) de una molécula de FtsZ se insertan en el sitio de unión de nucleótido del monómero inmediatamente inferior, configurando el sitio activo y actuando así como su propia GAP (figura 8) (Scheffers *et al.*, 2001; Löwe y Amos, 1999).

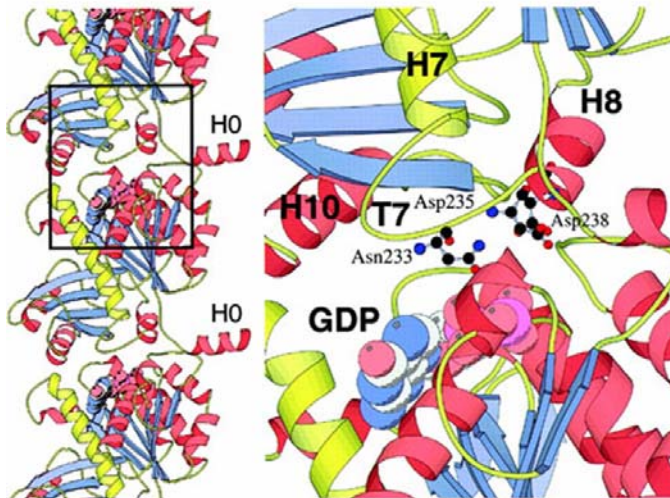


Figura 8: Sitio activo en el modelo de filamento de FtsZ. A la izquierda el protofilamento construido a partir de la estructura de FtsZ de *M. jannaschii* (código PDB 1FSZ), con una orientación acorde con la vista para β -tubulina en la reconstrucción del dímero de α,β -tubulina realizado a partir de láminas de zinc (código PDB 1JFF). A la derecha, región del bucle T7 ampliada; este bucle se introduce en la región de unión de nucleótido de la subunidad inferior del filamento introduciendo los residuos catalíticos D235 y D238 (D209 y D212 de *E. coli*). (Figura extraída de Löwe y Amos, 1999).

Aunque inicialmente hubo alguna controversia respecto al contenido del nucleótido de los polímeros formados por FtsZ (Scheffers y Driessen, 2002) finalmente parece ser que es mayoritariamente GTP (Mingorance *et al.*, 2001; Huecas y Andreu, 2003; González *et al.*, 2003; Romberg y Mitchison, 2004). La rápida hidrólisis del nucleótido tras el ensamblaje junto con el contenido mayoritario de GTP en el polímero sólo es compatible con un intercambio rápido del nucleótido (o en su defecto de monómeros de proteína) en el polímero (Mingorance *et al.*, 2001; Huecas y Andreu, 2003), que además recientemente se ha visto que es aún más rápido que la hidrólisis (Romberg y Mitchison, 2004).

Pero una de las principales cuestiones que se plantea es la funcionalidad de la actividad GTPasa y de la dinamicidad de los polímeros. De forma general se ha visto que los filamentos formados por FtsZ pueden adoptar dos tipos de conformaciones; recta (favorecida por la unión de GTP) y curvada (favorecida por la unión de GDP) (Lu *et al.*, 2000; Huecas y Andreu, 2004), de modo que la hidrólisis del GTP permitiría el cambio de conformación de FtsZ y desensamblar (figura 9).

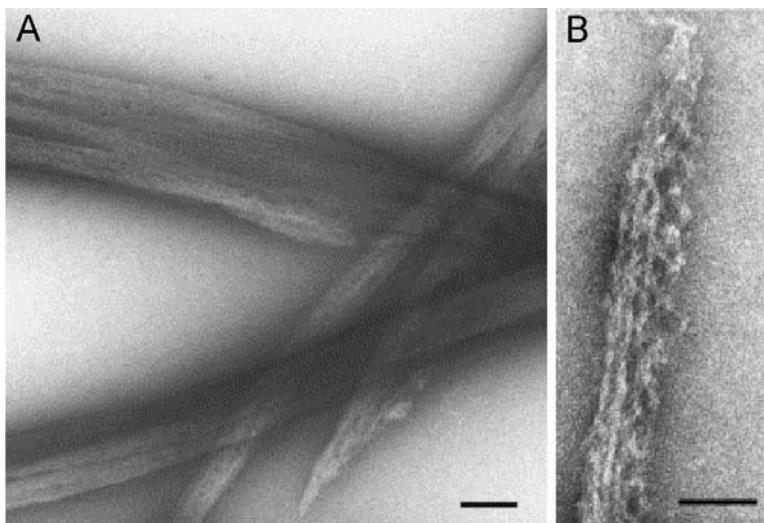


Figura 9: Polímeros formados por FtsZ de *M. jannaschii* en tampón de ensamblaje Mes pH 6.5 con 200g/l Ficoll 70, 10mM MgCl₂, 1mM GTP **(A)** y 1mM GDP **(B)**. En ambos casos las barras representan 100nm (extraído de Huecas y Andreu, 2004).

OBJETIVOS

El objetivo principal de esta Tesis es determinar como pliega, ensambla y desensambla la proteína de división celular FtsZ de *Methanococcus jannaschii*, incluyendo su actividad GTPasa y la estructura de sus polímeros, en comparación con su homóloga eucariótica tubulina. La selección de esta FtsZ como modelo de estudio se basa en: (i) la disponibilidad de la estructura cristalográfica de la proteína unida a GDP, y (ii) la mayor estabilidad de ésta frente a la de otros organismos, debido a que *M. jannaschii* es un arquea termófila, lo que hace posible una manipulación más fácil en el laboratorio. El estudio consiste en un análisis bioquímico y estructural, en el que se abordan una serie de objetivos concretos, que se detallan a continuación:

1.- La determinación de la estabilidad y el plegamiento de FtsZ comparada con tubulina, mediante el estudio de su estructura secundaria por dicroísmo circular.

Para ello se plantea:

- o El análisis de la estabilidad de FtsZ frente a un agente desnaturizante (GdmCl) y determinación de su capacidad de plegar *in vitro* en ausencia de chaperonas celulares. Implicaciones del nucleótido unido.
- o La determinación de modificaciones en la estabilidad y la capacidad de plegar *in vitro* de proteínas quiméricas de FtsZ y tubulina, debido a la acumulación de bucles característicos de tubulina en el núcleo estructural común que comparten ambas proteínas.

2.- La caracterización del ensamblaje y la actividad GTPasa de FtsZ en solución, estudiados mediante dispersión de luz, determinaciones enzimáticas y microscopía electrónica, incluyendo:

- o El análisis de la polimerización, actividad GTPasa y dinamicidad de los polímeros de FtsZ, considerando el efecto de las variables de solución, como concentración de proteína, el nucleótido, concentración de Mg^{2+} ,

distintos cationes monovalentes (K^+ , Na^+) y la temperatura, sobre la funcionalidad del sistema.

- o El análisis del efecto de la mutación puntual W319Y y una cola de histidinas en el extremo C-terminal, en el ensamblaje, actividad GTPasa y estructura de los polímeros formados por FtsZ.
- o El análisis de los polímeros formados por las quimeras FtsZMj-tubulina, para determinar si las inserciones de segmentos en el núcleo común con FtsZ inducen un ensamblaje similar al de tubulina en microtúbulos.

3.- La caracterización de la estructura de los polímeros de FtsZ en comparación con los de tubulina, incluyendo:

- o La determinación de la unidad básica de ensamblaje de FtsZMj a través del análisis de las micrografías electrónicas para intentar esclarecer: que tipo de contactos se producen durante la polimerización, y en que medida se parecen estos contactos a los que se forman entre heterodímeros de tubulina durante la polimerización de los microtúbulos.
- o Un objetivo adicional que surgió a lo largo del estudio fue determinar la estructura del protofilamento de FtsZ mediante difracción de rayos X.

4.- La determinación del cambio conformacional inducido por la hidrólisis del GTP unido a FtsZ, que explique el desensamblaje de los polímeros, mediante la obtención de la estructura cristalográfica de FtsZ en su conformación unida a GTP, y comparación con la de FtsZ unida a GDP.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.- MUTAGÉNESIS de FtsZ

1.1.- Construcción de los plásmidos que codifican para FtsZ y FtsZW319Y

Las construcciones de los nuevos plásmidos, en los que se elimina la cola de histidinas, se realizaron a partir de los plásmidos pHis17-*ftsZ-ggatcc(cat)*₆ (gen salvaje de FtsZ con cola de histidinas, Löwe, 1998) y pHis17-*ftsZtg319tac-ggatcc(cat)*₆ (gen mutado de FtsZ con cola de histidinas, Díaz *et al.*, 2001) mediante mutagénesis inversa dirigida. El protocolo de mutagénesis empleado presenta la particularidad de que durante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se procede a la amplificación del plásmido completo y no sólo del gen objeto de la mutación.

La PCR se realizó en un termociclador *PERKIN ELMER GeneAmp PCR System 2400*. Los oligos empleados en ambos casos, r-zmj (5'-*aatttttgaattcctgtgagttc*-3') y f-zmj (5'-*taaaagcttcaccaccaccaccacca*-3'), fueron sintetizados con un sintetizador *Beckman Oligo 1000M* en el Servicio de Química de Proteínas en el CIB-CSIC. Estos oligos hibridan con la región 3' del gen que codifica para la proteína (r-zmj) y la región del plásmido inmediatamente posterior a la cola de histidinas (f-zmj) y permitieron eliminar la secuencia que codifica para Gly-Ser-(His)₆ y el único sitio de restricción BamHI del plásmido. La mezcla de PCR incluía: 1.25µM de cada uno de los oligos (f-zmj y r-zmj), 250ng del ADN parental (pHis17-*ftsZ-(cat)*₆ o pHis17-*ftsZtg319tac-(cat)*₆), 0.25mM de cada uno de los desoxinucleótidos (dATP, dCTP, dTTP, dGTP) y 1.75U de la ADN polimerasa (*Expand High Fidelity PCR System*) diluida en su tampón (*Expand HF Buffer* con 15mM MgCl₂) (Roche) según especificaciones del proveedor, en un volumen final de 20µL. Los parámetros de PCR empleados fueron: 1 ciclo de 5 segundos a 95°C, 15 minutos a 50°C, 4 minutos a 68°C, seguido de 14 ciclos de 15 segundos a 95°C, 30 segundos a 50°C, 4 minutos a 68°C, y finalmente 1 ciclo de 20 minutos a 68°C.

Los productos de PCR se purificaron con el kit *Concert Rapid PCR Purification System* (Invitrogen) y la amplificación del ADN parental se comprobó

mediante electroforésis en gel de agarosa al 1% en tampón TAE (40mM Tris-acetato, 1mM EDTA, pH 8.5), empleando como marcador 0.5µg de ADN del fago λ digerido con la enzima de restricción HindIII (*a[^]agctt*) (Roche). Los geles fueron teñidos en una solución de 5µg/mL de Bromuro de Etidio durante 15 minutos y desteñidos en agua Mili-Q durante 5 minutos para su visualización con lámpara de ultravioleta a 312nm. El ADN amplificado aparecía con una movilidad electroforética comprendida entre 2322 y 4361 pares de bases (el plásmido con el gen *ftsZ* tiene 3700 pares de bases) (figura 10A).

Los extremos de los productos de PCR purificados se fosforilaron con la Quinasa del Fago T4 (Promega), para posteriormente poder realizar una extensión en ambas hebras con la ADN polimerasa *Pwo* (Roche). El ADN obtenido se ligó con la Ligasa del Fago T4 (Promega), con el fin de obtener un plásmido covalentemente cerrado, y finalmente el producto obtenido se digirió con la enzima *DpnI* (Promega) (endonucleasa que reconoce la secuencia 5'-G^{m6}ATC-3', es decir, es específica de las secuencias metiladas y hemimetiladas, por lo que degrada de forma selectiva el ADN plasmídico parental). En todas las reacciones enzimáticas se siguieron los protocolos de uso especificados por los proveedores y tras cada reacción enzimática se procedió a la purificación de los productos con kit *Concert Rapid PCR Purification System* (Invitrogen).

Los productos ligados y purificados se emplearon para transformar células competentes de la cepa *E. coli* DH5α obtenidas según el método A de CaCl₂ (Maniatis, 1982). Se seleccionaron varios clones para preparar cultivos de 3mL (en medio LB con 50µg/mL de ampicilina) a partir de los cuales se realizaron preparaciones de plásmido mediante minipreps con el kit *CONCERTTM Rapid Plasmid Miniprep System* (GIBCO-Life Technologies). Estas preparaciones de plásmido se analizaron para comprobar el correcto resultado de la mutagénesis y la transformación mediante: (i) ensayo de restricción con la enzima BamHI (*g[^]gatcc*) (según lo especificaciones del proveedor) seguido de electroforésis en gel de agarosa (según se ha descrito anteriormente), donde el ADN mutado carece del sitio de restricción y por tanto no es digerido por la enzima (figura 10B); (ii) secuenciación del gen *ftsZ* en el Servicio de

Secuenciación del CIB-CSIC, con un analizador de ADN *Applied Biosystems PRISM 3700*, empleando 100ng/ μ L del ADN a secuenciar y 5 μ M de cada uno de los siguientes oligos, diseñados específicamente para la secuenciación: mf3 (5'-accatatctgaatcttg-3'), mj1 (5'-cggcataatttgaac-3'), p319y (5'-atatataattgtagcatttgggtctaattcttg-3') y mj3 (5'-gaacaatggaggcttagcg-3'), sintetizados en el Servicio de Química de Proteínas del CIB-CSIC, con un sintetizador *Beckman Oligo1000M*. Estos oligos hibridan en distintas regiones del gen que *ftsZ* desde el extremo 5' al 3'.

Con el ADN plasmídico purificado se transformaron células competentes de la cepa *E. coli* BL21(DE3), pLysS, (método A de CaCl₂, Maniatis, 1982) y se comprobó los niveles de expresión de las proteínas (mismo protocolo que para expresiones de 1L reescalado a 20mL, ver en el apartado de Expresión y Purificación de las Proteínas), para seguidamente sobreexpresarlas a una escala mayor.

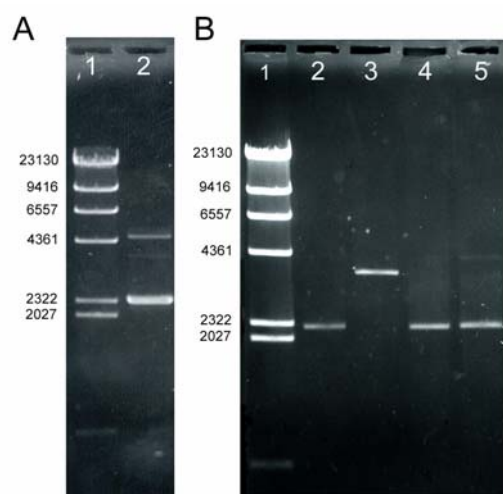


Figura 10: Mutagénesis para eliminar la cola de histidinas (A) comprobación de amplificación del ADN plasmídico mutado; *línea 1* marcador molecular λ DNA/*Hind III* digest, *línea 2* plásmido ligado pHis17(*ftsZ*) purificado de *E. coli* DH5 α . **(B)** comprobación de eliminación del sitio de restricción BamHI; *línea 1* marcador molecular λ DNA/*Hind III* digest, *líneas 2 y 4*, ADN plasmídico pHis17(*ftsZ*) purificado a partir de 2 cultivos distintos B1 y D1; *líneas 3 y 5* el mismo ADN tras digestión con BamHI, donde el ADN procedente de B1 sí ha sido digerido por BamHI mientras que el procedente del cultivo D1 no ha sido digerido, es decir, se ha eliminado la secuencia diana.

1.2.- Proteínas Quiméricas FtsZ- β Tubulina

La mutagénesis fue realizada por la Dra. Isabel Barthelemy (CNB-CSIC) empleando el kit *Quick Change site-directed mutagenesis* (Stratagene).

La PCR se desarrolló empleando como ADN parental el plásmido pHis17-*ftsZ-ggatcc(cat)*₆ y con parejas de oligos complementarios en los que se incluyeron las mutaciones deseadas en cada caso. El ADN parental se eliminó mediante una digestión selectiva con la enzima *DpnI* y el producto purificado de

la PCR se empleó para transformar células competentes de la cepa *E. coli* *XL1blue*. Los clones obtenidos fueron sometidos a un análisis de restricción y se secuenció el ADN. Posteriormente, se transformó la cepa *E. coli* BL21(DE3) para sobreexpresar las distintas construcciones.

Mediante este método se generaron cinco quimeras FtsZ/tubulina en las que determinadas secuencias de FtsZ de *M. jannaschii* fueron sustituidas por las secuencias correspondientes de tubulina β 2 de ratón (*Mus musculus*): FtsZ/N, presenta una sustitución en la secuencia del bucle N (situado entre H3 y S4); FtsZ/T7 en la secuencia del bucle T7 (situado entre H7 y H8); FtsZ/M en la secuencia del bucle M (entre S7 y H9); la doble quimera FtsZ/T7M presenta una combinación de las sustituciones que se introducen en las quimeras FtsZ/T7 y FtsZ/M; y la quimera triple FtsZ/NT7M incluye las sustituciones de las quimeras FtsZ/N, FtsZ/T7 y FtsZ/M (figura 13).

La quimera FtsZ/N se obtuvo cambiando la secuencia de FtsZ “¹²²SD₁₂₃” por la correspondiente de β -tubulina “¹²⁴SESCDCLQ₁₃₁”, para lo que se emplearon los oligos 17 (5'-caatacaagattcagaaagctgcgattgcctgcagatggattattattac-3') y 18 (5'-gtaataaataccatctgcaggcaatcgagctttctgaatcttgattg-3'). En la quimera FtsZ/T7 se cambió la secuencia “²²³VELITKDGLINVD₂₃₈” por “²³⁷TTCLRFPGLNADLRK₂₅₂”. Como esto implica el cambio de 16 aminoácidos y los oligos deben ser menores de 30 nucleótidos (para evitar problemas de hibridaciones inespecíficas), la mutación se llevó a cabo en dos pasos, en cada uno de los cuales se modificaron 8 aminoácidos. En el primer paso de mutagénesis se emplearon los oligos 5 (5'-gtcgtaaagggattaactacatgcttaagattccctggattgattaatg-3') y 6 (5'-cattatcaatccagggaaatcttaagcatgtagttaatccctttacagc-3') y en el segundo los oligos 7 (5'-gattccctggacagcttaatgctgatttgcgtaaagttaaagctgtta-3') y 8 (5'-taacagcttttaactttacgcaaatacagcattaagctgtccaggggaatc-3'). En la quimera FtsZ/M se sustituyó la secuencia “²⁵⁸SEKRAKE₂₆₄” por “²⁷⁵SRGSQQYRALTVPE₂₈₈” en dos pasos: en el primero se introdujo un único sitio de restricción SacII (ccgc^gg) y se eliminó la secuencia que codifica para “²⁵⁹EKRAK₂₆₃” mediante el empleo de los oligos 1 (5'-ggagagtgatagccgcggtagtatggc-3') y 2 (5'-

gccataactaaccgcggtatcactctcc-3'). En un segundo paso se insertó en el sitio *SacII* la secuencia que codifica para “*²⁷⁵SRGSQQYRALTV²⁸⁷*” empleando los oligos 3 (5'-*ggaagccagcagtatcgtgcgctgaccgtgccggaagc-3'*) y 4 (5'-*ttccggcacggctcagcgcacgatactgctggcttccgc-3'*). La doble quimera FtsZ/T7M se obtuvo mediante inserción del bucle T7 (según se ha descrito) en el plásmido que contenía el gen de la quimera FtsZ/M. Y la quimera triple se obtuvo reemplazando en el plásmido que contenía el gen de la doble quimera, el fragmento de 438 pares de bases situado entre los sitios de restricción *NdeI* (*ca[^]tatg*) y *EcoRV* (*gat[^]atc*), por el correspondiente del plásmido que contenía el gen de la quimera FtsZ/N.

1.3.- Caracterización de las proteínas resultantes

El correcto desarrollo de la mutagénesis, la transformación y la expresión se comprobó mediante distintos métodos:

1.3.1.- Inmunoelectroforesis de FtsZ y FtsZW319Y

La eliminación de la cola de histidinas en FtsZ y FtsZW319Y se comprobó mediante electroforesis e inmunoblot empleando un anticuerpo específico que reconoce la extensión (His)₆.

Se desarrolló una electroforesis en condiciones desnaturalizantes y reductoras en un gel al 10% de poliacrilamida en un sistema *Mini-Protean II* (Bio-Rad). 10 minutos antes de acabar la electroforesis se cargó en la última calle con 5 µL de verde metileno (0.5% diluido 1:2 en glicerol 50%) como control de transferencia a membrana de nitrocelulosa en el paso siguiente. La transferencia de las proteína a una membrana de nitrocelulosa *Trans-Blot Transfer Medium* (0.2mm) (Bio-Rad) se realizó en tampón de transferencia (48mM Tris-HCl, 39mM Glicina, 0.0375% SDS, 20% (v/v) metanol, pH 8.9) con un sistema de transferencia *Tras-Blot SD Semy-Dry Electrophoretic Transfer Cell* (Bio-Rad) empleando una intensidad de corriente de 1mA/cm² durante 1 hora. Seguidamente la membrana se bloqueó, para evitar uniones inespecíficas del anticuerpo primario, incubándola en tampón de bloqueo 50mM Tris-HCl, 0.9%

NaCl, 1% (v/v) Tween 20, pH 7.9, 10% (p/v) BSA durante 1.5 horas, con agitación suave. Una vez bloqueada la membrana se incubó con el anticuerpo primario, anti-His (Amersham Pharmacia Biotech) en una dilución 1:3000 en tampón de lavado 50mM Tris-HCl, 0.9% NaCl, 1% (v/v) Tween 20, pH 7.9, durante 1 hora. Seguidamente se incubó con el anticuerpo secundario, monoclonal de conejo frente a ratón conjugado con peroxidasa de rábano (Dako), en una dilución 1:2000 en tampón de lavado 50mM Tris-HCl, 0.9% NaCl, 1% (v/v) Tween 20, pH 7.9, también durante 1 hora. El anticuerpo secundario permite visualizar las bandas mediante quimioluminiscencia (*ECL* Amersham LIFE SCIENCE) y autorradiografía con *Película X-OMAT-S* (Kodak), en la que observó la ausencia de banda en comparación con el correspondiente control positivo (FtsZ-(His)₆), lo que indicó la correcta eliminación de la cola de histidinas.

Entre las distintas incubaciones se realizaron varios lavados de la membrana con tampón de lavado 50mM Tris-HCl, 0.9% NaCl, 1% (v/v) Tween 20, pH 7.9. Todas las incubaciones y los lavados se realizaron en un agitador *IKA KS 260 basic* a 150rpm.

1.3.2.- Secuenciación del extremo amino terminal

Se realizó la secuenciación amino terminal de las distintas proteínas en el Servicio de Química de Proteínas (CIB-CSIC) mediante microsecuenciación automática de Edman con un secuenciador *Applied Biosystems 477A* que presenta un HPLC conectado en línea. Por este método, con el fenilisotiocianato, se consigue marcar específicamente el grupo amino terminal de las proteínas en medio básico y el derivado que se forma, la feniltiohidantoina, hace inestable el segmento amino terminal de manera que puede ser selectivamente hidrolizado, sin romper los demás enlaces peptídicos, y analizado mediante HPLC (Edman, 1960).

A partir de 8 picomoles de muestra de las distintas construcciones expresadas, se obtuvo en todos los casos la secuencia del extremo amino

terminal *MKFL*, es decir, no se produjo ninguna modificación a consecuencia de la mutagénesis.

1.3.3.- Espectrometría de masas de desorción/ionización por láser asistida por matriz (MALDI-TOF)

Las proteínas FtsZ, FtsZ-(His)₆, FtsZW319Y, FtsZW319Y-(His)₆, FtsZ/T7-(His)₆, FtsZ/M-(His)₆ y FtsZ/T7M-(His)₆ fueron analizadas por este método en la Universitat Pompeu Fabra de Barcelona para determinar su peso molecular. El análisis se realizó a partir de 5µL de proteína a una concentración de 10pmol/µL en agua en un aparato *Applied Biosystems Voyager System 4242*, empleando entre 100 y 200 disparos por espectro. Se utilizó enolasa de levadura (Sigma) como estándar externo.

Los pesos moleculares obtenidos fueron: FtsZ, 38833Da (peso molecular teórico 38924.2Da); FtsZ-(His)₆, 39868Da (peso molecular teórico 39891.2Da); FtsZW319Y, 38865Da (peso molecular teórico 38901.2Da); FtsZW319Y-(His)₆, 39841Da (peso molecular teórico 39868.1Da); FtsZ/T7-(His)₆, 39953Da (peso molecular teórico 39962.3Da); FtsZ/M-(His)₆, 40610Da (peso molecular teórico 40636.0Da); y FtsZ/T7M-(His)₆, 40649 (peso molecular teórico 40707.1Da). Compatibles con los pesos teóricos dentro del error de las medidas experimentales (± 90 KDa).

Los pesos moleculares teóricos se obtuvieron a partir de la secuencia de aminoácidos en <http://us.expasy.org/tools/protparam.html>.

2.- EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LAS DISTINTAS PROTEÍNAS

2.1.- Expresión de las distintas construcciones en *E. coli*

Todas las construcciones con las que se ha trabajado están codificadas en el plásmido pHis17 (Löwe, 1998) (incluye el gen de la β -lactamasa, que confiere resistencia a ampicilina), con el que se transformó la cepa *E.coli* BL21(DE3), pLysS (Invitrogen). Esta cepa carece de proteasas como *OmpT* o *lon* (encargadas de degradar proteínas aberrantes) e incluye un segundo plásmido (pLysS) que presenta el gen que codifica para la Lisozima del fago T7

(inhibidor natural de la ARN polimerasa T7, por lo que evita la transcripción basal cuando no hay inducción por IPTG), y el gen que codifica para la proteína que proporciona resistencia al cloranfenicol.

Las células transformadas se cultivaron en 1L de medio de Luria-Bertani (10% triptona, 10% NaCl, 5% extracto de levadura, pH 7.0) con 50µg/mL de ampicilina y cloranfenicol, a 37°C y con agitación (200rpm en baño *Innova 3000*) hasta que se alcanzó una densidad óptica a 600nm de 0.5 ± 0.1 (fase exponencial de crecimiento), momento en el que se indujo la expresión añadiendo 1mM IPTG. Tras de 3 horas de inducción (a 37°C y 200rpm) se sedimentaron las células por centrifugación (8000g a 4°C durante 10 minutos), se resuspendieron en 20mL de tampón A (50mM Tris-HCl, 300mM NaCl, pH 8.0) y se congelaron a -80°C hasta el momento de la purificación. En la figura 11 se muestra la expresión típica de estas proteínas antes y 3 horas después de inducir con 1mM de IPTG en electroforésis en condiciones desnaturalizantes y reductoras en un gel al 10% (dePereda y Andreu, 1996) de poliacrilamida en un sistema *Mini-Protean II* (Bio-Rad).

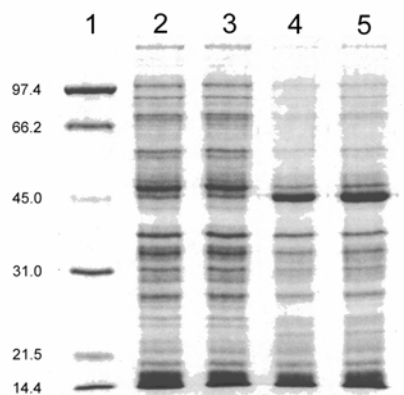


Figura 11: Expresión de FtsZ en *E. coli* BL21 (DE3), pLysS. Electroforésis en condiciones desnaturalizantes (con SDS) y reductoras (con β -mercaptoetanol) en geles discontinuos de poliacrilamida al 10%. Expresión de FtsZ en medio LB. *Línea 1*, marcador molecular de bajo peso molecular (Biorad); *líneas 2 y 3*, 0.05 unidades de densidad óptica a 600nm del cultivo en tampón de carga antes de inducir con 1mM de IPTG; *líneas 4 y 5*, 0.05 unidades de densidad óptica del cultivo a 600nm, en tampón de carga 3 horas después de inducir con 1mM de IPTG.

2.2.- Purificación de las Distintas Proteínas

Se han empleado tres métodos: cromatografía de afinidad, precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ seguida de cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía de afinidad en condiciones desnaturalizantes.

2.2.1.- Método I: Cromatografía de afinidad

Este método se utilizó para purificar todas las construcciones que incluyen cola de histidinas en el extremo carboxilo-terminal: FtsZ1-(His)₆, FtsZW319Y-(His)₆, FtsZ/T7-(His)₆, FtsZ/M-(His)₆, FtsZ/N-(His)₆, FtsZ/T7M-(His)₆ y FtsZ/NT7M-(His)₆. Está basado en el método ya publicado (Löwe y Amos,1998) pero con diversas modificaciones.

Las células se descongelaron en frío y se rompieron con ultrasonidos (sonicador *Branderlin Sonoplus HD200* con sonda de 1 centímetro de diámetro) con 5 pulsos de 20 segundos incluyendo pausas de 1 minuto entre pulsos (para evitar el calentamiento de la muestra), a un 20% de potencia (*output* 6).

El lisado celular se clarificó por centrifugación a 100000g durante una hora a 4°C. El sobrenadante se mantuvo a 4°C y se le ajustó la concentración de Imidazol a 150mM, para seguidamente aplicarlo una columna de afinidad *HiTrap Chelating* de 5mL (Amersham) cargada con Ni²⁺ y desarrollar una cromatografía en gradiente lineal (0.15M-1M Imidazol) empleando: tampón A (50mM Tris-HCl, 300mM NaCl, pH 8.0), tampón B (50mM Tris-HCl, 300mM NaCl, 1M Imidazol, pH 5.8), flujo 1mL/min y tamaño de fracción de 5mL. Las distintas proteínas eluyeron a una concentración de imidazol de entre 400 y 500mM, y las fracciones correspondientes se concentraron hasta un volumen de 2mL con *Centriprep 10K* (Amicon) mediante series de centrifugaciones según lo descrito por el proveedor.

Para alcanzar una mayor pureza y eliminar posibles agregados de proteína, el concentrado del paso anterior se cargó en una columna de *Sephacryl S400-HR XK 16/70* de 120mL (Amersham), para realizar a una cromatografía de exclusión por tamaño molecular. En este caso las condiciones empleadas fueron: tampón C (20mM Tris-HCl, 1mM NaN₃, 1mM EDTA, pH 8.0), flujo de 1mL/min y tras la elución de 30mL de tampón (un poco menos del volumen de exclusión de la columna), se recogieron fracciones de 3mL. Las distintas proteínas de interés eluyeron entre las fracciones 7 y 11 y éstas se concentraron con *Centriprep 10K* (Amicon) hasta una concentración final de

proteína aproximada de 10mg/mL. La proteína se congeló en alícuotas de 1mg a -80°C para su almacenamiento.

Con este método de purificación se obtuvieron entre 10-20mg de cada una de las construcciones por litro de cultivo.

2.2.2.- Método II: Precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y cromatografía de intercambio iónico

Este método se utilizó para purificar FtsZ1, FtsZW319Y, así como FtsZ1-(His)₆, FtsZW319Y-(His)₆, como control de que el método de purificación empleado no afectaba a las propiedades de ensamblaje de estas proteínas (ver Resultados). Está basado en el descrito anteriormente para purificar FtsZ de *E. coli* (Mukherjee *et al.*, 1993), pero con modificaciones.

Las células descongeladas, se sonicaron y clarificaron igual que en el caso anterior. El sobrenadante de la ultracentrifugación se mantuvo a 4°C y se sometió a una precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 33% de saturación (concentración que se había comprobado era la óptima para las proteínas de interés), manteniéndolo con agitación suave a 4°C durante 30 a 40 minutos, para precipitar la proteína. El precipitado se sedimentó (5000g a 4°C durante 30 minutos) y se resuspendió en 10mL de tampón A2 (50mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0), ajustando la concentración de KCl a 150mM con tampón B2 (50mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 1M KCl, pH 8.0). Esta solución se clarificó (10000g a 4°C durante 15 minutos) para eliminar posibles agregados de proteína y el sobrenadante se cargó en una columna *HiTrap Q HP* 5mL (APBiotech), en la que el grupo cargado es $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$. Se llevó a cabo una cromatografía de intercambio aniónico a un flujo de 1mL/min y recogiendo fracciones de 2mL. Para la elución de la proteína se aplicó un gradiente lineal (0M-1M KCl) en el que FtsZ eluyó a una concentración de KCl entre 450-500mM junto con otra proteína de unos 98KDa. Las alícuotas que contenían FtsZ se concentraron con *Centriprep 10K* (Amicon) hasta un volumen de 500μL. Para eliminar la proteína contaminante mediante cromatografía hidrofóbica, este volumen se cargó en una columna *HiTrap Phenyl Sepahrose HP* 1mL (APBiotech), en la que el ligando

hidrofóbico es el grupo fenilo. Con un flujo de 1mL/min y un tamaño de fracción de 1mL, en un gradiente lineal (0.8M-0M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) FtsZ eluyó a una concentración de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ entre 400-440mM y la proteína contaminante entre 0-96mM (tampón A3; 50mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, 1mM EDTA, 0.8M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 7.5 y tampón B3; 50mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, 1mM EDTA, pH 7.5).

Las proteínas purificadas por este método se guardaron en el mismo tampón C que las purificadas por cromatografía de afinidad, por lo que tras concentrar las alícuotas que contenían FtsZ con *Centriprep 10K* (Amicon), se realizó un cambio de tampón con una columna *Fast Desalting* 5mL, con matriz de *Sephadex G-25* Superfino (APBiotech) a un flujo de 2mL/min, en la que las distintas construcciones eluyeron entre las fracciones 5 y 7 (tamaño de fracción 500 μ L). Finalmente estas fracciones se concentraron con *Centriprep 10K* (Amicon) hasta una concentración de proteína de unos 10mg/mL y se almacenó en alícuotas de 1mg a -80°C.

Con este método de purificación disminuye la producción de proteína hasta 5-10mg por litro de cultivo.

2.2.3.- Método III: Cromatografía de afinidad en condiciones desnaturalizantes

Este método se ha empleado para obtener FtsZ libre de nucleótido (Apo-FtsZ-(His)₆) en cantidad suficiente como para realizar los experimentos de cristalización.

El sedimento congelado de 12L de cultivo se machacó y resuspendió en 300mL de tampón A4 (50mM Tris-HCl, 6M Urea, pH 7.0), dejándolo descongelar a temperatura ambiente con agitación fuerte, pero sin dejar que la muestra se llegase a calentar.

Las células se rompieron por sonicado (*XL2020 Sonicator Programmable Ultrasonic Processor*) durante 3 minutos con pulsos de 1 segundo que alternaban con pausas de 1 segundo, a 4°C y con agitación constante. El lisado celular se clarificó mediante centrifugación según lo descrito anteriormente y el sobrenadante se cargó en una columna de 50mL de agarosa Ni-NTA

(APBiotech) para llevar a cabo una cromatografía de afinidad. Con un flujo de 10mL/min y un tamaño de fracción de 12mL, en un gradiente por pasos (2%, 5%, 10%, 30% y 100% de tampón B4: 50mM Tris-HCl, 6M Urea, 1M Imidazol, pH7.0), la proteína desnaturalizada eluyó a una concentración de imidazol entre 100 y 300mM. Las alícuotas que contenían proteína (de la 5 a la 9, unos 60mL) se mantuvieron a temperatura ambiente, se juntaron y se añadieron a una velocidad de 0.1mL/min con una bomba Gilson (modelo 312) a un volumen de 5L (80 veces mayor) de tampón R (50mM Tris-HCl, 100mM NaCl, pH 7.0) que se mantuvo con agitación fuerte y a temperatura ambiente para favorecer la renaturalización de la proteína libre de nucleótido.

La proteína renaturalizada se precipitó con 50% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, manteniéndola con agitación suave durante 30 minutos a 4°C, se sedimentó por centrifugación (6000rpm a 4°C durante 30 minutos en centrífuga *Sorvall RC3B*), se resuspendió en 50mL de tampón C4 (20mM Tris-HCl, 1mM NaN_3 , 1mM EDTA, pH 7.5), se clarificó (10000g a 4°C durante 15 minutos) y se concentró con *Centriprep 10K* Amicon hasta un volumen final de unos 2mL para cargarlo en una columna *Sephacryl-S300 XK 16/70* (Amersham) y llevar a cabo una cromatografía de exclusión por tamaño molecular en tampón C4, de modo que se eliminasen posibles agregados de proteína. Con un flujo de 1mL/min y un tamaño de fracción de 5mL FtsZ eluyó entre las fracciones 9 y 12. Finalmente la proteína se volvió a concentrar con *Centriprep 10K* Amicon hasta una concentración final de unos 10mg/mL y se congeló en alícuotas de 2mg para su almacenamiento a -80°C.

Todas las cromatografías fueron realizadas a temperatura ambiente y las columnas estaban acopladas a un sistema FPLC (Pharmacia Biotech UV MII) con lámpara de ultravioleta, lo que permitió el seguimiento a tiempo real de la elución de las proteínas mediante observación del perfil de absorbancia a 280nm. El contenido proteico de las fracciones se analizó en electroforesis en condiciones desnaturalizantes y reductoras en geles discontinuos de poliacrilamida al 10% (de Pereda y Andreu, 1996) en un sistema *Mini-Protean II*

(Bio-Rad), en los que FtsZ y las construcciones creadas sobre su estructura aparecen con un peso molecular aparente de unos 45KDa (marcador molecular de bajo peso molecular de BioRad). En todos los casos se obtuvieron las proteínas con más de un 90% de pureza.

3.- DETERMINACIONES DE PROTEÍNA Y NUCLEÓTIDO

3.1.- Cálculo de la concentración de proteína

La concentración de FtsZ y de nucleótido unido a ésta, así como la relación entre el nucleótido y la proteína se determinó espectrofotométricamente (espectrofotómetro *Hitachi U-2000* con cubetas de cuarzo de paso óptico 1cm), empleando dos métodos. En el primero se consideraron la absorción de la proteína y el nucleótido en 6M GdmCl y en el segundo el espectro de absorción del nucleótido unido a la proteína tras extracción con 0.5N HClO₄ en frío.

3.1.1.- Método I: Absorción en 6M GdmCl

Se realizó una dilución 1/50 de proteína en 6M de GdmCl y tras incubar 5 minutos a temperatura ambiente se midió el espectro de absorción (240-330nm).

A partir de la ecuación de Lambert-Beer se generó un sistema de dos ecuaciones:

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

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

donde A_{280} y A_{254} son los valores de absorción obtenidos a 280nm (máximo de absorción de la proteína) y 254nm (máximo de absorción del nucleótido); $\epsilon_{\text{prot}(280)}$, $\epsilon_{\text{prot}(254)}$, $\epsilon_{\text{nuc}(280)}$ y $\epsilon_{\text{nuc}(254)}$ son los coeficientes de extinción molar teóricos en 6M GdmCl, de la proteína (calculados en función del número de fenilalaninas, tirosinas y triptófanos) y del nucleótido, a las longitudes de onda señaladas; y l es el paso óptico (1cm).

En la tabla 1 se muestra el coeficiente de extinción molar en 6M GdmCl, para el nucleótido y los aminoácidos fenilalanina, tirosina y triptófano tanto a 280nm como a 254nm (Fasman, 1992). También se incluye el coeficiente de extinción molar a 254nm del nucleótido en medio ácido (Correia *et al*, 1987). En

la tabla 2 se muestran los coeficientes de extinción molar a 254nm y 280nm calculados para las distintas construcciones así como su peso molecular teórico obtenido a partir de la secuencia de aminoácidos.

Tabla 1: Coeficientes de extinción del nucleótido y los aminoácidos F, Y, W

Coeficientes de Extinción ($M^{-1}cm^{-1}$)	Nucleótido (GXP)	Phe	Tyr	Trp
280nm	8100	0	1280	5690
254nm	13620 (GdmCl)	140	2795	309
	12400 (HClO ₄)			

Tabla 2: Datos relevantes de las distintas proteínas con las que se ha trabajado

Construcción	Phe	Tyr	Trp	ϵ_{254} ($M^{-1}cm^{-1}$)	ϵ_{280} ($M^{-1}cm^{-1}$)	Nº Residuos	Peso Molecular (Da)
FtsZ1-(His) ₆	8	1	1	4224	6970	372	39891.2
FtsZ1	8	1	1	4224	6970	364	38924.2
FtsZW319Y-(His) ₆	8	2	0	1738	2560	372	39868.1
FtsZW319Y	8	2	0	1738	2560	364	38901.2
FtsZ/T7-(His) ₆	8	1	1	4224	6970	372	39962.3
FtsZ/M-(His) ₆	8	2	1	4533	8250	379	40636.0
FtsZ/T7M-(His) ₆	8	2	1	4533	8250	379	40707.1
FtsZ/NT7M-(His) ₆	8	2	1	4533	8250	385	41368.8

3.1.2.- Método II: Extracción del nucleótido unido a la proteína

La proteína se incubó 10 minutos a 4°C en 0.5N HClO₄, se sedimentó (15000g a 4°C durante 10 minutos) y se midió el espectro de absorción (240-330nm) del sobrenadante.

Considerando la ecuación de Lambert-Beer se determinó la concentración de nucleótido empleando el coeficiente de extinción en medio ácido (tabla 1) (Díaz y Andreu, 1993), y la concentración de proteína se obtuvo a partir de una de las ecuaciones anteriores ($A_{280} = (\epsilon_{prot(280)} \times C_{prot} \times l) + (\epsilon_{nucl(280)} \times C_{nucl} \times l)$). Tras la obtención de la concentración molar de nucleótido y de proteína se determinó la relación entre ambos ($[GXP]/[proteína]$).

3.2.- Determinación del contenido en GTP y GDP de las proteínas

Espectrofotométricamente sólo se puede determinar la cantidad de nucleótido unido a las distintas construcciones, por lo que se recurrió al análisis de muestras de proteína por HPLC para estudiar la proporción de GTP y GDP (Seckler *et al*, 1990; Díaz y Andreu, 1993).

Muestras de 500 μ L de proteína se precipitaron con 0.5N HClO₄ en frío tal y como se ha descrito en el apartado anterior para extraer el nucleótido unido. Alícuotas de 482 μ L de cada sobrenadante se neutralizaron mediante la adición de 1/12 del volumen de 1M K₂HPO₄, 1/12 del volumen de 3M KOH y 0.5N CH₃-COOH, que tras mezclarlo, se congeló para asegurar la precipitación del KClO₄ que se forma. Las muestras se mantuvieron a -20°C hasta que se analizaron por HPLC, momento en el que se descongelaron en hielo y se centrifugaron (15000g a 4°C durante 10 minutos) para sedimentar el precipitado de KClO₄ formado en el paso anterior. Se analizaron 20 μ L del sobrenadante mediante cromatografía de par iónico en una columna Supelcosil LC-18-DB de 25cm x 4.6mm (Rohm and Haas Company) acoplada a un sistema HPLC LC-10 (Shimadzu) con tampón F (0.2M K₂HPO₄, 0.1N ácido acético, 4mM TBA; el pH no se ajustó pero se comprobó en cada ocasión, siendo de 6.7 $\pm$ 0.1). Mediante método isocrático, a un flujo de 1mL/min y empleando 13 μ M de Guanosina (eluye a 9.9 minutos) como estándar interno (se incluye en la solución de precipitación), se estudió el perfil de absorbancia a 254nm para determinar la cantidad y proporción de los nucleótidos GTP (eluye a los 7.7 minutos) y GDP (eluye a los 6.2 minutos) presentes en la muestra analizada. El tiempo de elución de los distintos nucleótidos tiene una variación de $\pm$ 1.0 minutos y es dependiente de la concentración de TBA, del pH del tampón, de la temperatura.

De esta manera se determinó que FtsZ1 contenía 0.4 $\pm$ 0.2 nucleótido unido (73% es GTP y 27% es GDP), FtsZ1-(His)₆, 0.6 $\pm$ 0.1 (39% GTP y 61%GDP); FtsZW319Y, 0.5 $\pm$ 0.2 (98% GTP 2% GDP); FtsZW319Y-(His)₆, 0.5 $\pm$ 0.1 (39% GTP y 61% GDP). También se pudo comprobar que la baja relación GTP/GDP de las proteínas que contienen cola de histidinas era debido al método de purificación, ya que FtsZ1-(His)₆ y FtsZW319Y-(His)₆ purificadas

por precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y cromatografía de intercambio aniónico tenían unido un 89% GTP y 11% GDP y un 95% GTP y 5% GDP respectivamente.

Respecto a las quimeras, se determinó que tanto FtsZ/T7-(His)₆ como FtsZ/M-(His)₆ presentaban 0.7 ± 0.1 nucleótido unido; FtsZ/T7M-(His)₆, 0.9 ± 0.1 y FtsZ/NT7M-(His)₆, 0.8 ± 0.1 .

4.- DICROÍSMO CIRCULAR

Esta técnica, se emplea para medir la actividad óptica de moléculas asimétricas (ópticamente activas) en solución, informando sobre la diferencia de absorción a izquierdas y a derechas de una luz polarizada circularmente (Schmid, 1997).

La señal de dicroísmo circular se detecta en la misma región espectral que la absorción de un determinado cromóforo, siempre que el cromóforo o su entorno sea asimétrico. Así, la señal de dicroísmo de las proteínas se produce en dos regiones espectrales: el ultravioleta lejano (170-250nm) y el ultravioleta próximo (250-300nm). En el ultravioleta lejano, en la región amida, es donde principalmente se producen contribuciones por la quiralidad inducida del enlace peptídico, dando información de la estructura del esqueleto carbonado y permitiendo caracterizar la estructura secundaria de las proteínas (Schmid, 1997). También se puede estudiar la estabilidad conformacional del estado nativo (plegado) de una proteína, en ausencia de cambios covalentes (que normalmente son irreversibles), mediante estudios de curvas de desnaturalización frente a agentes físicos (como la temperatura) o químicos (como la urea o el GdmCl). La medida de los cambios conformacionales requiere la determinación de la constante de equilibrio y el cambio de energía libre (ΔG) de la siguiente reacción:



El valor de ΔG en ausencia de agente desnaturalizante, $\Delta G(\text{H}_2\text{O})$, determina la estabilidad conformacional de la proteína. Estos estudios también

permiten determinar la curva de estabilidad de una proteína y diferencias de estabilidad entre proteínas (Tanford, 1968; Pace, 1975; Wong y Tanford, 1973).

4.1.- Espectros de dicroísmo

Los espectros (185-260nm) se realizaron en un dicrógrafo JASCO 720 termostatzado a 25°C con una celda con paso de luz de 0.01cm. Las proteínas se diluyeron a una concentración final de 2mg/mL en tampón D 20mM Tris-HCl, pH 7.9 y se realizaron diluciones paralelas para poder calcular la concentración exacta de proteína en cada experimento. Con un ancho de banda de 1nm, sensibilidad de 50mgrados, respuesta de 4 segundos, velocidad de barrido de 20nm/min y resolución de 1nm se obtuvieron espectros (a partir de 4 acumulaciones), tanto de las proteínas como del tampón en el que estaban diluías. Los valores de elipticidad a cada longitud de onda se expresaron como elipticidad molar por residuo ($\text{grados cm}^2 \text{dmol}^{-1}$), tras la sustracción del espectro del tampón, según la expresión:

$$[\Theta]_{MRW} = \frac{\Theta \times 100 \times Mr}{c \times l \times n}$$

donde Θ es la elipticidad medida en grados, c es la concentración de proteína medida en g/L, l es el paso de luz en cm, M_r es el peso molecular de la proteína, MRW es el peso medio por residuo y n es el número de residuos de la proteína. En la tabla 2 aparecen listados los valores de peso molecular y número de aminoácidos de cada una de las construcciones. La elipticidad molar calculada se representó frente a la longitud de onda.

4.2.- Curvas de desnaturalización

Para la realización de las curvas de desnaturalización se empleó como agente desnaturalizante GdmCl en vez de la Urea porque ésta se descompone a cianatos e iones amonio en poco tiempo, mientras que la solución concentrada de GdmCl es estable durante meses. La solución de GdmCl se preparó gravimétricamente y se comprobó la concentración por medida del índice de refracción:

$$\text{Molaridad} = (57.147(\Delta N) + 38.68(\Delta N)^2 - 91.60(\Delta N)^3),$$

siendo ΔN la diferencia del índice de refracción entre la solución de GdmCl y el tampón medida en un refractómetro tipo Abbe (Pace y Scholtz, 1997).

Inicialmente la proteína se diluyó a 8mg/mL en tampón CD 20mM Pipes-KOH, 5mM DTT, pH 7.5 (para la realización de la curva de desnaturalización) o en tampón CR 20mM Pipes-KOH, 5mM DTT, 8M GdmCl (en el caso de la curva de renaturalización). Es importante que en este segundo caso la concentración final de GdmCl sea 6M para que la proteína quede completamente desnaturalizada, por lo que en algunas ocasiones, dependiendo de la concentración de proteína de partida, fue necesario añadir el GdmCl en sólido (para una concentración final de 6M es necesario añadir 1.009g de GdmCl por gramo de agua, lo que implica un factor de dilución de 1.76 sobre la proteína). Seguidamente la proteína se diluyó a 0.16mg/mL en soluciones de distintas concentraciones de GdmCl (de 0M a 6M), preparados con anterioridad.

Las muestras se incubaron a 25°C durante 48 horas para que las reacciones alcanzasen el equilibrio y se midieron los valores de Dicroísmo Circular (DC) de cada una de las muestras a 222nm, durante 10 minutos en el dicrógrafo JASCO 720 termostatzado a 25°C, con una celda con paso de luz de 0.1cm. Los parámetros de medida en estos experimentos fueron: sensibilidad, 20mgrados; respuesta, 16 segundos y resolución, 10 segundos.

Los valores obtenidos se representaron frente a la concentración de GdmCl y en aquellos casos en los que fue posible las curvas se ajustaron a un modelo de 2 estados según lo descrito (Pace y Scholtz, 1997).

4.3.- Disociación del nucleótido

En el caso de FtsZ-(His)₆ se comprobó cómo afectaba la desnaturalización de la proteína por GdmCl al nucleótido unido, para determinar si éste influía en la estabilidad y el plegamiento de FtsZMj.

Se diluyó FtsZ-(His)₆ a una concentración de 40μM en tampón DN 20mM Pipes-KOH, pH 7.5, 2mM TCEP (en lugar de DTT porque a diferencia de éste, al oxidarse no interfiere en la medida en el ultravioleta cercano), y en presencia de

distintas concentraciones de GdmCl (de 0 a 4M). Tras centrifugación de las muestras a 600000g a 25°C durante 4 horas (centrífuga Beckman modelo Optima TLX con rotor TLA120.2), se tomaron 500μL del sobrenadante (parte superior del tubo) para determinar espectrofotométricamente tanto el contenido de nucleótido como la ausencia de proteína mediante el análisis de los espectros de absorción (240-330nm) con cubetas de paso óptico de 1cm. Para cada muestra de proteína se empleó un blanco en función del contenido de GdmCl del tampón.

5.- ENSAMBLAJE Y ACTIVIDAD GTPasa

5.1.- Polimerización de FtsZ

El ensamblaje se monitorizó determinando los valores de dispersión de luz a 90° a lo largo del tiempo. Los experimentos se realizaron en un fluorímetro *Shimadzu RF-540*, empleando cubetas de 0.2 x 1cm de paso de luz, a una longitud de onda de excitación/emisión de 350nm, con una anchura de banda de 2nm (tanto de excitación como de emisión), fijando una sensibilidad alta y midiendo a una escala de ordenadas de 1.

La proteína diluida hasta 400μL en tampón de ensamblaje MesK (50mM MES-KOH, 50mM KCl, 1mM EDTA, pH 6.5) o MesNa (50mM MES-NaOH, 50mM NaCl, 1mM EDTA, pH 6.5) a una concentración final de 0.5mg/mL (12.5μM), se mantuvo durante 5 minutos en la cubeta dentro del fluorímetro para que alcanzase la temperatura del experimento (55°C u 80°C) y se estabilizase la línea base. El ensamblaje se inició añadiendo nucleótido (considerando un exceso de éste para que no resultase un factor limitante en la reacción) y Mg²⁺ y se monitorizó el cambio de dispersión de luz a lo largo del tiempo, pudiendo determinar cómo se ve afectado el ensamblaje por la temperatura, la concentración de nucleótido o de iones y que alteraciones se producen por la presencia/ausencia de la cola de histidinas o de la mutación W319Y.

5.2.- Actividad GTPasa

Las mismas soluciones en las que se midió el ensamblaje se emplearon para determinar la actividad GTPasa. Se tomaron muestras de 20 μ L de las distintas reacciones de polimerización a distintos tiempos y se determinó su contenido de nucleótido tras extracción con 0.5N HClO₄ en frío, neutralización y análisis en HPLC según se ha descrito en el apartado Determinaciones de Proteína y Nucleótido.

Como se tomaron muestras de una misma reacción a lo largo del tiempo, se pudo: (i) observar la disminución de GTP e incremento del GDP en el medio de reacción debido a la actividad hidrolítica de la proteína; (ii) calcular la cantidad de GTP consumido en relación a la cantidad de proteína presente en la reacción y; (iii) calcular la velocidad de hidrólisis de nucleótido por minuto.

Se realizaron controles de hidrólisis de nucleótido en presencia y ausencia de Mg²⁺, bajo las mismas condiciones de ensamblaje que la proteína, para considerarlo a la hora de determinar la velocidad de hidrólisis de la proteína.

5.3.- Contenido de nucleótido en el polímero

En tubos de centrifuga precalentados a 55°C (*Thermostat Plus* de Eppendorf) se diluyó FtsZ en tampón de ensamblaje MesK hasta una concentración final de 0.5mg/mL (12.5 μ M). Seguidamente se le añadió 5mM GTP + 10mM Mg²⁺ o 1mM GMPCPP + 6mM Mg²⁺ e inmediatamente se sedimentaron los polímeros formados mediante centrifugación (157000g durante 6 minutos a 40°C en ultracentrifuga Beckman Optima TLX) en un rotor TLA100 precalentado a 58°C. Se determinó el nucleótido presente tanto en el sobrenadante como en el sedimento mediante extracción con 0.5N HClO₄, neutralización y análisis por HPLC según lo descrito en el apartado Determinaciones de Proteína y Nucleótido. También se analizaron muestras en paralelo que contenían sólo proteína, sólo nucleótido o sólo tampón para evitar errores en el análisis del contenido de nucleótido del polímero.

6.- MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

La formación de polímeros o en su defecto, agregados de proteína, así como la estructura de dichos polímeros se monitorizó mediante microscopía electrónica de transmisión.

6.1.- Preparación de muestras y microscopía

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).

Las muestras se adsorbieron sobre las rejillas en una placa caliente (para mantener la solución a la misma temperatura que en el experimento mientras se adsorbía la muestra sobre la rejilla), durante 1 minuto y seguidamente se tiñeron a temperatura ambiente con una solución de acetato de uranilo al 2%, para lo cual primero se eliminaron los restos de la mezcla de polimerización (pasando la rejilla por 4 gotas de acetato de uranilo al 2%) y seguidamente se tiñó durante 30 segundos sobre una quinta gota de acetato de uranilo.

Se tomaron imágenes a varios aumentos en un microscopio JEOL 1200EX-II (a 100Kv) sobre película Kodak SO-163.

6.2.- Procesamiento de imágenes

En el caso de las láminas de FtsZ las micrografías se tomaron con un aumento nominal de 40000 y las 3 mejores imágenes (determinado por difracción óptica) se seleccionaron para digitalizarlas en un escáner Zeiss-SCAI a 3.5Å/píxel. El posterior tratamiento de estas imágenes se llevó a cabo por el Dr. Jaime Martín-Benito (CNB-CSIC). Las imágenes se refinaron (programa SPECTRA, Schmid *et al*, 1993) y procesaron (conjunto de programas del MRC Crowther *et al*, 1996), corrigiendo la función de transferencia (programa *Integrated Crystallographic Environment*, Hardt *et al*, 1996). Las imágenes se juntaron con el programa ORIGIN (Crowther *et al*, 1996), empleando el grupo cristalográfico $p222_1$, obtenido a partir del programa ALLSPACE (Hardt *et al*, 1996).

En el caso de los filamentos aislados, el Dr. Jose María Valpuesta (CNB-CSIC), tomó las imágenes a 60000 aumentos y las digitalizó a 2.4Å/píxel. Seguidamente seleccionó 528 áreas (en el caso de FtsZMj) y 268 (en el caso de FtsZEc) de 6 monómeros de filamentos (3 de cada protofilamento), se alinearon las imágenes mediante métodos descritos previamente (Marco *et al*, 1996) para seguidamente procesarlas empleando el paquete de programas XMIPP (Marabini *et al*, 1996).

7.-CRISTALOGRAFÍA

El trabajo de cristalografía se llevó a cabo en el laboratorio del Dr. Jan Löwe (LMB–MRC, Cambridge-UK). La estructura cristalográfica de FtsZMj-(His)₆ unida a GDP fue resuelta en 1998 (Löwe y Amos, 1998) y para determinar los posibles cambios estructurales debidos a la hidrólisis del nucleótido se emplearon la proteína mutante FtsZW319Y-GTP y Apo-FtsZ. La primera porque tiene inhibida la actividad GTPasa y su contenido de nucleótido tras la purificación es mayoritariamente GTP (Determinaciones de Proteína y Nucleótido). La segunda porque es la proteína sin nucleótido unido y debe tener una estructura similar a la de la proteína unida a GTP, como muestran resultados bioquímicos publicados recientemente (Huecas y Andreu, 2004).

7.1.- Selección de condiciones de cristalización

En el Laboratory of Molecular Biology la búsqueda de condiciones en las que la proteína puede cristalizar está optimizada mediante el empleo de dos robots. Con el robot Tecan se preparan las soluciones precipitantes y se reparten en placas de 96 pocillos; el test preliminar incluye 12 placas denominadas LMB1-LMB12 lo que permite probar 1152 condiciones distintas. Con el robot Cartesian se realiza el test de cristalización, que está basado en la técnica denominada gota sentada, empleando volúmenes de 100nL (Stock *et al*, 2005).

En el test sobre cada pocillo en el que está el depósito de la solución precipitante existe otro pocillo en el que se dispensaron 100nL de dicha solución

más 100nL de la proteína a una concentración de unos 10mg/mL. El sistema se selló antes de incubarlo a 19°C para evitar modificaciones las condiciones de cristalización por evaporación.

Como el precipitante es el soluto mayoritario en el reservorio y el sistema se encuentra cerrado, se produce difusión de agua desde la solución con proteína (gota) a la solución del reservorio, hasta que la concentración del precipitante se iguala en ambas soluciones. A medida que se va estableciendo el equilibrio entre ambas soluciones, la proteína va pasando a condiciones de sobresaturación, lo que la puede llevar a precipitar en forma de precipitados amorfos, microcristales o cristales de mayor tamaño (McPherson, 1999).

El periodo de incubación depende de la proteína, pero en el caso de FtsZ nunca superó los 3 días.

7.2.- Optimización de condiciones

Tras la detección de cristales se seleccionaron dos de las condiciones en las que los cristales eran poco numerosos y de buen tamaño y se procedió a la optimización de las condiciones de la solución precipitante para intentar obtener cristales de mayor tamaño. Las condiciones seleccionadas para optimización en el caso de FtsZW319Y fueron LMB2-D4 (10% v/v 2-propanol, 0.1M Mes pH 6.0, 0.2M Ca(OAc)₂, pH final 6.1) y LMB3-C4 (0.1M Hepes pH 7.0, 1M LiCl). En el caso de Apo-FtsZ se seleccionaron LMB7-D2 (40% (v/v) PEG 400, 0.1M Tris pH8.5, 0.2M Li₂SO₄) y LMB7-H11 (50% (v/v) PEG 200, 0.1M Hepes pH7.5).

La optimización de condiciones se realizó manualmente en placas de 4x6 pocillos continuando con la técnica de gota sentada, pero en este paso se emplearon volúmenes mayores: 1mL de reservorio de solución precipitante y 1μL de proteína a una concentración de unos 10mg/mL más 1μL de solución precipitante en la gota. En cada una de las placas se modificó ligeramente y de forma gradual las condiciones iniciales de cristalización. En el caso de FtsZW319Y, de LMB2-D4 se modificó la concentración de isopropanol, el pH, la concentración de acetato de calcio y de Mes; de LMB3-C4 se modificó la concentración de Hepes y de LiCl y el pH. En el caso de Apo-FtsZ, de LMB7-D2

se modificó el porcentaje de PEG 400, la concentración de Tris, el pH, y la concentración de Li_2SO_4 ; de LMB7-H11 se modificó la concentración de PEG 200, la concentración de Hepes y el pH. Estas placas también se sellaron e incuban a 19°C.

7.3.- Obtención de mapas de difracción

Los cristales formados (figura 12 A y B) se examinaron en el difractómetro Mar345-1, 2 o 4 del LMB, previa congelación en nitrógeno líquido empleando una solución crioprotectora (cuya composición es la solución reservorio más una concentración determinada del crioprotector) que evita que se formen cristales de hielo. En el caso de FtsZW319Y se probaron como crioprotectores distintas concentraciones de glicerol, etilen glicol, PEG200, PEG400, 2-metil-2,4-pentanediol, 1,6-hexanediol, aceite de parafina y LiCl, siendo el mejor para estos cristales el 1,6-hexanediol a una concentración 2.5M. En el caso de Apo-FtsZ, tras probar varios crioprotectores, se observó que el 40% de PEG400 que incluía la solución de cristalización era suficiente y cualquier crioprotector extra añadido disminuía la resolución y calidad del difractograma.

Los cristales se pescaron de la gota con un aro de nylon de 10-20 μm de diámetro, se pasaron por la solución crioprotectora, se congelaron y se montaron en el goniómetro del difractómetro, para seguidamente tomar un difractograma (distancia 250mm, $\Delta\phi$ 0.1°, intensidad 101.5mA, tiempo 300 segundos). Tanto en el caso de FtsZW319Y como de Apo-FtsZ fué necesario probar numerosos cristales ya que los difractogramas obtenidos no presentaban una buena resolución y en gran parte de ellos los puntos aparecían corridos como consecuencia de la congelación o del periodo de incubación con el crioprotector (figura 12 C y D). Los mejores cristales se guardaron en nitrógeno líquido para su posterior difracción en las fuentes de radiación sincrotrón SRS Daresbury Laboratory (estación 9.6) o en ESRF, Grenoble (estación ID29) donde se obtuvieron los difractogramas (conjunto de datos) necesarios para la posterior resolución de la estructura. El número de difractogramas y los ángulos a los que se tomaron variaron en función de los cristales analizados y fue determinado por

el Dr. Jan Löwe en función del grupo espacial aparente que presentaba cada cristal.

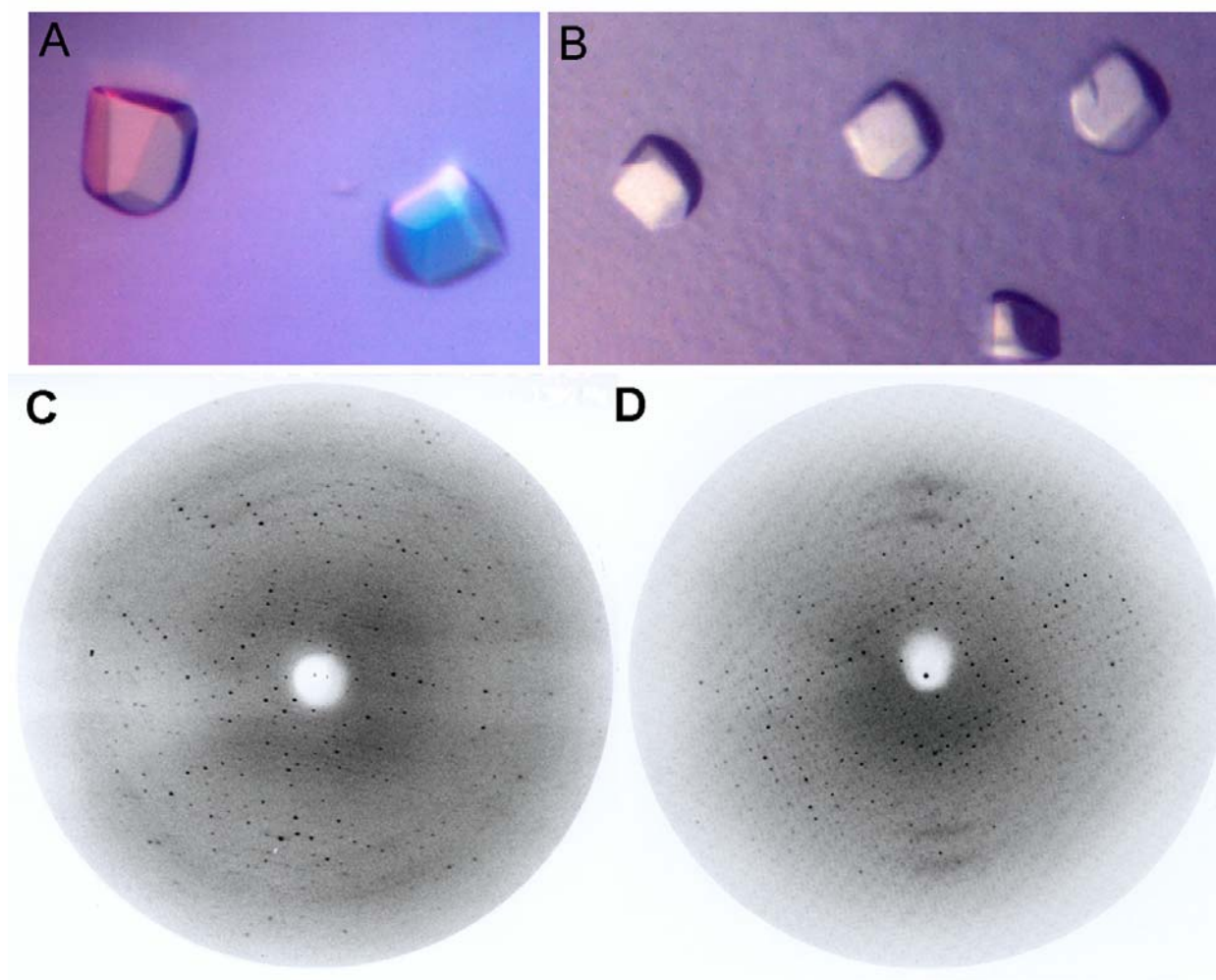


Figura 12 Cristales y mapas de difracción de FtsZW319Y y Apo-FtsZ: (A) Cristales de FtsZW319Y. (B) Cristales de Apo-FtsZ. (C) Mapa de difracción de FtsZW319Y (D) Mapa de difracción de Apo-FtsZ.

7.4.- Resolución de la estructura

Las estructuras fueron resueltas por el Dr. Jan Löwe mediante reemplazamiento molecular, empleando la estructura de FtsZ-GDP (entrada del PDB 1FSZ) como modelo de búsqueda. Los cristales empleados para la obtención de la estructura fueron los crecidos en 100mM HEPES pH 7.4, 1.3M LiCl (para FtsZW319Y) y 100mM Tris-HCl, 200mM Li₂SO₄, 40% PEG400, pH 8.4 (para Apo-FtsZ).

7.5. Determinación de la estructura del sitio activo de FtsZ

Para la obtención de la estructura del sitio activo de la proteína a partir de los cristales de Apo-FtsZ se procedió a la inmersión de éstos en la solución precipitante suplementada con 3mM de GTP (o GDP) o 3mM de GTP (o GDP) más 6mM $MgCl_2$, incubándose por periodos de 10 minutos a 2 horas. El procesamiento de los cristales y la obtención de la estructura se realizó como se ha descrito anteriormente.

8.- REACTIVOS

De **Aldrich**: Fosfato de tetrabutilamonio (TBA $[CH_3(CH_2)_3]_4N(H_2PO_4)$). De **Amersham**: ECL *western blotting detection reagents*, *Sephacryl S300* y *S400* y *Sephadex G25 medium*. De **BioRad**: Acrilamida (C_3H_5NO), Bis-acrilamina (Bis(N,N'-metilen-bis-acrilamida), Bromuro de etidio ($C_{21}H_{21}BrN$), Persulfato amónico, *SDS-PAGE molecular weight standard low* y N,N,N',N'-tetrametil etilenamida (TEMED). De **BioLabs**: Marcador molecular λ -DNA *HindIII digest*. De **Boehringer-Mannheim**: Ampicilina ($C_{15}H_{18}N_3O_4SNa$), Cloranfenicol ($C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$), Guanosina-5'-difosfato (GDP, $G_{10}H_{13}N_5O_{11}P_2Li_2$), Guanosina-5'-trifosfato (GTP, $C_{10}H_{14}N_5O_{14}P_3Li_2$). De **Calbiochem**: 1, 4 Ditiotreitól (DTT, $C_4H_{10}O_2S_2$), Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG, $C_9H_{18}O_5S$). De **Difco**: Agar noble especial, Triptona, Extracto de levadura. De **Fluka**: Ácido etilen diaminotetraacético (EDTA, $C_{10}H_{14}N_2NaO_8 \cdot 2H_2O$), Tween-20. De **Merck**: Acetato de uranilo, Ácido sódico (NaN_3), Ácido acético glacial (CH_3COOH), Ácido clorhídrico 37% (HCl), Ácido perclórico 70% ($HClO_4$), *Coomassie Brilliant Blue R-250* ($C_{45}H_{44}N_3NaO_7S_2$), Cloruro de magnesio ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$), Cloruro de calcio ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$), Cloruro de níquel ($NiCl_2 \cdot H_2O$), Cloruro de potasio (KCl), Cloruro sódico (NaCl), Fosfato bipotásico bibásico (K_2HPO_4), Fosfato potásico monobásico (KH_2PO_4), Hidrocloruro de guanidinio-GdnHCl (CH_6ClN_3), Hidróxido potásico (KOH), Hidróxido sódico (NaOH), Hidroximetil aminometano (Tris, $C_4H_{11}NO_3$), Imidazol ($C_3H_4N_2$), Metanol (CH_3OH), Dodecil sulfato sódico-SDS ($C_{12}H_{25}O_4SNa$), Sulfato amónico ($(NH_4)_2SO_4$). De **Sigma**: Aceite mineral PCR,

BSA-Albúmina bovina (fracción V), Guanosina, MES ($\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_4\text{S}$), PIPES ($\text{C}_8\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}_2\text{Na}_2$), HEPES ($\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$). De **Pronadisa**: Agarosa D-2.

RESULTADOS

1.- PLEGAMIENTO DE FtsZ

A pesar de tener estructuras tridimensionales homólogas, FtsZ y tubulina (Nogales *et al.*, 1998b), presentan grandes diferencias a nivel de plegamiento y ensamblaje. Tubulina requiere la ayuda de varias chaperonas moleculares y cofactores para adquirir la conformación adecuada que le permita generar los dímeros $\alpha\beta$, que posteriormente forman parte de los microtúbulos (Yaffe *et al.*, 1992; Shah *et al.*, 2001; López-Fanarraga *et al.*, 2001; Cowan *et al.*, 2001), mientras que FtsZ sería capaz de plegar espontáneamente, puesto que se sobreexpresa fácilmente, y no requiere la ayuda de chaperonas (*in vitro* no se une ni a GroEL ni a CCT) (Houry *et al.*, 1999; Dobrzynski *et al.*, 2000).

En esta parte del trabajo se ha estudiado las características del plegamiento de FtsZ del arqueobacteria *Methanococcus jannaschii* (FtsZMj), para poder compararlo con su homóloga eucariota, tubulina. Para ello hemos empleado cuatro construcciones distintas de FtsZMj; (FtsZ-(His)₆, FtsZW319Y-(His)₆, FtsZ, FtsZW319Y), y cuatro quimeras FtsZMj - β tubulina *Mus musculus* (β tubMm) (FtsZ/T7-(His)₆, FtsZ/M-(His)₆, FtsZ/T7M-(His)₆, FtsZ/NT7M-(His)₆).

1.1.- FtsZ, FtsZ-(His)₆, y las proteínas mutantes FtsZW319Y, FtsZW319Y-(His)₆

1.1.1.- Descripción de las proteínas FtsZ empleadas

En un trabajo anterior del grupo se diseñó el doble mutante FtsZT92W/W319Y-(His)₆ para estudiar la región T3 y los cambios producidos por la hidrólisis del nucleótido en esta región (Díaz *et al.*, 2001). Los estudios se basaron en medidas del cambio de fluorescencia, por lo que para poder interpretar fácilmente la señal fue necesario eliminar el único triptófano de la proteína. FtsZW319Y-(His)₆ se diseñó como paso intermedio en la obtención del doble mutante FtsZT92W/W319Y-(His)₆.

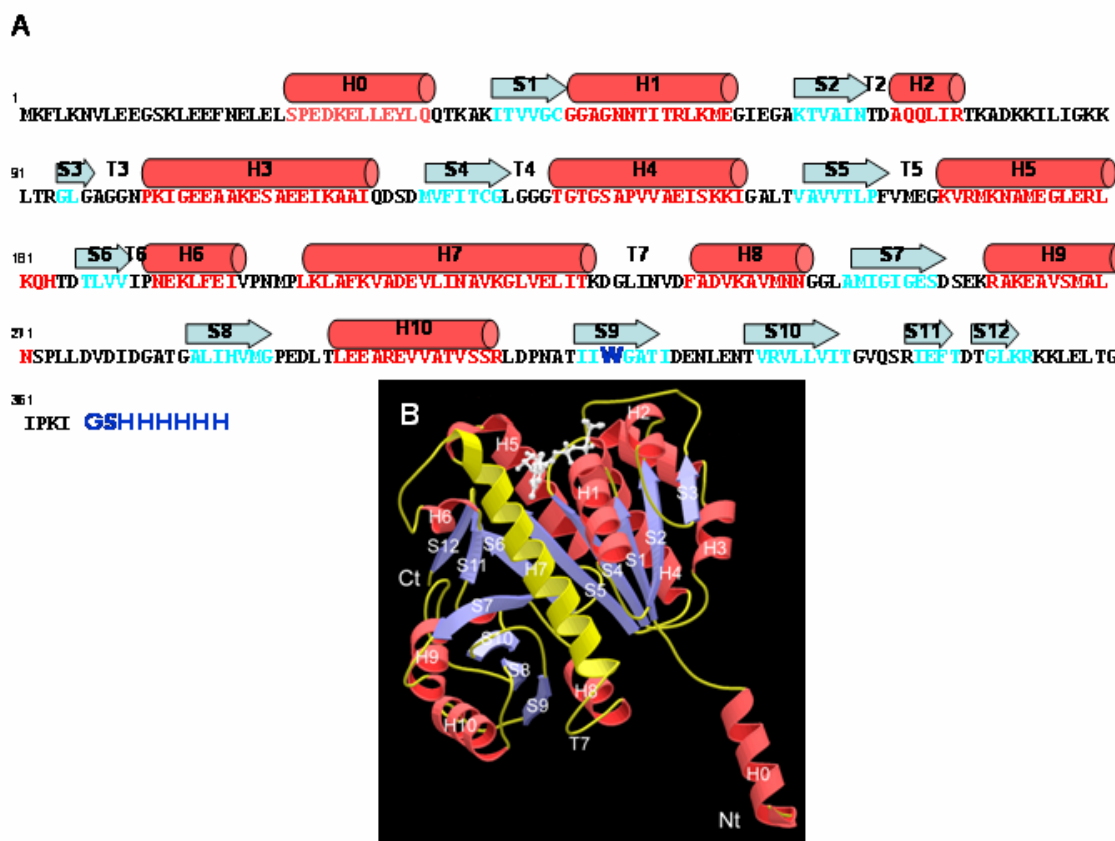


Figura 13: Estructuras primaria y terciaria de FtsZMj. (A) Estructura primaria de FtsZMj en la que se resaltan los aminoácidos que forman parte de estructuras en α hélice (rojo), en β (azul) y estructura desordenada (negro). En azul oscuro aparecen resaltados el triptófano (sustituido por tirosina) y la cola de seis histidinas que se han modificado mediante mutagénesis dirigida. Sobre la estructura primaria se representa la estructura secundaria de las α hélices (tubos) y los segmentos β (flechas), según lo descrito por Löwe, 1998. (B) Estructura terciaria de FtsZMj.

En el presente estudio las proteínas mutantes FtsZW319Y-(His)₆ y FtsZW319Y se han empleado para investigar el papel del triptófano en la interfase de la actividad GTPasa (figura 13), aprovechando su baja frecuencia de sustitución por tirosina. Alineamientos de 64 secuencias de FtsZ (obtenidas de la base de datos *SwissProt*), realizados con el programa *Clustal W* mostraron que esta posición está altamente conservada en procariotas (Oliva *et al.*, 2003), y en el caso de las arqueobacterias esta posición siempre está ocupada por un triptófano (figura 14).

La cola de seis histidinas en el extremo carboxilo terminal de las construcciones (figura 13), empleada inicialmente para facilitar su purificación

(Löwe y Amos, 1998; Díaz *et al.*, 2001), se adquiere como consecuencia de la inserción de los genes que codifican para las distintas proteínas en el vector pHis17. Al no formar parte de la proteína nativa, la cola podría afectar tanto a la estructura como a la estabilidad y funcionalidad de FtsZ, y por esta razón se eliminó mediante mutagénesis dirigida (Material y Métodos) tanto en la proteína salvaje (FtsZ) como en la mutante (FtsZW319Y).

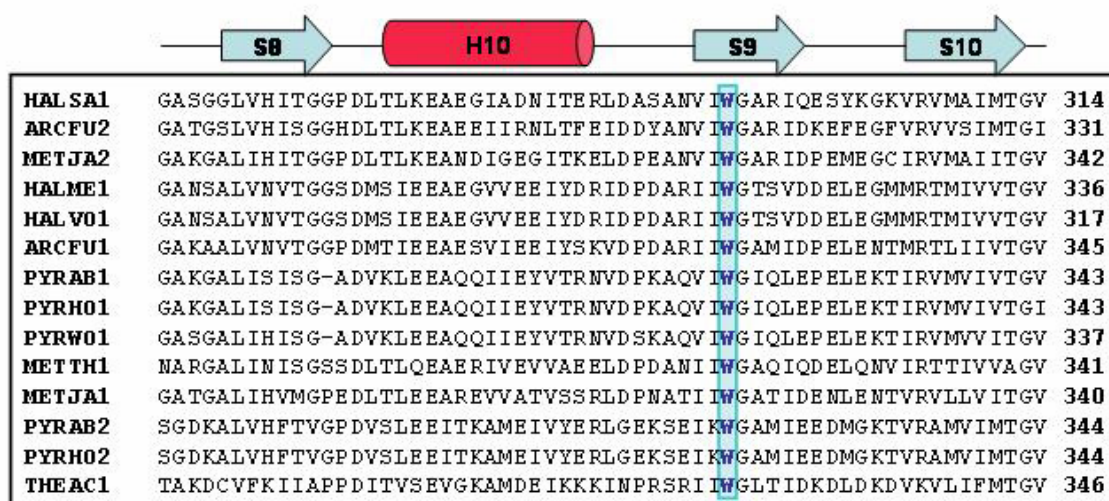


Figura 14: Alineamientos del segmento β S9, de 12 secuencias de FtsZ de arqueobacterias en el que se observa cómo se conserva el triptófano 319 (FtsZMj). HALSA (*Halobacterium salinarum*), ARCFU (*Archaeoglobus fulgidus*), METJA (*Methanococcus jannaschii*), HALME (*Halobacterium mediterranei*), HALVO (*Halobacterium volcanii*), PYRAB (*Pyrococcus abyssi*), PYRHO (*Pyrococcus horikoshii*), PYRWO (*Pyrococcus woesei*), METTH (*Methanobacterium thermoautotrophicum*), THEAC (*Thermoplasma acidophilum*). Los números 1 y 2 tras los nombres hacen referencia a las secuencias paralogas presentes en arqueobacterias FtsZ1 y FtsZ2.

1.1.2.- Estabilidad y plegamiento de estas proteínas

El espectro de dicroísmo circular en el ultravioleta lejano de estas cuatro proteínas era muy parecido, caracterizándose por un máximo, a 190-193nm de unos 20000 grados $\text{cm}^2 \text{dmol}^{-1}$ y dos mínimos, a 209 y 222nm en el rango entre -9000 y -12000 grados $\text{cm}^2 \text{dmol}^{-1}$ (figura 15A), con diferencias no significativas en la forma del espectro (la relación $\text{DC}_{222\text{nm}}/\text{DC}_{209\text{nm}}$ en las 4 proteínas es de 0.89), lo que es indicativo de que presentan la misma estructura secundaria promedio.

Este espectro se convertía en uno característico de polipéptidos desordenados cuando la proteína estaba en una solución de más de 5M de GdmCl, mientras que si la proteína desnaturalizada se diluía o dializaba en frío para eliminar el GdmCl, rápidamente recuperaba su espectro original (líneas de puntos y círculos vacíos respectivamente, en la figura 15A). Resultados similares se obtuvieron si el tampón de diálisis incluía 10 μ M GDP, 10 μ M GTP o ningún nucleótido (estas muestras dializadas contenían una relación de nucleótido/FtsZ de 1.0, 0.8 y 0.5 respectivamente) es decir, se vió que el nucleótido no influye en la capacidad de replegar de la proteína. También se estudió cómo afectaba la temperatura en la renaturalización y se obtuvieron resultados similares a los anteriores si la proteína se diluía a 2°C, 25°C o 53°C. A 80°C se producía una pérdida del 20% en el valor de dicroísmo circular a 222nm, respecto al valor obtenido a 25°C, lo que sugiere que se ha producido desnaturalización térmica parcial, aunque a esta temperatura la proteína sigue manteniendo una capacidad de renaturalizar de hasta el 45%.

Los perfiles de desnaturalización/renaturalización en GdmCl a 25°C indicaban una transición completamente reversible entre 2.2M y 4M de GdmCl en las cuatro construcciones (figura 15B, C, D y E). No existen evidencias de que ninguna de las cuatro proteínas conserve algún tipo de estructura residual a concentraciones de GdmCl superiores a 5M. Las curvas se ajustaron bastante bien a un modelo de equilibrio de 2 estados (Pace y Scholtz, 1997), sugiriendo (aunque no probando) que los dos dominios de FtsZ desnaturalizan simultáneamente. Los valores de $[GdmCl]_{1/2}$ y ΔG obtenidos a partir de los ajustes de las distintas construcciones se muestran en la tabla 3. La existencia de una cola con seis histidinas en el extremo carboxilo terminal de las proteínas, la mutación puntual W319Y en el segmento S9 o ambas modificaciones juntas, no tienen ningún efecto significativo sobre el equilibrio de desnaturalización/renaturalización, por lo que se puede considerar un valor medio de $[GdmCl]_{1/2}$ de 3.02 ± 0.09 M y de ΔG de 10.6 ± 3.1 Kcal mol⁻¹.

Los valores de $[GdmCl]_{1/2}$ de FtsZ-(His)₆ obtenidos a distintas temperaturas (2.3M a 5°C, 3.1M a 25°C, 2.8M a 55°C y 2.2M a 70°C) mostraron

que esta proteína alcanza su máxima estabilidad cerca de los 40°C, siendo menos estable en frío o a temperaturas muy altas, aunque realmente debe ser suficientemente estable a elevadas temperaturas, ya que la temperatura óptima de crecimiento de *M. jannaschii* es 85°C (Jones *et al.*, 1983).

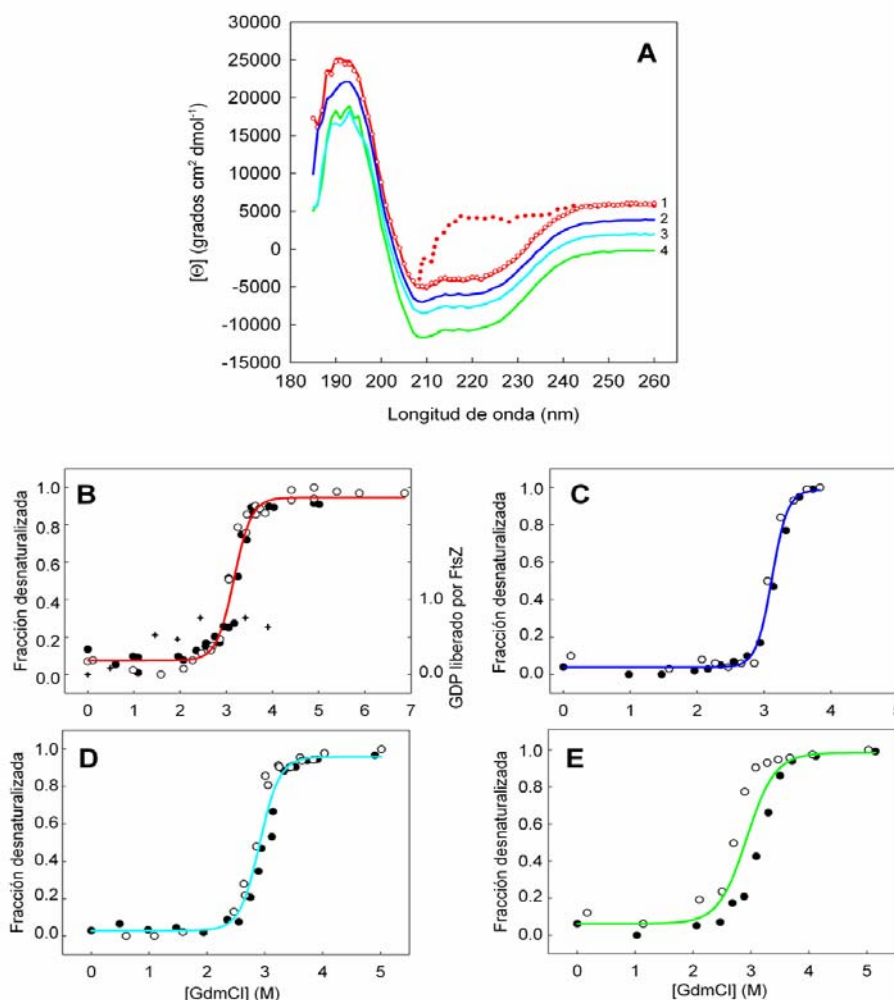


Figura 15: Espectros de dicroísmo circular y curvas de desnaturalización de FtsZ-(His)₆, FtsZ, FtsZW319Y-(His)₆, FtsZW319Y. (A) Espectros de dicroísmo circular (2mg/ml de proteína en 20mM Tris-HCl, pH 7.9 a 25°C). FtsZ-(His)₆ (línea 1), FtsZ (línea 2), FtsZW319Y-(His)₆ (línea 3), FtsZW319Y (línea 4), FtsZ-(His)₆ desnaturalizada en presencia de 6M GdmCl (•••) y FtsZ-(His)₆ renaturalizada por dilución de la proteína desnaturalizada en 20mM Pipes-KOH, pH 7.5 (○). Las distintas líneas se han desplazado 2000 unidades en el eje Y para distinguir mejor los espectros. (B) Curvas de equilibrio de desnaturalización de FtsZ-(His)₆, (C) FtsZ, (D) FtsZW319Y-(His)₆ y (E) FtsZW319Y, en las que se representa la fracción de proteína desnaturalizada frente a la concentración de GdmCl, tanto concentraciones decrecientes de GdmCl (○) como concentraciones crecientes (●). Los experimentos se realizaron a una concentración final de proteína de 0.16mg/ml en 20mM Pipes-KOH, pH 7.5 a 25°C y distintas concentraciones de GdmCl. Las líneas son el ajuste a un modelo de 2 estados según lo descrito por Pace y Scholtz (1997). En B también se presenta la liberación de nucleótido por FtsZ-(His)₆ medido por centrifugación (cruces), cuya escala aparece a la derecha del gráfico.

Tabla 3: Valores de los ajustes de las curvas de plegamiento de las distintas proteínas

Proteína	[GdmCl] _{1/2} (M)	$\Delta G(H_2O)$ (Kcal mol ⁻¹)
FtsZ	3.11	15.6
FtsZ-(His) ₆	3.09	9.82
FtsZW319Y	2.94	7.07
FtsZW319Y-(His) ₆	2.91	9.96
FtsZ/T7-(His) ₆	1.90	3.96
FtsZ/M-(His) ₆	2.60	3.82
FtsZ/T7M-(His) ₆	-	-
FtsZ/NT7M-(His) ₆	-	-

La determinación de la disociación de nucleótido unido a la proteína en condiciones desnaturalizantes mostró que: (i) tras incubar FtsZ-(His)₆ en distintas concentraciones de GdmCl y sedimentarla para determinar la cantidad de nucleótido liberado en el sobrenadante, la liberación de nucleótido tenía lugar a bajas concentraciones de GdmCl (punto medio a 1.5M GdmCl), a las que el cambio de dicroísmo circular es insignificante (figura 15B, cruces). (ii) la proteína era capaz de volver a unir hasta el 80% del nucleótido liberado. En el perfil A de la figura 16 se muestra la liberación de 0.9 moles de nucleótido por mol de proteína en cromatografía en *Sephadex G-25* con 6M GdmCl y en el perfil B, la liberación de sólo 0.2 moles por mol de FtsZ tras diluir esa misma proteína en frío hasta 0.12M GdmCl, seguida de cromatografía en *Sephadex G-25*, esta vez en ausencia de GdmCl. Esto quiere decir que la proteína desnaturalizada en GdmCl recupera fácilmente su funcionalidad al eliminar el agente desnaturalizante.

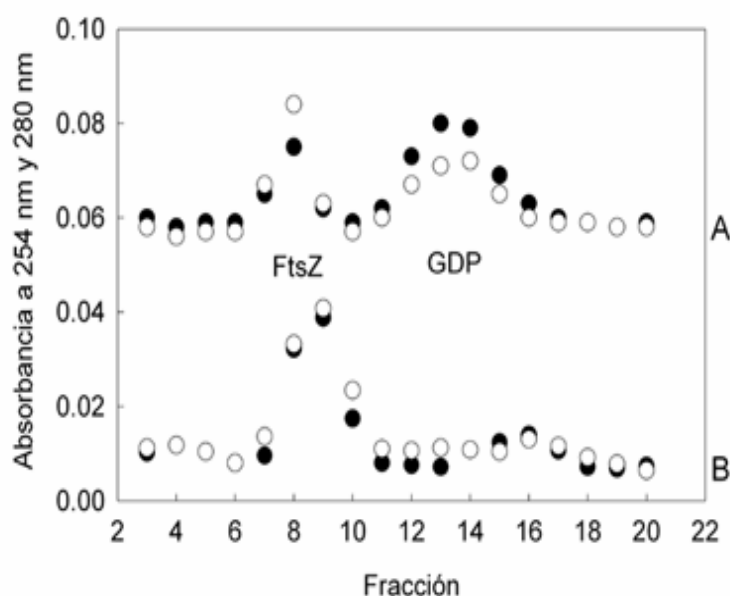


Figura 16: Unión de nucleótido por FtsZMj renaturalizada. (A) Liberación de nucleótido de 6.4nmol de FtsZ en presencia de 6M GdmCl, determinado mediante cromatografía en *Sephadex G-25* y medidas de absorción a 254nm (●) y a 280nm (○). Se calculan 5.6nmol de FtsZ-(His)₆ en el primer pico y 5.3nmol de nucleótido liberado en el segundo pico. (B) FtsZ-(His)₆ en 6M GdmCl diluida 50 veces en tampón frío sin GdmCl y equilibrada en 20mM Pipes-KOH, 1mM DTT, pH 7.5 a 5°C, en una columna *Sephadex G-25*. La cantidad de FtsZ y nucleótido determinados por absorción muestran que la proteína une de nuevo la mayor parte su nucleótido (el primer pico contiene aproximadamente 6nmol de FtsZ-(His)₆ y el segundo pico 1.1nmol de nucleótido liberado).

1.2.- Proteínas quiméricas de FtsZ y Tubulina

La siguiente parte del estudio se realizó con las quimeras FtsZMj/ β TubMm, obtenidas mediante mutagénesis dirigida (Material y Métodos). Son construcciones que incluyen inserciones de bucles de superficie de la β tubMm en FtsZMj (figura 17) y se diseñaron para estudiar cómo afectan estas inserciones en la estabilidad y el plegamiento de FtsZMj y confirmar cuáles son las regiones de tubulina que se unen a la chaperona CCT durante su proceso de plegamiento *in vivo* (ver Discusión). Los bucles insertados son: T7, implicado en contactos longitudinales y activación de la actividad GTPasa en ambas proteínas (Nogales *et al.*, 1998; Scheffers *et al.*, 2002), M (*microtubule loop*) implicado tanto en contactos longitudinales como laterales en los microtúbulos y N (bucle entre H3 y S4) implicado en la formación de contactos laterales (Nogales *et al.*,

1999; Li *et al.*, 2002). Todas estas quimeras incluyen cola de histidinas para facilitar la purificación.

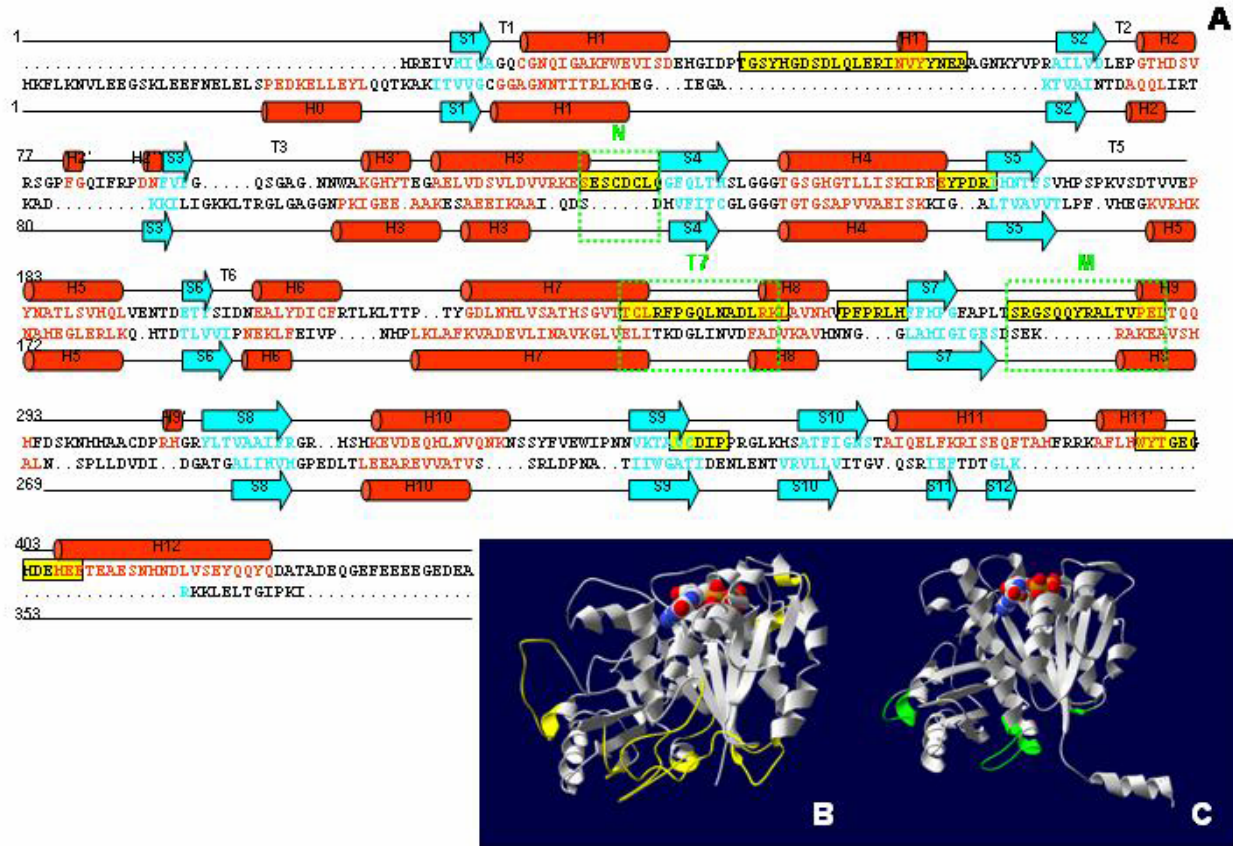


Figura 17: (A) Alineamientos basados en la estructura secundaria de las secuencias de tubulina $\beta 2$ de ratón (*Mus musculus*), isotipo mayoritario en cerebro, y FtsZMj. Se muestran las estructuras secundarias de tubulina de cerebro de cerdo (Löwe, J. *et al.*, 2001) y FtsZMj (Löwe, J. y Amos, L., 1998) donde se representan las α hélices (tubos) y los segmentos β (flechas). Las barras amarillas señalan los bucles de tubulina implicados en la unión a CCT (Llorcas, O. *et al.*, 2001). Las tres secuencias de tubulina elegidas para ser sustituidas en la secuencia de FtsZMj aparecen en cajas verdes denominadas como N, T7 y M. **(B) Estructura terciaria** de β -tubulina (izquierda), donde aparecen marcados en amarillo los bucles implicados en la interacción con CCT, y FtsZMj (derecha), donde aparecen marcados en verde las tres secuencias, N, T7 y M, sustituidas por sus equivalentes en tubulina.

Los espectros de dicroísmo circular en el ultravioleta lejano de cada una de las quimeras eran bastante similares al de FtsZ-(His)₆ (Líneas 2 a 6 en figura 18A), presentando un máximo de 20000 grados $\text{cm}^2 \text{dmol}^{-1}$ a 190nm y dos mínimos a 209nm y 222nm. El dicroísmo circular a 222nm era prácticamente el mismo en todos los casos (-12000 grados $\text{cm}^2 \text{dmol}^{-1}$, considerando el error

experimental) y sólo se observaban pequeñas diferencias en la relación de intensidades entre los valores mínimos (DC_{222nm}/DC_{209nm}), siendo éstos de 0.94 (FtsZ/T7-(His)₆), 0.90 (FtsZ/M-(His)₆) y 0.98 (FtsZ/T7M-(His)₆ y FtsZ/NT7M-(His)₆), lo que hace que el espectro de las quimeras se parezca más al espectro de la tubulina (figura 18A, línea 1), el cual presenta una relación de mínimos de 1.01 (Andreu *et al.*, 2002), que al de FtsZ (con una relación de mínimos de 0.89, apartado anterior).

Las curvas de desnaturalización/renaturalización, en las que se ha determinado el cambio en diroísmo circular a 222nm en función de la concentración de GdmCl, permitieron estudiar la estabilidad y el plegamiento espontáneo de estas proteínas en comparación con FtsZ-(His)₆.

El equilibrio de desnaturalización de FtsZ/T7-(His)₆ era completamente reversible y tenía una $[GdmCl]_{1/2}$ de 1.9M, por lo que es significativamente menos estable que FtsZ-(His)₆, cuyo valor de $[GdmCl]_{1/2}$ es de 3.1M (figura 18B, círculos y cuadrados respectivamente). FtsZ/M-(His)₆ también desnaturalizaba de manera reversible y con un perfil de desnaturalización mucho más parecido al de FtsZ-(His)₆ (presentaba un $[GdmCl]_{1/2}$ de 2.6M, figura 18C). FtsZ/T7M-(His)₆ y FtsZ/NT7M-(His)₆ presentaban un perfil de desnaturalización de dos fases (figura 18D y E respectivamente), con unos puntos medios aproximados de concentración de GdmCl de 1.3M y 2.3M (FtsZ/T7M-(His)₆) y de 0.7M y 2.7M (FtsZ/NT7M-(His)₆). Además FtsZ/NT7M-(His)₆, al igual que tubulina, no replegaba completamente (figura 18E y F respectivamente) al eliminar el GdmCl de la muestra por dilución. El espectro de diroísmo circular de FtsZ/NT7M-(His)₆ replegada en 0.6M GdmCl (figura 18A, línea discontinua) era claramente diferente al de la proteína nativa (figura 18A, línea 6) o al de la proteína completamente desnaturalizada (figura 18A, línea de puntos). La proteína no replegaba completamente y se seguía observando una renaturalización parcial aunque se emplease una concentración de proteína 10 veces menor o la dilución se realizase a 4°C (para evitar la formación de agregados).

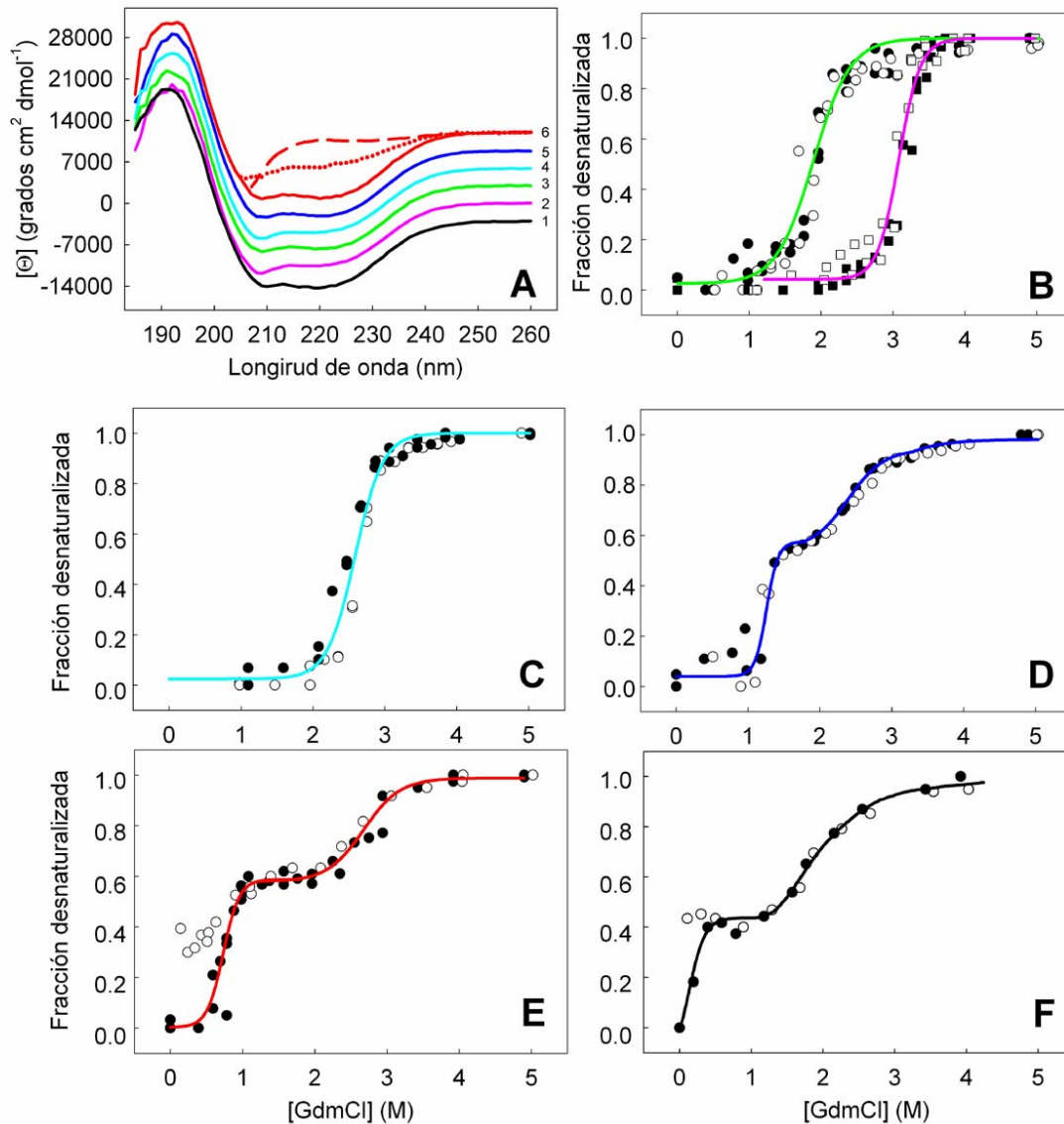


Figura 18: Espectros de dicroísmo circular y curvas de desnaturalización de tubulina, FtsZ-(His)₆ y las quimeras. (A) Espectros de dicroísmo circular de tubulina (línea 1), FtsZ-(His)₆ (línea 2), FtsZ/T7-(His)₆ (línea 3), FtsZ/M-(His)₆ (línea 4), FtsZ/T7M-(His)₆ (línea 5) y FtsZ/NT7M-(His)₆ (línea 6). Las líneas se han desplazado 2000 unidades en el eje Y para distinguir los espectros. Cada espectro es el resultado de la media de 2 preparaciones distintas de proteínas a 2mg/ml en 20mM Tris-HCl, pH 7.9 a 25°C. También se muestra el espectro de FtsZ/NT7M-(His)₆ desnaturalizada en presencia de 6M GdmCl (•••) y la misma proteína renaturalizada parcialmente al diluirla en 0.6M GdmCl (línea discontinua). (B) Curvas de desnaturalización en GdmCl de FtsZ-(His)₆ (■) y FtsZ/T7-(His)₆ (●), respectivamente, (C) FtsZ/M-(His)₆, (D) FtsZ/T7M-(His)₆, (E) FtsZ/NT7M-(His)₆ y (F) tubulina. Se representa la fracción de proteína desnaturalizada frente a la concentración de GdmCl, tanto concentraciones decrecientes de GdmCl (○) como concentraciones crecientes (●). En B y C, las líneas son el ajuste a un modelo de 2 estados según lo descrito por Pace y Scholtz, 1997. En D, E y F las líneas son un ajuste arbitrario a una doble sigmoide.

Estos resultados muestran que la inserción de bucles de β -tubulina en la estructura de FtsZ va reduciendo progresivamente la estabilidad de la proteína, siendo la quimera menos afectada la que incluye sólo el bucle M, y que la inserción del bucle N complica el proceso de replegamiento en la quimera FtsZ/NT7M-(His)₆.

2.- ENSAMBLAJE Y ACTIVIDAD GTPasa

Estudios *in vitro* demostraron que FtsZ_{Ec} polimeriza hidrolizando nucleótido de forma parecida a como lo hace tubulina (Mukherjee y Lutkenhaus, 1998). Ambas proteínas forman una nueva familia de GTPasas (Nogales *et al.*, 1998b) ya que tienen un total de 7 segmentos implicados en la unión del nucleótido, en vez los 5 existentes en la familia de las GTPasas clásicas (a la que pertenecen p21 (ras), EF-Tu o α -trasducina). Por lo tanto en FtsZ y tubulina el nucleótido se asienta sobre una gran superficie (casi el 10% de la superficie total de la proteína, Nogales *et al.*, 1998b), que en el caso de tubulina forma parte de la interfase de unión entre monómeros (Nogales *et al.*, 1998a; Löwe *et al.*, 2001). Además las zonas equivalentes a las regiones *switch I* y *II* de las GTPasas clásicas (bucle T2 y T3 respectivamente) interaccionan con el nucleótido de manera muy distinta (Nogales *et al.*, 1998b), por lo que la información existente sobre el efecto de la hidrólisis del GTP en estas proteínas no se puede extrapolar a FtsZ y tubulina.

La tubulina hidroliza el nucleótido inmediatamente después de polimerizar, pero éste no se puede intercambiar en el polímero debido a que el sitio de unión queda completamente ocluido tras el ensamblaje (Nogales *et al.*, 1999). El resultado es una estructura termodinámicamente inestable (polímero GDP, con unos monómeros de GTP en los extremos) que eventualmente se colapsa, dando lugar a lo que se conoce como inestabilidad dinámica de los microtúbulos (Mitchison y Kirschner, 1984).

Así se propuso el estudio del tipo de polímeros formados por FtsZ_{Mj} bajo distintas condiciones, el contenido de nucleótido de dichos polímeros y la implicación de la actividad GTPasa en la dinámica del ensamblaje, mediante la

caracterización bioquímica del ensamblaje y la actividad hidrolítica de la proteína.

2.1.- Ensamblaje reversible y dependiente de nucleótido de FtsZ de *M. jannaschii*

La monitorización del ensamblaje de FtsZMj se realizó mediante dispersión de luz a 90° (que depende del tamaño y cantidad de los polímeros formados) y toma de rejillas de microscopía electrónica (para visualización de dichos polímeros). Los estudios a 55°C mostraron que el ensamblaje de FtsZMj es reversible y dependiente de GTP y Mg^{2+} , de forma similar a lo observado previamente con FtsZEc a temperaturas más bajas. Intentos de ensamblajes realizados a temperaturas más bajas con FtsZMj resultaron fallidos probablemente debido a que como se ha comentado anteriormente la temperatura óptima de crecimiento de esta arqueobacteria es 85°C.

En la figura 19 se muestra el ensamblaje de FtsZ (12.5μM) en tampón MesK y a 55°C. El valor de dispersión de luz previo a la adición de nucleótido era insignificante, mientras que 20 segundos después (que es el tiempo más corto que se puede medir) del inicio del ensamblaje por la adición de 1mM GTP y 6mM Mg^{2+} (consideradas como condiciones estándar) alcanzaba el valor máximo de dispersión de luz, que después iba decayendo poco a poco (línea 1), siguiendo a la hidrólisis del GTP a GDP (los círculos sólidos son medidas de la concentración de GTP del medio por HPLC). Transcurridos unos 15 minutos se había consumido todo el GTP del medio y los valores de dispersión de luz retornaban hasta los niveles iniciales. El incremento de la dispersión de luz era prácticamente insignificante si sólo se añadía a la solución de proteína GTP o GDP o GDP y Mg^{2+} (figura 19, línea 3) y el incremento era muy pequeño cuando se añadía sólo Mg^{2+} (figura 19, línea 2) indicando que no se estaban formando grandes polímeros bajo estas condiciones.

La sustitución de 1mM GTP por 1mM GMPCPP (análogo de GTP lentamente hidrolizable, Hyman *et al.*, 1992) permitió que los polímeros se mantuvieran ensamblados durante más de 2 horas (figura 19, línea 5) y la

disminución de la concentración hasta 0.1mM producía un ensamblaje más corto, alcanzándose valores de dispersión de luz basales a los 10 minutos (figura 19, línea 4), una vez que se había hidrolizado completamente todo el análogo de nucleótido (círculos vacíos son medidas de GMPCPP del medio por HPLC).

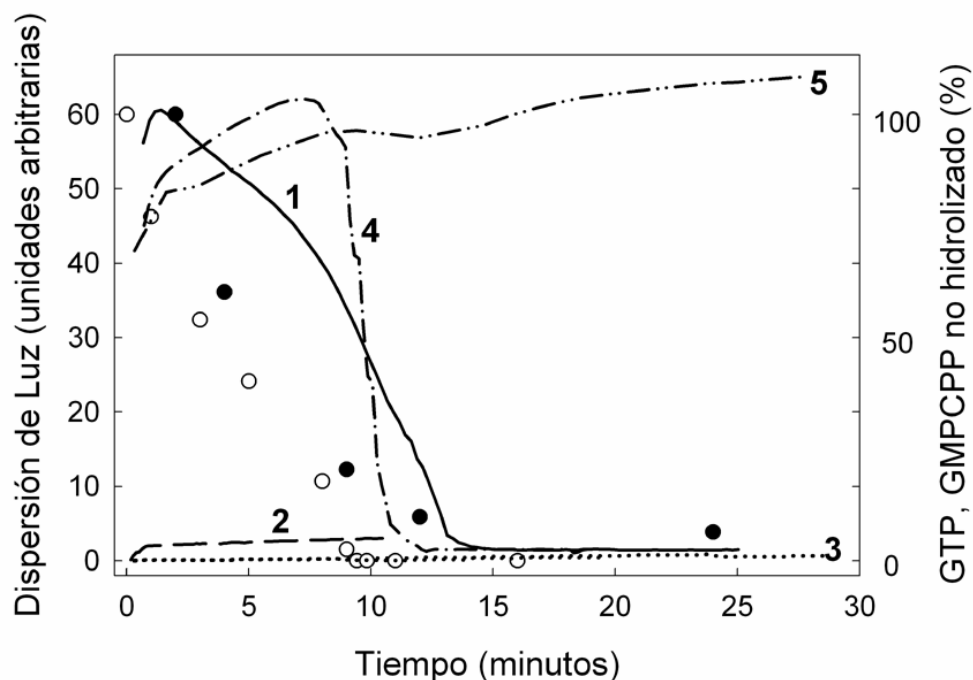


Figura 19: Curso de tiempo del ensamblaje de 12.5μM de FtsZ (en tampón MesK, 55°C), seguido mediante dispersión de luz a 90°. El ensamblaje se inicia añadiendo a tiempo 0: 6mM Mg²⁺ y 1mM GTP (línea 1) con % de GTP no hidrolizado en la solución (●); 6mM Mg²⁺, sin añadir nucleótido (línea 2); 1mM GTP o 2mM GDP o 6mM Mg²⁺ y 2mM GDP (línea 3); 6mM Mg²⁺ y 0.1mM GMPCPP (línea 4) con % de GMPCPP no hidrolizado en

También se observó que tras un ciclo de ensamblaje/desensamblaje la nueva adición de GTP inducía un nuevo incremento de dispersión de luz que disminuía poco a poco como en el caso anterior. Además los polímeros podían ser desensamblados completamente en menos de 20 segundos por la adición de GDP. También se pudo inducir el ciclado de los polímeros por enfriamiento y calentamiento de la muestra y quelando el Mg²⁺ del medio mediante la adición de EDTA y luego añadiendo un exceso de Mg²⁺ (figura 20).

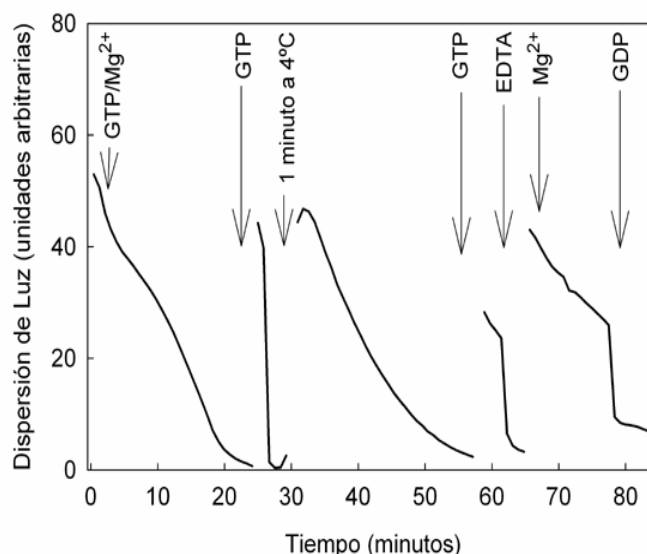


Figura 20: Ciclos de polimerización de $12.5\mu\text{M}$ de FtsZ (en tampón MesK, 55°C) seguido mediante dispersión de luz a 90° . El ensamblaje se inicia añadiendo 6mM Mg^{2+} y 1mM GTP a la solución, y se deja completar un ciclo de polimerización-despolimerización. Al añadir 1mM GTP se inicia un nuevo ciclo de polimerización, pero en este caso tras 2 minutos se deja la solución a 4°C durante 1 minuto antes de continuar a 55°C . El ensamblaje se recupera de este choque frío y se completa el este segundo ciclo. Se inicia otro ciclo más añadiendo 1mM GTP , pero en este caso se acelera la despolimerización quelando el Mg^{2+} presente en el medio con 6mM EDTA , alcanzándose niveles basales de dispersión de luz en menos de 1 minutos. Si se añade 6mM Mg^{2+} se vuelven a recuperar los valores de dispersión de luz que se tenían antes de la despolimerización. Finalmente, al añadir 2mM GDP volvemos a acelerar la despolimerización terminando este último ciclo.

En las condiciones estudiadas, los polímeros de FtsZ en la solución, hidrolizaban una molécula de GTP por molécula de FtsZ cada 10 segundos. El incremento de la concentración de Mg^{2+} producía una disminución en la velocidad de hidrólisis del nucleótido e incrementaba la estabilidad de los polímeros, ya que se mantenían ensamblados durante más tiempo (figura 21A). Así, el tiempo medio de desensamblaje medido (cuándo se alcanza el 50% del valor máximo de dispersión de luz) era de unos 4 minutos con 3mM Mg^{2+} , mientras que alcanzaba valores de hasta 9 minutos con 6mM Mg^{2+} y 12 minutos con 10mM Mg^{2+} . En todos los casos el desensamblaje de FtsZMj seguía estrechamente el consumo de GTP. En la figura 21B, en la que se representa el valor de dispersión de luz frente a la relación GDP/GTP del medio, se observa que las intensidades relativas de dispersión de luz (que alcanzan valores

máximos absolutos distintos dependiendo de la concentración de magnesio, figura 21A) disminuyen prácticamente a la vez con la hidrólisis de GTP.

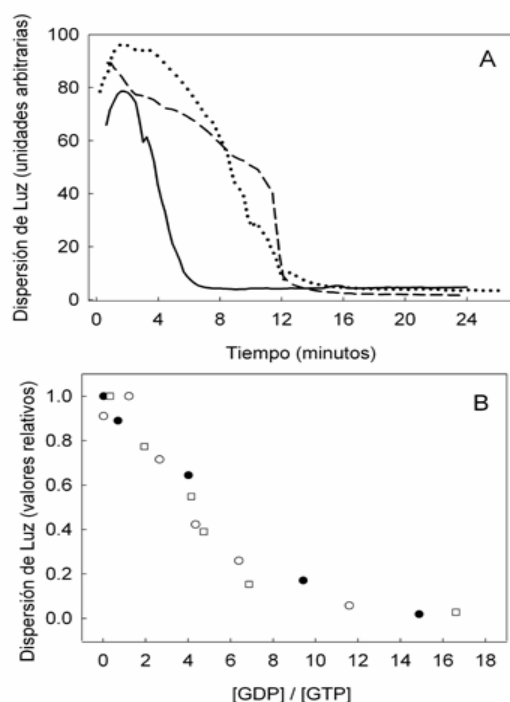


Figura 21: Ensamblaje de FtsZ a distintas concentraciones de Mg²⁺. (A) Ensamblaje de 12.5μM de FtsZ (en tampón MesK, 55°C) seguido mediante dispersión de luz a 90° con 1mM GTP y 3mM Mg²⁺ (línea sólida), 6mM Mg²⁺ (línea discontinua) y 10mM Mg²⁺ (línea punteada). (B) Valor relativo de dispersión de luz frente a la relación de nucleótido ([GDP]/[GTP]) en la solución de polimerización; 3mM Mg²⁺ (○), 6mM Mg²⁺ (●) y 10mM Mg²⁺ (□).

Resultados parecidos se obtuvieron con FtsZ-(His)₆, con la salvedad de que aparentemente los polímeros que se formaban con 10mM Mg²⁺ eran estables durante más de 60 minutos.

La sedimentación de los polímeros formados (Material y Métodos), mostró que estos contenían distintas proporciones de nucleótido no hidrolizado. Así los sedimentos de polímeros de FtsZ ensamblados en tampón con MesK con 5mM GTP y 10mM Mg²⁺, contenían un 67% de GTP y un 33% de GDP (con un 89% de GTP y un 11% de GDP en el sobrenadante); y con 1mM GMPCPP y 6mM Mg²⁺, contenían un 53% de GMPCPP y un 47% de GMPCP (con un 94% GMPCPP y un 6% GMPCP en el sobrenadante). FtsZ, en condiciones estándar (MesK, 55°C, 1mM GTP, 6mM Mg²⁺), formaba polímeros de 120 a 300Å de anchura (figura 22A), mientras que los polímeros formados con GMPCPP y Mg²⁺ (figura 22C) eran bastante más anchos, alcanzando aproximadamente los 800Å. Además, en ambos casos también aparecían polímeros aislados de unos 60Å de anchura tanto rectos como curvados (figura 22B).

Se comprobó que a 80°C la proteína ensamblaba de manera similar a lo observado a 55°C, sin presentarse diferencias significativas (no se muestra).

FtsZ-(His)₆ ensamblaba de forma similar a FtsZ bajo condiciones estándar a 55°C, independientemente del método de purificación empleado para la obtención de proteína (no se muestra), pero cuando se realizaban modificaciones de estas condiciones se observaron diferencias significativas: (i) la formación de tubos helicoidales (figura 22D) cuando el ensamblaje se realizaba en presencia de Ca²⁺ en lugar de Mg²⁺ y cuando el tampón incluía Na⁺ en vez de K⁺, (ii) la proteína puede ensamblar en tampón con Na⁺ sin añadir nucleótido, formando tubos anchos (figura 22G) y (iii) la formación de láminas ordenadas cuando se inducía el ensamblaje a 80°C tanto con Mg²⁺ y nucleótido (GTP o GDP) como sólo con Mg²⁺ (figura 22E).

Todos estos resultados indican que: (i) tanto el fosfato γ del nucleótido como el Mg²⁺ son necesarios para promover el ensamblaje de FtsZ, (ii) la hidrólisis del nucleótido en el polímero produce el desensamblaje y (iii) la cola de 6 histidinas incrementa el ensamblaje, favoreciendo la formación de polímeros helicoidales y laminares en vez de los típicos polímeros filamentosos formados FtsZ. Las estructuras de los distintos polímeros y de los filamentos que forma FtsZ se describen más adelante.

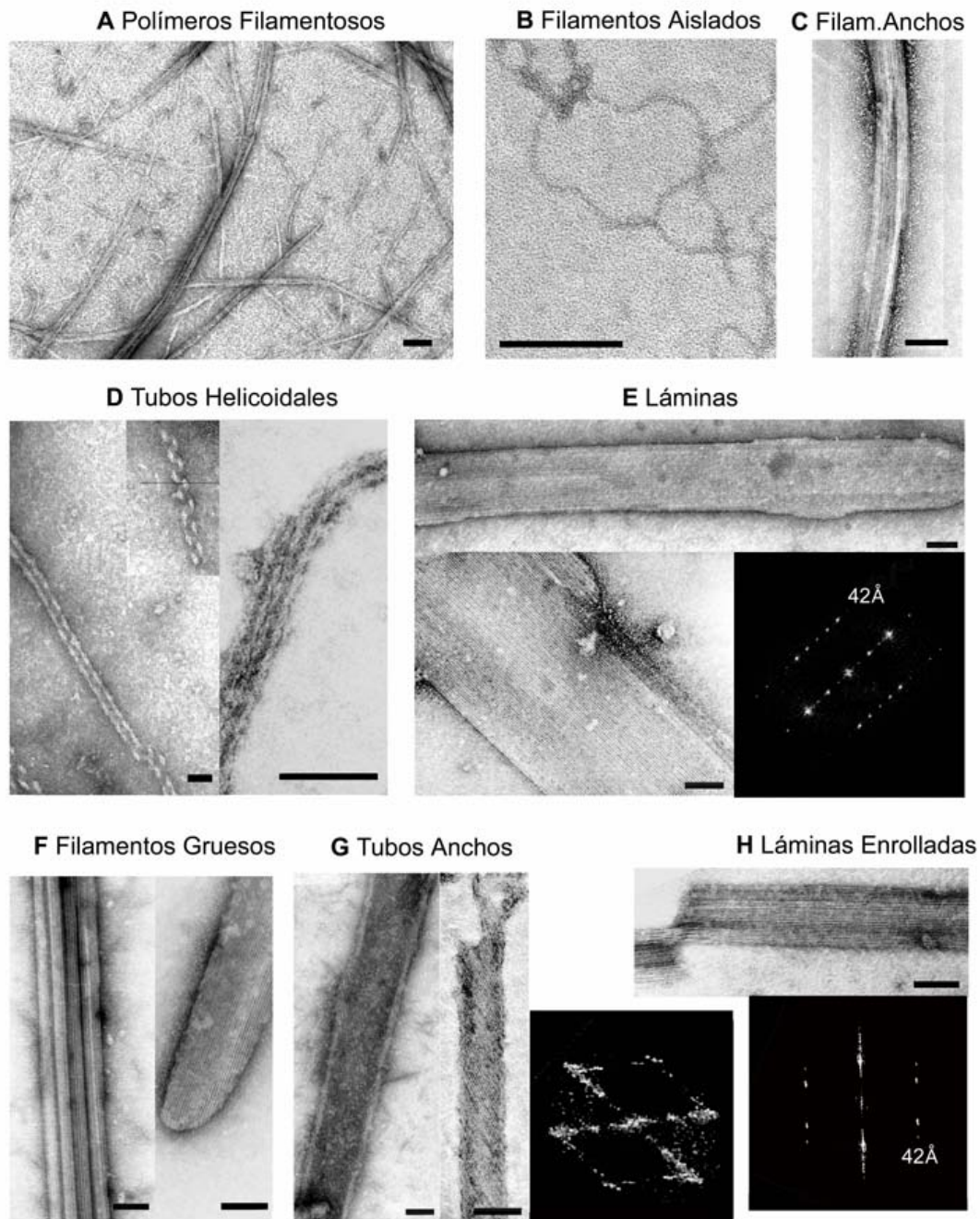


Figura 22: Micrografías electrónicas representativas de los distintos polímeros formados por FtsZMj en tinción negativa. Los difractogramas que se enseñan en E, G y H están al lado de las fotografías de las que se obtienen. Las condiciones en las que se observa la formación de estos polímeros se muestran en la tabla 5 y se describen en el texto. La barra en todas las fotografías corresponde a 100nm.

2.2.- Activación de la GTPasa por el ensamblaje en tampón con K^+ e inhibición por Na^+

La formación de polímeros de FtsZ fue inducida por GTP y se pudo medir hidrólisis significativa del nucleótido debida al ensamblaje por encima de la concentración crítica de proteína (aproximadamente $2\mu M$). En la figura 23, en la que se representan medidas paralelas de la hidrólisis de GTP y del valor máximo de dispersión de luz a distintas concentraciones de proteína, se observa que la proteína no ensamblada por debajo de la concentración crítica hidrolizaba aproximadamente 0.3 GTP por minuto, mientras que la proteína ensamblada llegaba a hidrolizar 6.2 GTP por minuto. Resultados similares se obtuvieron con FtsZ-(His)₆.

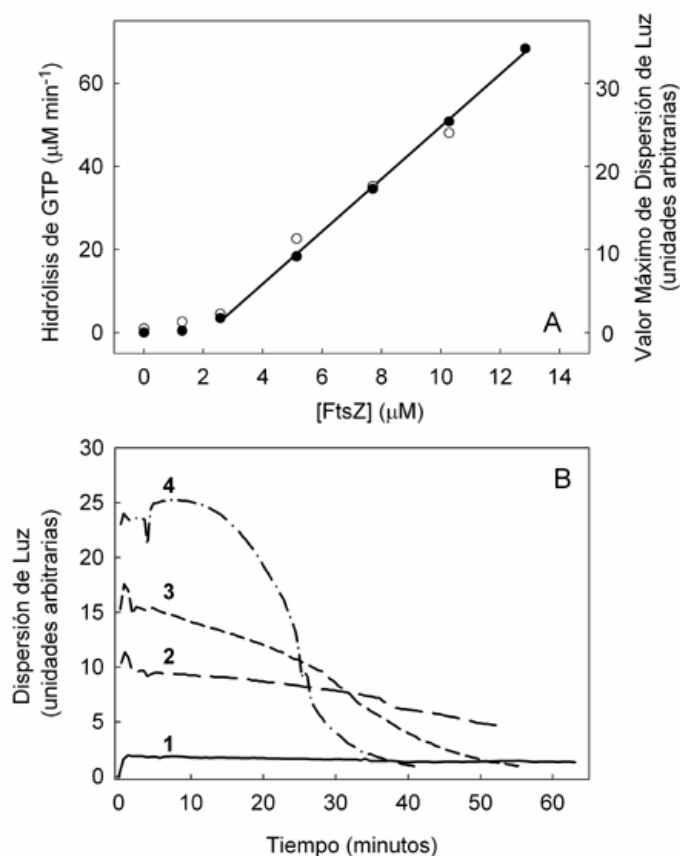


Figura 23: Concentración crítica (A) y curso de tiempo de ensamblaje (B) de FtsZ (en tampón MesK, $55^{\circ}C$). En A, se muestran medidas de actividad GTPasa (●) escala en el eje de ordenadas de la izquierda, y los valores de dispersión de luz (○), escala en el eje de ordenadas de la derecha, ambos medidos a distintas concentraciones de proteína. En B, ensamblaje de FtsZ a lo largo del tiempo a distintas concentraciones de proteína: $2.6\mu M$ (línea 1), $5.1\mu M$ (línea 2), $7.7\mu M$ (línea 3) y $10.3\mu M$ (línea 4).

La hidrólisis de nucleótido se puede desacoplar del ensamblaje mediante el reemplazamiento del K^+ por Na^+ en el tampón de ensamblaje. La figura 24, en la que se representa el valor de dispersión de luz frente al tiempo, muestra el ensamblaje ($12.5\mu M$ de proteína) y el consumo de nucleótido de FtsZMj en tampón de ensamblaje MesNa (con Na^+ en vez de K^+), a $55^\circ C$.

Bajo estas condiciones FtsZ-(His)₆ formaba hélices estables (figura 22D) tanto con GTP y Mg^{2+} (figura 24 línea 1) como con GMPCPP y Mg^{2+} (figura 24 línea 4) o sólo con Mg^{2+} (figura 24 línea 2), pero no con GDP y Mg^{2+} (figura 24 línea 3). Como se ha observado que el GDP es inhibidor del ensamblaje, la inducción del ensamblaje sólo con Mg^{2+} se atribuye al GTP presente en la proteína purificada (la relación de nucleótido unido es de 0.6 ± 0.1 del que el 39% es GTP). Los polímeros ensamblados con GTP contenían un 94% de GTP y un 6% de GDP. Si se añadía un exceso de GDP se producía el desensamblaje rápido de estos polímeros que no hidrolizan nucleótido, con un tiempo medio de desensamblaje de 40 segundos (figura 24A).

FtsZ también ensamblaba formando polímeros estables que no hidrolizaban nucleótido (aunque los valores de dispersión de luz eran mucho menores), y desensamblaba por la adición de GDP en menos de 30 segundos (figura 24B).

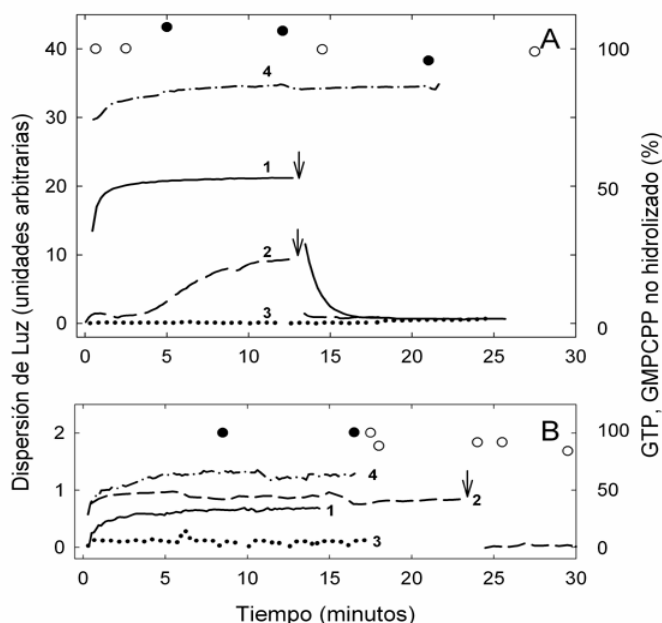


Figura 24: Monitorización del ensamblaje de $12.5\mu M$ de FtsZ-(His)₆ (A) y FtsZ (B) en tampón MesNa, $55^\circ C$, mediante dispersión de luz a 90° con $0.1mM$ GTP y $6mM$ Mg^{2+} (línea 1), $6mM$ Mg^{2+} (línea 2), $1mM$ GTP o $2mM$ GDP o $2mM$ GDP y $6mM$ Mg^{2+} (línea 3) y $0.1mM$ GMPCPP y $6mM$ Mg^{2+} (línea 4). También se representa el % de GTP no hidrolizado, presente en la solución $0.1mM$ GTP y $6mM$ Mg^{2+} (●), o de GMPCPP, presente en la solución $0.1mM$ GMPCPP y $6mM$ Mg^{2+} (○). Las flechas indican la adición de $2mM$ GDP en la solución, dando lugar al rápido desensamblaje de los polímeros. Los símbolos son los mismos en el panel A y B.

La hidrólisis de nucleótido en MesNa se vio disminuída hasta 100 veces respecto a los resultados observados en el tampón de ensamblaje MesK (tabla 4).

Tabla 4: Actividad GTPasa y GMPCPPasa de FtsZMj

Proteína	Condiciones ¹	Velocidad de Hidrólisis de GTP (minuto ⁻¹)
FtsZ	K ⁺	5.9 ± 0.6
	K ⁺ , no Mg ²⁺	0.02 ± 0.01
	Na ⁺	0.01 ± 0.01
1µM FtsZ	K ⁺	0.26 ± 0.07
FtsZ-(His)₆	K ⁺	6.0 ± 0.5
	Na ⁺	0.04 ± 0.01
1µM FtsZ-(His)₆	K ⁺	0.11 ± 0.06
FtsZW319Y-(His)₆	K ⁺	0.02 ± 0.01
FtsZW319Y	K ⁺	0.07 ± 0.02
Proteína	Condiciones ²	Velocidad de Hidrólisis de GMPCPP (minuto ⁻¹)
FtsZ	K ⁺	0.71 ± 0.04
	Na ⁺	0.00 ± 0.01
FtsZ-(His)₆	K ⁺	0.50 ± 0.24
	Na ⁺	0.04 ± 0.02

¹Medidas realizadas por HPLC a partir de soluciones de 12.5µM FtsZ incubadas con 1mM GTP y 6mM Mg²⁺ en tampón MesK (K⁺) o MesNa (Na⁺) a 55°C. Al menos dos determinaciones independientes por medida.

²Medidas realizadas por HPLC a partir de soluciones de 12.5µM FtsZ incubadas con 0.1mM GMPCPP y 6mM Mg²⁺ en tampón MesK (K⁺) o MesNa (Na⁺) a 55°C. También se midió la hidrólisis de FtsZ con 1mM GMPCPP sin observarse diferencias respecto a lo medido con 0.1mM.

2.3.- Inhibición de la GTPasa en el mutante FtsZW319Y-(His)₆

Los resultados obtenidos hasta ahora muestran que el ensamblaje de FtsZ y FtsZ-(His)₆ es dependiente de GTP y Mg²⁺ y los polímeros formados hidrolizan el nucleótido induciendo la despolimerización. Como se ha dicho en el sección 1 de esta apartado de reultados, la mutación W319Y se empleó para investigar la influencia del único triptofano de la proteína en la interfase de activación de GTPasa.

El ensamblaje se indujo tanto con GTP y Mg²⁺ como con sólo Mg²⁺, pero no con GDP y Mg²⁺ (independientemente del método de purificación empleado para la obtención de la proteína) (figura 25, líneas 1, 2 y 3 respectivamente), siendo estos resultados similares a los obtenidos anteriormente con FtsZ-(His)₆

en tampón con Na^+ (figura 24A), excepto el hecho de que la adición de GDP no desencadenó el desensamblaje de los polímeros formados por FtsZW319Y-(His)₆. El ensamblaje sólo con Mg^{2+} se puede explicar por el GTP residual unido a la proteína purificada (el nucleótido unido a la proteína tras la purificación es de 0.5 ± 0.1 del que un 39% es GTP).

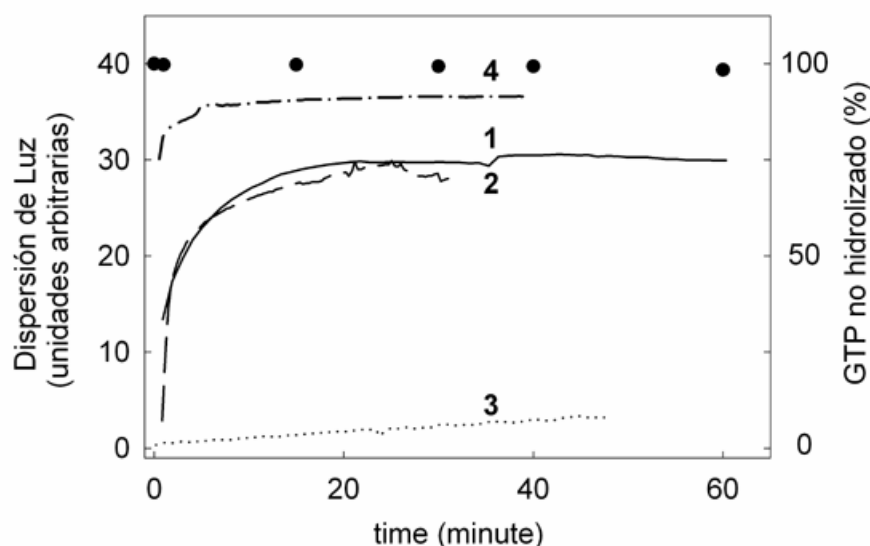


Figura 25: Monitorización del ensamblaje de $12.5\mu\text{M}$ de FtsZW319Y-(His)₆ en tampón MesK, 55°C , con 1mM GTP y 6mM Mg^{2+} (línea 1), 6mM Mg^{2+} (línea 2), 1mM GTP o 2mM GDP o 2mM GDP y 6mM Mg^{2+} (línea 3) y 0.1mM GMPCPP y 6mM Mg^{2+} (línea 4). También se muestran medidas de nucleótido no hidrolizado en la solución con 1mM GTP y 6mM Mg^{2+} (●).

Las principales estructuras que se observaron bajo estas condiciones de ensamblaje fueron polímeros bidimensionales grandes y ordenados (figura 22E), aunque a 80°C también se observó la formación de polímeros laminares enrollados (figura 22H), en ausencia de nucleótido y/o de Mg^{2+} , y de filamentos gruesos (figura 22F), formados en presencia de Mg^{2+} y GTP o GDP.

Como la polimerización de FtsZW319Y sólo se observó a 80°C (se formaron polímeros gruesos, figura 22F), se puede asegurar que la polimerización en el caso de FtsZW319Y-(His)₆ se ve favorecida por la presencia de la cola de 6 histidinas.

La actividad hidrolítica de FtsZW319Y-(His)₆ y de FtsZW319Y se vio disminuida al menos 2 veces respecto a la medida para FtsZ-(His)₆ y FtsZ en tampón Na^+ , y entre 100 y 300 veces respectivamente, respecto a las medidas

para estas proteínas en tampón con K^+ (tabla 4). Es decir, esta mutación inhibe la actividad GTPasa durante el ensamblaje y favorece la formación de polímeros estables.

3.- ESTRUCTURA DE LOS POLÍMEROS DE FtsZ

3.1.- Estructuras polimórficas de ensamblaje de FtsZ

Como muestran los resultados obtenidos en los ensayos de ensamblaje, la estructura de los polímeros que se forman es diferente en función de las condiciones empleadas (resumido en la tabla 5). La figura 22 muestra micrografías representativas de cada tipo de polímero. Todos estos polímeros se observaron en gran cantidad, ensamblan en condiciones bioquímicamente controladas y de forma reversible.

De forma abreviada, FtsZ y FtsZ-(His)₆ bajo condiciones estándar (tampón de ensamblaje MesK con GTP y Mg^{2+} a 55°C), forma polímeros filamentosos y filamentos aislados rectos (22A) y curvados (22B). Los filamentos aislados tienen unos 60Å de grosor y son similares a los formados durante el ensamblaje de FtsZ_{Ec} (Rivas *et al.*, 2000; Andreu *et al.*, 2002). También pueden formar filamentos anchos (22C) en presencia de GMPCPP. Además FtsZ-(His)₆ puede formar tubos helicoidales (22D) en presencia de Ca^{2+} y tubos grandes (22G) en presencia de Na^+ . Los tubos helicoidales tienen un diámetro de unos 320Å, y presentan cierto grado de desenrollamiento en algunas zonas lo que revelaba su forma helicoidal. Son similares a los estudiados anteriormente con Ca^{2+} y GMPCPP (Löwe y Amos, 2000). FtsZW319Y-(His)₆ ensambla formando polímeros laminares (22E) y tubos helicoidales (22D) bajo las condiciones estándar de ensamblaje.

A partir de las imágenes de láminas (obtenidas con FtsZW319Y-(His)₆ en condiciones estándar), se obtuvo un patrón de difracción (figura 22E y 26B) con el que se comprobó que el espaciado axial entre las subunidades de FtsZ en el polímero (celda unidad de $\sim 42\text{\AA}$ por $\sim 140\text{\AA}$) es similar al existente entre α y β tubulina ($\sim 40\text{\AA}$) en las láminas de zinc (Nogales *et al.*, 1998a; Löwe *et al.*, 2001) y en los microtúbulos (Nogales *et al.*, 1999). Estas láminas son de estructura

muy parecida a las obtenidas anteriormente con Ca^{2+} , donde el espaciado entre subunidades de FtsZ en el polímero era de $\sim 43\text{\AA}$ (Löwe y Amos, 1999).

Tabla 5: Estructura de los polímeros formados por FtsZMj

Proteína	Condiciones ¹	Estructura del Polímero Observado ²
FtsZ	Estándar	Polímeros filamentosos (A) y Filamentos aislados (B).
	GMPCPP	Filamentos anchos (C) y filamentos A y B
	GMPCPP, Na^+	Filamentos aislados (B)
	Ca^{2+}	Polímeros filamentosos (A)
FtsZ-(His)₆	Estándar	Polímeros filamentosos (A) y Filamentos aislados (B)
	Na^+	Tubos helicoidales (D) y Polímeros filamentosos (A)
	Na^+ sin GTP	Tubos grandes (G)
	GMPCPP	Filamentos anchos (C) y Filamentos aislados (B)
	GMPCPP, Na^+	Tubos helicoidales (D) y Polímeros filamentosos (A)
	Ca^{2+}	Tubos helicoidales (D)
	80°C (GTP, GDP o sin nucleótido)	Polímeros laminares (E)
	80°C (sin Mg^{2+})	Polímeros filamentosos (A)
FtsZW319Y-(His)₆	Estándar	Polímeros laminares (E) y Tubos helicoidales (D)
	Sin GTP	Polímeros laminares (E)
	GMPCPP	Tubos helicoidales (D) y Polímeros laminares (E)
	80°C (GTP o GDP)	Filamentos gruesos (F)
	80°C (sin nucleótido y Mg^{2+})	Láminas enrolladas (H)
	80°C (GTP, GDP o GMPCPP), a 55°C no se induce ensambl.	Filamentos gruesos (F)
FtsZW319Y	80°C (GTP, GDP o GMPCPP), a 55°C no se induce ensambl.	Filamentos gruesos (F)

¹En el cuadro sólo aparecen listadas las condiciones o sustituciones que dan lugar a la formación de polímeros diferentes de forma significativa. La condición Estándar de ensamblaje es 12.5 μM FtsZMj en MesK, 6mM Mg^{2+} , 1mM GTP, a 55°C. Na^+ indica que el tampón se prepara con sodio en vez de potasio. Ca^{2+} indica que se emplea calcio en vez de magnesio en el ensamblaje.

²Cada tipo de polímero está identificado con una letra entre paréntesis que se corresponde con las micrografías mostradas en la figura 22.

Estos resultados sugieren que los distintos polímeros observados deben estar constituidos por una estructura básica de tipo filamento, y mediante distintos contactos laterales se forman polímeros anchos, hélices, láminas o tubos.

El hecho de que FtsZ sólo forme estructuras filamentosas y no estructuras más ordenadas como las hélices o láminas formadas por FtsZ-(His)₆ o

FtsZW319Y-(His)₆ sugiere que la cristalización bidimensional está facilitada por la presencia de la cola de histidinas que favorece la formación de interacciones laterales más ordenadas, mientras que las interacciones laterales en FtsZ se producen de una manera más desordenada. Aunque estas estructuras más ordenadas no son probablemente el tipo de estructuras que se forman *in vivo*, son bastante útiles para estudiar la estructura del filamento formado por FtsZ.

3.2.- Estructura del doble filamento de FtsZ

Como se ha comentado en el apartado anterior, a partir de las láminas bidimensionales obtenidas con FtsZW319Y-(His)₆ (figura 26A) se obtuvo un patrón de difracción (figura 26B) que se analizó para determinar la disposición de las subunidades de FtsZ en el polímero y los contactos establecidos entre éstas (figura 26C).

El análisis de las imágenes seleccionadas (figura 26A), realizado por el Dr. Jaime Martín-Benito y el Dr. José María Valpuesta (CNB-CSIC), reveló que éstas presentaban características similares a las láminas estudiadas previamente por Löwe y Amos (1999). El procesamiento de estas imágenes empleando una simetría p222₁ (la misma que la obtenida en las láminas de Ca²⁺, Löwe y Amos, 1999) reveló una disposición idéntica de FtsZ en el polímero, es decir, filamentos antiparalelos formados por 2 protofilamentos paralelos, con delgadas conexiones entre filamentos (indicado por la flecha en la figura 26C).

La visualización de los polímeros formados por FtsZ mostró que además de los polímeros filamentosos (figura 22A) también forma filamentos aislados (figura 22A y B), pero no se podía apreciar si la estructura de estos filamentos era simple o estaban formados por 2 protofilamentos como se ha observado en las láminas. El análisis de estos filamentos aislados (figura 26D) mediante el promediado de varios cientos de pequeñas áreas, permitió generar una imagen (figura 26E), en la que también se pudo apreciar la naturaleza del filamento de FtsZ, formado por dos protofilamentos paralelos. El espaciado longitudinal en las estructuras obtenidas a partir de las láminas (figura 26C) y de los filamentos (figura 26E) era prácticamente idéntico (43Å y 44Å respectivamente), mientras

que parecía existir una cierta discrepancia en el grosor de los filamentos siendo de 57Å en el primer caso y de 88Å en el segundo. Esta diferencia se puede explicar por el hecho de que los filamentos representados en las láminas están inclinados (Löwe y Amos, 1999) y por lo tanto la proyección es menor.

Finalmente el estudio de los filamentos formados por FtsZEc (figura 26F) mostró que son muy parecidos a los filamentos aislados formados por FtsZMj y el promediado de pequeñas áreas de forma similar a como se ha descrito anteriormente dio lugar a una imagen prácticamente idéntica de doble filamento a la observada con FtsZMj.

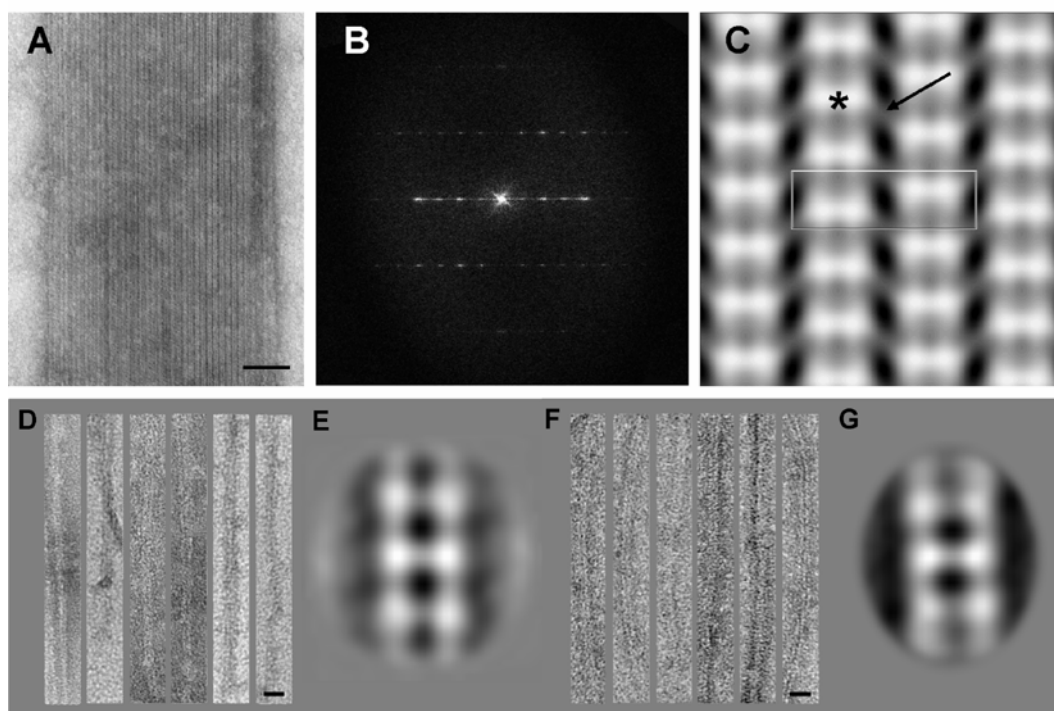


Figura 26: Procesado de imagen de las láminas formadas por FtsZW319Y-(His)₆ y de los filamentos formados por FtsZMj y FtsZEc. En (A) se muestra una micrografía de una lámina de FtsZW319Y-(His)₆, en (B) el patrón de difracción obtenido a partir de esa lámina y en (C) el mapa de proyección generado a partir del patrón de difracción empleando una simetría p222₁, donde se indica la celda unidad del cristal (rectángulo) formada por 4 monómeros y las interacciones que se generan entre éstos dentro del filamento (asterisco) y con otros filamentos (flecha). En (D) se muestra una galería de filamentos aislados obtenidos con FtsZMj junto con la imagen promediada (E) después de procesar 528 áreas extraídas de filamentos individuales. En (F) se muestra una galería de filamentos aislados obtenidos con FtsZEc junto con la imagen promediada (G) a partir de 268 áreas de dichos filamentos. La barra en (A) representa 1000Å, y en (E) y (F) 100Å.

3.3.- Polímeros formados por las quimeras FtsZ/tubulina

Los filamentos formados por FtsZ no parecen asociar lateralmente de la misma manera que lo hace tubulina para formar los microtúbulos, aunque esto no resulta especialmente sorprendente teniendo en cuenta que las mayores diferencias entre tubulina y FtsZ se dan en las regiones laterales de la molécula (Nogales *et al.*, 1998b).

Es por lo tanto interesante determinar que polímeros forman las quimeras FtsZ/tubulina bajo las condiciones estándar de ensamblaje de FtsZ (tampón MesK a 55°C), para comprobar si las secuencias insertadas en la estructura de FtsZ, especialmente las implicadas en contactos laterales en tubulina (los bucles N y M), son capaces de mimetizar alguna de las características del ensamblaje en tubulina. En este punto es destacable el hecho de que estas quimeras presentaban cierta tendencia a precipitar en tampón MesK a 4°C, mientras que a 55°C este problema era reducido considerablemente. Una de las causas podría ser la proximidad del punto isoeléctrico de estas proteínas (entre 5.5 y 6.1) y el pH del tampón de ensamblaje (6.5), aunque el empleo de tampones de pH superior (hasta 7.0) no produjo ninguna mejoría en el comportamiento de las quimeras.

La visualización de muestras tomadas durante las reacciones de ensamblaje de las distintas quimeras FtsZMj/tubulina mostraron que FtsZ/T7-(His)₆ forma estructuras tubulares (figura 27B), FtsZ/M-(His)₆, FtsZ/T7M-(His)₆ y FtsZ/NT7M-(His)₆ forman filamentos curvados que dan lugar a distintos polímeros retorcidos (figura 27C, D y F respectivamente), y FtsZ/T7M-(His)₆ también forma polímeros laminares (figura 27E). Todas estas estructuras son significativamente distintas a las formadas por FtsZ bajo las mismas condiciones (figura 27A), por lo que se puede asegurar que estos resultados son compatibles con distorsiones en los contactos laterales entre monómeros de FtsZ en el doble filamento, producidas por las inserciones de los bucles N y M de tubulina.

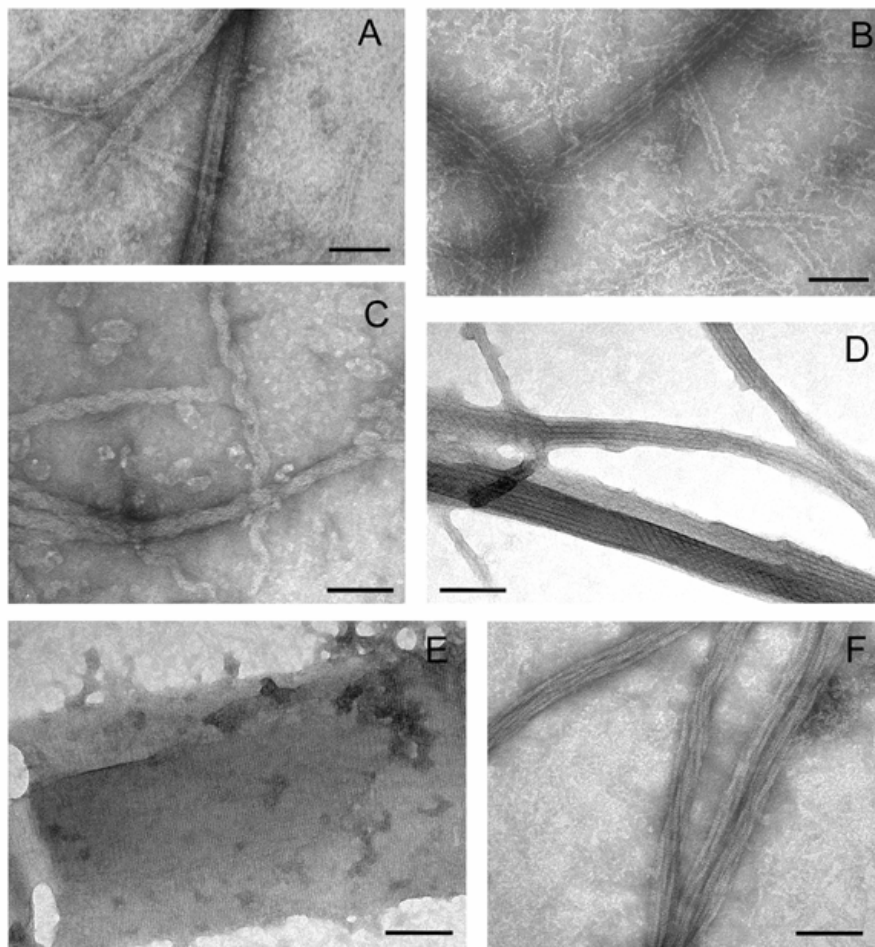


Figura 27: Micrografías de los polímeros formados por las quimeras FtsZMj/βTubMm. Los polímeros se formaron en tampón MesK a 55°C con 1mM GTP y 6mM Mg²⁺. **(A)** FtsZ-(His)₆, **(B)** FtsZ/T7-(His)₆, **(C)** FtsZ/M-(His)₆, **(D y E)** FtsZ/T7M-(His)₆ y **(F)** FtsZ/NT7M-(His)₆. Las barras corresponden a 100nm.

4.- ESTRUCTURAS CRISTALOGRÁFICAS DE FtsZMj Y SU PROTOFILAMENTO

Las estructuras tridimensionales de FtsZMj con GDP unido (Löwe y Amos, 1998) y del heterodímero α/β tubulina (Nogales *et al.*, 1998a; Löwe *et al.*, 2001) muestran dos proteínas estrechamente relacionadas. Ambas están formadas por dos dominios globulares; el dominio N-terminal que es el dominio de unión del nucleótido y el dominio C-terminal. En este segundo dominio tubulina presenta dos hélices α terminales, las cuales quedarían expuestas hacia la parte externa de los microtúbulos y se piensa, que constituyen el principal punto de interacción con proteínas motoras y otras proteínas que se

unen a la parte externa de los microtúbulos (Nogales *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2002). FtsZMj presenta dos cortos segmentos β , en lugar de estas hélices (figuras 13 y 17).

La estructura de tubulina fue resuelta con la proteína polimerizada en láminas planas inducidas por zinc, por lo que da información de los contactos longitudinales, pero no de los laterales (los formados en estas láminas son distintos a los que se producen en los microtúbulos). Los protofilamentos de tubulina están formados por la interacción del dominio C-terminal de una subunidad con el dominio de unión de GTP (N-terminal) de otra, generando un polímero de una dimensión y completamente recto. En este punto hay que destacar que la actividad GTPasa de tubulina se activa cuando polimeriza debido a la inserción de un residuo del bucle T7 de α -tubulina (Glu254) en el bolsillo de unión de nucleótido de la subunidad anterior (Nogales *et al.*, 1998a). El residuo equivalente en β -tubulina es una lisina, que no permite la catálisis y por lo tanto la α -tubulina presenta un GTP no hidrolizable en su sitio de unión de nucleótido (denominado sitio N).

Debido a la estrecha relación estructural entre FtsZ y tubulina y a la existencia de evidencias como: i) FtsZ polimeriza con una repetición longitudinal de subunidades muy parecida (40Å en tubulina, 42-43Å en FtsZ) a la que se observa en los protofilamentos de tubulina (Erickson *et al.*, 1996; Oliva *et al.*, 2003); ii) el modelado de un protofilamento de FtsZ con la estructura de tubulina encaja muy bien en un mapa de baja resolución de láminas de FtsZ inducidas por calcio (Löwe y Amos, 1999); iii) un mutante en el residuo correspondiente al Glu254 de tubulina (Asp212 en FtsZ_{Ec} o Asp238 en FtsZ_{Mj}) elimina la actividad GTPasa (Scheffers *et al.*, 2001) y iv) el inhibidor de la respuesta SOS de las células, SulA, se une al bucle T7 evitando la polimerización de FtsZ (Cordell *et al.*, 2003), siempre se ha asumido que FtsZ formaría protofilamentos similares a aquellos formados por tubulina. Pero también existen importantes diferencias en la cinética de la actividad GTPasa de estas dos proteínas que podrían contradecir esta teoría. Tubulina hidroliza nucleótido muy rápidamente nada más producirse la polimerización, pero el intercambio del nucleótido es prácticamente

nulo (la estructura del protofilamento de tubulina muestra que el nucleótido está en un sitio ocluido y no expuesto al solvente, (Nogales *et al.*, 1998a; Löwe *et al.*, 2001)), obteniéndose como resultado un polímero con GDP unido con unas cuantas de subunidades en los extremos que presentan GTP unido. En el caso de FtsZ el paso limitante en su actividad GTPasa no parece ser el intercambio sino la hidrólisis del nucleótido, obteniéndose un polímero que presenta mayoritariamente GTP unido (Mingorance *et al.*, 2001; Huecas y Andreu, 2003; Romberg y Mitchison, 2004).

4.1.- Estructura FtsZ-W319Y

Para investigar el cambio conformacional durante el ciclo de actividad GTPasa se cristalizó FtsZW319Y, proteína que tras su purificación tiene mayoritariamente GTP unido (98%) y que tiene inhibida su actividad GTPasa (resultados Ensamblaje y Actividad GTPasa).

La resolución de esta estructura se realizó mediante reemplazamiento molecular, por el Dr. Jan Löwe (LMB-MRC), empleando la estructura de la proteína unida a GDP como modelo de búsqueda (código PDB 1FSZ). Debido a distorsiones de la red y al desordenamiento de 6 de las 9 subunidades de la unidad asimétrica (grupo espacial P1), sólo se consiguió llegar a una resolución de 3.0Å.

Existen pequeñas diferencias estructurales entre α y β tubulina localizadas principalmente en el bucle T2 (que ocupa el lugar del *switch I* en las GTPasas clásicas) y en la hélice H3' (presente en β tubulina y desenrollada en α), que podría reflejar diferencias en la proteína en función del nucleótido unido (Löwe *et al.*, 2001). Con la superposición de la estructura FtsZW319Y-GTP con FtsZMj-GDP (Löwe y Amos, 1998) se observó que existían muy pocas diferencias entre ellas tanto si consideráramos cambios locales (en la cadena de aminoácidos) como globales (en dominios) (figura 28). Sólo se observaron pequeñas diferencias en el bucle T2 y en el bucle que conecta las hélices H6 y H7, pero estos bucles formaban parte de los contactos en el cristal por lo que ésta debía de ser la causa de las diferencias.

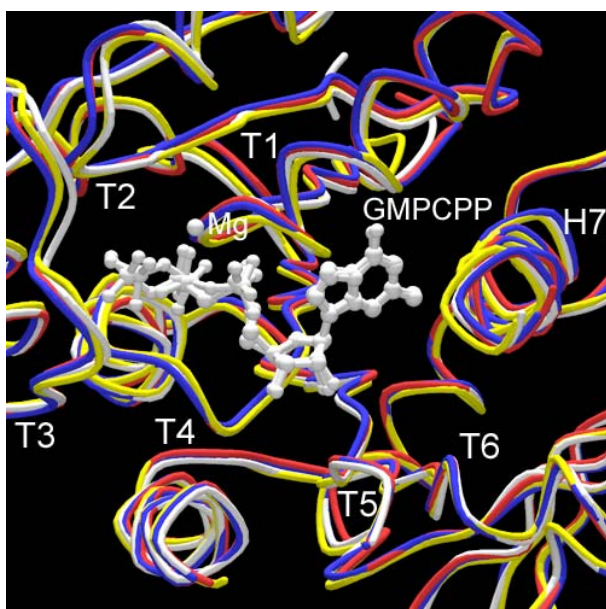


Figura 28: Superposición del sitio de unión de nucleótido de las distintas estructuras de FtsZMj. Monómero FtsZMj-GDP a una resolución de 2.8Å y grupo espacial I2,3, Löwe, J. y Amos, L.A., 1998 (rojo). Monómero FtsZMj-GMPCPP a una resolución de 2.5Å (por inmersión del cristal anterior) (azul). Monómero FtsZMj-W319Y-GTP a una resolución de 3.0Å y grupo espacial P1 (blanco). Monómero de protofilamento Apo-FtsZMj a una resolución de 2.7Å y grupo espacial P2₁ (amarillo), Oliva, M.A. *et al*, 2004. Aparecen señalados tanto el nucleótido (GMPCPP) en su bolsillo, como el ión Mg^{2+} presente en el sitio de unión de nucleótido y los 6 bucles implicados en el reconocimiento y unión del nucleótido (T1-T6).

Este resultado no sería el esperado considerando otros resultados publicados en los que se describen cambios en la posición del bucle T3 de FtsZ (Díaz. *et al.*, 2001) o en la estructura de los filamentos formados (rectos o curvados) en función de si presenta unido GTP o GDP (Lu *et al.*, 2000; Huecas y Andreu, 2004) (ver Discusión).

4.2.- Estructura del protofilamento de Apo-FtsZMj

La estructura de la apo-proteína debe estar estrechamente relacionada con la de la proteína con el nucleótido trifosfato unido, ya que mantiene la capacidad de polimerización (Huecas y Andreu, 2004). Además FtsZMj renaturaliza sin la ayuda de chaperonas moleculares y otros cofactores y mantiene su estructura en ausencia de nucleótido (resultados; Desplegamiento Reversible de FtsZ). Por ello se planteó la obtención de la estructura de la apo-proteína, de modo que posteriormente, mediante inmersión de los cristales en soluciones con GTP o GDP pudiéramos determinar las diferencias en la conformación de la proteína en función del nucleótido que tenga unido.

La proteína libre de nucleótido (Material y Métodos), se cristalizó sin añadir nucleótido o Mg^{2+} , obteniéndose cristales que difractaban bien en el

grupo espacial P2₁. Como en el caso anterior, la estructura se resolvió, por el Dr Jan Löwe (MRC-LMB), mediante reemplazamiento molecular empleando la estructura de la proteína unida a GDP como modelo de búsqueda (código PDB 1FSZ).

Apo-FtsZ-(His)₆ cristalizó como un protofilamento semicontínuo (figura 29) muy parecido en orientación y estructura al de tubulina (Löwe *et al.*, 2001), y similar al modelo de protofilamento obtenido a partir de láminas de Ca²⁺ de FtsZMj por microscopía electrónica (Löwe y Amos, 1999). El protofilamento en el cristal es semicontínuo porque el espaciamiento entre subunidades alternaba entre 43.2Å y 46.4Å (esta última es una distancia demasiado larga para que exista una interfase proteína-proteína propiamente dicha, generándose un pequeño hueco). Esta ruptura en el protofilamento es necesaria para la cristalización porque el dímero formado con una interfase de 43Å no es completamente recto (como ocurre en el caso del heterodímero de tubulina, figura 30 y 31C), forzando cualquier contacto siguiente a ser roto a causa de un ángulo de aproximadamente 10°. El alineamiento de esta estructura con la de tubulina, mostró que el protofilamento tendía a curvarse hacia la cara interna del microtúbulo (figura 30B), mientras que tubulina se curva hacia la cara externa cuando tiene unido GDP (Nogales *et al.*, 2003), aunque de todas formas tampoco se sabe a que lado se curvan los filamentos de FtsZ cuando están unidos a GDP.

La interfase de 43Å es más estrecha (figura 31A) y probablemente represente mejor la interacción entre subunidades en el protofilamento, ya que se aproxima mucho al espaciado de 42-43Å visto en estudios anteriores (Erickson *et al.*, 1996; Löwe y Amos, 1999; Oliva *et al.*, 2003). Esta distancia es significativamente mayor que la observada para tubulina (figura 31B y C) tanto en microtúbulos como en láminas de zinc, aunque es similar al espaciado observado cuando se ensambla tubulina con GMPCPP en vez de con GTP (Hyman *et al.*, 1995).

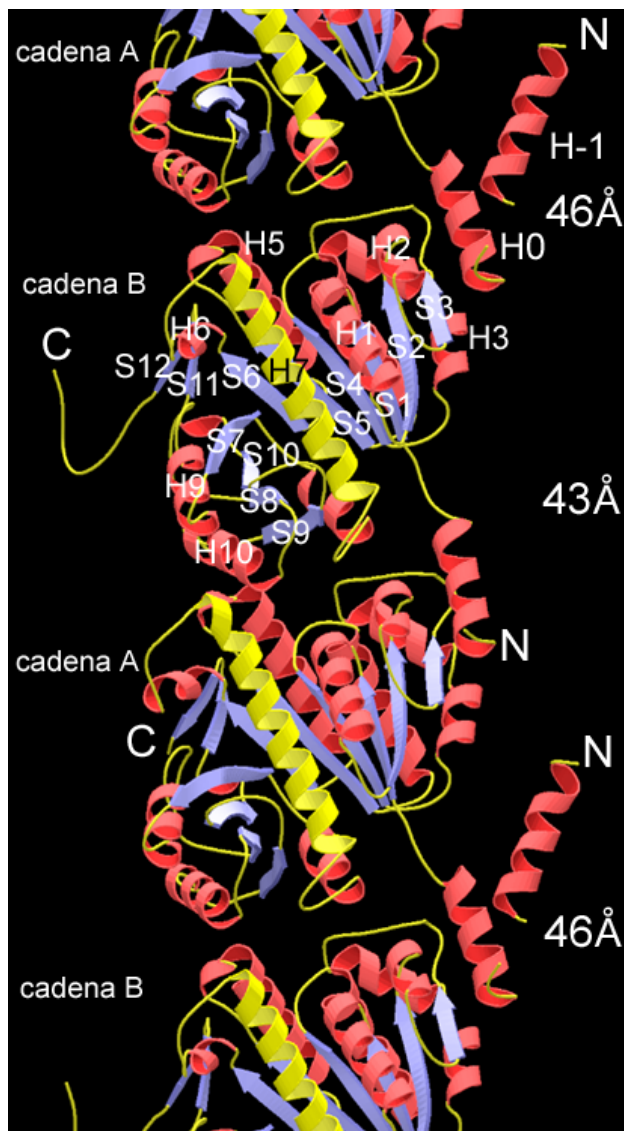
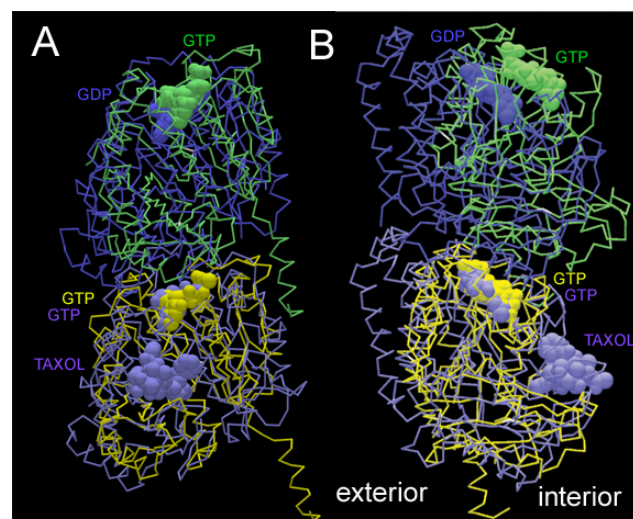


Figura 29: Diagrama de cintas de la estructura cristalográfica de apo-FtsZMj. Se han señalado las cadenas A y B de la estructura así como los 2 espaciados existentes entre éstas, de 43Å y 46Å. En la cadena B (central) se han marcado las hélices α y los segmentos β , según lo descrito (Löwe y Amos, 1998). También se destacan los dominios carboxilo terminal (C) y amino terminal (N) de la proteína y las hélices H0 (extremo amino terminal), que cambia de posición respecto a la estructura del monómero, H-1 (ordenamiento en el extremo amino terminal que se observa por primera vez y sólo en la cadenas A), y la H7 (hélice en amarillo que separa los 2 dominios de la proteína).

Figura 30: Superposición del dímero FtsZ (verde y amarillo) y el de tubulina (azul y violeta). Superponiendo las subunidades inferiores se produce una rotación de unos 10° de la subunidad superior de FtsZ (A) que tiende hacia la cara interna de los microtúbulos (B).



En el cristal aparecían protofilamentos sencillos, por lo que no se pudo determinar que tipos de interacciones laterales tienen lugar para formar estructuras de mayor tamaño.

Se vio que el dímero del protofilamento de FtsZMj presenta 4 regiones que interaccionan, tanto en la subunidad superior como en la inferior (figura 29 y 31). La subunidad superior (cadena B) emplea H0, T7, S9 y H10 en la interacción, mientras que la subunidad inferior (cadena A) emplea principalmente los bucles T2, T3, el existente entre H6 y H7 y T5 para la interacción. A parte de la hélice H0, todos los contactos de la subunidad superior residen en el dominio C-terminal, mientras que los contactos en los que interviene la subunidad inferior provienen del dominio N-terminal de la proteína. En la tabla 6 se resumen cuáles son los contactos longitudinales en el filamento y qué aminoácidos intervienen.

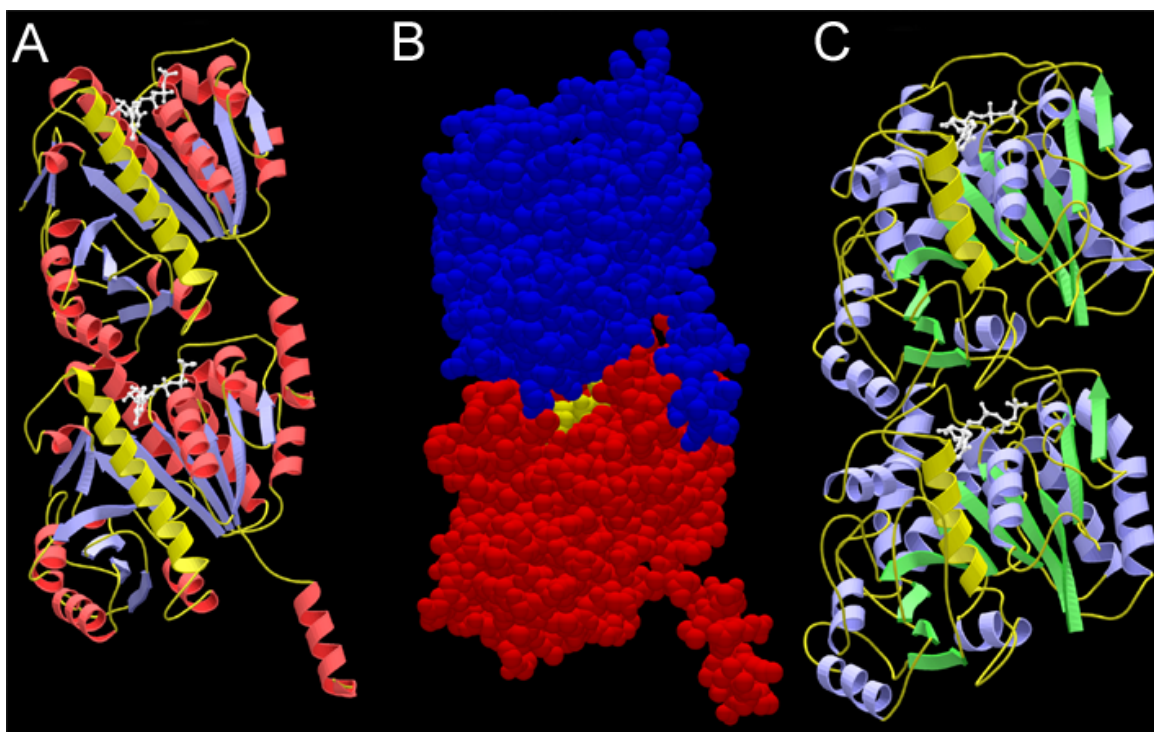


Figura 31: Dímeros de FtsZ y tubulina: accesibilidad del nucleótido. Dímero de FtsZMj del protofilamento (espaciado 43Å) donde se destaca el nucleótido (GTP) y la hélice H7 que conecta los dominios N y C terminal de la proteína (A), y la accesibilidad del nucleótido (amarillo) debido a la presencia de un canal abierto de 8x9Å, que permite conectar el sitio activo con el solvente (B). (C) Dímero de tubulina obtenido a partir de láminas de zinc, en el que se observa una disposición de los monómeros como la del dímero de FtsZ.

Tabla 6: Contactos longitudinales en el protofilamento

Subunidad Superior			Subunidad Inferior	
Contacto	Dominio	Residuo	Dominio	Residuo
1	C	H10 298-305 (E298, R301, E302, 305)	N	Bucle H6/H7 204-209 (L204, K205, K209)
2	C	Bucle H10/S9 313-314 (P313, N314)	N	Bucle T5 164-167 (bbM164, G166, bK167)
3	C	Bucle T7 232-235 (bbl232, N233, D235)	N	H2 72-78 (D72, Q74, R78)
4	C	H8 235-238 (D235, A237, D238)	N	Bucle T3 95-98 (L95, G98)
5	C	H0 25-36 (E25, D26, L29, Y32, L33, T36)	N	H2 73-77 (A73, Q74, L76, I77) S3 83-89 (K83, K84, L86, K89) Bucle T3 95-98 (R93, L95)

Además se puede destacar que en esta nueva estructura la hélice H0 cambia de posición respecto a la estructura previa de la forma monomérica, formando parte integral de los contactos en el filamento. También existe una densidad débil para los residuos 1-21 presente en la estructura dimérica, que forman una hélice que se ha denominado H-1.

La superposición de la estructura de Apo-FtsZMj con la estructura de la proteína unida a GDP puso de relieve muy pocas diferencias entre ambas estructuras, al igual que lo observado entre GTP-FtsZ y GDP-FtsZ (apartado anterior).

Seguidamente estos cristales se sumergieron en distintas soluciones que contenían GTP, GTP y Mg^{2+} y GDP. Los cristales en la solución GTP permitieron inferir para obtener la estructura del sitio activo de la de la proteína (figura 32), mientras que los sumergidos en las soluciones que contenían GDP dejaban de difractar y se disolvían. La estructura del sitio activo muestra la presencia de 2 residuos clave en el bucle T7 de la subunidad superior (en rojo en la figura) que complementan el sitio de unión de nucleótido de dominio N terminal de la subunidad inferior (en blanco en la figura) para formar el sitio activo. El Asp 235 y el Asp238 (Asp 251 y Glu 254 en α -tubulina) están posicionados a una distancia adecuada (2.8Å y 3.5Å respectivamente) para la formación de un

punto de hidrógeno con la molécula de agua 105, que es la molécula de agua atacante para la hidrólisis del nucleótido. El fosfato γ está más polarizado en presencia del ión magnesio que a su vez está acomplejado con Gln75, varias moléculas de agua y los fosfatos γ y β . Así el dominio C terminal actúa como el activador de la actividad GTPasa (tal como se predijo por homología con tubulina), aunque el bucle T7 no se introduce dentro del sitio activo como se observaba en tubulina (Löwe *et al.*, 2001). El Trp319 está localizado sobre la base del nucleótido, pero en esta estructura está demasiado lejos para una interacción directa con el nucleótido (unos 8.5Å desde el indol del Trp hasta la purina del nucleótido), que pudiese explicar la inhibición de la actividad GTPasa en este mutante.

En la tabla 7 se muestran los datos cristalográficos de estas estructuras.

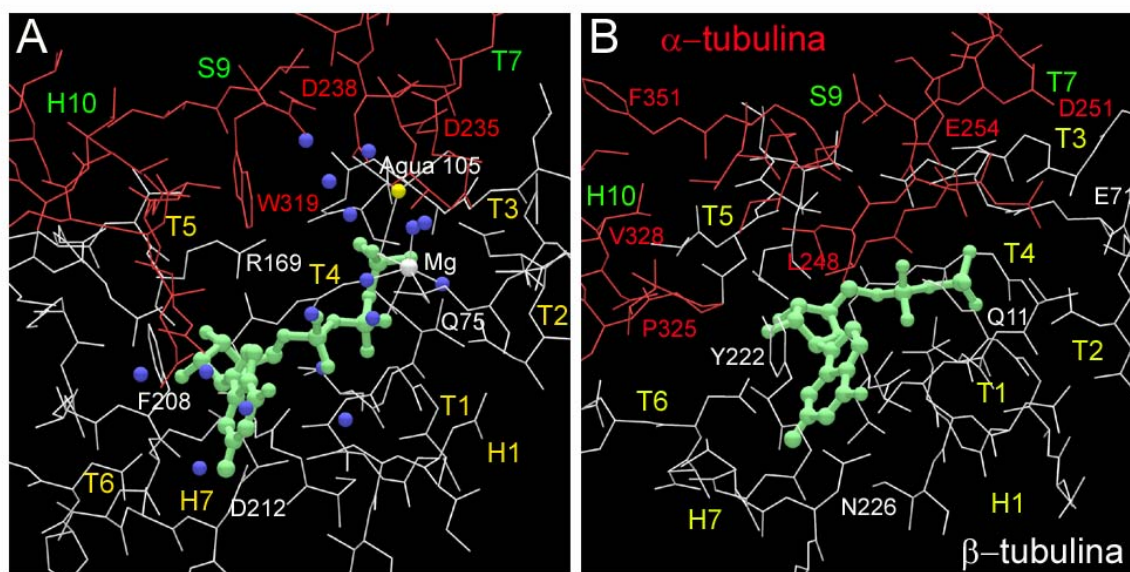


Figura 32: Detalle del sitio activo de FtsZMj (A) comparado con el de α -tubulina (B). El sitio GTPasa de la subunidad inferior se completa con 2 asparticos (Asp235 y Asp238) del bucle T7 de la subunidad superior (D251 y E254 en tubulina), que polarizan la molécula de agua atacante (105). A parte de estos residuos el segmento S9 y la hélice H10 del dominio carboxilo terminal de la subunidad superior también intervienen en los contactos en el protofilamento.

Tabla 7: Datos cristalográficos y estadística de los datos de rayos X

	FtsZMj W319Y, GTP	Apo-FtsZMj, vacía	Apo-FtsZMj, GTP	Apo-FtsZMj, GTP/Mg ²⁺
RECOGIDA DE DATOS				
Grupo Espacial	P1	P2 ₁	P2 ₁	P2 ₁
Dimensiones de la Celda				
Unidad				
<i>a</i> (Å)	114.0	70.1	70.3	70.4
<i>b</i> (Å)	114.3	53.9	55.2	55.2
<i>c</i> (Å)	115.1	89.2	88.1	88.1
α (°)	90.1			
β (°)	90.2	91.3	91.0	91.3
γ (°)	119.9			
Resolución (Å)	3.0	2.7	2.2	2.4
Compleitud (%) ^a	94.7 (86.6)	99.9 (99.9)	98.2 (98.2)	95.9 (95.9)
REFINAMIENTO				
<i>R</i> _{free} ^{a,b}	0.298 (0.518)	0.296 (0.358)	0.259 (0.268)	0.264 (0.332)
Nº de átomos				
Proteína	22167	5159	4959	4959
Agua	676	122	247	247
Ligando/ión	9	1	1	1
Factores B (Å ²) ^c				
Promedio	48.7	48.6	37.9	39.4
Enlaces	4.67	3.22	4.6	3.36
Desviaciones R.m.s.				
Longitud del enlace (Å)	0.011	0.007	0.006	0.007
Ángulos de enlace (°)	1.56	1.341	1.195	1.196
CÓDIGO PDB	1W5E	1W59	1W5B	1W5A

^alos valores entre paréntesis corresponden a los de la resolución más alta.

^bpara la determinación de *R*_{free}, el 5% de las reflexiones se seleccionaron al azar antes del refinamiento.

^clos factores de temperatura se promediaron para todos los átomos y la desviación r.m.s. de los factores de temperatura en puentes entre átomos.

DISCUSIÓN

1.- ESTABILIDAD Y PLEGAMIENTO DE LA PROTEÍNA PROCARIOTA FtsZ EN COMPARACIÓN CON SU HOMÓLOGA EUCARIOTA TUBULINA

Los microtúbulos son polímeros que proporcionan el soporte mecánico que da forma a la célula y además son los ejes sobre los que se desplazan los motores moleculares que se encargan de transportar orgánulos de un lado a otro de la célula. Para desarrollar estas funciones, debe existir un control estricto sobre el ensamblaje de los microtúbulos (mediante la polimerización del dímero de tubulina) y su orientación (reflejo de la polaridad de dicho dímero). El funcionamiento de α y β tubulina durante el ensamblaje depende de forma directa de su correcto plegamiento. Tubulina no puede adquirir su conformación nativa por si misma y necesita de la asistencia de varias chaperonas moleculares para plegarse correctamente (Gao *et al.*, 1992; López-Fanarraga *et al.*, 2001; Cowan y Lewis, 2001). La curva de desnaturalización del dímero de tubulina en GdmCl, muestra la incapacidad de la proteína de alcanzar su conformación nativa tras su desnaturalización (figura 18F).

In vivo los polipéptidos recién sintetizados son transportados hacia la chaperona citosólica CCT (chaperona que contiene TCP-1 (Marco *et al.*, 1994; Liou y Willison, 1997) por la prefoldina (Hansen *et al.*, 1999; Rommelaere *et al.*, 2001; Simons *et al.*, 2004). Antes de unirse a CCT, tubulina ya ha adquirido una conformación casi nativa, entendiéndose por esto que presenta una elevada proporción de estructura secundaria y terciaria (Llorca *et al.*, 2001). CCT es un complejo toroidal con actividad ATPasa formado por 8 subunidades que aunque distintas, son homólogas y se colocan en un determinado orden en cada anillo del complejo (Liou y Willison, 1997). La interacción entre CCT y tubulina está perfectamente definida, de modo que los dominios N y C terminal de tubulina interaccionan con subunidades opuestas del anillo CCT a través de regiones muy específicas (Llorca *et al.*, 2000). Tras la hidrólisis de ATP, CCT induce el plegamiento de tubulina, formándose intermediarios que experimentan una serie de interacciones con hasta cinco cofactores proteicos, denominados A-E (Gao *et*

al., 1994; Tian *et al.*, 1996; Tian *et al.*, 1997) formándose también un supercomplejo que incluye GTP como parte de la reacción y del que se libera el heterodímero $\alpha\beta$ -tubulina en su conformación nativa y listo para polimerizar en microtúbulos (Fontalba *et al.*, 1993; Tian *et al.*, 1997).

FtsZ no requiere de la ayuda de chaperonas moleculares para adquirir su conformación nativa. La obtención de la proteína soluble tras expresión en *E. coli* BL21 (DE3), pLysS podría atribuirse a la asistencia del plegamiento *in vivo* por chaperonas procariotas como GroEL/GroES, pero sin embargo se ha visto que *in vitro* la proteína desnaturalizada también es capaz de adquirir su conformación nativa sin la ayuda de ningún otro factor (figura 15). FtsZ no presenta cambios significativos en el espectro de dicroísmo circular a la concentración de agente desnaturalizante a la que se produce la liberación de nucleótido (figura 15B), lo que indicaría que el nucleótido no influye en la adquisición de la conformación nativa de la proteína (a diferencia de los requerimientos de tubulina). De todas formas, es de esperar una cierta estabilización de FtsZMj debido a la presencia de nucleótido, como se ha visto que ocurre con su homólogo mesófilo FtsZEc, en el que se conserva la capacidad de replegar pero la liberación de nucleótido induce una hasta un 30% del cambio de dicroísmo circular de la proteína durante la desnaturalización (Andreu *et al.*, 2002). Además considerando FtsZ en su ambiente biológico (un citosol con un elevado nivel de aglomeración macromolecular y de iones), es fácil pensar que existen macromoléculas, que aunque no se unan directamente podrían colaborar en la adquisición de la estructura nativa de la proteína. Además las chaperonas moleculares pueden evitar una agregación no específica de intermediarios en el plegamiento de FtsZ.

A pesar de la homología estructural entre FtsZ y tubulina (Nogales *et al.*, 1998b), alineamientos de secuencia basados en la estructura secundaria (figura 33) mostraron la existencia de hasta 10 inserciones de 85-90 residuos en tubulina (tanto en α como en β) respecto a FtsZ. Como ya se ha comentado estas inserciones se localizan en los bucles que rodean el núcleo proteico,

común entre estas proteínas. Además existen otras 3 inserciones de 9-10 residuos en FtsZ que no están presentes en tubulina.

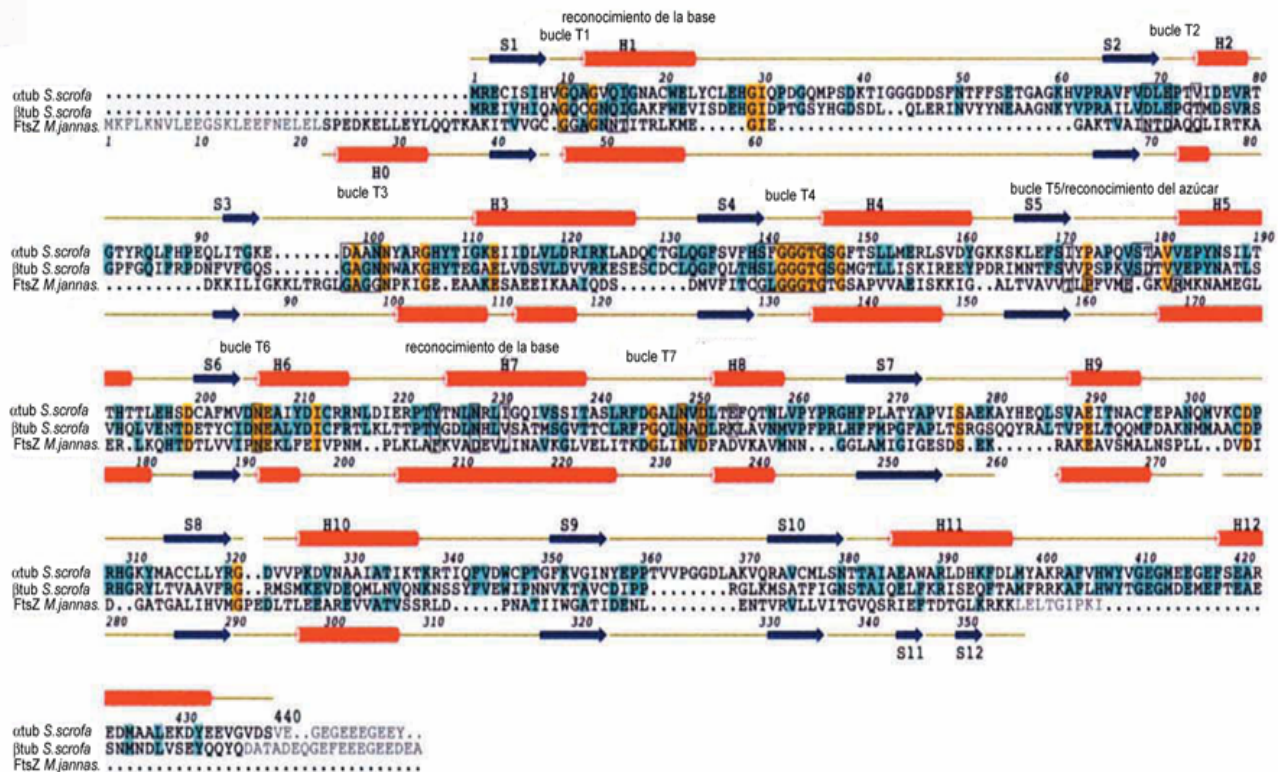


Figura 33: Alineamientos de las secuencias de α y β tubulina y FtsZMj basados en su estructura. Los residuos comunes en las tres secuencias están marcados en amarillo, mientras que los que son sólo comunes en dos de las secuencias aparecen marcados en azul. En las cajas están los residuos implicados en la unión de nucleótido. (Extraída de Nogales *et al*, 1998b)

2.- ANÁLISIS DE LOS ELEMENTOS ESTRUCTURALES QUE FORMAN PARTE DE LOS CONTACTOS AXIALES Y LATERALES EN FtsZ Y TUBULINA

Los $C\alpha$ de la estructura secundaria del núcleo común de FtsZ y tubulina se pueden superponer con una desviación cuadrática media de 2.4Å, que se incrementa hasta 4.3Å si tenemos en cuenta los bucles, que son más extensos en tubulina que en FtsZ (Nogales *et al.*, 1998b).

Las cadenas completas de α y β tubulina de vertebrados y construcciones que incluyen el dominio de unión de nucleótido o el dominio intermedio son típicamente insolubles (G. Pucciarelli y J.M. Andreu, resultados no publicados), lo que sugiere que estos dominios son incapaces de plegar de forma

espontánea como se ha visto con FtsZ. Pero construcciones expresadas en bacterias formadas por los 48 o 52 residuos del extremo C-terminal de α y β tubulina son solubles y pueden formar una hélice (que corresponde a H12) en presencia de trifluoroetanol (Jiménez *et al.*, 1999), sugiriendo que al menos parte del dominio C-terminal de tubulina puede plegarse sin la ayuda de chaperonas. Todo esto sugiere que las inserciones de los bucles en tubulina han provocado la incapacidad de esta proteína a plegarse de forma espontánea.

Las inserciones de bucles de tubulina en el núcleo común de FtsZ/tubulina determinan la adquisición de interacciones funcionales. La inspección de la localización de estas inserciones muestra que no están en el sitio de unión de nucleótido ni en las zonas implicadas en la interfase de los contactos axiales (implicados en la formación de protofilamentos), que por otro lado son regiones que se han visto están conservadas entre monómeros de tubulina y de FtsZ (Nogales *et al.*, 1999; Löwe y Amos, 1999; Oliva *et al.*, 2004). En cambio, se suelen localizar sobre posiciones más periféricas a los lados y en la parte trasera del monómero de tubulina (figura 34A, B y C). En la tabla 8 aparece el listado de el grupo de elementos de estructura secundaria de tubulina que contienen inserciones, aquellos que se proponen participan en contactos axiales o en contactos laterales y los implicados en la interacción con la chaperona citosólica CCT.

Según se observa en esta tabla el grupo de las inserciones incluye contactos laterales y elementos del grupo CCT, excepto el bucle altamente conservado de unión de nucleótido T7. Todos los elementos estructurales que se han asociado a contactos laterales entre protofilamentos de microtúbulos, coinciden con una de las inserciones de bucles en el núcleo común de FtsZ/tubulina. Estos elementos incluyen tres zonas principales en los contactos laterales: el bucle M, H3 y su bucle C-terminal, y parte del bucle entre H1 y S2 (figura 17, 33). Es más, incluso a nivel de residuos todos excepto uno de los residuos relacionados con contactos laterales en el microtúbulo modelado (Meurer-Grob *et al.*, 2001) están asociados con los bucles de inserciones nombrados aquí.

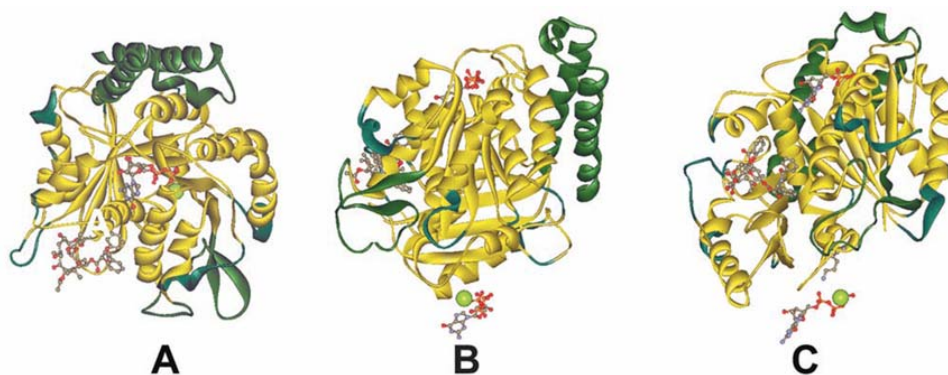


Figura 34: Distintas vistas en diagrama de cintas amarillo de β -tubulina (obtenido a partir del dímero $\alpha\beta$ del *Protein Data Bank* cuyo código de identificación es 1JFF), en el que se han coloreado en verde las inserciones sobre el núcleo común de FtsZ/tubulina y las dos hélices del extremo C-terminal de tubulina. **(A)** Vista desde el extremo + del protofilamento de tubulina, de modo que en la parte superior queda la región de la proteína que quedaría expuesta a la cara externa del microtúbulo (las dos hélices del extremo C-terminal), y en la parte inferior la región expuesta al lumen del microtúbulo (el taxol). En el centro aparece también marcado el GDP unido a la proteína. **(B)** Vista tangencial en la que la parte externa del microtúbulo queda a la derecha. **(C)** Vista desde la cara interna del microtúbulo

Tabla 8: Elementos de estructura secundaria de tubulina

Elemento Estructural ^a	Inserciones ^a	Contacto Axial ^{b,c} en microtúbulo	Contacto Lateral ^{b,c} en microtúbulo	Contacto con CCT ^d
Bucle T1 (S1-H1)		X		
Bucle H1-S2	X		X	X
Bucle T2 (S2-H2)		X		
Bucle H2-S3	X		X	X
Bucle T3 (S3-H3)		X		
Bucle H3/H3-S4	X	X	X	X
Bucle H4/H4-S5	X		X	X
Bucle T5 (S5-H5)		X		
Bucle H6-H7	X	X	X	
Bucle T7 (H7-H8)		X		X
Bucle H8/H8-T7	X	X		X
Bucle M (S7-H9)	X		X	X
Bucle H9/H9-S8	X		X	
H10		X		
Bucle H10-S9	X	X	X	
Bucle S9/S9-S10	X	X		X
(sólo en α -tubulina)				

^a(Nogales *et al*, 1998b), ^b(Nogales *et al*, 1999), ^c(Meurer-Grob *et al*, 2001), ^d(Llorca *et al*, 2001)

Basado en este análisis, estos bucles insertados en tubulina probablemente co-evolucionaron con la asociación lateral de protofilamentos para formar los microtúbulos, una característica que no se ha observado en la formación de protofilamentos del homólogo FtsZ. Se ha sugerido que CCT co-evolucionó con tubulina para contrarrestar los problemas de plegamiento asociados con las nuevas zonas implicadas en la polimerización (Llorca *et al.*, 2001). Considerando las 8 regiones de tubulina que están en contacto con la chaperona en el modelo del complejo tubulina-CCT (tabla 8, columna Contactos con CCT), 5 están implicadas en las interacciones laterales en la formación de microtúbulos, 2 corresponden a bucles de tubulina insertados que no están implicados en contactos laterales (bucles H8-S7 y S9-S10), y el último es el bucle altamente conservado T7.

3.- LAS QUIMERAS FtsZ/TUBULINA ADQUIEREN CARACTERÍSTICAS DEL PLEGAMIENTO DE SU HOMÓLOGA EUCARIOTA SEGÚN ACUMULA EN SU ESTRUCTURA BUCLES DE TUBULINA

Las secuencias de tubulina implicadas en la interacción con CCT forman parte de las diez inserciones en los bucles de tubulina y por lo tanto no tienen sus homólogas en FtsZ, es más, como ya se ha comentado, FtsZ no interacciona con CCT *in vitro* (Dobrzynski *et al.*, 2000) y a pesar de formar contactos longitudinales similares, las estructuras derivadas del ensamblaje de FtsZ no se parecen a los microtúbulos formados por tubulina (Erickson *et al.*, 1996; Yu y Margolin, 1997; Mukherjee y Lutkenhaus, 1998; Löwe y Amos, 1999; Löwe y Amos, 2000; Oliva *et al.*, 2003).

Tres de los bucles de tubulina implicados en la interacción con CCT, que denominamos N, T7 y M (figura 17) han sido insertados en FtsZ para determinar que modificaciones se producirían en las características de plegamiento y ensamblaje de ésta, que asemejaran a las de tubulina.

Otros estudios de estabilidad realizados con tubulina en presencia de GdmCl, urea o frente a la temperatura han mostrado que la desnaturalización se puede producir en dos (Andreu *et al.*, 2002) o más etapas (Sackett *et al.*, 1994;

Guha y Bhattacharyya, 1997) dependiendo del agente desnaturizante empleado. Pero independientemente del agente al que es sometida la proteína para alcanzar la conformación desnaturizada, tubulina no es capaz de volver a su estado nativo (Wolff *et al.*, 1996) sino que, por ejemplo con GdmCl, adquiere un espectro característico de agregados en lámina β (Andreu *et al.*, 2002). Además la desnaturización va acompañada de la disociación del nucleótido unido al dímero $\alpha\beta$ (Andreu *et al.*, 2002).

Las quimeras FtsZ/T7, FtsZ/M, FtsZ/N, FtsZ/T7M y FtsZ/NT7M se expresaron predominantemente de forma soluble, aunque parece que la inserción del bucle N modifica considerablemente la estabilidad de FtsZ ya que: (i) a pesar de expresarse de forma soluble, los niveles de expresión de la quimera FtsZ/N eran tan bajos que no se obtuvo proteína suficiente para la realización de determinados experimentos (como dicróismo circular y desnaturización con GdmCl) y (ii) sólo el 50% de la quimera FtsZ/NT7M expresada se obtenía soluble.

Las quimeras FtsZ/T7, FtsZ/M, FtsZ/T7M y FtsZ/NT7M tienen una estructura promedio (observada por dicróismo circular) similar a la de FtsZ, todas presentan nucleótido unido (Material y Métodos) y son capaces de ensamblar, lo que sugiere que estas proteínas tienen un plegamiento correcto. De todas formas resulta significativo que la relación de mínimos (obtenidos a partir de los espectros de dicróismo) de las quimeras FtsZ/T7 y FtsZ/M se parece más a la de FtsZ mientras que en el caso de la doble y la triple quimera se asemeja más a la de tubulina, es decir, cuantas más inserciones acumula FtsZ más se va pareciendo a tubulina.

La inserción de secuencias de tubulina va modificando la estabilidad de FtsZ. La inserción de los bucles M o T7 producen pequeñas desestabilizaciones del proceso de desnaturización que por lo demás sigue siendo reversible. La acumulación de dos inserciones (T7 y M) genera un perfil de desnaturización que es más complejo (se produce en dos etapas), aunque sigue siendo reversible. La acumulación de tres secuencias no sólo produce un perfil bifásico (como con la doble quimera), sino que al igual que lo observado con tubulina el

proceso es irreversible (figura 18). Todo esto corrobora los resultados obtenidos por dicroísmo circular, es decir, cuantas más inserciones se acumulan en FtsZ, más se parece a tubulina. La discordancia existente entre la obtención de FtsZ/NT7M de forma soluble al expresarla en *E. coli*, y que el proceso de desnaturalización es irreversible se podría explicar de nuevo basándonos en el estado de aglomeración macromolecular del citosol bacteriano o en la ayuda que pueden proporcionar chaperonas citosólicas procariotas para superar el problema de plegamiento de esta quimera.

Los cambios en estabilidad y plegamiento observado en las quimeras están acompañados por la adquisición de la capacidad de interaccionar con CCT (Bertrand *et al.*, 2005). Como ya se ha comentado tubulina y CCT interaccionan a través de regiones específicas, generándose dos tipos de interacción: (i) el dominio N-terminal de tubulina interacciona con CCT θ/δ y el dominio C-terminal con CCT $\epsilon/\zeta/\beta$ (figura 35a); (ii) el dominio N-terminal de tubulina interacciona con CCT η/α y el dominio C-terminal con CCT $\beta/\gamma/\theta$ (figura 35b). La inserción del bucle N en la quimera FtsZ/N induce la unión de FtsZ a las mismas subunidades del dominio apical de CCT a las que se une el dominio N-terminal de tubulina: CCT $\theta/\delta/\eta$ o CCT $\eta/\alpha/\epsilon$ (figura 35c y d, comparadas con a y b respectivamente). La inserción de los bucles T7 y M (localizados en el dominio C-terminal) induce la unión de las quimeras que los incluyen (FtsZ/T7, FtsZ/M y FtsZ/T7M) a aproximadamente las mismas subunidades de CCT con las que interacciona tubulina a través de este dominio: CCT $\epsilon/\zeta/\beta/\gamma$ (figura 35e, g e i comparadas con a) y CCT $\zeta/\beta/\gamma/\theta$ (figura 35f, h y j comparadas con b). La interacción de la quimera FtsZ/NT7M es más compleja, aunque esto se puede explicar por el hecho de que esta quimera incluye bucles de unión a CCT localizados tanto en el dominio N como en el C-terminal. En el 70% de los casos esta quimera parece interaccionar con las subunidades de CCT implicadas en la unión con el dominio C-terminal de tubulina, CCT $\epsilon/\zeta/\beta$ o CCT $\beta/\gamma/\theta$ (figura 35k y l), y en el 30% restante parece que interacciona con las subunidades de CCT implicadas en la interacción con el dominio N-terminal de tubulina, CCT θ/δ o CCT $\eta/\alpha/\epsilon$ (figura 35m y n). El hecho de que en la mayor parte de los casos se una a subunidades

implicadas en la unión del dominio C-terminal puede ser debido a que dos de las tres inserciones de esta quimera, los bucles T7 y M, se localizan en este dominio y a que se ha visto que el bucle M es la región de tubulina que interacciona con mayor afinidad con CCT (Dobrzynski *et al.*, 1996; Rommelaere *et al.*, 1999; Llorca *et al.*, 2000; Dobrzynski *et al.*, 2000; Ritco-Vonsovici y Willison, 2000; Llorca *et al.*, 2001).

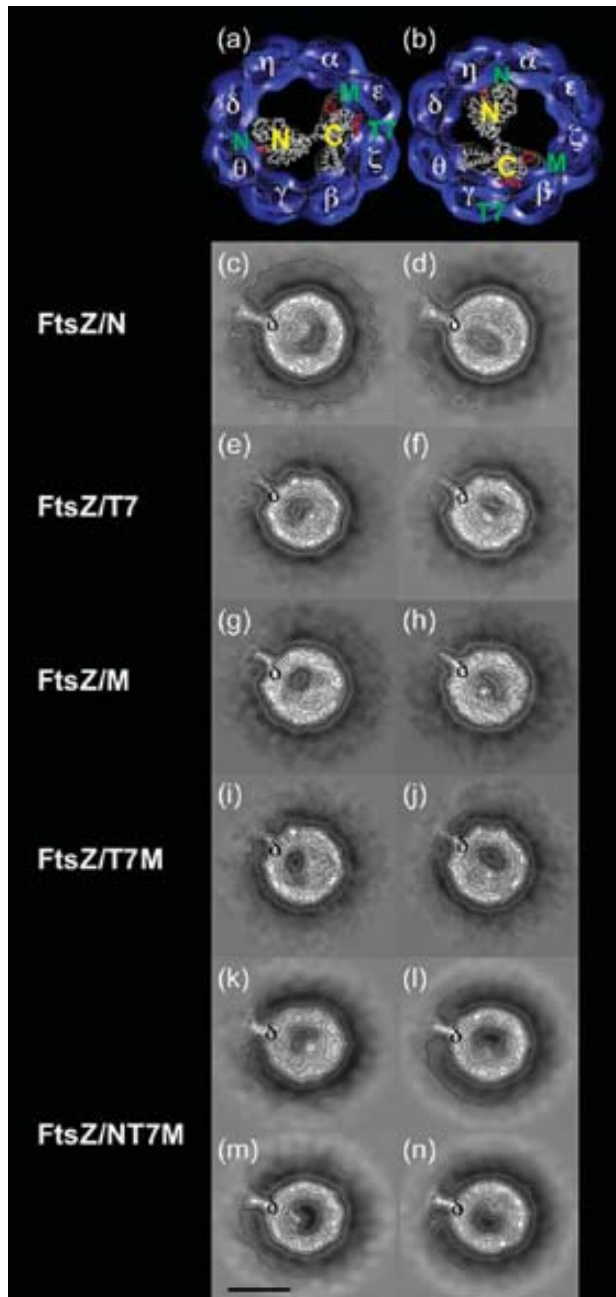


Figura 35: Imágenes bidimensionales promedio de inmunocomplejos de CCT:FtsZ con el anticuerpo anti-CCTδ. En (A) y (B) aparecen representados dos posibles maneras de interacción entre CCT y tubulina con la estructura de tubulina abierta ajustada a la masa del complejo (Llorca *et al.*, 2000). La topología de las subunidades de CCT es la descrita anteriormente (Liou y Willison, 1997). Las regiones en rojo en la estructura de tubulina (A y B) corresponden a los tres bucles (M, T7 y N, marcados en verde) empleados en la construcción de las quimeras FtsZ/tubulina. Las letras amarillas marcan los dominio N y C terminal. (C) y (D) son imágenes promediadas (234 y 245 partículas respectivamente) del complejo entre CCT y la quimera FtsZ/N desnaturalizada. (E) y (F) son imágenes promediadas (315 y 275 partículas respectivamente) del complejo entre CCT y la quimera desnaturalizada FtsZ/T7. (G) y (H) son imágenes promediadas (514 y 507 partículas respectivamente) del complejo entre CCT y la quimera desnaturalizada FtsZ/M. (I) y (J) son imágenes promediadas (572 y 635 partículas respectivamente) del complejo entre CCT y la quimera desnaturalizada FtsZ/T7/M. (K-M) son imágenes promediadas (353, 342, 148 y 133 partículas respectivamente) del complejo entre CCT y la quimera desnaturalizada FtsZ/NT7M. La barra corresponde 10nm. (extraída de Bertrand *et al.*, 2005)

4.- ENSAMBLAJE DINÁMICO DE FtsZ INDUCIDO POR LA UNIÓN DE NUCLEÓTIDO

El primer objetivo que se planteó cuando se abordó el ensamblaje de FtsZMj fue el de encontrar unas condiciones bioquímicamente controladas en las que se pudiese estudiar la dinámica de los polímeros de esta proteína. Como la FtsZ de otras especies bacterianas como *E. coli*, *Azotobacter vinelandii*, *Thermotoga maritima* y *Mycobacterium tuberculosis* (Mukherjee y Lutkenhaus, 1993; Lu *et al.*, 1998; White *et al.*, 2000), FtsZMj requiere la presencia de Mg^{2+} para la unión de GTP (de Boer *et al.*, 1992), que a su vez, es indispensable para inducir el ensamblaje. La asociación de FtsZ en el polímero implica la formación del sitio activo de la proteína con la consiguiente activación de la GTPasa (Scheffers *et al.*, 2001). Bajo las condiciones empleadas la proteína ensamblada hidroliza 1 GTP cada 10 segundos, aunque la velocidad de hidrólisis se ve modificada por cambios en las condiciones de la solución, y cuando la proporción de GDP es mayoritaria los polímeros desensamblan.

Es conocida la dependencia que existe entre la actividad GTPasa de FtsZ de *E. coli* y la concentración de proteína (Wang y Lutkenhaus, 1993; Sossong *et al.*, 1999; Romberg *et al.*, 2001). Los resultados obtenidos con FtsZMj muestran que, como se ha descrito anteriormente, la actividad GTPasa es debida a los contactos intermoleculares entre moléculas de FtsZ en el polímero (Sossong *et al.*, 1999; Scheffers *et al.*, 2001). Además el incremento que se produce en la hidrólisis está inducido de forma cooperativa, ya que sólo puede medir por encima de la concentración crítica (figura 23). Los valores de actividad GTPasa detectados por debajo de la concentración crítica son muy bajos y se pueden atribuir a contactos en oligómeros de FtsZ (Sossong *et al.*, 1999) o a una actividad basal de los monómeros de FtsZ.

Aunque bajo las condiciones estándar de polimerización (MesK, 55°C) la cola de histidinas no parecía influir en el ensamblaje y la actividad GTPasa, modificaciones de estas condiciones mostraron un claro incremento en el ensamblaje, permitiendo la polimerización de las proteínas con cola de histidinas en presencia de Ca^{2+} , en tampón con Na^+ , o a 80°C a pesar de no añadir GTP a

la solución de ensamblaje, dando lugar a la formación de tubos helicoidales, láminas o tubos en lugar de los característicos polímeros filamentosos (figura 22 y tabla 5).

De todas formas estos resultados no aclaran cuál es la dinámica del ensamblaje de FtsZ. No permiten determinar si una vez hidrolizado el nucleótido el intercambio tiene lugar en el polímero o si son los monómeros de FtsZ los que se intercambian mediante un rápido desensamblaje-ensamblaje. Si el intercambio tuviese lugar en el polímero, los polímeros de FtsZ estarían continuamente ensamblados en el citosol bacteriano debido a su contenido en GTP y por tanto sería imprescindible la presencia de proteínas desestabilizadoras para la regulación de la formación y contracción del anillo Z. En el caso de que el sitio de unión del nucleótido estuviese ocluido (no fuese accesible al solvente) y se formase un polímero con GDP unido estabilizado por subunidades unidas a GTP en los extremos (como ocurre en tubulina), los polímeros individuales serían intrínsecamente inestables una vez que los monómeros hubiesen hidrolizado el GTP y por tanto, sería necesaria la presencia de factores estabilizadores. En los resultados de sedimentación realizados en este trabajo los polímeros aparecen con una mezcla de GTP y GDP, lo que es un buen argumento a favor de un sitio accesible al nucleótido y en contra del segundo modelo, en el que el contenido de los polímeros sería mayoritariamente GDP (Scheffers y Driessen, 2002). Si estos resultados se confirmasen con un método de separación más rápido, también sería un argumento en contra del modelo de polímero que contiene mayoritariamente GTP (Mingorance *et al.*, 2001; Romberg y Mitchison, 2004) y favorecería la posibilidad de que FtsZ forma polímeros mixtos cuya estabilidad estaría relacionada con la proporción de monómeros con GTP y GDP unido.

5.- EL ENSAMBLAJE EN AUSENCIA DE HIDRÓLISIS DE NUCLEÓTIDO: EFECTO DE CAMBIOS EN LAS CONDICIONES DE ENSAMBLAJE Y LA MUTACIÓN W319Y

Los resultados obtenidos en tampón con Na^+ mostraron que se puede producir ensamblaje de la proteína tanto en presencia de GTP como de GMPCPP sin que se observe hidrólisis del nucleótido. La actividad GTPasa de FtsZ de bacterias como *E. coli* (Mukherjee *et al.*, 1993) y de arqueas como *H. volcanii* (Wang y Lutkenhaus, 1996) presenta un requerimiento de K^+ similar al observado en este trabajo con *M. jannaschii*, mientras que FtsZ de *A. vinelandii* y de *T. maritima* presentan la misma actividad en Na^+ y en K^+ (Lu *et al.*, 1998). Por otro lado tubulina presenta un comportamiento totalmente opuesto ya que en el caso de microtúbulos ensamblados con GMPCPP, la hidrólisis de nucleótido es mayor en tampón con Na^+ que con K^+ (Caplow *et al.*, 1994). Si bien es cierto que existen otros trabajos en los que se muestra que el ensamblaje y la actividad GTPasa no sólo están modulados por cationes divalente (Mg^{2+} , Ca^{2+}) sino también por cationes monovalentes (Yu y Margolin, 1997; Mukherjee y Lutkenhaus, 1998; Mukherjee y Lutkenhaus, 1999; White *et al.*, 2000; Romberg *et al.*, 2001; Mingorance *et al.*, 2001), los resultados presentados en este trabajo mostraron por primera vez polímeros de una FtsZ salvaje que no hidrolizan nucleótido (Oliva *et al.*, 2003).

También resulta interesante que cuando se añade GDP para mimetizar la hidrólisis del GTP, los polímeros de FtsZ que eran cinéticamente estables despolimerizan rápidamente (figura 24), lo que confirma la función del GDP en la dinámica de desensamblaje de FtsZ y sería también otro factor a favor de la teoría de la presencia de un sitio de unión de nucleótido no ocluido e intercambiable en el polímero ya que no es probable que se intercambien monómeros tan rápido.

El único triptófano de FtsZ de *M. jannaschii* se localiza en la parte inferior del monómero (figura 13), en la interfase de asociación con la subunidad inmediatamente inferior, a menos de 10Å del bucle co-catalítico T7 y a 8.5Å del nucleótido (figura 29). La proteína mutante FtsZW319Y-(His)₆ ensambla sin

hidrolizar nucleótido, aunque hay que destacar que esta misma proteína sin cola de histidinas ensambla significativamente menos (no se induce ensamblaje a 55°C, tabla 5), mostrando que la mutación afecta considerablemente al ensamblaje *in vitro*, y que éste se recupera por la presencia de la cola de histidinas. La inhibición de la actividad GTPasa es difícil de explicar con los resultados obtenidos. En la estructura del protofilamento se observa que la distancia del residuo al nucleótido es demasiado grande para que se produzca una interacción directa, por lo que si el triptófano interviene en la hidrólisis podría ser a través de la interacción con otro residuo implicado en el proceso. La estructura del mutante FtsZW319Y es del monómero de proteína, por tanto no disponemos de la estructura del sitio activo completo para poder medir la distancia hasta el nucleótido. Además la resolución de esta estructura es de 3.0Å, por lo que la posición de las cadenas puede que no sean exactas. El efecto de la tirosina (W319Y) en la inhibición la actividad GTPasa podría ser debida a un cambio de orientación que produjese un nuevo tipo de interacción con uno o varios residuos del sitio activo.

6.- LA ESTRUCTURA BÁSICA EN EL POLÍMERO DE FtsZ ES UN FILAMENTO DOBLE

Tanto FtsZ como FtsZ-(His)₆ y FtsZW319Y-(His)₆ ensamblan formando un conjunto de estructuras polimórficas filamentosas, sugiriendo que realmente se forman un tipo de filamento que da lugar a distintos polímeros mediante asociaciones laterales diferentes. Los resultados presentados en este trabajo, obtenidos bajo condiciones bioquímicamente controladas, confirman la estructura de filamento presentada por Löwe y Amos anteriormente (1999). En su trabajo realizaron un ajuste manual de la estructura de FtsZ de *M. jannaschii* (Löwe y Amos, 1998) en una reconstrucción tridimensional de polímeros laminares obteniendo una disposición de los monómeros de FtsZ en el protofilamento similar a la de los protofilamentos de tubulina. Según estos autores el elemento β S3 es el responsable de la interacción entre protofilamentos (figura 36) para formar un filamento doble (figura 26C, asterisco),

mientras que la región C-terminal con la cola de histidinas quedaría expuesta hacia la parte externa del filamento pudiendo formar un enlace con un filamento doble vecino (flecha en la misma figura). Como la cola de histidinas no está presente en la proteína salvaje (que además no es capaz de formar láminas ordenadas sino estructuras filamentosas con conexiones laterales desordenadas), es razonable sugerir que estas láminas son artificiales y están generadas por la presencia de una serie de residuos extras en el extremo C-terminal de la proteína.

Por otro lado parece que la interacción entre dos protofilamentos para formar un filamento doble es natural, ya que se ha confirmado no sólo con las imágenes obtenidas de láminas ordenadas, sino también a través de imágenes obtenidas de filamentos de FtsZMj y FtsZEc (Resultados, figura 26E y G), en las que se observa que los filamentos están formados por dos protofilamentos paralelos con el mismo espaciamiento axial entre monómeros. Es cierto que se ha referido que los polímeros de FtsZ están formados por uno (Romberg *et al.*, 2001), dos o varios protofilamentos (Mukherjee y Lutkenhaus, 1999; Rivas *et al.*, 2000; White *et al.*, 2000; Mingorance *et al.*, 2001; Andreu *et al.*, 2002), pero el procesamiento de las imágenes presentado apoya que la unidad básica del ensamblaje de FtsZ es el doble filamento.

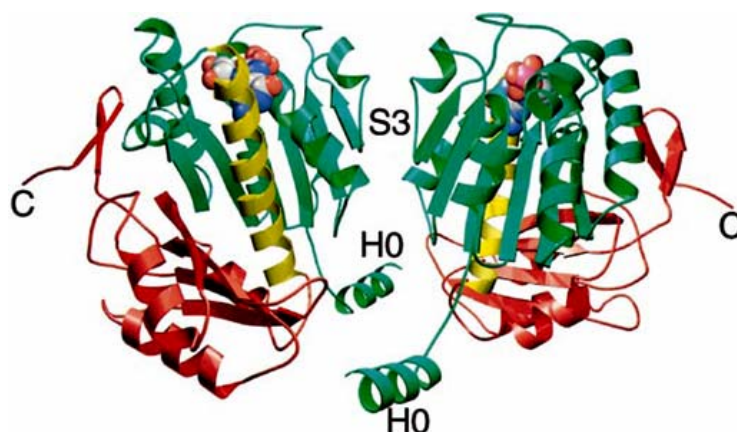


Figura 36: Contactos laterales entre dos moléculas de FtsZ en un filamento grueso. Las dos moléculas interactúan a través del dominio N-terminal (S3), mientras que los extremos C-terminales apuntarían hacia fuera y podrían interactuar con otros filamentos dobles u otras proteínas implicadas en la división celular. En este modelo las hélices H0 apuntan en sentido opuesto también hacia fuera del dímero, pero ahora se sabe que interactuarían con la subunidad inmediatamente inferior en el protofilamento. (Extraída de Löwe y Amos, 1999).

Las interacciones laterales entre los dos protofilamentos simétricos de FtsZ son claramente distintas de las que se producen entre protofilamentos en los microtúbulos (mostrados de forma esquemática en la figura 37). Las asociaciones laterales entre protofilamentos de tubulina se propagan indefinidamente hasta que se cierra la circunferencia del microtúbulo (Nogales 2000), pero esa misma propagación no se puede producir en el doble protofilamento de FtsZ debido a que las interfases que entran en contacto no son las mismas. En las interfases de los contactos laterales de protofilamentos de tubulina se localizan algunas de las inserciones comentadas anteriormente que no aparecen en FtsZ. Por tanto, parece ser, que el plegamiento común que presenta FtsZ y tubulina es utilizado para formar protofilamentos similares que asocian lateralmente de forma distinta para llevar a cabo distintas funciones. Los microtúbulos forman estructuras rectas y perpendiculares al eje de división de la célula eucariota y se encargan de unirse a los cromosomas para favorecer su segregación durante la división. El anillo Z marca el plano de división para la citoquinesis de la célula procariota y dirige la formación del septo, aunque realmente todavía no se ha probado que realice ningún trabajo durante la constricción de la célula.

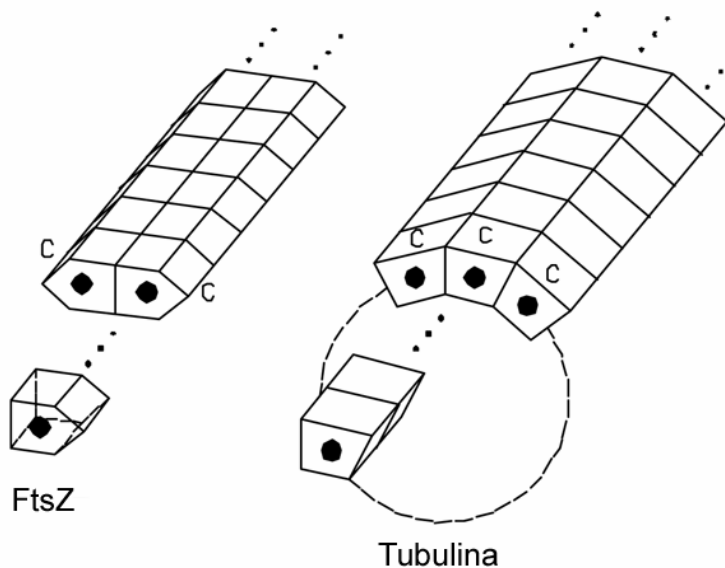


Figura 37: Modelo simplificado del mecanismo de interacción de FtsZ en un filamento doble, comparado con el de tubulina en microtúbulos. Los dímeros de tubulina ensamblan formado protofilamentos similares a los que forma FtsZ, pero las interacciones laterales que se establecen son diferentes, de modo que en tubulina se prolongan hasta que se cierra la circunferencia. El círculo negro representa la posición del nucleótido en la proteína y la letra C, la posición del extremo C-terminal.

7.- ALTERACIONES EN EL ENSAMBLAJE DE QUIMERAS DE FtsZ DEBIDAS A LA ACUMULACIÓN DE SEGMENTOS DE TUBULINA

Los microtúbulos son polímeros pseudohelicoidales formados por protofilamentos paralelos de dímeros de $\alpha\beta$ -tubulina. Los dímeros de tubulina asocian lateralmente mediante la propagación lateral de interacciones de homólogos α/α y β/β , sólo el cierre de los microtúbulos implica la formación de interacciones α/β y β/α (Nogales, 2000).

El ensamblaje de FtsZ da lugar a la producción de una gran variedad de filamentos y láminas, pero el modelo de ensamblaje de FtsZMj básico propuesto en el apartado anterior es la asociación lateral de dos protofilamentos paralelos con un eje de simetría entre ellos, formando un filamento doble. Estos filamentos pueden asociar para dar lugar a polímeros de mayor tamaño como cables o láminas empleando interacciones laterales que necesariamente son diferentes a las que se establecen entre los dos protofilamentos. Esta asociación además es claramente incompatible con la formación de estructuras tipo microtúbulo donde las mismas interacciones laterales que forma un protofilamento con su pareja se propaga a lo largo del polímero (figura 37).

La inserción de secuencias de tubulina en FtsZ parece inducir nuevas propiedades en su ensamblaje. Aunque no se han podido realizar estudios de ensamblaje en mayor profundidad debido a problemas de precipitación de las quimeras bajo las condiciones de ensamblaje de FtsZ, parece evidente que estas proteínas son capaces de generar estructuras más complejas que las observadas con FtsZ bajo condiciones estándar. De forma significativa la inserción de los bucles M y N, que en tubulina están implicados en la formación de contactos laterales, induce la formación de polímeros curvados (figura 27), aunque ninguna de las quimeras da lugar a la formación de microtúbulos (quizá debido a que aunque poseen alguno de los bucles implicados en la formación de estas estructuras, no poseen todos).

8.- FtsZ Y TUBULINA FORMAN EL MISMO PROTOFILAMENTO

La cristalización de FtsZ polimerizada en presencia de GTP o algún análogo no hidrolizable no es factible debido a: (i) la dinámica del ensamblaje de FtsZ es mucho más rápida que el crecimiento de los cristales durante el proceso de cristalización con la consiguiente formación de agregados; (ii) condiciones favorables para la cristalización pueden ser incompatibles con el mantenimiento de la estructura del polímero. La utilización de la proteína mutante FtsZW319Y dio como resultado la obtención de una estructura monomérica que además resultó prácticamente idéntica a la de la proteína unida a GDP (Löwe y Amos, 1998). Empleando la apo-FtsZMj se consiguió la estructura del protofilamento con la que se obtuvo una clara evidencia de que FtsZ y tubulina polimerizan formando unos protofilamentos muy parecidos (figura 29).

La estructura del dímero de FtsZ presentada en este trabajo, obtenida a partir del protofilamento, presenta una curvatura de unos 10° . A partir de datos estructurales se ha observado que tubulina puede presentar hasta tres conformaciones distintas (figura 38): (i) recta, como la observada en las láminas de zinc (Nogales *et al.*, 1998); (ii) curvada, (observada en oligómeros de tubulina tras despolimerización, anillos de tubulina-GDP inducidos por Mg^{2+} y en dímeros de tubulina en complejos con Op18/estadmina), en la que los dominios de unión de nucleótido y C-terminal se comportan como un bloque rígido y deben de girar respecto al dominio intermedio (11° de β y 8° de α), lo que supone una rotación de unos 12° entre dos dímeros consecutivos tangencial a la pared del microtúbulo (Ravelli *et al.*, 2004); (iii) estado intermedio entre recto y curvado, porque tras la hidrólisis del GTP en el microtúbulo se induce una ligera curvatura del dímero (5° de β y 2.8° de α) que no llega hasta los 12° de la conformación curvada debido a las restricciones que provoca el entramado del microtúbulo (Krebs *et al.*, 2005). Basándonos en el alineamiento de FtsZ con el dímero α,β -tubulina (en el microtúbulo), el dímero de FtsZ está curvado hacia lo que sería la cara interna del microtúbulo (figura 30), pero de todas formas no se sabe en que modo se curvan los protofilamentos de FtsZ cuando tienen unido GDP.

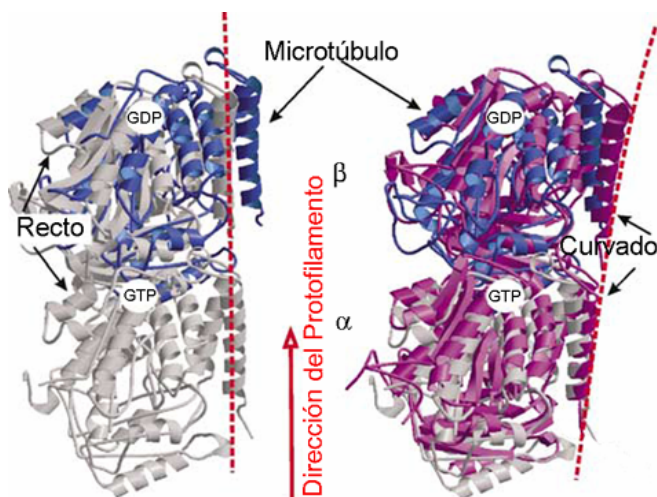


Figura 38: Estructuras del dímero de α,β -tubulina. En gris aparece la conformación recta del dímero obtenida a partir de láminas de zinc (Nogales *et al.*, 1998), en azul la conformación intermedia que se genera tras la hidrólisis de nucleótido (Krebs *et al.*, 2005) y en rosa la estructura curva obtenida a partir del complejo con estadmina (Ravelli *et al.*, 2004). (Extraído de Krebs *et al.*, 2005)

9.- ACCESIBILIDAD DEL SITIO DE UNIÓN DE NUCLEÓTIDO EN EL PROTOFILAMENTO DE FtsZ

La unidad estructural básica de los microtúbulos son los dímeros de $\alpha\beta$ tubulina que presentan un ordenamiento cabeza-cola en la formación de protofilamentos, que al asociar lateralmente forman los microtúbulos. Como se ha comentado anteriormente, en el heterodímero tanto α como β unen GTP, pero sólo el unido en β es hidrolizable durante la polimerización, tras una pequeña fase de retardo. La hidrólisis produce un cambio conformacional en β pero debido a las restricciones de movimiento provocada por el propio entramado del microtúbulo, el dímero de tubulina no puede adoptar una conformación completamente curvada y se mantiene en un estado intermedio, que obviamente constituye un estado menos estable para el microtúbulo (Krebs *et al.*, 2005). Además el sitio de unión de nucleótido tanto en α como en β está completamente ocluido por la propia proteína, lo que implica que es necesario que se produzca el desensamblaje para que pueda tener lugar el intercambio de nucleótido, es decir, el paso limitante en la hidrólisis es el intercambio de nucleótido.

El restardo en la hidrólisis de GTP en tubulina permite la formación de extremos de GTP-tubulina en el lado creciente del microtúbulo evitando su despolimerización (Mitchison y Kirschner, 1984). Eventualmente la velocidad de crecimiento es menor que la de hidrólisis y la hidrólisis del nucleótido en el

extremo del microtúbulo lo convierte en vulnerable a la despolimerización debido al cambio conformacional del dímero que se curva completamente (Krebs *et al.*, 2005), generándose lo que se conoce como inestabilidad dinámica de los microtúbulos.

En el caso de FtsZ el nucleótido no se encuentra ocluido y por tanto puede tener lugar el intercambio de nucleótido en el protofilamento. Esto quedaría demostrado no sólo por la estructura de dímero presentada en el apartado de resultados (figura 31A) sino también por la obtención de la estructura del sitio activo mediante inmersión de los cristales de apo-proteína en una solución que contiene nucleótido (figura 32). La abertura que da acceso al nucleótido es suficientemente grande, tiene unas dimensiones de 8 x 9Å, como para permitir el acceso por difusión libre de GTP y proporciona una explicación a nivel estructural de por qué en el caso de FtsZ el paso limitante en la hidrólisis de nucleótido es la propia hidrólisis y no el intercambio como se ha visto recientemente (Mingorance *et al.*, 2001; Romberg y Mitchinson, 2004).

También es cierto que estos resultados podrían ser interpretados como la visualización del estado pre-hidrólisis del filamento, de modo que después de la hidrólisis y la liberación del fosfato γ la interfase podría cerrarse. En la estructura del dímero de tubulina todo indica que el cambio conformacional se ha producido ya que: (i) existen diferencias en la posición de los aminoácidos Asp251 y Glu254 (residuos encargados de polarizar la molécula de agua atacante en tubulina) entre α (GTP no hidrolizable) y β tubulina (GTP hidrolizable), en FtsZ como todas las subunidades son idénticas y por lo tanto todas las interfases entre subunidades pueden hidrolizar GTP estas diferencias no se pueden apreciar; (ii) los aminoácidos Asp251 y Glu254 en tubulina no se encuentran en una posición correcta para el ataque (aunque la resolución de la estructura es sólo de 3.5Å y la posición de las cadenas laterales puede que no sean muy exactas), es decir, han quedado desplazados tras la hidrólisis; (iii) en el hueco que queda en el sitio activo de tubulina, no existe suficiente espacio para el fosfato γ y la molécula de agua atacante (figura 32B).

De todas formas los resultados obtenidos de contenido de nucleótido en el polímero apoyarían la teoría de un sitio accesible.

10.- EL INTERRUPTOR DE LA GTPasa Y EL CICLO FUNCIONAL DE FtsZ

Los resultados muestran que la actividad GTPasa de FtsZ cambia entre el estado inactivo (monómero) y el estado activo (polímero), complementando el sitio de unión de nucleótido con la molécula de agua atacante para la hidrólisis del fosfato γ . Entre la gran variedad de mecanismos de activación de NTPasas existentes en la naturaleza todos presentan una característica común, la necesidad de estabilizar el estado de transición mediante compensación de la carga.

Muchas de las Proteínas Activadoras de GTPasas (GAPs) clásicas usan un “dedo de arginina” que alcanza el sitio activo incrementando la actividad GTPasa al menos en 105 veces (Ahmadian *et al.*, 1997) y probablemente estabilizando la carga que se produce durante la hidrólisis del nucleótido (Scheffzek *et al.*, 1997), aunque recientemente se ha visto que este mecanismo no es universal y estas GTPasas pueden emplear otros residuos como asparagina (Daumke *et al.*, 2004). Durante la fijación del nitrógeno los dos componentes de la nitrogenasa (proteína Fe y proteína MoFe) forman un complejo transitorio en el que la transferencia de cada electrón está acoplada a la hidrólisis de dos moléculas de ATP, y un residuo de lisina es el encargado de estabilizar el estado de transición que se forma (Schindelin *et al.*, 1997). El complejo de GTPasa heterodimérico entre Ffh (homólogo al SRP54 eucariota, partícula de reconocimiento de señal) y FtsY (homólogo al $Sr\alpha$ eucariota, receptor del anterior), se encargan de dirigir a las proteínas que van a ser secretadas o que van a integrarse en la membrana y durante la hidrólisis emplean una arginina para estabilizar el estado de transición (Egea *et al.*, 2004; Focia *et al.*, 2004). En todos estos casos la molécula de agua polarizada reside en el dominio de unión de nucleótido. En el complejo $G_{i\alpha 1}$ con el activador RGS4, se produce otra variación con una asparagina y una superficie de unión que

colabora con el dominio de unión de nucleótido en el estado de transición (Tesmer *et al.*, 1997).

A partir de los datos estructurales presentados parece que el cambio de la actividad GTPasa estabiliza una transición temprana en la que la molécula de agua atacante se polariza. El dominio de unión de nucleótido de FtsZ presenta su propio “dedo de arginina”, Arg169 (figura 32A), que es necesario para que la catálisis sea eficiente, ya que estabiliza la carga que se produce en el estado de transición tardío. La arginina equivalente en FtsZ_{Ec}, que además está conservada, sería Arg142 y no la Arg214 propuesta anteriormente (Sossong *et al.*, 1999).

El ciclo funcional de FtsZ, al igual que el de tubulina, implica la hidrólisis y el intercambio del nucleótido. Según se deduce a partir de la estructura curvada de tubulina (Ravelli *et al.*, 2004), la hidrólisis de nucleótido induce cambios y rotaciones que permiten movimientos de los elementos estructurales responsables de los contactos laterales como el bucle M y el que se encuentra entre H1-S2. Además se produce un cambio conformacional en el bucle T5 y un movimiento en bloque del bucle H6-H7 seguido de una traslación de 2.5Å a lo largo del eje de la hélice H7. Estos cambios en el extremo del microtúbulos inducen la despolimerización, aunque realmente no se sabe si estos cambios observados son debidos a la hidrólisis del nucleótido o son inducidos por la presencia de estadmina en el complejo.

La hidrólisis de nucleótido en FtsZ induce curvatura en sus polímeros (Lu *et al.*, 2000; Huecas y Andreu, 2004) debida probablemente a un cambio conformacional. Estudios de dinámica molecular mostraron un posible cambio conformacional en el bucle T3, inducido por el fosfato γ del GTP, que provocaría un empuje sobre la hélice H8 del monómero inmediatamente superior (figura 29) (Díaz *et al.*, 2001). Varias estructuras cristalográficas de monómeros de FtsZ unidos a distintos nucleótidos (Löwe y Amos, 1998; Cordell *et al.*, 2003; Oliva *et al.*, 2004) muestran que no existen diferencias entre el estado vacío y el unido a GTP en el filamento, y entre el unido a GDP y GTP en el monómero (figura 39). Sin embargo la adición de GDP o GDP y Mg^{2+} al dímero de FtsZ en el cristal

(que no contiene nucleótido unido en el sitio activo), provocó la disolución de estos cristales, al contrario de lo que ocurre con GTP, lo que puede inducir a pensar que se ha producido un cambio conformacional que sería incompatible con el empaquetamiento del cristal. Todo esto sugiere que se necesita el sitio de unión completo para llevar a cabo el cambio estructural (figura 39).

A diferencia de tubulina, todavía no se sabe cuáles son los cambios en FtsZ debidos a la hidrólisis de nucleótido que inducirían la despolimerización. La estructura de varias proteínas como $G_{i\alpha 1}$ (Tesmer et al., 1997), trasducina (Sondek et al., 1994), el complejo Ras-RasGAP (Scheffzek et al., 1997) o RhoA (Rittinger et al., 1997) se han analizado en complejos con GDP y AlF_4^- , que se piensa imita al estado de transición pentavalente del nucleótido con fosfato γ , por lo que podría permitir la visualización de la conformación curvada del protofilamento de FtsZ.

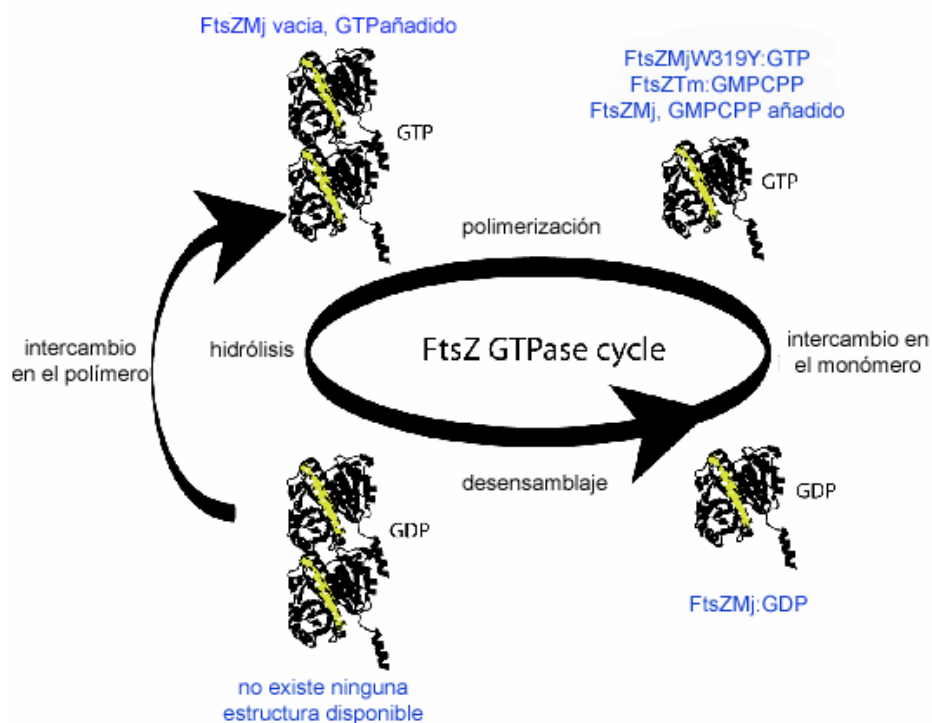


Figura 39: Esquema del ciclo de actividad GTPasa de FtsZ. Se muestran las estructuras disponibles referentes a los distintos estados conformacionales de la proteína. Como se puede apreciar en la figura uno de los principales estados de los que todavía se desconoce la estructura es el de GDP en el polímero. Sí se sabe que este estado es curvado en contraste con la coformación recta de la proteína ensamblada unida a GTP

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo, considerados en el contexto del conocimiento existente sobre FtsZ, han llevado a las siguientes conclusiones.

Sobre el plegamiento y la estabilidad de FtsZ

- 1.- La cadena polipeptídica de FtsZ *Methanococcus jannaschii* (FtsZMj) es capaz de plegar por si misma sin la ayuda de ninguna chaperona o cofactor (incluido el nucleótido) para adquirir su conformación nativa y funcional, a diferencia de lo observado con tubulina.
- 2.- Pequeñas modificaciones en la estructura química de FtsZMj como la mutación puntual W319Y, la adición de una cola de histidinas en su extremo C-terminal, o ambas modificaciones juntas, no inducen cambios en la estabilidad o la capacidad de plegar *in vitro* de la proteína.
- 3.- Las proteínas quiméricas, que incluyen los bucles T7, M y/o N, característicos de tubulina, sobre el núcleo común de las estructuras de FtsZ y tubulina, presentan cambios en la estabilidad de estas proteínas. El incremento en el número de inserciones acumuladas en FtsZ, influye en la adquisición de características del plegamiento y de estabilidad propias de tubulina.

Sobre el ensamblaje y la actividad GTPasa

- 4.- FtsZMj, al igual que FtsZ de otras especies, presenta un ensamblaje dinámico dependiente de GTP y Mg^{2+} , en el que la estabilidad de los polímeros formados depende de la hidrólisis del nucleótido.

- 5.- El ensamblaje de FtsZMj es cooperativo. La GTPasa se activa a partir de una concentración crítica de formación de los polímeros.
- 6.- La estabilidad de los polímeros de FtsZMj depende de la proporción de GDP/GTP en solución. La acumulación de GDP conduce al desensamblaje de los polímeros.
- 7.- La dinamicidad de los polímeros de FtsZMj se puede bloquear inhibiendo la hidrólisis del nucleótido. Este bloqueo se ha conseguido alterando la interfase longitudinal de contacto entre subunidades (mutación W319Y), y sustituyendo K^+ por Na^+ (cationes implicados en la modulación de la hidrólisis) en el tampón de ensamblaje.
- 8.- La mutación puntual W319Y o la cola de histidinas, inducen grandes cambios en las características funcionales de la proteína. La mutación W319Y, que inhibe la actividad GTPasa, disminuye la capacidad de la proteína de polimerizar. La cola de histidinas actúa favoreciendo artificialmente el ensamblaje de polímeros ordenados. Las dos modificaciones juntas generan un ensamblaje estable que da lugar a la formación de cristales bidimensionales.

Sobre la estructura de los polímeros de FtsZ

- 9.- Aunque el ensamblaje de FtsZ es polimórfico, en este trabajo se muestra, bajo condiciones bioquímicamente controladas, que la estructura básica en la polimerización de FtsZ es un filamento doble, constituidos por dos protofilamentos que discurren paralelamente y que son similares a los de tubulina, pero la asociación lateral entre ellos es diferente a la de los microtúbulos. Este filamento puede dar lugar a la formación de polímeros diferentes a través de distintas asociaciones laterales.

- 10.-** La inserción de bucles de tubulina, implicados en la formación de contactos laterales en el ensamblaje de microtúbulos, sobre el núcleo común FtsZ/tubulina, induce nuevas propiedades en el ensamblaje de FtsZ. Se forman polímeros cuya estructura es compatible con distorsiones en los contactos laterales entre protofilamentos.
- 11.-** La estructura cristalográfica de los protofilamentos muestra que FtsZ forma el mismo protofilamento que tubulina, en el que los contactos axiales que se forman entre monómeros consecutivos en el protofilamento son similares.

Sobre la hidrólisis de GTP y el cambio conformacional que induce el desensamblaje

- 12.-** La estructura del sitio activo de FtsZ, constituido por la interfase entre dos monómeros consecutivos en el protofilamento, confirma el papel de los residuos Asp235 y Asp238 en la hidrólisis del nucleótido. También permite señalar el papel de la Arg169 para estabilizar el estado de transición tras la hidrólisis del nucleótido.
- 13.-** El sitio de unión de nucleótido es accesible en el polímero. Podría haber intercambio de nucleótido sin necesidad de un paso previo de desensamblaje, a diferencia de los microtúbulos.
- 14.-** No existen diferencias estructurales significativas de FtsZ monoméricas con GTP, GDP o sin nucleótido unido. Sin embargo la inmersión de los cristales que contienen los protofilamentos de apo-FtsZ en una solución con GDP, provocó su disolución, probablemente debido a la incompatibilidad del cambio inducido con el empaquetamiento del cristal. Para observar este cambio conformacional inducido por la hidrólisis del nucleótido parece ser necesario estudiar el sitio de unión de nucleótido completo (incluyendo la

interfase entre dos monómeros), en lugar del sitio de unión de nucleótido en monómero.

BIBLIOGRAFÍA

Aarsman, M.E.; Piette, A.; Fraipont, C.; Vinkenvleugel, T.M.; Nguyen-Disteche, M.; den Blaauwen, T. (2005). Maturation of the *Escherichia coli* divisome occurs in two steps. *Mol Microbiol.* **55**(6):1631-45.

Adam, M.; Fraipont, C.; Rhazi, N.; Nguyen-Disteche, M.; Lakaye, B.; Frere, J.M.; Devreese, B.; Van Beeumen, J.; van Heijenoort, Y.; van Heijenoort, J.; Ghuysen, J.M. (1997). The bimodular G57-V577 polypeptide chain of the class B penicillin-binding protein 3 of *Escherichia coli* catalyzes peptide bond formation from thioesters and does not catalyze glycan chain polymerization from the lipid II intermediate. *J Bacteriol.* **179**(19):6005-9.

Addinall, S.G.; Bi, E.; Lutkenhaus, J. (1996). FtsZ ring formation in fts mutants. *J Bacteriol.* **178**(13):3877-84.

Addinall, S.G.; Lutkenhaus, J. (1996). FtsA is localized to the septum in a FtsZ-dependent manner. *J Bacteriol.* **178** (24): 7167-72

Addinall, S.G.; Cao, C.; Lutkenhaus, J. (1997). FtsN, a late recruit to the septum in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* **25** (2): 303-9.

Ahmadian, M.R.; Hoffmann, U.; Goody, R.S.; Wittinghofer, A. (1997). Individual rate constants for the interaction of Ras proteins with GTPase-activating proteins determined by fluorescence spectroscopy. *Biochemistry.* **36**(15):4535-41.

Anderson, D.E.; Gueiros-Filho, F.J.; Erickson, H.P. (2004). Assembly dynamics of FtsZ rings in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* and effects of FtsZ-regulating proteins. *J Bacteriol.* **186**(17):5775-81.

Andreu, J.M.; Oliva, M.A.; 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**(45):43262-70.

Ausmees, N.; Kuhn, J.R.; Jacobs-Wagner, C. (2003). The bacterial cytoskeleton: an intermediate filament-like function in cell shape. *Cell.* **115**(6):705-13.

Aussel, L.; Barre, F.X.; Aroyo, M.; Stasiak, A.; Stasiak, A.Z.; 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**(2):195-205.

Ayala, J.A.; Garrido, T.; de Pedro, M.A.; Vicente, M. (1994). Molecular biology of bacterial septation. In *Bacterial Cell Wall*. Ghuysu, J.M. Habenbeck, R. (eds). Elsevier Science: Amsterdam

Beech, P.L.; Nheu, T.; Schultz, T.; Herbert, S.; Lithgow, T.; Gilson, P.R.; McFadden, G.I. (2000). Mitochondrial FtsZ in a chromophyte alga. *Science*. **287**(5456):1276-9.

Begg, K.J.; Dewar, S.J.; Donachie, W.D. (1995). A new *Escherichia coli* cell division gene, ftsK. *J Bacteriol*. **177**(21):6211-22.

Ben-Yehuda, S.; Losick, R. (2002). Asymmetric cell division in *B. subtilis* involves a spiral-like intermediate of the cytokinetic protein FtsZ. *Cell*. **109**(2):257-66.

Bernhardt, T.G.; de Boer, P.A. (2003). The *Escherichia coli* amidase AmiC is a periplasmic septal ring component exported via the twin-arginine transport pathway. *Mol Microbiol*. **48**(5):1171-82.

Bertrand, S.; Barthelemy, I.; Oliva, M.A.; Carrascosa, J.L.; Andreu, J.M.; Valpuesta, J.M. (2005). Folding, stability and polymerization properties of FtsZ chimeras with inserted tubulin loops involved in the interaction with the cytosolic chaperonin CCT and in microtubule formation. *J Mol Biol*. **346**(1):319-30.

Bi, E.F.; Lutkenhaus, J. (1991). FtsZ ring structure associated with division in *Escherichia coli*. *Nature*. **354**(6349):161-4.

Bourne, H.R.; Sanders, D.A.; McCormick, F. (1991). The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature*. **349**(6305):117-27.

Bowler, L.D.; Spratt, B.G. Membrane topology of penicillin-binding protein 3 of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*. **3**(9):1277-86.

Bramhill, D.; Thompson, C.M. (1994). GTP-dependent polymerization of *Escherichia coli* FtsZ protein to form tubules. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **91**(13):5813-7.

Bramhill, D. (1997). Bacterial cell division. *Annu Rev Cell Dev Biol*. **13**:395-424. Review.

Brown, W.J.; Rockey, D.D. (2000). Identification of an antigen localized to an apparent septum within dividing chlamydiae. *Infect Immun*. **68**(2):708-15.

Buddelmeijer, N.; Aarsman, M.E.; Kolk, A.H.; Vicente, M.; Nanninga, N. (1998). Localization of cell division protein FtsQ by immunofluorescence microscopy in dividing and nondividing cells of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. **180**(23):6107-16.

Buddelmeijer, N.; Beckwith, J. (2002). Assembly of cell division proteins at the *E. coli* cell center. *Curr Opin Microbiol*. **5**(6):553-7.

Buddelmeijer, N.; Judson, N.; Boyd, D.; Mekalanos, J.J.; Beckwith, J. (2002). YgbQ, a cell division protein in *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae*, localizes in codependent fashion with FtsL to the division site. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **99**(9):6316-21.

Buddelmeijer, N.; 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**(5):1315-27.

Caldas, T.; Binet, E.; Boulloc, P.; Costa, A.; Desgres, J.; Richarme, G. (2000). The FtsJ/RrmJ heat shock protein of *Escherichia coli* is a 23 S ribosomal RNA methyltransferase. *J Biol Chem*. **275**(22):16414-9.

Caplan, M.R.; Erickson, H.P. (2003). Apparent cooperative assembly of the bacterial cell division protein FtsZ demonstrated by isothermal titration calorimetry. *J Biol Chem*. **278**(16):13784-8.

Caplow, M ; Shanks, J.; Ruhlen, N. (1994). How taxol modulates microtubule disassembly. *J Biol Chem*. **269**(38):23399-402.

Carballido-Lopez, R.; Errington, J. (2003). The bacterial cytoskeleton: *in vivo* dynamics of the actin-like protein Mbl of *Bacillus subtilis*. *Dev Cell*. **4**(1):19-28.

Carson, M.J.; Barondess, J.; Beckwith, J. (1991). The FtsQ protein of *Escherichia coli*: membrane topology, abundance, and cell division phenotypes due to overproduction and insertion mutations. *J Bacteriol*. **173**(7):2187-95.

Chen, J.C.; Weiss, D.S.; Ghigo, J.M.; Beckwith, J. (1999). Septal localization of FtsQ, an essential cell division protein in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. **181**(2):521-30.

Chen, Y.; Bjornson, K.; Redick, S.D.; Erickson, H.P. (2005). A rapid fluorescence assay for FtsZ assembly indicates cooperative assembly with a dimer nucleus. *Biophys J*. **88**(1):505-14.

Corbin, B.D.; Geissler, B.; Sadasivam, M.; Margolin, W. (2004). Z-ring-independent interaction between a subdomain of FtsA and late septation proteins as revealed by a polar recruitment assay. *J Bacteriol*. **186**(22):7736-44.

Cordell, S.C., Robinson, E.J.; Löwe J. (2003). Crystal structure of the SOS cell division inhibitor Sula and in complex with FtsZ. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **100**(13):7889-94.

Corre, J.; Louarn, J.M. (2002). Evidence from terminal recombination gradients that FtsK uses replicore polarity to control chromosome terminus positioning at division in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. **184**(14):3801-7.

Correia, J.J.; Baty, L.T.; Williams, R.C. Jr. (1987). Mg²⁺ dependence of guanine nucleotide binding to tubulin. *J Biol Chem.* **262**(36):17278-84.

Cowan, N.J.; Lewis, S.A. (2001). Type II chaperonins, prefoldin, and the tubulin-specific chaperones. *Adv Protein Chem.* **59**:73-104.

Crowther, R.A.; Henderson, R.; Smith, J.M. (1996). MRC image processing programs. *J Struct Biol.* **116**(1):9-16.

Dai, K.; Xu, Y.; Lutkenhaus, J. (1996). Topological characterization of the essential *Escherichia coli* cell division protein FtsN. *J Bacteriol.* **178**(5): 1328-34.

Dandekar, T.; Snel, B.; Huynen, M.; Bork, P. (1998). Conservation of gene order: a fingerprint of proteins that physically interact. *Trends Biochem Sci.* **23**(9):324-8.

Daniel, R.A.; Harry, E.J.; Katis, V.L.; Wake, R.G.; Errington, J. (1998). Characterization of the essential cell division gene ftsL(yIIID) of *Bacillus subtilis* and its role in the assembly of the division apparatus. *Mol Microbiol.* **29**(2):593-604.

Daniel, R.A.; Errington, J. (2000). Intrinsic instability of the essential cell division protein FtsL of *Bacillus subtilis* and a role for DivIB protein in FtsL turnover. *Mol Microbiol.* **36**(2):278-89.

Daumke, O.; Weyand, M.; Chakrabarti, P.P.; Vetter, I.R.; Wittinghofer, A. (2004). The GTPase-activating protein Rap1GAP uses a catalytic asparagine. *Nature.* **429**(6988):197-201.

de Boer, P.A.; Crossley, R.E.; Rothfield, L.I. (1992). Roles of MinC and MinD in the site-specific septation block mediated by the MinCDE system of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **174**(1):63-70.

de Leeuw, E.; Graham, B.; Phillips, G.J.; ten Hagen-Jongman, C.M.; Oudega, B.; Luirink, J. (1999). Molecular characterization of *Escherichia coli* FtsE and FtsX. *Mol Microbiol.* **31**(3):983-93.

de Pereda, J.M.; Leynadier, D.; Evangelio, J.A.; Chacon, P.; Andreu, J.M.; (1996). Tubulin secondary structure analysis, limited proteolysis sites, and homology to FtsZ. *Biochemistry.* **35**(45):14203-15.

de Pereda, J.M.; Andreu, J.M. (1996). Mapping surface sequences of the tubulin dimer and taxol-induced microtubules with limited proteolysis. *Biochemistry.* **35**(45):14184-202.

den Blaauwen, T.; Buddelmeijer, N.; Aarsman, M.E.; Hameete, C.M.; Nanninga, N. (1999). Timing of FtsZ assembly in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **181**(17):5167-75.

Diaz, J.F.; Andreu, J.M. (1993). Assembly of purified GDP-tubulin into microtubules induced by taxol and taxotere: reversibility, ligand stoichiometry, and competition. *Biochemistry.* **32**(11):2747-55.

Diaz, J.F.; Kralicek, A.; Mingorance, J.; Palacios, J.M.; Vicente, M.; Andreu, J.M. (2001). Activation of cell division protein FtsZ. Control of switch loop T3 conformation by the nucleotide gamma-phosphate. *J Biol Chem.* **276**(20):17307-15.

Di Lallo, G.; Fagioli, M.; Barionovi, D.; Ghelardini, P.; Paolozzi, L. (2003). Use of a two-hybrid assay to study the assembly of a complex multicomponent protein machinery: bacterial septosome differentiation. *Microbiology.* **149**(Pt 12):3353-9.

Dobrzynski, J.K.; Sternlicht, M.L.; Farr, G.W.; Sternlicht, H. (1996). Newly-synthesized beta-tubulin demonstrates domain-specific interactions with the cytosolic chaperonin. *Biochemistry.* **35**(49):15870-82.

Dobrzynski, J.K.; Sternlicht, M.L.; Peng, I.; Farr, G.W.; Sternlicht, H. (2000). Evidence that beta-tubulin induces a conformation change in the cytosolic chaperonin which stabilizes binding: implications for the mechanism of action. *Biochemistry.* **39**(14):3988-4003.

Donachie, W.D.; Begg, K.J. (1990). Genes and the replication cycle of *Escherichia coli*. *Res Microbiol.* **141**(1):64-75.

Dorazi, R.; Dewar, S.J. (2000). Membrane topology of the N-terminus of the *Escherichia coli* FtsK division protein. *FEBS Lett.* **478**(1-2):13-8.

Dougherty, T.J.; Kennedy, K.; Kessler, R.E.; Pucci, M.J. (1996). Direct quantitation of the number of individual penicillin-binding proteins per cell in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **178**(21):6110-5.

Edman, P. (1960). Phenylthiohydantoins in protein analysis. *Ann N Y Acad Sci.* **88**:602-10.

Egea, P.F.; Shan, S.O.; Napetschnig, J.; Savage, D.F.; Walter, P.; Stroud, R.M. (2004). Substrate twinning activates the signal recognition particle and its receptor. *Nature.* **427**(6971):215-21.

Erickson, H.P. (1995). FtsZ, a prokaryotic homolog of tubulin?. *Cell.* **80**(3):367-70.

Erickson, H.P.; Taylor, D.W.; Taylor, K.A.; Bramhill, D. (1996). Bacterial cell division protein FtsZ assembles into protofilament sheets and minirings, structural homologs of tubulin polymers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **93**(1):519-23.

Erickson, H.P. (1997). Stretching single protein molecules: titin is a weird spring. *Science*. **276**(5315):1090-2.

Errington, J; Daniel, R.A; Scheffers, D.J. (2003). Cytokinesis in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*. **67**(1):52-65.

Errington. J. (2003). Dynamic proteins and a cytoskeleton in bacteria. *Nat Cell Biol*. **5**(3):175-8.

Espeli, O.; Lee, C.; Marians, K.J. (2003). A physical and functional interaction between *Escherichia coli* FtsK and topoisomerase IV. *J Biol Chem*. **278**(45):44639-44.

Fasman, G. D. (ed) (1992) *Practical Handbook of Biochemistry and Molecular Biology*, pp. 81–83, CRC Press Inc., Boca Raton, FL

Fischer, B.; Rummel, G.; Aldridge P.; Jenal, U. (2002). The FtsH protease is involved in development, stress response and heat shock control in *Caulobacter crescentus*. *Mol Microbiol*. **44**(2):461-78.

Fitz-Gibbon, S.T.; Ladner, H.; Kim, U.J.; Stetter, K.O.; Simon, M.I.; Miller, J.H. (2002). Genome sequence of the hyperthermophilic crenarchaeon *Pyrobaculum aerophilum*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **99**(2):984-9.

Flardh, K.; Palacios, P.; Vicente, M. (1998). Cell division genes ftsQAZ in *Escherichia coli* require distant cis-acting signals upstream of ddlB for full expression. *Mol Microbiol*. **30**(2):305-15.

Focia, P.J.; Shepotinovskaya, I.V.; Seidler, J.A.; Freymann, D.M. (2004). Heterodimeric GTPase core of the SRP targeting complex. *Science*. **303**(5656):373-7.

Fontalba, A.; Paciucci, R.; Avila, J.; Zabala, J.C. (1993). Incorporation of tubulin subunits into dimers requires GTP hydrolysis. *J Cell Sci*. **106** (Pt 2):627-32.

Fu, X.; Shih, Y.L.; Zhang, Y.; Rothfield, L.I. (2001). The MinE ring required for proper placement of the division site is a mobile structure that changes its cellular location during the *Escherichia coli* division cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **98**(3):980-5.

Fujiwara, M.; Yoshida, S. (2001). Chloroplast targeting of chloroplast division FtsZ2 proteins in *Arabidopsis*. *Biochem Biophys Res Commun*. **287**(2):462-7.

Gao, Y.; Thomas, J.O.; Chow, R.L.; Lee, G.H.; Cowan, N.J. (1992). A cytoplasmic chaperonin that catalyzes beta-actin folding. *Cell*. **69**(6):1043-50.

Gao, Y.; Melki, R.; Walden, P.D.; Lewis, S.A.; Ampe, C.; Rommelaere, H.; Vandekerckhove, J.; Cowan, N.J. (1994). A novel cochaperonin that modulates the ATPase activity of cytoplasmic chaperonin. *J Cell Biol*. **125**(5):989-96.

Gao, X.; Wen, X.; Esser, L.; Quinn, B.; Yu, L.; Yu, C.A.; Xia, D. (2003). Structural basis for the quinone reduction in the bc1 complex: a comparative analysis of crystal structures of mitochondrial cytochrome bc1 with bound substrate and inhibitors at the Qi site. *Biochemistry*. **42**(30):9067-80.

Garner, E.C.; Campbell, C.S.; Mullins, R.D. (2004). Dynamic instability in a DNA-segregating prokaryotic actin homolog. *Science*. **306**(5698):1021-5.

Gerard, P.; Vernet, T.; Zapun, A. (2002). Membrane topology of the *Streptococcus pneumoniae* FtsW division protein. *J Bacteriol*. **184**(7):1925-31.

Ghigo, J.M.; Weiss, D.S.; Chen, J.C.; Yarrow, J.C.; Beckwith, J. (1999). Localization of FtsL to the *Escherichia coli* septal ring. *Mol Microbiol*. **31**(2):725-37.

Gill, D.R.; Salmond, G.P. (1990). The identification of the *Escherichia coli* ftsY gene product: an unusual protein. *Mol Microbiol*. **4**(4):575-83.

Glass, J.I.; Lefkowitz, E.J.; Glass, J.S.; Heiner, C.R.; Chen, E.Y.; Cassell, G.H. (2000). The complete sequence of the mucosal pathogen *Ureaplasma urealyticum*. *Nature*. **407**(6805):757-62.

Glockner, F.O.; Kube, M.; Bauer, M.; Teeling, H.; Lombardot, T.; Ludwig, W.; Gade, D.; Beck, A.; Borzym, K.; Heitmann, K.; Rabus, R.; Schlesner, H.; Amann, R.; Reinhardt, R. (2003). Complete genome sequence of the marine planctomycete *Pirellula* sp. strain 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **100**(14):8298-303.

Goehring, N.W.; Gueiros-Filho, F.; Beckwith, J. (2005). Premature targeting of a cell division protein to midcell allows dissection of divisome assembly in *Escherichia coli*. *Genes Dev*. **19**(1):127-37.

Goffin, C.; Ghuysen, J.M. (1998). Multimodular penicillin-binding proteins: an enigmatic family of orthologs and paralogs. *Microbiol Mol Biol Rev*. **62**(4):1079-93.

Gonzalez, J.M.; Jimenez, M.; Velez, M.; Mingorance, J.; Andreu, J.M.; Vicente, M.; Rivas, G. (2003). Essential cell division protein FtsZ assembles into one

monomer-thick ribbons under conditions resembling the crowded intracellular environment. *J Biol Chem.* **278**(39):37664-71.

Gueiros-Filho, F.J.; Losick, R. (2002). A widely conserved bacterial cell division protein that promotes assembly of the tubulin-like protein FtsZ. *Genes Dev.* **16**(19):2544-56.

Guha, S.; Bhattacharyya, B. (1997). Refolding of urea-denatured tubulin: recovery of nativelike structure and colchicine binding activity from partly unfolded states. *Biochemistry.* **36**(43):13208-13.

Guzman, L.M.; Weiss, D.S.; Beckwith, J. (1997). Domain-swapping analysis of FtsI, FtsL, and FtsQ, bitopic membrane proteins essential for cell division in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **179**(16):5094-103.

Haeusser, D.P.; Schwartz, R.L.; Smith, A.M.; Oates, M.E.; Levin, P.A. (2004). EzrA prevents aberrant cell division by modulating assembly of the cytoskeletal protein FtsZ. *Mol Microbiol.* **52**(3):801-14.

Hale, C.A.; de Boer, P.A. (1997). Direct binding of FtsZ to ZipA, an essential component of the septal ring structure that mediates cell division in *E. coli*. *Cell.* **88**(2):175-85.

Hale, C.A.; 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**(1):167-76.

Hale, C.A.; Rhee, A.C.; de Boer, P.A. (2000). ZipA-induced bundling of FtsZ polymers mediated by an interaction between C-terminal domains. *J Bacteriol.* **182**(18):5153-66.

Hale, C.A.; Meinhardt, H.; de Boer, P.A. (2001). Dynamic localization cycle of the cell division regulator MinE in *Escherichia coli*. *EMBO J.* **20**(7):1563-72.

Haney, S.A.; Glasfeld, E.; Hale, C.; Keeney, D.; He, Z.; de Boer, P. (2001). Genetic analysis of the *Escherichia coli* FtsZ.ZipA interaction in the yeast two-hybrid system. Characterization of FtsZ residues essential for the interactions with ZipA and with FtsA. *J Biol Chem.* **276**(15):11980-7.

Hansen, W.J.; Cowan, N.J.; Welch, W.J. (1999). Prefoldin-nascent chain complexes in the folding of cytoskeletal proteins. *J Cell Biol.* **145**(2):265-77.

Hara, H.; Yasuda, S.; Horiuchi, K.; Park, J.T. (1997). A promoter for the first nine genes of the *Escherichia coli* mra cluster of cell division and cell envelope biosynthesis genes, including ftsI and ftsW. *J Bacteriol.* **179**(18):5802-11.

Hardt, S.; Wang, B.; Schmid, M.F. (1996). A brief description of I.C.E.: the integrated crystallographic environment. *J Struct Biol.* **116**(1):68-70.

Harry, E.J. (2001). Bacterial cell division: regulating Z-ring formation. *Mol Microbiol.* **40**(4):795-803.

Heidrich, C.; Templin, M.F.; Ursinus, A.; Merdanovic, M.; Berger, J.; Schwarz, H.; de Pedro, M.A.; Holtje, J.V. (2001). Involvement of N-acetylmuramyl-L-alanine amidases in cell separation and antibiotic-induced autolysis of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* **41**(1):167-78.

Henriques, N.B.; Normark, S. (2002). Antibiotic tolerance in pneumococci. *Clin Microbiol Infect.* **8**(10):613-22.

Hirota, Y.; Riter, A.; Jacob, F. (1968). Thermosensitive mutants of *E. coli* affected in the processes of DNA synthesis and cellular division. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* **33**:677-93.

Houry, W.A.; Frishman, D.; Eckerskorn, C.; Lottspeich, F.; Hartl, F.U. (1999). Identification of *in vivo* substrates of the chaperonin GroEL. *Nature.* **402**(6758):147-54.

Howard, M.; Rutenberg, A.D.; de Vet, S. (2001). Dynamic compartmentalization of bacteria: accurate division in *E. coli*. *Phys Rev Lett.* **87**(27 Pt 1):278102.

Howard, M. (2004). A mechanism for polar protein localization in bacteria. *J Mol Biol.* **335**(2):655-63.

Hu, Z.; Lutkenhaus, J. (1999). Topological regulation of cell division in *Escherichia coli* involves rapid pole to pole oscillation of the division inhibitor MinC under the control of MinD and MinE. *Mol Microbiol.* **34**(1):82-90.

Hu, Z.; Mukherjee, A.; Pichoff, S.; 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**(26):14819-24.

Hu, Z.; Lutkenhaus, J. (2001). Topological regulation of cell division in *E. coli*. spatiotemporal oscillation of MinD requires stimulation of its ATPase by MinE and phospholipid. *Mol Cell.* **7**(6):1337-43.

Huecas, S.; Andreu, J.M. (2003). Energetics of the cooperative assembly of cell division protein FtsZ and the nucleotide hydrolysis switch. *J Biol Chem.* **278**(46):46146-54.

Huecas, S.; Andreu, J.M. (2004). Polymerization of nucleotide-free, GDP- and GTP-bound cell division protein FtsZ: GDP makes the difference. *FEBS Lett.* **569**(1-3):43-8.

Hyman, A.A.; Salser, S.; Drechsel, D.N.; Unwin, N.; Mitchison, T.J. (1992). Role of GTP hydrolysis in microtubule dynamics: information from a slowly hydrolyzable analogue, GMPCPP. *Mol Biol Cell.* **3**(10):1155-67.

Hyman, A.A.; Chretien, D.; Arnal, I.; Wade, R.H. (1995). Structural changes accompanying GTP hydrolysis in microtubules: information from a slowly hydrolyzable analogue guanylyl-(alpha,beta)-methylene-diphosphonate. *J Cell Biol.* **128**(1-2):117-25.

Ikeda, M.; Sato, T.; Wachi, M.; Jung, H.K.; Ishino, F.; Kobayashi, Y.; Matsubashi, M. (1989). Structural similarity among *Escherichia coli* FtsW and RodA proteins and *Bacillus subtilis* SpoVE protein, which function in cell division, cell elongation, and spore formation, respectively. *J Bacteriol.* **171**(11):6375-8.

Ize, B.; Stanley, N.R.; Buchanan, G.; Palmer, T. (2003). Role of the *Escherichia coli* Tat pathway in outer membrane integrity. *Mol Microbiol.* **48**(5):1183-93.

Jimenez, M.A.; Evangelio, J.A.; Aranda, C.; Lopez-Brauet, A.; Andreu, D.; Rico, M.; Lagos, R.; Andreu, J.M.; Monasterio, O. (1999). Helicity of alpha(404-451) and beta(394-445) tubulin C-terminal recombinant peptides. *Protein Sci.* **8**(4):788-99.

Jones, L.J.; Carballido-Lopez, R.; Errington, J. (2001). Control of cell shape in bacteria: helical, actin-like filaments in *Bacillus subtilis*. *Cell.* **104**(6):913-22.

Katis, V.L.; Wake, R.G.; 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**(12):3607-11.

Kawarabayashi, Y.; Hino, Y.; Horikawa, H.; Jin-no, K.; Takahashi, M.; Sekine, M.; Baba, S.; Ankai, A.; Kosugi, H.; Hosoyama, A.; Fukui, S.; Nagai, Y.; Nishijima, K.; Otsuka, R.; Nakazawa, H.; Takamiya, M.; Kato, Y.; Yoshizawa, T.; Tanaka, T.; Kudoh, Y.; Yamazaki, J.; Kushida, N.; Oguchi, A.; Aoki, K.; Masuda, S.; Yanagii, M.; Nishimura, M.; Yamagishi, A.; Oshima, T.; Kikuchi, H. (2001). Complete genome sequence of an aerobic thermoacidophilic crenarchaeon, *Sulfolobus tokodaii* strain 7. *DNA Res.* **8**(4):123-40.

Kiefel, B.R.; Gilson, P.R.; Beech, P.L. (2004). Diverse eukaryotes have retained mitochondrial homologues of the bacterial division protein FtsZ. *Protist.* **155**(1):105-15.

Kiessling, J.; Kruse, S.; Rensing, S.A.; Harter, K.; Decker, E.L.; Reski, R. (2000). Visualization of a cytoskeleton-like FtsZ network in chloroplasts. *J Cell Biol.* **151**(4):945-50.

Kiessling, J.; Martin, A.; Gremillon, L.; Rensing, S.A.; Nick, P.; Sarnighausen, E.; Decker, E.L.; Reski, R. (2004). Dual targeting of plastid division protein FtsZ to chloroplasts and the cytoplasm. *EMBO Rep.* **5**(9):889-94.

Krebs, A.; Goldie, K.N.; Hoenger, A. (2005). Structural rearrangements in tubulin following microtubule formation. *EMBO Rep.* **6**(3):227-32.

Kruse, K. (2002). A dynamic model for determining the middle of *Escherichia coli*. *Biophys J.* **82**(2):618-27.

Lara, B.; Ayala, J.A. (2002). Topological characterization of the essential *Escherichia coli* cell division protein FtsW. *FEMS Microbiol Lett.* **216**(1):23-32.

Lau, I.F.; Filipe, S.R.; Soballe, B.; Okstad, O.A.; Barre, F.X.; Sherratt, D.J. (2003). Spatial and temporal organization of replicating *Escherichia coli* chromosomes. *Mol Microbiol.* **49**(3):731-43.

Levin, P.A.; Kurtser, I.G.; 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**(17):9642-7.

Li, H.; DeRosier, D.J.; Nicholson, W.V.; Nogales, E.; Downing, K.H. (2002). Microtubule structure at 8 Å resolution. *Structure (Camb).* **10**(10):1317-28.

Liou, A.K.; Willison, K.R. (1997). Elucidation of the subunit orientation in CCT (chaperonin containing TCP1) from the subunit composition of CCT micro-complexes. *EMBO J.* **16**(14):4311-6.

Llorca, O.; Martin-Benito, J.; Ritco-Vonsovici, M.; Grantham, J.; Hynes, G.M.; Willison, K.R.; Carrascosa, J.L.; Valpuesta, J.M. (2000). Eukaryotic chaperonin CCT stabilizes actin and tubulin folding intermediates in open quasi-native conformations. *EMBO J.* **19**(22):5971-9.

Llorca, O.; Martin-Benito, J.; Gomez-Puertas, P.; Ritco-Vonsovici, M.; Willison, K.R.; Carrascosa, J.L.; Valpuesta, J.M. (2001). Analysis of the interaction between the eukaryotic chaperonin CCT and its substrates actin and tubulin. *J Struct Biol.* **135**(2):205-18.

Lopez-Fanarraga, M.; Avila, J.; Guasch, A.; Coll, M.; Zabala, J.C. (2001). Postchaperonin tubulin folding cofactors and their role in microtubule dynamics. *J Struct Biol.* **135**(2):219-29.

Low, H.H.; Moncrieffe, M.C.; Löwe, J. (2004). The crystal structure of ZapA and its modulation of FtsZ polymerisation. *J Mol Biol.* **341**(3):839-52.

Löwe, J.; Amos, L.A. (1998). Crystal structure of the bacterial cell-division protein FtsZ. *Nature.* **391**(6663):203-6.

Löwe, J.; Amos, L.A. (1999). Tubulin-like protofilaments in Ca²⁺-induced FtsZ sheets. *EMBO J.* **18**(9):2364-71.

Löwe, J.; Amos, L.A. (2000). Helical tubes of FtsZ from *Methanococcus jannaschii*. *J Biol Chem.* **381**(9-10):993-9.

Löwe, J.; Li, H.; Downing, K.H.; Nogales, E. (2001). Refined structure of alpha beta-tubulin at 3.5 Å resolution. *J Mol Biol.* **313**(5):1045-57.

Lu, C.; Stricker, J.; Erickson, H.P. (1998). FtsZ from *Escherichia coli*, *Azotobacter vinelandii*, and *Thermotoga maritima*-quantitation, GTP hydrolysis, and assembly. *Cell Motil Cytoskeleton.* **40**(1):71-86.

Lu, C.; Reedy, M.; Erickson, H.P. (2000) Straight and curved conformations of FtsZ are regulated by GTP hydrolysis. *J Bacteriol.* **182**(1):164-70.

Lutkenhaus, J.; Addinall, S.G. (1997) Bacterial cell division and the Z ring. *Annu Rev Biochem.* **66**:93-116.

Ma, X.; Ehrhardt, D.W.; 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**(23):12998-3003.

Ma, X.; Sun, Q.; Wang, R.; Singh, G.; Jonietz, E.L.; Margolin, W. (1997). Interactions between heterologous FtsA and FtsZ proteins at the FtsZ ring. *J Bacteriol.* **179**(21):6788-97.

Maniatis, T.; Fritsch, F.; Sambrook, J. (1982). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold spring harbor. NY.

Marabini, R.; Masegosa, I.M.; San Martin, M.C.; Marco, S.; Fernandez, J.J.; de la Fraga, L.G.; Vaquerizo, C.; Carazo, J.M. (1996). Xmipp: An Image Processing Package for Electron Microscopy. *J Struct Biol.* **116**(1):237-40.

Marco, S.; Carrascosa, J.L.; Valpuesta, J.M. (1994). Reversible interaction of beta-actin along the channel of the TCP-1 cytoplasmic chaperonin. *Biophys J.* **67**(1):364-8.

Margolin, W. (2000). Themes and variations in prokaryotic cell division. *FEMS Microbiol Rev.* **24**(4):531-48.

Margolin, W. (2001). Spatial regulation of cytokinesis in bacteria. *Curr Opin Microbiol.* **4**(6):647-52.

Marston, A.L.; Thomaides, H.B.; Edwards, D.H.; Sharpe, M.E.; Errington, J. (1998). Polar localization of the MinD protein of *Bacillus subtilis* and its role in selection of the mid-cell division site. *Genes Dev.* **12**(21):3419-30.

Massey, T.H.; Aussel, L.; Barre, F.X.; Sherratt, D.J. (2004). Asymmetric activation of Xer site-specific recombination by FtsK. *EMBO Rep.* **5**(4):399-404.

McAndrew, R.S.; Froehlich, J.E.; Vitha, S.; Stokes, K.D.; Osteryoung, K.W. (2001). Colocalization of plastid division proteins in the chloroplast stromal compartment establishes a new functional relationship between FtsZ1 and FtsZ2 in higher plants. *Plant Physiol.* **127**(4):1656-66.

McFadden, G.I. (1999). Endosymbiosis and evolution of the plant cell. *Curr Opin Plant Biol.* **2**(6):513-9.

McPherson A. (1999). Crystallization of Biological Macromolecules. CSHL Press, New York.

Meinhardt, H.; de Boer, P.A. (2001) Pattern formation in *Escherichia coli*: a model for the pole-to-pole oscillations of Min proteins and the localization of the division site. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**(25):14202-7.

Menéndez, M.; Rivas, G.; Díaz, J.F.; Andreu, J.M. (1998). Control of the structural stability of the tubulin dimer by one high affinity bound magnesium ion at nucleotide N-site. *J Biol Chem.* **273**(1):167-76.

Mengin-Lecreulx, D.; Ayala, J.; Bouhss, A.; van Heijenoort, J.; Parquet, C.; Hara, H. (1998). Contribution of the PmrA promoter to expression of genes in the *Escherichia coli* mra cluster of cell envelope biosynthesis and cell division genes. *J Bacteriol.* **180**(17):4406-12.

Mercer, K.L.; Weiss, D.S. (2002). The *Escherichia coli* cell division protein FtsW is required to recruit its cognate transpeptidase, FtsI (PBP3), to the division site. *J Bacteriol.* **184**(4):904-12.

Meurer-Grob, P.; Kasparian, J.; Wade, R.H. (2001). Microtubule structure at improved resolution. *Biochemistry.* **40**(27):8000-8.

Mingorance, J.; Rueda, S.; Gomez-Puertas, P.; Valencia, A.; Vicente, M. (2001). *Escherichia coli* FtsZ polymers contain mostly GTP and have a high nucleotide turnover. *Mol Microbiol.* **41**(1):83-91.

Mitchison, T.; Kirschner, M. (1984). Dynamic instability of microtubule growth. *Nature*. **312**(5991):237-42.

Miyagishima, S.; Kuroiwa, H.; Kuroiwa, T. (2001). The timing and manner of disassembly of the apparatuses for chloroplast and mitochondrial division in the red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *Planta*. **212**(4):517-28.

Miyagishima, S.Y.; Nishida, K.; Mori, T.; Matsuzaki, M.; Higashiyama, T.; Kuroiwa, H.; Kuroiwa, T. (2003). A plant-specific dynamin-related protein forms a ring at the chloroplast division site. *Plant Cell*. **15**(3):655-65.

Mori, T.; Kuroiwa, H.; Takahara, M.; Miyagishima, S.Y.; Kuroiwa, T. (2001). Visualization of an FtsZ ring in chloroplasts of *Lilium longiflorum* leaves. *Plant Cell Physiol*. **42**(6):555-9.

Mosyak, L.; Zhang, Y.; Glasfeld, E.; Haney, S.; Stahl, M.; Seehra, J.; 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**(13):3179-91.

Mukherjee, A; Dai, K.; Lutkenhaus, J. (1993). *Escherichia coli* cell division protein FtsZ is a guanine nucleotide binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **90**(3):1053-7.

Mukherjee, A.; Lutkenhaus, J. (1994). Guanine nucleotide-dependent assembly of FtsZ into filaments. *J Bacteriol*. **176**(9):2754-8.

Mukherjee, A; Lutkenhaus, J (1998). Dynamic assembly of FtsZ regulated by GTP hydrolysis. *EMBO J*. **17**(2):462-9.

Mukherjee, A.; Cao, C.; Lutkenhaus, J. (1998). Inhibition of FtsZ polymerization by Sula, an inhibitor of septation in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **95**(6):2885-90.

Mukherjee, A; Lutkenhaus, J (1999). Analysis of FtsZ assembly by light scattering and determination of the role of divalent metal cations. *J Bacteriol*. **181**(3):823-32.

Mulder, E.; Woldringh, C.L. (1989). Actively replicating nucleoids influence positioning of division sites in *Escherichia coli* filaments forming cells lacking DNA. *J Bacteriol*. **171**(8):4303-14.

Nanninga, N (1998). Morphogenesis of *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev*. **62**(1):110-29. Review.

Natale, D.A.; Shankavaram, U.T.; Galperin, M.Y.; Wolf, Y.I.; Aravind, L.; Koonin, E.V. (2000). Towards understanding the first genome sequence of a

crenarchaeon by genome annotation using clusters of orthologous groups of proteins (COGs). *Genome Biol.* **1**(5):RESEARCH0009.

Nishida, K.; Takahara, M.; Miyagishima, S.Y.; Kuroiwa, H.; Matsuzaki, M.; Kuroiwa, T. (2003). Dynamic recruitment of dynamin for final mitochondrial severance in a primitive red alga. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100**(4):2146-51.

Nishida, K.; Misumi, O.; Yagisawa, F.; Kuroiwa, H.; Nagata, T.; Kuroiwa, T. (2004). Triple immunofluorescent labeling of FtsZ, dynamin, and EF-Tu reveals a loose association between the inner and outer membrane mitochondrial division machinery in the red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *J Histochem Cytochem.* **52**(7):843-9.

Noirclerc-Savoye, M.; Le Gouellec, A.; Morlot, C.; Dideberg, O.; Vernet, T.; Zapun, A. (2005). In vitro reconstitution of a trimeric complex of DivIB, DivIC and FtsL, and their transient co-localization at the division site in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol.* **55**(2):413-24.

Nogales, E.; Wolf, S.G.; Downing, K.H. (1998). Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography. *Nature.* **391**(6663):199-203. **a**

Nogales, E.; Downing, K.H.; Amos, L.A.; Löwe, J. (1998). Tubulin and FtsZ form a distinct family of GTPases. *Nat Struct Biol.* **5**(6):451-8. **b**

Nogales, E.; Whittaker, M.; Milligan, R.A.; Downing, K.H. (1999). High-resolution model of the microtubule. *Cell.* **96**(1):79-88.

Nogales, E. (2000). Structural insights into microtubule function. *Annu Rev Biochem.* **69**:277-302.

Nogales, E.; Wang, H.W.; Niederstrasser, H. (2003). Tubulin rings: which way do they curve?. *Curr Opin Struct Biol.* **13**(2):256-61.

Ogura, T.; Tomoyasu, T.; Yuki, T.; Morimura, S.; Begg, K.J.; Donachie, W.D.; Mori, H.; Niki, H.; Hiraga, S. (1991). Structure and function of the ftsH gene in *Escherichia coli*. *Res Microbiol.* **142**(2-3):279-82.

Ohashi, T.; Hale, C.A.; de Boer, P.A.; 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**(15):4313-5.

Oliva, M.A.; Huecas, S.; Palacios, J.M.; Martin-Benito, J.; Valpuesta, J.M.; Andreu, J.M. (2003). Assembly of archaeal cell division protein FtsZ and a GTPase-inactive mutant into double-stranded filaments. *J Biol Chem.* **278**(35):33562-70.

Oliva, M.A.; Cordell, S.C.; Löwe, J. (2004). Structural insights into FtsZ protofilament formation. *Nat Struct Mol Biol.* **11**(12):1243-50.

Osteryoung, K.W.; Vierling, E. (1995). Conserved cell and organelle division. *Nature.* **376**(6540):473-4.

Osteryoung, K.W.; Stokes, K.D.; Rutherford, S.M.; Percival, A.L.; Lee, W.Y. (1998). Chloroplast division in higher plants requires members of two functionally divergent gene families with homology to bacterial ftsZ. *Plant Cell.* **10**(12):1991-2004

Osteryoung, K.W.; McAndrews, R.S. (2001). THE PLASTID DIVISION MACHINE. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* **52**:315-333.

Osteryoung, K.W.; Nunnari, J. (2003). The division of endosymbiotic organelles. *Science.* **302**(5651):1698-704.

Pace, C.N. (1975). The stability of globular proteins. *CRC Crit Rev Biochem.* **3**(1):1-43.

Pace, C. N., and Scholtz, J. M. (1997) in *Protein Structure, a Practical Approach*. (Creighton, T. E., ed) 2nd Ed., pp. 299–321, Oxford University Press, Oxford.

Park, J.T. (1996). The murein sacculus in *E. coli* and *Salmonella*. Vol.1 Neidhardt, F.C. et al (eds). pp 48, 57. Washington DC: American Society for Microbiology Press.

Pastoret, S.; Fraipont, C.; den Blaauwen, T.; Wolf, B.; Aarsman, M.E.; Piette, A.; Thomas, A.; Brasseur, R.; Nguyen-Disteche, M. (2004). Functional analysis of the cell division protein FtsW of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **186**(24):8370-9.

Pichoff, S.; Lutkenhaus, J. (2002). Unique and overlapping roles for ZipA and FtsA in septal ring assembly in *Escherichia coli*. *EMBO J.* **21**(4):685-93.

Pichoff, S.; Lutkenhaus, J. (2005). Tethering the Z ring to the membrane through a conserved membrane targeting sequence in FtsA. *Mol Microbiol.* **55**(6):1722-34.

Raskin, D.M.; de Boer, P.A. (1997). The MinE ring: an FtsZ-independent cell structure required for selection of the correct division site in *E. coli*. *Cell.* **91**(5):685-94.

Raskin, D.M.; de Boer, P.A (1999). Rapid pole-to-pole oscillation of a protein required for directing division to the middle of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**(9):4971-6.

Ravelli, R.B.; Gigant, B.; Curmi, P.A.; Jourdain, I.; Lachkar, S.; Sobel, A.; Knossow, M. (2004). Insight into tubulin regulation from a complex with colchicine and a stathmin-like domain. *Nature*. **428**(6979):198-202.

Raychaudhuri, D.; Park, J.T. (1992) *Escherichia coli* cell-division gene *ftsZ* encodes a novel GTP-binding protein. *Nature*. **359**(6392):251-4.

Raychaudhuri, D.; Park, J.T. (1994). A point mutation converts *Escherichia coli* FtsZ septation GTPase to an ATPase. *J Biol Chem*. **269**(37):22941-4.

Raychaudhuri, D. (1999). ZipA is a MAP-Tau homolog and is essential for structural integrity of the cytokinetic FtsZ ring during bacterial cell division. *EMBO J*. **18**(9):2372-83.

Read, T.D.; Brunham, R.C.; Shen, C.; Gill, S.R.; Heidelberg, J.F.; White, O.; Hickey, E.K.; Peterson, J.; Utterback, T.; Berry, K.; Bass, S.; Linher, K.; Weidman, J.; Khouri, H.; Craven, B.; Bowman, C.; Dodson, R.; Gwinn, M.; Nelson, W.; DeBoy, R.; Kolonay, J.; McClarty, G.; Salzberg, S.L.; Eisen, J.; Fraser, C.M. (2000) Genome sequences of *Chlamydia trachomatis* MoPn and *Chlamydia pneumoniae* AR39. *Nucleic Acids Res*. **28**(6):1397-406.

Rensing, S.A.; Kiessling, J.; Reski, R.; Decker, E.L. (2004). Diversification of *ftsZ* during early land plant evolution. *J Mol Evol*. **58**(2):154-62.

Ritco-Vonsovici, M.; Willison, K.R. (2000). Defining the eukaryotic cytosolic chaperonin-binding sites in human tubulins. *J Mol Biol*. **304**(1):81-98.

Rittinger, K.; Walker, P.A.; Eccleston, J.F.; Smerdon, S.J.; Gamblin, S.J. (1997). Structure at 1.65 Å of RhoA and its GTPase-activating protein in complex with a transition-state analogue. *Nature*. **389**(6652):758-62.

Rivas, G.; Lopez, A.; Mingorance, J.; Ferrandiz, M.J.; Zorrilla, S.; Minton, A.P.; Vicente, M.; 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**(16):11740-9.

Romberg, L.; Simon, M.; Erickson, H.P. (2001). Polymerization of FtsZ, a bacterial homolog of tubulin. is assembly cooperative?. *J Biol Chem*. **276**(15):11743-53.

Romberg, L.; Levin, P.A. (2003). Assembly dynamics of the bacterial cell division protein FtsZ: poised at the edge of stability. *Annu Rev Microbiol*. **57**:125-54.

Romberg, L.; Mitchison, T.J. (2004). Rate-limiting guanosine 5'-triphosphate hydrolysis during nucleotide turnover by FtsZ, a prokaryotic tubulin homologue involved in bacterial cell division. *Biochemistry*. **43**(1):282-8.

Rommelaere, H.; De Neve, M.; Melki, R.; Vandekerckhove, J.; Ampe, C. (1999). The cytosolic class II chaperonin CCT recognizes delineated hydrophobic sequences in its target proteins. *Biochemistry*. **38**(11):3246-57.

Rommelaere, H.; De Neve, M.; Neiryneck, K.; Peelaers, D.; Waterschoot, D.; Goethals, M.; Fraeyman, N.; Vandekerckhove, J.; Ampe, C. (2001). Prefoldin recognition motifs in the nonhomologous proteins of the actin and tubulin families. *J Biol Chem*. **276**(44):41023-8.

Rowland, S.L.; Fu, X.; Sayed, M.A.; Zhang, Y.; Cook, W.R.; Rothfield, L.I. (2000). Membrane redistribution of the *Escherichia coli* MinD protein induced by MinE. *J Bacteriol*. **182**(3):613-9.

Rueda, S.; Vicente, M.; Mingorance, J. (2003). Concentration and assembly of the division ring proteins FtsZ, FtsA, and ZipA during the *Escherichia coli* cell cycle. *J Bacteriol*. **185**(11):3344-51.

Sackett, D.L.; Bhattacharyya, B.; Wolff, J. (1994). Local unfolding and the stepwise loss of the functional properties of tubulin. *Biochemistry*. **33**(43):12868-78.

Seckler, R.; Wu, G.M.; Timasheff, S.N. Interactions of tubulin with guanylyl-(beta-gamma-methylene)diphosphonate. Formation and assembly of a stoichiometric complex. *J Biol Chem*. **265**(13):7655-61.

Scheffers, D.J.; de Wit, J.G.; den Blaauwen, T.; Driessen, A.J. (2001). Substitution of a conserved aspartate allows cation-induced polymerization of FtsZ. *FEBS Lett*. **494**(1-2):34-7.

Scheffers, D.J.; Driessen, A.J. (2002). Immediate GTP hydrolysis upon FtsZ polymerization. *Mol Microbiol*. **43**(6):1517-21.

Scheffers, D.J.; de Wit, J.G.; den Blaauwen, T.; 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**(2):521-9.

Scheffzek, K.; Ahmadian, M.R.; Kabsch, W.; Wiesmuller, L.; Lautwein, A.; Schmitz, F.; Wittinghofer, A. (1997). The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants. *Science*. **277**(5324):333-8.

Schindelin, H.; Kisker, C.; Schlessman, J.L.; Howard, J.B.; Rees, D.C. (1997). Structure of ADP x AIF4(-)-stabilized nitrogenase complex and its implications for signal transduction. *Nature*. **387**(6631):370-6.

Schmid, M.F.; Dargahi, R.; Tam, M.W. (1993). SPECTRA: a system for processing electron images of crystals. *Ultramicroscopy*. **48**(3):251-64.

Schmid, F.X. (1997) in *Protein Structure, a Practical Approach*. (Creighton, T. E., ed) 2nd Ed., pp. 299–321, Oxford University Press, Oxford.

Schmidt, K.L.; Peterson, N.D.; Kustusch, R.J.; Wissel, M.C.; Graham, B.; Phillips, G.J.; Weiss, D.S. (2004). A predicted ABC transporter, FtsEX, is needed for cell division in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. **186**(3):785-93.

Shah, C.; Xu, C.Z.; Vickers, J.; Williams, R. (2001). Properties of microtubules assembled from mammalian tubulin synthesized in *Escherichia coli*. *Biochemistry*. **40**(15):4844-52.

Shaw, J.M.; Nunnari, J. (2002). Mitochondrial dynamics and division in budding yeast. *Trends Cell Biol*. **12**(4):178-84.

She, Q.; Singh, R.K.; Confalonieri, F.; Zivanovic, Y.; Allard, G.; Awayez, M.J.; Chan-Weiher, C.C.; Clausen, I.G.; Curtis, B.A.; De Moors, A.; Erauso, G.; Fletcher, C.; Gordon, P.M.; Heikamp-de-Jong, I.; Jeffries, A.C.; Kozera, C.J.; Medina, N.; Peng, X.; Thi-Ngoc, H.P.; Redder, P.; Schenk, M.E.; Theriault, C.; Tolstrup, N.; Charlebois, R.L.; Doolittle, W.F.; Duguet, M.; Gaasterland, T.; Garrett, R.A.; Ragan, M.A.; Sensen, C.W.; Van der Oost, J. (2001). The complete genome of the crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus* P2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **98**(14):7835-40.

Shih, Y.L.; Le, T.; 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**(13):7865-70.

Simons, C.T.; Staes, A.; Rommelaere, H.; Ampe, C.; Lewis, S.A.; Cowan, N.J. (2004). Selective contribution of eukaryotic prefoldin subunits to actin and tubulin binding. *J Biol Chem*. **279**(6):4196-203.

Sossong, T.M. Jr; Brigham-Burke, M.R.; Hensley, P.; Pearce, K.H. Jr. (1999). Self-activation of guanosine triphosphatase activity by oligomerization of the bacterial cell division protein FtsZ. *Biochemistry*. **38**(45):14843-50.

Steiner, W.; Liu, G.; Donachie, W.D.; Kuempel, P. (1999). The cytoplasmic domain of FtsK protein is required for resolution of chromosome dimers. *Mol Microbiol*. **31**(2):579-83.

Stricker, J.; Maddox, P.; Salmon, E.D.; 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**(5):3171-5.

Stock, D.; Perisic, O.; Löwe, J. (2005). Robotic nanolitre protein crystallisation at the MRC Laboratory of Molecular Biology. *Prog Biophys Mol Biol.* **88**(3):311-27.

Stokes, K.D.; Osteryoung, K.W. (2003). Early divergence of the FtsZ1 and FtsZ2 plastid division gene families in photosynthetic eukaryotes. *Gene.* **320**:97-108.

Sun, Q.; Margolin, W. (1998). FtsZ dynamics during the division cycle of live *Escherichia coli* cells. *J Bacteriol.* **180**(8):2050-6.

Takahara, M.; Takahashi, H.; Matsunaga, S.; Miyagishima, S.; Takano, H.; Sakai, A.; Kawano, S.; Kuroiwa, T. (2000). A putative mitochondrial ftsZ gene is present in the unicellular primitive red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *Mol Gen Genet.* **264**(4):452-60.

Tamames, J.; Gonzalez-Moreno, M.; Mingorance, J.; Valencia, A.; Vicente, M. (2001). Bringing gene order into bacterial shape. *Trends Genet.* **17**(3):124-6.

Tanford, C. (1968). Protein denaturation. *Adv Protein Chem.* **23**:121-282.

Tesmer, J.J.; Berman, D.M.; Gilman, A.G.; Sprang, S.R. (1997). Structure of RGS4 bound to AIF4--activated G(i alpha1): stabilization of the transition state for GTP hydrolysis. *Cell.* **89**(2):251-61.

Thanedar, S.; Margolin, W. (2004). FtsZ exhibits rapid movement and oscillation waves in helix-like patterns in *Escherichia coli*. *Curr Biol.* **14**(13):1167-73.

Tian, G.; Huang, Y.; Rommelaere, H.; Vandekerckhove, J.; Ampe, C.; Cowan, N.J. (1996). Pathway leading to correctly folded beta-tubulin. *Cell.* **86**(2):287-96.

Tian, G.; Lewis, S.A.; Feierbach, B.; Stearns, T.; Rommelaere, H.; Ampe, C.; Cowan, N.J. (1997). Tubulin subunits exist in an activated conformational state generated and maintained by protein cofactors. *J Cell Biol.* **138**(4):821-32.

Trusca, D.; Scott, S.; Thompson, C.; Bramhill, D. (1998). Bacterial SOS checkpoint protein SulA inhibits polymerization of purified FtsZ cell division protein. *J Bacteriol.* **180**(15):3946-53.

Ursinus, A.; van den Ent, F.; Brechtel, S.; de Pedro, M.; Holtje, J.V.; Löwe, J.; Vollmer, W. (2004). Murein (peptidoglycan) binding property of the essential cell division protein FtsN from *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **186**(20):6728-37.

van den Ent, F.; Löwe, J. (2000). Crystal structure of the cell division protein FtsA from *Thermotoga maritima*. *EMBO J.* **19**(20):5300-7.

van den Ent, F.; Amos, L.A.; Lowe, J. (2001). Prokaryotic origin of the actin cytoskeleton. *Nature.* **413**(6851):39-44.

van den Ent, F.; Möller-Jensen, J.; Amos, L.A.; Gerdes, K.; Löwe, J. (2002). F-actin-like filaments formed by plasmid segregation protein ParM. *EMBO J.* **21**(24):6935-43.

Vaughan, S.; Wickstead, B.; Gull, K.; Addinall, S.G. (2004). Molecular evolution of FtsZ protein sequences encoded within the genomes of archaea, bacteria, and eukaryota. *J Mol Evol.* **58**(1):19-29.

Vicente, M.; Gómez, M.J.; Ayala, J.A. (1998). Regulation of transcription of cell division genes in the *Escherichia coli* dcw cluster. *Cell Mol Life Sci.* **54**(4):317-24.

Vitha, S.; McAndrew, R.S.; Osteryoung, K.W. (2001). FtsZ ring formation at the chloroplast division site in plants. *J Cell Biol.* **153**(1):111-20.

Vitha, S.; Froehlich, J.E.; Koksharova, O.; Pyke, K.A.; van Erp, H.; Osteryoung, K.W. (2003). ARC6 is a J-domain plastid division protein and an evolutionary descendant of the cyanobacterial cell division protein Ftn2. *Plant Cell.* **15**(8):1918-33.

Wang, L.; Khattar, M.K.; Donachie, W.D.; Lutkenhaus, J. (1998). FtsI and FtsW are localized to the septum in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **180**(11):2810-6.

Wang, X.; Lutkenhaus, J. (1993). The FtsZ protein of *Bacillus subtilis* is localized at the division site and has GTPase activity that is dependent upon FtsZ concentration. *Mol Microbiol.* **9**(3):435-42.

Weiss, D.S.; Pogliano, K.; Carson, M.; Guzman, L.M.; Fraipont, C.; Nguyen-Disteche, M.; Losick, R.; Beckwith, J. (1997). Localization of the *Escherichia coli* cell division protein FtsI (PBP3) to the division site and cell pole. *Mol Microbiol.* **25**(4):671-81.

Weiss, D.S.; Chen, J.C.; Ghigo, J.M.; Boyd, D.; Beckwith, J. (1999). Localization of FtsI (PBP3) to the septal ring requires its membrane anchor, the Z ring, FtsA, FtsQ, and FtsL. *J Bacteriol.* **181**(2):508-20.

Weiss, D.S. (2004). Bacterial cell division and the septal ring. *Mol Microbiol.* **54**(3):588-97.

White, E.L.; Ross, L.J.; Reynolds, R.C.; Seitz, L.E.; Moore, G.D.; Borhani, D.W. (2000). Slow polymerization of *Mycobacterium tuberculosis* FtsZ. *J Bacteriol.* **182**(14):4028-34.

Wolff, J.; Knipling, L.; Sackett, D.L. (1996). Charge-shielding and the "paradoxical" stimulation of tubulin polymerization by guanidine hydrochloride. *Biochemistry.* **35**(18):5910-20.

Wong, K.P.; Tanford, C. (1973). Denaturation of bovine carbonic anhydrase B by guanidine hydrochloride. A process involving separable sequential conformational transitions. *J Biol Chem.* **248**(24):8518-23.

Wu, L.J.; Errington, J. (2004). Coordination of cell division and chromosome segregation by a nucleoid occlusion protein in *Bacillus subtilis*. *Cell.* **117**(7):915-25.

Yaffe, M.B.; Farr, G.W.; Miklos, D.; Horwich, A.L.; Sternlicht, M.L.; Sternlicht, H. (1992). TCP1 complex is a molecular chaperone in tubulin biogenesis. *Nature.* **358**(6383):245-8.

Yu, X.C.; Margolin, W. (1997). Ca²⁺-mediated GTP-dependent dynamic assembly of bacterial cell division protein FtsZ into asters and polymer networks in vitro. *EMBO J.* **16**(17):5455-63.

Yu, X.C.; Tran, A.H.; Sun, Q.; Margolin, W. (1998). Localization of cell division protein FtsK to the *Escherichia coli* septum and identification of a potential N-terminal targeting domain. *J Bacteriol.* **180**(5):1296-304.

ANEXO

PUBLICACIONES A LAS QUE HA DAO LUGAR ESTA TESIS DOCTORAL

Andreu, J.M.; **Oliva, M.A.**; 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**(45):43262-70.

Oliva, M.A.; Huecas, S.; Palacios, J.M.; Martin-Benito, J.; Valpuesta, J.M.; Andreu, J.M. (2003). Assembly of archaeal cell division protein FtsZ and a GTPase-inactive mutant into double-stranded filaments. *J Biol Chem.* **278**(35):33562-70.

Oliva, M.A.; Cordell, S.C.; Löwe, J. (2004). Structural insights into FtsZ protofilament formation. *Nat Struct Mol Biol.* **11**(12):1243-50.

Bertrand, S.; Barthelemy, I.; **Oliva, M.A.**; Carrascosa, J.L.; Andreu, J.M.; Valpuesta, J.M. (2005). Folding, stability and polymerization properties of FtsZ chimeras with inserted tubulin loops involved in the interaction with the cytosolic chaperonin CCT and in microtubule formation. *J Mol Biol.* **346**(1):319-30.