

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



**ENSAMBLAJE DE FtsZ DE E. Coli, PROTEÍNA
ESENCIAL EN LA DIVISIÓN BACTERIANA: EFECTO
DE LA AGLOMERACIÓN MACROMOLECULAR**

**MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE
DOCTOR POR**

José Manuel González Izquierdo

Bajo la dirección del Doctor:

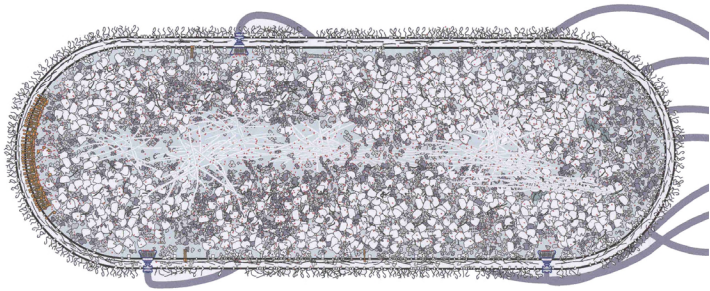
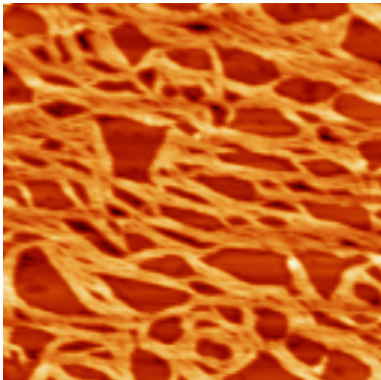
Germán Rivas Caballero

Madrid, 2004

ISBN: 978-84-669-3023-9

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

ENSAMBLAJE DE FtsZ DE *E. coli*,
PROTEÍNA ESENCIAL EN LA DIVISIÓN BACTERIANA:
EFECTO DE LA AGLOMERACIÓN MACROMOLECULAR



TESIS DOCTORAL
JOSÉ MANUEL GONZÁLEZ IZQUIERDO
2004

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

ENSAMBLAJE DE FtsZ DE *E. coli*,
PROTEÍNA ESENCIAL EN LA DIVISIÓN BACTERIANA:
EFECTO DE LA AGLOMERACIÓN MACROMOLECULAR

Memoria presentada por
José Manuel González Izquierdo
para optar al grado de Doctor

Director de la Tesis: Germán Rivas Caballero
CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
CSIC, MADRID

A mi familia y a Amparo

Quiero dar las gracias a:

A Germán, director de esta tesis, por su dirección, por la ayuda desde el primer momento hasta la conclusión de esta tesis, por su enseñanza y por su facilidad para entusiasmarse y contagiarlo. Por su espíritu de colaboración, que me ha llevado a trabajar con gente muy interesante y que me ha influido mucho. Por hacer del laboratorio un sitio abierto, donde sea más fácil aprender, madurar y disfrutar trabajando.

A José Manuel Andreu, por sus consejos y por facilitarme el uso de los medios de su laboratorio para la realización de este trabajo. A todos los miembros de su laboratorio, por muchos ratos pasados juntos.

A Pilar Lillo, por resolver mis dudas de fluorescencia y por abrirme las puertas de su laboratorio. A Silvia y a Olga, por ayudarme en los días que pasé en su laboratorio y por ser mis hermanas mayores de tesis, enseñándome todo lo que habría de venir. A José Manuel Guisán, por acogerme en su laboratorio; a todos los miembros del grupo por su ayuda, y por crear también uno de esos ambientes del que es difícil despegarse. A Francico Blanco, Guillermo Montoya y Jesús Prieto, del CNIO, por facilitarme el acceso al aparato de dispersión de luz dinámica.

A toda la gente del CIB que me ha prestado su apoyo, consejo, material, en cualquier momento de estos últimos años...

A Miguel Vicente, por el tiempo que he pasado aprendiendo en su laboratorio. A Jesús Mingorance, por todo lo que he aprendido sobre el trabajo de laboratorio, sobre FtsZ y sobre división celular a su lado, y por su atenta revisión de este manuscrito. Y a toda la gente del grupo, que consiguen uno de los mejores ambientes que yo he podido ver en un laboratorio.

A Marisela Vélez, por todo su buen hacer en el microscopio de fuerzas atómicas, por todas sus ideas, inquietudes, sugerencias, y por todo lo que he aprendido con su manera de pensar y trabajar, y por su ayuda en esta etapa final de preparación de la tesis.

A mi tutura, Ana Saborido, por guiarme en la parte académica...

A Allen P. Minton, que me ha acogido en su laboratorio, del que he podido aprender cosas muy importantes en ciencia y que ha tenido la atención de orientarme y guiarme... A los que estaban en su laboratorio por aquel entonces, Damien, ese post-doc magnífico, que tanto me ha enseñado, Harry, historia viva de la ciencia, encantador...

A Peter Schuck, por el tiempo que me ha dedicado en EEUU, pudiendo aprender ultracentrifugación analítica y dispersión de luz dinámica.

A Harold P. Erickson, que me acogió recientemente en su laboratorio, donde me enseñó tantas cosas de microscopía electrónica y FtsZ; gra-

cias también a Stephane, Dave y Julie, también hermanos mayores de tesis. A Carmen Lucaveche, que tan pacientemente me enseñó a preparar las secciones finas, entre charlas en español. A Ruth Richter, por acogerme en su familia y compartir conmigo charlas a diario sobre esas cosas importantes de la vida.

A mis *vecinos* de los laboratorios de Ángel T. Martínez y M. Jesús Martínez, por adoptarme en sus laboratorios; por los ratos compartidos en las comidas y en ese cuartito tan maravilloso...

A los chicos de RMN y Microscopía, que han estado tan cerquita desde que nos hemos mudado al nuevo "CIB", yogures, sisters y demás, y con los que da gusto salir a comer cada día y compartir tantas otras cosas.

A toda la gente del CIB con la que he compartido tantos buenos ratos; a todos los del espíritu de Jaca...

A mis compañeros de laboratorio, a los que estuvieron, como Andrew, habitante también de ese cuartito, por todo lo que me enseñaste sobre ciencia y sobre Nueva Zelanda. A los que, desde muchos puntos de España, han decidido pasar una temporada por aquí, con los que hemos compartido muy buenos ratos. A Cecilia, Esther, Gemma, Ana e Isabel. A Mercedes, por recibirme en el laboratorio, enseñarme de todo, pasándolo divinamente mientras. A Carlos, por las risas que me has arrancado, por hacerme de rabiar, por todo lo que me has enseñado de ultracentrifugación analítica. A Pilar, la sonrisa del laboratorio, por tu ayuda y por ser una compañera estupenda. A todos, gracias, por los ratos que hemos disfrutado juntos entre vino (picado, claro!), cava, empanadas, bizcochos, historias...

A mi familia, que va creciendo... A mis padres, que lo hacéis todo tan fácil que hasta parece imposible.

A Amparo, por estar a mi lado...

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	1
ÍNDICE DE FIGURAS.....	5
ABREVIATURAS.....	9
SÍMBOLOS	11
RESUMEN.....	13
1 INTRODUCCIÓN	15
1.1 FtsZ y división celular.....	15
<i>1.1.1 FtsZ, una proteína esencial en la división celular.....</i>	<i>15</i>
<i>1.1.2 La maquinaria de división celular bacteriana.....</i>	<i>16</i>
<i>1.1.3 Relación estructural entre FtsZ y la tubulina eucariota. El</i> <i>citoesqueleto bacteriano</i>	<i>18</i>
<i>1.1.4 Bioquímica de FtsZ</i>	<i>21</i>
<i>1.1.5 Oligomerización de FtsZ.....</i>	<i>22</i>
<i>1.1.6 Ensamblaje de FtsZ: energética y dinámica</i>	<i>23</i>
<i>1.1.7 Organización estructural de los polímeros de FtsZ y su relación</i> <i>con el anillo Z funcional.....</i>	<i>27</i>
<i>1.1.8 Modulación del ensamblaje de FtsZ por otros componentes</i> <i>macromoleculares</i>	<i>30</i>
1.2 Implicaciones biológicas de la aglomeración macromolecular	33
<i>1.2.1 El interior bacteriano está aglomerado.....</i>	<i>33</i>
<i>1.2.2 Exclusión de volumen: consecuencias energéticas.....</i>	<i>35</i>
<i>1.2.3 Efecto de la aglomeración macromolecular sobre el ensamblaje</i> <i>de proteínas</i>	<i>38</i>
2 OBJETIVOS.....	41
3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	45
3.1 Reactivos	45
3.2 Expresión y purificación de la proteína FtsZ	45
3.3 Tampón fisiológico y sistema enzimático de regeneración del GTP	46

3.4	Marcaje de FtsZ con FITC	48
3.5	Ultracentrifugación analítica	49
3.5.1	<i>Principios básicos.....</i>	49
3.5.2	<i>Equilibrio de sedimentación</i>	53
3.5.3	<i>Velocidad de sedimentación</i>	58
3.5.4	<i>Modelado hidrodinámico.....</i>	66
3.6	Dispersión de luz dinámica	70
3.7	Ensamblaje de FtsZ	75
3.7.1	<i>Teoría.....</i>	75
3.7.2	<i>Determinación de la concentración crítica</i>	79
3.7.3	<i>Ensamblaje de FtsZ en tampón fisiológico.....</i>	79
3.7.4	<i>Ensamblaje de FtsZ en medios aglomerados.....</i>	81
3.8	Microscopía	83
3.8.1	<i>Microscopía electrónica</i>	83
3.8.2	<i>Microscopía de fuerzas atómicas.....</i>	84
3.8.3	<i>Microscopía de fluorescencia</i>	87
3.9	Otros procedimientos	87
3.9.1	<i>Cuantificación de la concentración de proteína, dextrano y Ficoll.....</i>	87
3.9.2	<i>Experimentos de intercambio de GTP.....</i>	88
3.9.3	<i>Cuantificación de la actividad GTPasa.....</i>	89
3.9.4	<i>Electroforesis</i>	89
4	RESULTADOS	91
4.1	FtsZ-GDP tiene una baja tendencia a oligomerizar en tampón fisiológico	91
4.1.1	<i>Análisis por ultracentrifugación analítica (equilibrio y velocidad de sedimentación).....</i>	91

4.2 FtsZ en presencia de GTP en tampón fisiológico ensambla en filamentos dinámicos.....	97
4.2.1 <i>Análisis mediante dispersión de luz a 90°</i>	97
4.2.2 <i>Morfología de los polímeros mediante microscopía electrónica y de fuerzas atómicas</i>	97
4.2.3 <i>Determinación de la distribución de tamaños de los protofilamentos de FtsZ en disolución: Análisis mediante velocidad de sedimentación y dispersión de luz dinámica</i>	102
4.2.4 <i>Determinación de la concentración crítica del ensamblaje</i>	117
4.3 La aglomeración macromolecular favorece la formación GTP-dependiente de polímeros dinámicos de FtsZ.....	119
4.3.1 <i>Morfología de los polímeros por microscopía electrónica</i>	119
4.4 Los polímeros de FtsZ formados en medios aglomerados son compatibles con cintas bidimensionales.....	122
4.4.1 <i>Análisis por microscopía de fuerzas atómicas y secciones finas</i> ..	122
4.4.2 <i>Análisis mediante microscopía de fluorescencia</i>	125
4.5 La aglomeración macromolecular promueve la formación de cintas de FtsZ a partir de filamentos de FtsZ preformados.....	127
4.5.1 <i>Determinación de la concentración crítica de formación de las redes(C_{red}) de FtsZ</i>	127
4.6 La aglomeración macromolecular retrasa la dinámica de los polímeros de FtsZ, la hidrólisis y el intercambio de GTP	133
4.6.1 <i>Dinámica de despolimerización</i>	133
4.6.2 <i>Hidrólisis e intercambio de GTP</i>	136
5 DISCUSIÓN	139
5.2 Sobre la influencia de la aglomeración macromolecular en la organización estructural y dinámica de los polímeros de FtsZ.	145
5.3 Implicaciones biológicas	148
5.4 Consideraciones futuras	153
5.4.1 <i>Aspectos estructurales, bioquímicos y biofísicos</i>	153
5.4.2 <i>Aspectos biológicos</i>	154
5.4.3 <i>Aspectos biotecnológicos</i>	155

6 CONCLUSIONES	157
7 BIBLIOGRAFÍA	163

ÍNDICE DE FIGURAS

Introducción

Figura 1.1. Comportamiento dinámico de FtsZ durante el ciclo celular.	16
Figura 1.2. Maquinaria de la división celular bacteriana.	17
Figura 1.3. Estructura tridimensional de FtsZ y tubulina.	19
Figura 1.4. Inestabilidad dinámica de microtúbulos.	28
Figura 1.5. Ciclo de ensamblaje/desensamblaje del anillo Z.	31
Figura 1.6. Representación esquemática del interior de <i>E. coli</i>	34
Figura 1.7. Reconstrucción tridimensional del interior de <i>Dictyostelium discoideum</i>	34
Figura 1.8. Volumen excluido (mostrado en rosa y negro) y volumen accesible (mostrado en azul) en una disolución de macromoléculas.	37
Figura 1.9. Transiciones de fase dirigidas por entropía en condiciones de aglomeración macromolecular.	40

Materiales y Métodos

Figura 3.1. Ejemplo de sedimentación de una macromolécula.	51
Figura 3.2. Celdas de doble sector y de seis agujeros en experimentos de velocidad y equilibrio de sedimentación.	54
Figura 3.3. Análisis e interpretación del equilibrio de sedimentación.	56
Figura 3.4. Patrón de interferencia en un experimento de velocidad de sedimentación.	59
Figura 3.5. Perfiles de sedimentación y análisis mediante una distribución de coeficientes de sedimentación $c(s)$	62
Figura 3.6. Relación del coeficiente de sedimentación de polímeros de distintas geometrías en función del número de subunidades.	69
Figura 3.7. Función de autocorrelación de un experimento de dispersión de luz dinámica.	74
Figura 3.8. Propiedades de ensamblajes cooperativos e isodésimicos.	78

Figura 3.9. Determinación de la concentración crítica a partir de un ensayo de centrifugación diferencial. 80

Figura 3.10. Esquema de un microscopio de fuerzas atómicas. 86

Resultados

Figura 4.1. Gradiente de equilibrio de sedimentación de *E. coli* FtsZ-GDP en tampón fisiológico. 92

Figura 4.2. Auto-asociación de la proteína de *E. coli* FtsZ-GDP en tampón fisiológico determinada por equilibrio de sedimentación. 93

Figura 4.3. Análisis por velocidad de sedimentación de FtsZ-GDP en tampón fisiológico. 96

Figura 4.4. Ensamblaje de FtsZ en tampón fisiológico analizado por dispersión de luz a 90°. 99

Figura 4.5. Análisis del ensamblaje de FtsZ en ausencia de agentes de aglomeración por microscopía electrónica. 100

Figura 4.6. Análisis del ensamblaje de FtsZ en tampón fisiológico por microscopía de fuerzas atómicas. 100

Figura 4.7. Dinámica de despolimerización de los polímeros de FtsZ analizada por microscopía de fuerzas atómicas. 101

Figura 4.8. Análisis por velocidad de sedimentación del ensamblaje de FtsZ-GTP. 105

Figura 4.9. Efecto de la concentración de proteína sobre la distribución de coeficientes de sedimentación de FtsZ en presencia de GTP. 107

Figura 4.10. Variación del coeficiente de sedimentación de los polímeros de FtsZ con la concentración de proteína. 108

Figura 4.11. Dependencia del coeficiente de sedimentación de un polímero con el número de subunidades. 111

Figura 4.12. Dependencia con la concentración de proteína de las funciones de autocorrelación de polímeros de FtsZ obtenidas en un experimento de dispersión de luz dinámica. 112

Figura 4.13. Efecto de la concentración de Mg²⁺ sobre la distribución de coeficientes de coeficientes de sedimentación de FtsZ 1.5 g/l en presencia de GTP. 115

Figura 4.14. Efecto de la concentración de Mg^{2+} sobre la abundancia relativa de las especies moleculares de FtsZ.....	116
Figura 4.15. Ensamblaje de FtsZ en tampón fisiológico analizado por ensayos de dispersión de luz y de centrifugación.....	118
Figura 4.16. Análisis del ensamblaje inducido por agentes de aglomeración por microscopía electrónica.....	121
Figura 4.17. Análisis del ensamblaje inducido por agentes de aglomeración por microscopía de fuerzas atómicas.....	123
Figura 4.18. Análisis estructural de los polímeros por microscopía electrónica de secciones finas.....	124
Figura 4.19. Formación de polímeros inducidos por agentes de aglomeración: análisis por microscopía de fluorescencia.....	126
Figura 4.20. Dependencia con la concentración de proteína del ensamblaje de FtsZ inducido por aglomeración macromolecular.....	128
Figura 4.21. Determinación de la concentración crítica aparente de formación de polímeros de FtsZ en presencia de agentes de aglomeración.	129
Figura 4.22. Dependencia con la concentración de Ficoll de la fracción de polímeros de FtsZ.....	132
Figura 4.23. Dependencia con la concentración de GTP de la dinámica de los polímeros inducidos por Ficoll.....	134
Figura 4.24. Efecto de la aglomeración macromolecular en la dinámica de ensamblaje/desensamblaje de FtsZ. Actividad GTPasa de los polímeros de FtsZ.	135
Figura 4.25. Efecto de la concentración de agentes de aglomeración sobre la hidrólisis de GTP.	137
Figura 4.26. Intercambio de nucleótido de los polímeros de FtsZ.....	138

Discusión

Figura 5.1. Modelo para el ensamblaje de FtsZ bajo condiciones que simulan el aglomerado interior bacteriano.	152
--	-----

ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-GTP}$	Guanosín trifosfato marcado con ^{32}P en el fosfato γ
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Adenosín difosfato
AFM	Microscopia de fuerzas atómicas
ATP	Adenosín trifosfato
BCA	Ácido bicinconínico (del inglés <i>BiCinchoninic Acid</i>)
CCD	Un tipo de cámara fotográfica digital (del inglés <i>Charge-Coupled Device</i>)
Da	Dalton, unidad de masa molecular (g/mol)
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético (del inglés <i>EthyleneDiamineTetraacetic Acid</i>)
EGTA	Ácido etilenglicol-bis(2-aminoetileter)-N,N,N',N'-tetraacético (del inglés <i>Ethylene Glycol-bis(2-amioethylether)-N,N,N',N'-Tetraacetic Acid</i>)
FITC	5-isotiocianato de fluoresceína (del inglés <i>Fluorescein-5-IsoThioCyanate</i>)
FRAP	Recuperación de la señal de fluorescencia después de fotoblanqueo (del inglés <i>Fluorescence Recovery After Photobleaching</i>)
GDP	Guanosín difosfato
GFP	Proteína verde fluorescente (del inglés <i>Green Fluorescent Protein</i>)
GMPCPP	Guanosina-5'-[(α,β)-metileno]trifosfato

GTP	Guanosín trifosfato
GTPasa	Actividad de hidrólisis de GTP
HEPES	Ácido (N-[2-hidroxi-etil]piperazina-N'-[2-etanosulfónico])
IPTG	Isopropil β-D-tiogalactopiranosido
LB	Medio de cultivo Luria Broth
MES	Ácido 2-[N-morfolino]etanosulfónico
PDB	Banco de Datos de Proteínas (del inglés <i>Protein Data Bank</i>)
PEM	Tampón 50 mM PIPES, 5 mM MgCl ₂ , 1 mM EDTA, pH 6.5
pI	Punto isoeléctrico
PIPES	Ácido piperazina-N,N'-bis[2-etanosulfónico]
SDS	Dodecil sulfato sódico (del inglés <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (del inglés <i>Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i>)
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
UV-Visible	Ultravioleta-Visible

SÍMBOLOS

Alfabeto latino

Símbolo	Significado
A	Absorbancia
$a(r, t)$	Desplazamiento de franjas (velocidad de sedimentación; es función del radio y del tiempo)
C_c	Concentración crítica de ensamblaje
C_{fil}	Concentración crítica de formación de filamentos
C_{red}	Concentración crítica de formación de redes de filamentos
C_t	Concentración total
$c(s)$	Distribución de coeficientes de sedimentación (es función del coeficiente de sedimentación, s)
D	Coefficiente de difusión
f	Coefficiente de fricción
f^0	Coefficiente de fricción a dilución infinita
f_{min}	Coefficiente de fricción de una esfera anhidra equivalente
f/f_{min}	Relación friccional en relación a una esfera anhidra equivalente
f/f_0	Relación friccional en relación a una esfera hidratada equivalente
fr_i	Fracción de especie i
fr_{pol}	Fracción de polímero
$g(t)$	Función de autocorrelación (es función del tiempo)
J	Flujo
K	Constante de asociación
K_g	Constante de elongación de un polímero cooperativo
K_m	Constante de nucleación de un polímero cooperativo

k_s	Constante de no idealidad hidrodinámica
L	Longitud

Alfabeto griego

Símbolo	Significado
Δ	Incremento
δ	Errores aleatorios en los datos de desplazamiento de franjas (velocidad de sedimentación)
ε	Coefficiente de absorción molar
ϕ	Errores sistemáticos en los datos de desplazamiento de franjas (velocidad de sedimentación)
η_0	Viscosidad del disolvente
λ	Longitud de onda
\bar{v}	Volumen específico parcial
ν_s	Volumen específico parcial de una partícula hidratada
θ	Ángulo de dispersión de luz
ρ_0	Densidad del disolvente
τ	Tiempo de autocorrelación
ω	Velocidad angular

RESUMEN

En esta Memoria de Tesis Doctoral se han empleado condiciones experimentales que simulan la osmolaridad y el aglomerado ambiente del citoplasma bacteriano para el estudio del ensamblaje de la proteína esencial de división celular de *E. coli* FtsZ.

FtsZ (40 kDa), en presencia de GDP, tiene una débil tendencia a oligomerizar en disoluciones diluidas que contienen concentraciones apropiadas de osmolitos fisiológicos. Sin embargo, en presencia de GTP, FtsZ ensambla de manera cooperativa para formar filamentos dinámicos finos relativamente pequeños ($1-2 \cdot 10^6$ Da).

La aglomeración macromolecular favorece el ensamblaje GTP-dependiente de FtsZ en polímeros bidimensionales dinámicos que desensamblan después de agotado el GTP. Las imágenes de microscopía de fuerzas atómicas revelan que estos polímeros adoptan la estructura de cintas de una subunidad de alto. Comparadas con los filamentos de FtsZ observados *in vitro* en ausencia de aglomeración macromolecular, las cintas presentan un retraso y disminución de la actividad GTPasa y una disminución en el intercambio de GTP dentro del polímero.

Proponemos que, en el aglomerado citoplasma bacteriano y en condiciones que promueven el ensamblaje, los filamentos de FtsZ tienden a alinearse espontáneamente formando las cintas dinámicas. Estas estructuras podrían formar parte del anillo Z que se forma en el septo bacteriano en el momento de la división celular bacteriana, sin necesidad de interacciones específicas adicionales. Postulamos que, en células en reposo (no-división), deben existir mecanismos de regulación que eviten el ensamblaje de las cintas de FtsZ (y del anillo Z), lo que evitaría la formación del septo a destiempo durante el ciclo de división.

Introducción

1 INTRODUCCIÓN

1.1 FtsZ y división celular

1.1.1 FtsZ, una proteína esencial en la división celular

La proteína FtsZ, que está conservada en la mayoría de los organismos procariotas, juega un papel central en la división celular de estos organismos. En los cloroplastos de algunas algas y plantas superiores como *Arabidopsis thaliana* (Vitha *et al.*, 2001) se han encontrado homólogos de FtsZ, así como en mitocondrias de algas de la especie *Mallomonas splendens* (Beech *et al.*, 2000). El gen *ftsZ* se descubrió, al igual que otras proteínas de división celular, por medio de mutaciones termosensibles que interrumpían la división celular causando filamentación de *E. coli*, de ahí el nombre *fts* de **filamentación termosensible** (Rueda, 2002). FtsZ es la proteína mejor caracterizada en división celular.

Las moléculas de FtsZ se encuentran en el citoplasma hasta el momento previo a la división. Estudios de fluorescencia con anticuerpos anti-FtsZ y fusiones FtsZ-GFP indicaron que FtsZ forma un anillo (anillo Z) en o cerca de la cara interna de la membrana en el sitio de división de la bacteria (Bi y Lutkenhaus, 1991; Vitha *et al.*, 2001), siendo éste el primer evento conocido de la división celular (Figura 1.1).

FtsZ es esencial para la posterior localización del resto de proteínas que intervienen en la división celular. Durante el proceso de septación, el anillo de FtsZ se contrae y finalmente se produce la separación de las dos bacterias hijas.

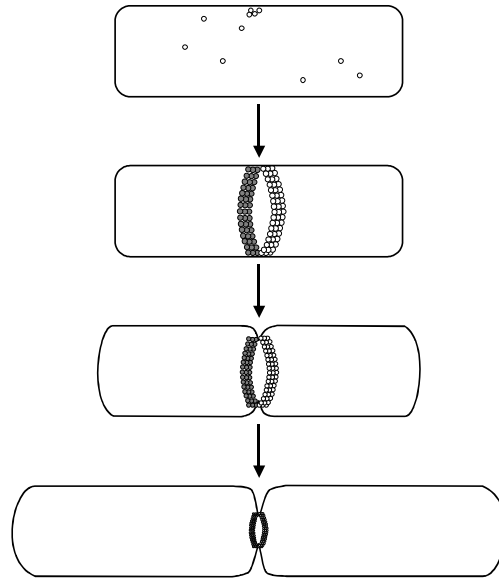


Figura 1.1. **Comportamiento dinámico de FtsZ durante el ciclo celular.** FtsZ permanece en el citoplasma antes de la formación del anillo. La formación del anillo en el punto medio de la bacteria puede originarse a partir de un único punto. Durante la división, el anillo Z disminuye su diámetro acoplado al borde del septo.

1.1.2 *La maquinaria de división celular bacteriana*

La división celular requiere un complejo multiproteico que ensambla en el sitio de división y que produce la constricción de la membrana citoplasmática junto con las distintas capas que forman la pared celular. En *E. coli*, se requieren al menos 10 proteínas: FtsZ, FtsA, ZipA, FtsK, FtsQ, FtsL, FtsB, FtsW, FtsI (PBP3) y FtsN, que ensamblan de una manera secuencial en el sitio de división (Figura 1.2) (Buddelmeijer y Beckwith, 2002).

Se ha descrito la interacción de varias de estas proteínas, FtsA y la proteína de membrana ZipA, con FtsZ (revisado en (Addinall y Holland, 2002)). FtsQ, FtsI, FtsW, todas ellas proteínas de membrana, participan en la síntesis del peptidoglicano

de la pared celular, necesario para la constricción de la pared celular y síntesis de los polos de las bacterias hijas.

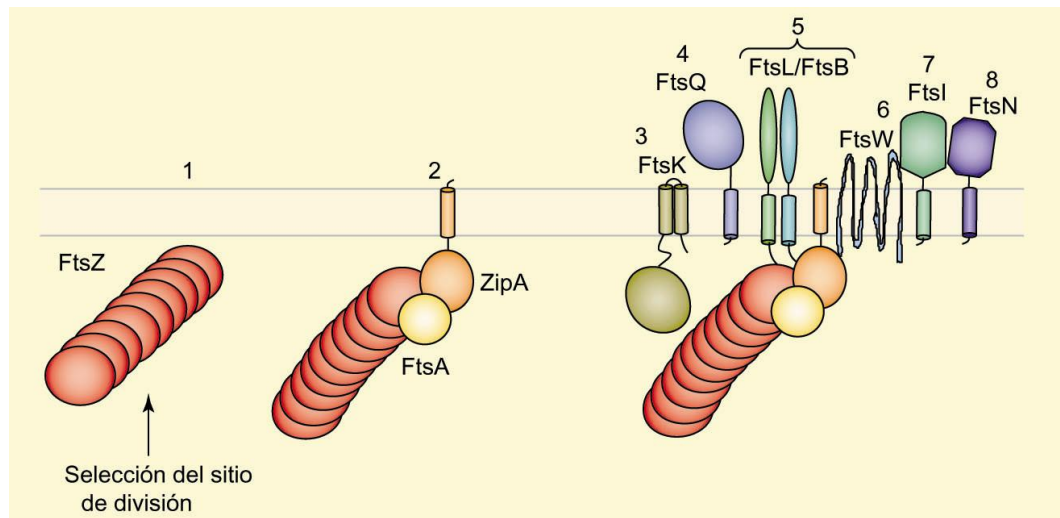


Figura 1.2. **Maquinaria de la división celular bacteriana.** La maquinaria ensambla en el sitio de división y dirige el proceso de constricción de la membrana y la pared celular. En *E. coli*, el ensamblaje de las proteínas es secuencial, y consiste en los pasos del 1 al 8 mostrados en la figura. En el paso 1, se produce una señal que define el sitio de división. FtsZ en un estado polimérico se dirige a la membrana a formar un anillo alrededor de la célula, llamado anillo Z. En los pasos del 2 al 8 el resto de proteínas ensamblan en el orden mostrado. Figura adaptada de (Carballido-Lopez y Errington, 2003).

Se cree que existen dos factores que regulan la selección del sitio de división donde FtsZ forma el anillo, la oclusión del nucleoide y el sistema min (Margolin, 2001). El modelo de la oclusión del nucleoide se refiere a un mecanismo inhibitorio no bien comprendido todavía que previene que la división ocurra en las inmediaciones del nucleoide (Den Blaauwen *et al.*, 1999; Woldringh *et al.*, 1990). En *E. coli* el sistema MinCDE consiste en tres proteínas, MinC, MinD y MinE. MinC es realmente

el inhibidor de la formación del anillo (Hu *et al.*, 1999). MinD es una proteína de membrana con actividad GTPasa que interacciona con MinC. MinE se requiere para la oscilación polo a polo de MinCD, que, en promedio, resulta en una concentración menor del inhibidor de la polimerización de FtsZ, MinC, en el centro de la bacteria (Meinhardt y de Boer, 2001), permitiendo la polimerización de FtsZ en este lugar

1.1.3 Relación estructural entre FtsZ y la tubulina eucariota. El citoesqueleto bacteriano

La identidad de secuencia entre FtsZ y tubulina es muy escasa (10 %), pero contienen un motivo homólogo de 7 aminoácidos que en tubulina está implicado en la unión de nucleótidos de guanina (de Boer *et al.*, 1992; RayChaudhuri y Park, 1992); ambas tienen actividad de hidrólisis de GTP (Mukherjee y Lutkenhaus, 1999), la habilidad de polimerizar para formar filamentos (Erickson *et al.*, 1996) y presentan estructuras secundarias homólogas (de Pereda *et al.*, 1996). La resolución de la estructura tridimensional de FtsZ de la arquea termófila *Methanococcus jannaschii* (Löwe y Amos, 1998) y del heterodímero de α,β -tubulina (Nogales *et al.*, 1998) de cerebro bovino en el mismo año, ofreció evidencias concluyentes de la homología estructural (Figura 1.3).

FtsZ y tubulina presentan un plegamiento casi idéntico y pertenecen a una misma subclase dentro de la familia de las GTPasas. Los residuos que forman el sitio de unión a GTP en tubulina y FtsZ están especialmente conservados, reflejo de la similitud con que las dos proteínas interaccionan con el nucleótido. En el heterodímero de α,β -tubulina y en el microtúbulo, cada monómero de tubulina interacciona con el nucleótido presente de la subunidad que se encuentra situada debajo (Figura 1.3). Se ha postulado una interacción similar para FtsZ a partir de un modelado del alineamiento

miento de los monómeros de FtsZ en un protofilamento, utilizando información de la estructura del dímero de tubulina y de micrografías de filamentos de FtsZ formados en presencia de Ca^{2+} (Löwe y Amos, 1999). Estos datos indican que la hidrólisis del GTP se produce en un sitio activo que se forma por interacción de dos monómeros (Scheffers *et al.*, 2002).

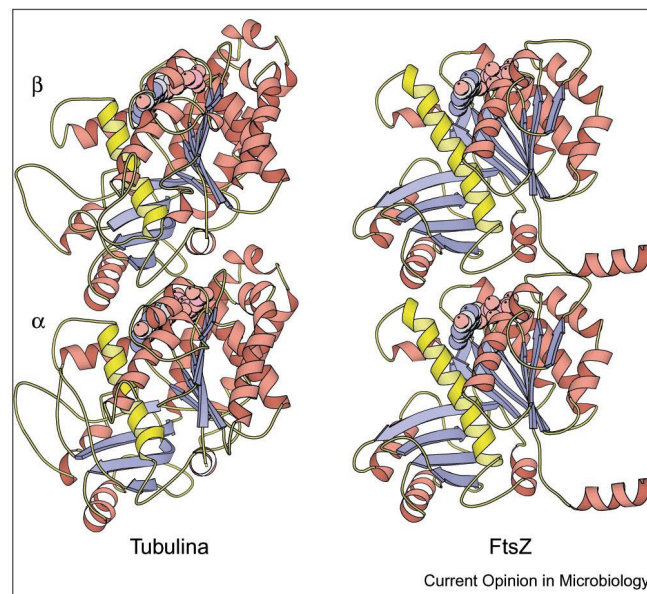


Figura 1.3. **Estructura tridimensional de FtsZ y tubulina.** La estructura tridimensional del dímero de FtsZ, mostrado a la derecha, tiene un plegamiento similar al del dímero de tubulina, que consiste en α -tubulina (abajo a la izquierda) y β -tubulina (arriba a la izquierda). El dímero de FtsZ (derecha) se modeló usando las coordenadas del Banco de Datos de Proteínas (PDB, del inglés *Protein Data Bank*) a partir de la estructura del monómero obtenida por cristalografía de rayos X (código 1FSZ) (Löwe y Amos, 1998). El dímero de tubulina está basado en datos de cristalografía electrónica (Nogales *et al.*, 1998), código PDB 1JFF. Imagen adaptada de (van den Ent *et al.*, 2001a).

La región C-terminal de FtsZ, no resuelta en la estructura cristalográfica, es flexible y participa en la unión a ZipA y FtsA, dos proteínas esenciales para la formación del anillo en *E. coli* (Mosyak *et al.*, 2000; van den Ent y Löwe, 2000). Esta misma región en tubulina es sitio de unión para muchas proteínas que se asocian a microtúbulos (Romberg y Levin, 2003).

Años después del descubrimiento de la homología funcional y estructural de FtsZ y tubulina, se identificaron los homólogos procariotas de actina MreB y Mbl (del inglés *MreB-like*), y se encontró que formaban estructuras helicoidales *in vivo* en *B. subtilis* (Jones *et al.*, 2001) y que MreB de *Thermotoga maritima* (van den Ent *et al.*, 2001b) polimerizaba en filamentos muy similares a los de actina. La función de las proteínas de la familia de MreB está relacionada con la forma celular, en general bacterias que tienen forma esférica no tienen un homólogo de MreB. ParM, una proteína que participa en la segregación del plásmido de *E. coli* R1, forma filamentos similares a los de actina (Møller-Jensen *et al.*, 2002) y la homología estructural con actina fue confirmada por estudios de cristalografía de Rayos X (van den Ent *et al.*, 2002). Otro miembro procariota de la misma familia de proteínas que unen ATP a la que pertenece la actina es FtsA, cuya función se cree que es el anclaje de FtsZ a la membrana (van den Ent y Löwe, 2000).

Estas relaciones funcionales y estructurales indican que el citoesqueleto eucariota tiene su origen en los organismos procariotas. El citoesqueleto eucariota, compuesto mayoritariamente de filamentos de actina, microtúbulos (polímeros de tubulina) y filamentos intermedios controla procesos vitales como la forma celular, la división, el movimiento y el transporte intracelular (Amos y Amos, 1991).

1.1.4 Bioquímica de FtsZ

FtsZ, como su homóloga estructural y funcional tubulina, une nucleótidos de guanina y tiene actividad GTPasa. La unión del nucleótido a FtsZ es independiente de la presencia de Mg^{2+} en el medio (P. López Navajas *et al.*, resultados no publicados), (Mukherjee *et al.*, 1993), como ocurre en otras proteínas que unen nucleótidos, las proteínas de la familia Rho, de la superfamilia Ras, que participan en la señalización celular en células eucariotas (Zhang *et al.*, 2000). El nucleótido unido a FtsZ puede liberarse si la fuerza iónica del medio es baja, pero en este mismo caso, la presencia de Mg^{2+} en el medio evita la liberación de nucleótido por parte de *M. jannaschii* FtsZ (Andreu *et al.*, 2002) o *E. coli* FtsZ (P. López Navajas *et al.*, resultados no publicados). El Mg^{2+} también estabiliza al nucleótido unido en otras proteínas, como tubulina (Menéndez *et al.*, 1998) y proteínas de la familia Rho (Zhang *et al.*, 2000). Existen diferencias en la afinidad de tubulina y FtsZ por el Mg^{2+} . La unión de Mg^{2+} a FtsZ unida a GDP (FtsZ-GDP) es de baja afinidad ($K_a \approx 10^3 M^{-1}$, (P. López Navajas *et al.*, resultados no publicados)), mientras que la unión a tubulina-GDP es de alta afinidad ($K_a \approx 10^7 M^{-1}$, (Menéndez *et al.*, 1998)).

Esta diferencia radica en que la unión de alta afinidad del Mg^{2+} a tubulina controla la estabilidad estructural del heterodímero de tubulina. En FtsZ, la unidad estructural de FtsZ es el monómero y no se requiere, por tanto, la unión de alta afinidad de Mg^{2+} a FtsZ. La unión de Mg^{2+} a FtsZ de baja afinidad, en la región milimolar, tiene un importante papel funcional en ambas proteínas; la oligomerización (Rivas *et al.*, 2000) y el óptimo ensamblaje de FtsZ (P. López Navajas *et al.*, resultados no publicados, y esta misma Memoria, sección 4.2.3.1 de Resultados) y tubulina (Lee y Timasheff, 1975) requieren concentraciones milimolares de Mg^{2+} .

FtsZ tiene una capacidad intrínseca para hidrolizar GTP, a diferencia de otras proteínas que hidrolizan GTP, como las proteínas G o Ras, que requieren de proteínas activadoras para la hidrólisis. La actividad GTPasa depende de la concentración de proteína (Lu *et al.*, 1998), como es de esperar de una proteína en la que el sitio de unión de GTP se forma por unión de dos monómeros (Scheffers *et al.*, 2002) y es activada por polimerización de FtsZ (Lu *et al.*, 1998). En *E. coli*, la actividad GTPasa es activada por el Mg²⁺ (Mukherjee y Lutkenhaus, 1999) y por el K⁺ (Lu *et al.*, 1998). La actividad específica de FtsZ (6 min⁻¹, determinada en un tampón a pH neutro conteniendo 100 mM KCl (Mingorance *et al.*, 2001)) es cien veces mayor que la de tubulina cuando se encuentra ensamblada en el microtúbulo; la repercusión que esta diferencia tiene *in vivo* aun no ha sido establecida (Addinall y Holland, 2002). La mayoría de los estudios de actividad GTPasa de FtsZ han sido realizados a pH 6.5, sin embargo, el pH de *E. coli* está bien regulado, variando entre 7.4 y 7.8, bajo condiciones de pH exterior en un rango muy amplio, entre 5.5 y 9 (Mingorance *et al.*, 2001), por lo tanto no se dispone de suficientes estudios sobre el ensamblaje de FtsZ en medios próximos, y, por lo tanto, más relevantes, al interior citoplasmático de *E. coli*.

1.1.5 Oligomerización de FtsZ

En presencia de GDP, *E. coli* FtsZ experimenta una asociación reversible ligada a magnesio que da lugar a la formación de oligómeros lineales de FtsZ. Dicha asociación se ha descrito como una asociación no cooperativa (isodésmica, ver sección 3.7.1 y Figura 3.8 en Materiales y Métodos) indefinida a partir del monómero, con unión de un ión Mg²⁺ adicional por cada subunidad de FtsZ añadida al oligómero, y se ve debilitada por el aumento de la fuerza iónica del medio (Rivas *et al.*, 2000). Esta asociación indefinida para la formación de oligómeros lineales se ve moderadamente

aumentada en presencia de altas concentraciones de macromoléculas que simulan el aglomerado citoplasma bacteriano (Rivas *et al.*, 2001)

Para evitar confusiones frecuentes, nos referiremos a la asociación de FtsZ como la formación de oligómeros, mientras que el ensamblaje implica generalmente la formación de polímeros largos y superestructuras biológicas (Andreu *et al.*, 2004). En condiciones similares a las descritas más arriba, FtsZ, en presencia de Mg^{2+} y GTP ensambla en polímeros largos. Se ha propuesto que la interacción entre monómeros es similar en el caso de oligómeros y polímeros de FtsZ (Rivas *et al.*, 2000).

1.1.6 Ensamblaje de FtsZ: energética y dinámica

Los polímeros fisiológicamente relevantes, como ocurre con los de actina y tubulina, ensamblan cooperativamente (Andreu *et al.*, 2004). Las características de un ensamblaje cooperativo (ver Materiales y Métodos, sección 3.7.1) son, de manera breve, las siguientes: las subunidades del polímero están conectadas por dos clases de enlaces para formar un polímero helicoidal o bidimensional; el ensamblaje se produce en dos etapas, en la primera se forma el núcleo de polimerización y en la segunda el polímero crece mediante adición de nuevas subunidades, la formación del núcleo es energéticamente costosa, pero una vez formado, la adición de nuevas subunidades es más favorable; por último, el ensamblaje exhibe una concentración crítica de polimerización (C_c), por encima de la cual las subunidades de proteína se distribuyen en dos poblaciones distintas, especies solubles y polímeros largos (Oosawa y Asakura, 1975).

El ensamblaje de FtsZ en presencia de GTP ha sido descrito como cooperativo, y se ha determinado la concentración crítica de ensamblaje en distintas condiciones (Caplan y Erickson, 2003; Huecas y Andreu, 2003; Mukherjee y Lutkenhaus,

1998; Mukherjee y Lutkenhaus, 1999; White *et al.*, 2000). Otros autores (Romberg *et al.*, 2001) han descrito el mecanismo de ensamblaje de FtsZ como no cooperativo (isodésmico, ver Materiales y Métodos, sección 3.7.1 y Figura 3.8), basándose en que FtsZ ensamblaba mayoritariamente en filamentos de una sola cadena a pH 6.5 y a concentraciones de FtsZ por debajo de 2 μM y en que no existía una concentración crítica de ensamblaje en ensayos de centrifugación. Más recientemente, el mismo laboratorio, ha descrito el ensamblaje de FtsZ como aparentemente cooperativo (Caplan y Erickson, 2003).

El uso de tampones que no contienen potasio provoca la supresión de la hidrólisis de GTP por parte de *M. jannaschii* FtsZ. El estudio termodinámico de este proceso de ensamblaje en el equilibrio indica que la elongación del polímero es un proceso endotérmico en el que se une un ion Mg^{2+} por cada subunidad que se incorpora al polímero (Huecas y Andreu, 2003), tal como ocurría en el proceso de oligomerización de FtsZ-GDP (ver más arriba) (Rivas *et al.*, 2000). *E. coli* FtsZ a pH neutro requiere para el ensamblaje la presencia conjunta de Mg^{2+} y K^+ (Mingorance *et al.*, 2001). A pH 6.5, sin embargo, FtsZ ensambla en ausencia de K^+ (Huecas y Andreu, 2003; Romberg *et al.*, 2001). Se requiere una concentración milimolar de Mg^{2+} para un ensamblaje óptimo de FtsZ (P. López Navajas *et al.*, resultados no publicados, y esta Memoria, sección 4.2.3.1 de Resultados)

La presencia en disolución de los polímeros de FtsZ está acoplada a la hidrólisis de GTP, coincidiendo la desaparición de los polímeros con el agotamiento del GTP (Mukherjee y Lutkenhaus, 1998). Los factores que tienen una influencia en la velocidad de hidrólisis de GTP, K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , afectan también a la estabilidad de los polímeros (Mukherjee y Lutkenhaus, 1998; Mukherjee y Lutkenhaus, 1999; Yu y Margolin, 1997).

En la hidrólisis de GTP se requieren varias etapas: unión de GTP, hidrólisis, liberación de fosfato y liberación de GDP, y la etapa más lenta en el ciclo determina el intermedio que predomina (Romberg y Levin, 2003). Aunque ha existido cierta controversia acerca de este hecho (Scheffers y Driessen, 2002), se ha determinado finalmente que en el ciclo de FtsZ, la etapa limitante es la hidrólisis de GTP y en estado estacionario los polímeros de FtsZ contienen mayoritariamente GTP (Mingorance *et al.*, 2001; Romberg y Mitchison, 2004). Se ha encontrado que el intercambio de nucleótido puede darse tanto en las subunidades no ensambladas como en las subunidades dentro del polímero (Mingorance *et al.*, 2001). Si el nucleótido no se pudiera intercambiar dentro del polímero, la hidrólisis dirigiría la dinámica del polímero, como ocurre en tubulina, pero sin embargo, el nucleótido sí puede intercambiarse dentro del polímero, sugiriendo que el papel de la hidrólisis debe ser diferente, por ejemplo, produciendo cambios en los polímeros de FtsZ que se forman *in vivo* (Desai y Mitchison, 1998).

En el ensamblaje de microtúbulos, la hidrólisis de GTP provoca comportamientos complejos, de no-equilibrio, como la polimerización polar (en inglés, *tread-milling*) e inestabilidad dinámica. Cada protofilamento de tubulina dentro de un microtúbulo es una estructura polar, con β -tubulina expuesta en un extremo, llamado *extremo más* y α -tubulina en el otro, llamado *extremo menos*. El extremo más crece de manera continua, rápida, mientras el extremo menos se acorta también de manera continua, pero a una velocidad menor.

En contraste con FtsZ, en los microtúbulos, el intercambio de nucleótido es solo posible cuando las subunidades se han liberado del microtúbulo. La hidrólisis del GTP se produce poco después de la polimerización, y se genera una distribución asimétrica de GTP, GDP + P_i y GDP a lo largo del microtúbulo, habiendo más GDP en

el extremo menos, donde las subunidades de tubulina disocian y más GTP en el extremo más, donde están asociando nuevas subunidades. Las distintas funciones que los microtúbulos desempeñan *in vivo*, como el control de la forma celular y del movimiento de la célula, se basan en este hecho. Los microtúbulos establecen trayectorias dentro de la célula, de manera que distintos orgánulos y componentes celulares utilizan a los microtúbulos para moverse, gracias a la polaridad de su mecanismo de ensamblaje. Los microtúbulos que forman el huso mitótico anclan sus extremos menos en el centrosoma, dirigiendo la separación de los cromosomas en la mitosis (Bray, 2001). El mecanismo de ensamblaje polar ha sido extensamente caracterizado en la polimerización de otra proteína del citoesqueleto, actina (Pollard y Cooper, 1986; Wegner, 1976).

La inestabilidad dinámica se caracteriza por la coexistencia de microtúbulos en estado de despolimerización y microtúbulos en estado de polimerización (ver Figura 1.4). Los extremos de los microtúbulos alternan, al azar, de manera abrupta, entre estos periodos de crecimiento y despolimerización. Este fenómeno está dirigido por la hidrólisis del GTP. De acuerdo con esto, los polímeros de tubulina-GTP son rectos, mientras que los polímeros de tubulina-GDP son curvos. Como la hidrólisis se produce poco después del ensamblaje, los microtúbulos contienen principalmente tubulina-GDP, que se encontrará forzada a estar en una conformación no curvada por interacciones laterales con otros vecinos. La energía que proviene de la hidrólisis del GTP se acumula en forma de energía mecánica dentro del microtúbulo. Sin embargo, cuando se produce la pérdida de las subunidades tubulina-GTP del extremo más, se produce una despolimerización rápida, pasando las subunidades tubulina-GDP a su conformación más estable, la conformación curva.

No se conoce todavía si en la dinámica de ensamblaje de FtsZ se dan estos fenómenos de no-equilibrio porque los polímeros de FtsZ son demasiado pequeños para observar su crecimiento bajo el microscopio óptico, si bien estos fenómenos no serían esperables de un polímero que contiene mayoritariamente GTP. Es necesario la búsqueda de nuevas metodologías para estudiar la dinámica del ensamblaje de FtsZ.

1.1.7 Organización estructural de los polímeros de FtsZ y su relación con el anillo Z funcional

Hay muchos estudios *in vitro* sobre el ensamblaje de FtsZ, que pueden ayudar a comprender la posible estructura y mecanismo del anillo Z. En presencia de Mg^{2+} y GTP, FtsZ forma polímeros *in vitro* de estructura variada. La estructura más simple de todas es el polímero lineal sencillo, llamado protofilamento. Los protofilamentos, de 5 nm de ancho se han observado por microscopía electrónica (Romberg *et al.*, 2001). Los protofilamentos pueden asociar lateralmente para formar polímeros dobles (a veces llamados “filamentos anchos” (Löwe y Amos, 1999; Oliva *et al.*, 2003)), u otras estructuras compuestas por mayor número de filamentos como láminas, redes (asociación lineal no ordenada de filamentos) y tubos (asociaciones antiparalelas de pares de filamentos de manera circular para formar una estructura tubular (Löwe y Amos, 1999; Lu *et al.*, 2000)).

Las láminas se han visualizado en presencia de Ca^{2+} (Löwe y Amos, 1999), DEAE-dextrano y sobre una monocapa de lípidos catiónicos (Erickson *et al.*, 1996). En presencia de Ca^{2+} , FtsZ silvestre (Löwe y Amos, 1999) y FtsZ con una extensión de 6 histidinas en su extremo C-terminal (Oliva *et al.*, 2003), ambas de *Methanococcus jannaschii*, forman láminas de polímeros ordenadas formadas por pares de filamentos paralelos que se disponen entre sí de manera antiparalela. Los protofilamentos

de FtsZ asocian lateralmente para formar estructuras más complejas además de en presencia de Ca^{2+} (Yu y Margolin, 1997), al interactuar con la proteína ZipA de *Escherichia coli* (Hale *et al.*, 2000), ZapA de *Bacillus subtilis* (Gueiros-Filho y Losick, 2002), y con altas concentraciones de glutamato (Beuria *et al.*, 2003). También se han descrito polímeros de FtsZ de forma circular, mini-anillos, pequeños círculos formados tras la polimerización de FtsZ sobre una monocapa de lípidos catiónicos (Erickson *et al.*, 1996).

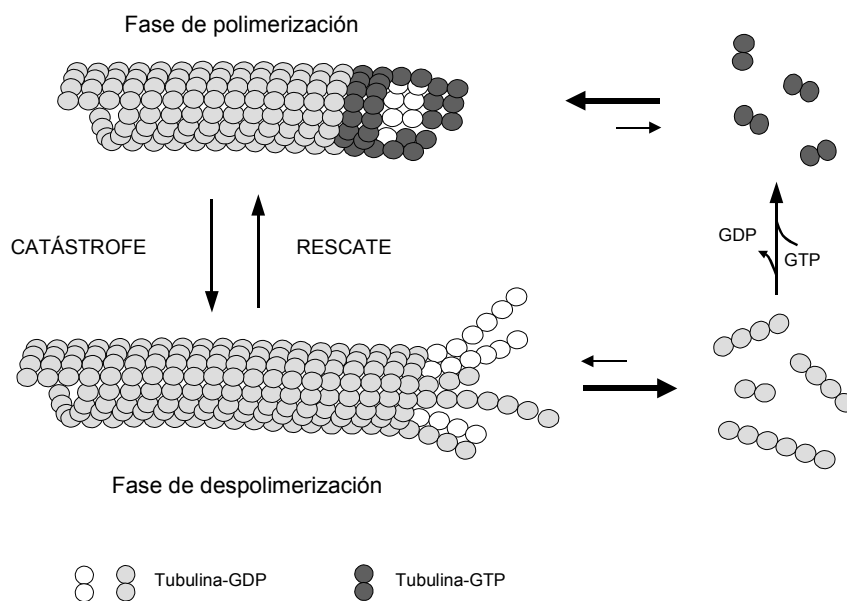


Figura 1.4. **Inestabilidad dinámica de microtúbulos.** La inestabilidad dinámica se caracteriza por la coexistencia de microtúbulos en estado de polimerización y en estado de despolimerización. Tubulina-GTP se incorpora al extremo más del microtúbulo, y el GTP es hidrolizado durante o después del ensamblaje. Cuando se pierden las subunidades de Tubulina-GTP en el extremo, el microtúbulo pasa de una fase de polimerización a una fase de despolimerización (catástrofe), produciéndose una curvatura de los polímeros del extremo, que contienen GDP. Los microtúbulos en fase de despolimerización también pueden volver a una fase de polimerización (rescate).

Como resultado de todos los estudios realizados *in vitro*, es posible preguntarse cuál de estos polímeros de FtsZ descritos está presente en el anillo Z. Hasta el momento no se ha podido visualizar ningún polímero de FtsZ al microscopio electrónico en secciones finas del septo de bacterias en división. Estructuras de varios protofilamentos podrían haber sido detectadas con esta técnica, pero aun descartando estructuras de gran diámetro, el anillo Z podría estar formado por varios protofilamentos, en forma de láminas o cintas (Addinall y Holland, 2002).

El descubrimiento de proteínas que interactúan con FtsZ, como ZipA y ZapA (ver sección 1.1.8), y que favorecen la formación de asociaciones de protofilamentos *in vitro* (ver más arriba), ha llevado a la propuesta de que las estructuras operativas en el anillo Z podrían ser redes de protofilamentos (Margolin, 2003), tal como se esquematiza en la Figura 1.5.

Los anillos Z de células de *E. coli* en crecimiento son muy dinámicos. Mediante la inmunodetección de anillos formados en células de un cultivo bacteriano en el que se inhibió la respiración con azida sódica, se concluyó que cuando se inhibe la respiración (el aporte de energía a la bacteria) los anillos desaparecen, confirmando que el anillo Z no es una estructura estática, y requiere un continuo suministro de energía (Rueda *et al.*, 2003). El intercambio de subunidades de FtsZ en el anillo ha sido examinado mediante recuperación de la señal de fluorescencia después de fotoblanqueo (FRAP, del inglés *Fluorescence Recovery After Photobleaching*) de fusiones FtsZ-GFP, encontrando que hay un continuo intercambio de subunidades con el conjunto de moléculas de FtsZ presentes en el citoplasma, con un tiempo de remodelación de medio minuto, y que este comportamiento dinámico está relacionado con la actividad GTPasa (Stricker *et al.*, 2002).

No se conoce el mecanismo por el que el anillo Z se contrae durante el proceso de invaginación de la membrana bacteriana. Se han presentado diferentes modelos para intentar explicar el papel de FtsZ en este proceso. Dentro de las hipótesis que establecen un papel activo de FtsZ en la acción motora del anillo Z, se ha sugerido una transición de especies de FtsZ unidas a GTP a formas unidas a GDP que induce una curvatura en los polímeros (Lu *et al.*, 2000). Dicha curvatura podría ejercer una fuerza hacia el citoplasma que causara la invaginación de la membrana. También se ha propuesto que el acortamiento del anillo Z podría ocurrir por disociación de subunidades de FtsZ de los polímeros, con la posterior formación de nuevos contactos entre las subunidades restantes (Rothfield y Justice, 1997).

Por último, otros modelos atribuyen un papel pasivo a FtsZ en este proceso, sirviendo como molde para otras proteínas que ejercerían la fuerza motora. En este caso, las proteínas motoras podrían dirigir el deslizamiento de unos protofilamentos de FtsZ sobre otros (Bramhill y Thompson, 1994; Erickson *et al.*, 1996), mecanismo análogo al del anillo de división de actina y miosina de células eucariotas. Hasta el momento no ha sido descubierta la interacción de FtsZ con proteínas motoras análogas a las proteínas asociadas a microtúbulos como las kinesinas o dineínas.

1.1.8 Modulación del ensamblaje de FtsZ por otros componentes macromoleculares

Se han descubierto varias proteínas cuya interacción afecta al ensamblaje de FtsZ, por lo tanto, en el ensamblaje de FtsZ existe un conjunto de factores que participan en la regulación de este proceso. Aunque FtsZ está muy conservada entre distintas especies, parece que solo dos de las proteínas que interaccionan con FtsZ están amplia-

mente conservadas, FtsA y ZapA, lo que sugiere que las proteínas que regulan el ensamblaje de FtsZ tienen efectos sutiles adaptados a la medida del organismo donde se encuentran.

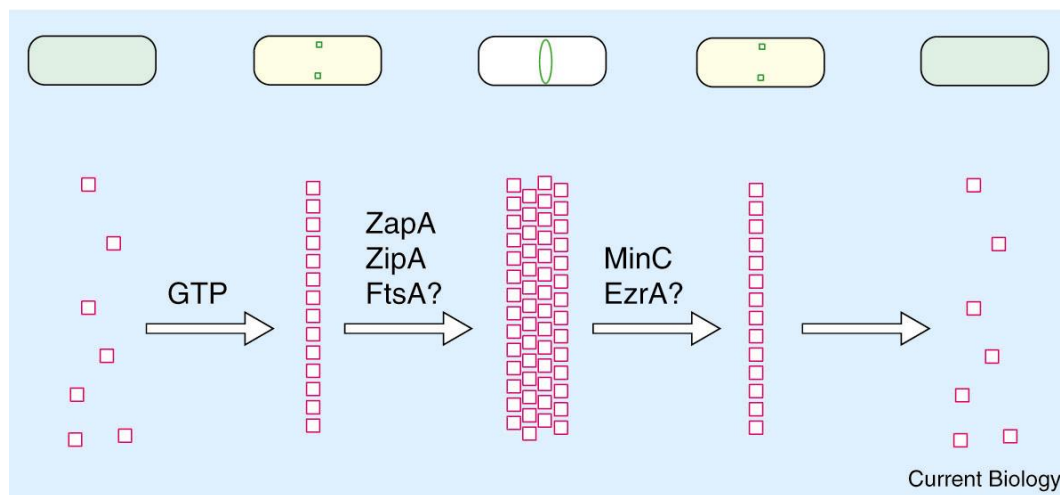


Figura 1.5. **Ciclo de ensamblaje/desensamblaje del anillo Z.** Se muestra el ciclo de formación de protofilamentos y redes de protofilamentos de FtsZ a partir de monómeros, seguido del desensamblaje de las redes y luego de los protofilamentos. Aunque no se conoce, se asume que las redes de protofilamentos son las estructuras operativas en el anillo Z. Se indican las proteínas que participan en algunos de los pasos del ciclo. Los signos interrogantes después del nombre de una proteína indican que no se conoce ninguna actividad bioquímica de estas proteínas sobre el ensamblaje de FtsZ. La potencial distribución de FtsZ en la célula se muestra en la parte superior. Figura tomada de (Margolin, 2003).

Hasta la fecha, entre las proteínas que interaccionan con FtsZ estabilizando el anillo Z se encuentran FtsA, ZipA y ZapA (ver Figura 1.5). **FtsA** es una proteína muy conservada que interacciona con FtsZ, y es la única proteína de división conocida, además de FtsZ, que no tiene una región de unión a la membrana (Errington *et al.*,

2003). Aunque FtsA no es necesaria para la formación del anillo Z, la estabilidad y la función del anillo se ve afectada por los niveles de FtsA (Romberg y Levin, 2003). Los niveles de concentración de FtsA (también los de ZipA y FtsZ) permanecen constantes a lo largo de todo el ciclo celular, mostrando que el ensamblaje de estas proteínas no está promovido por cambios de concentración. FtsA se localiza en el sitio de división siguiendo el mismo patrón y evolución temporal que FtsZ (Rueda *et al.*, 2003). FtsA, como ya se ha comentado más arriba, forma parte de la familia de las proteínas procariotas homólogas de la actina. **ZipA** no es tampoco indispensable para la formación del anillo, pero sí para el correcto ensamblaje del resto de proteínas en el sitio de división (Margolin, 2000). ZipA es esencial en *E. coli*, y está conservada solo en la subdivisión γ de las bacterias gram-negativas. Experimentos genéticos sugieren que ZipA es esencial para la integridad del anillo Z durante la división celular (RayChaudhuri, 1999), y se ha encontrado que promueve el alineamiento de protofilamentos de FtsZ *in vitro* (Hale *et al.*, 2000). ZipA consiste en un dominio insertado en la membrana que está anclado al extremo C-terminal, responsable de la unión a FtsZ, mediante un dominio flexible (Ohashi *et al.*, 2002). **ZapA**, en contraste con FtsA y ZipA, parece esencial para la división de *B. subtilis*. Interacciona con FtsZ *in vitro* y favorece el alineamiento de filamentos de FtsZ para formar redes de filamentos (Gueiros-Filho y Losick, 2002).

En las primeras etapas del ciclo celular no se observan anillos (Rueda *et al.*, 2003), luego FtsZ debe permanecer soluble en el citoplasma antes de la formación del anillo. Existen factores que desestabilizan la formación de anillos Z para una correcta regulación del ciclo celular. Se han descrito, hasta el momento, las siguientes proteínas: el sistema MinCD, EzrA (ver Figura 1.5) y SulA. **MinC** y MinD forman un inhibidor de la división que se encuentra predominantemente en los polos celulares,

siendo responsable de la selección del sitio de división (existe otro factor que puede regular la selección del sitio de división, la oclusión del nucleoide, ver 1.1.2). MinC es la proteína del sistema que interacciona con FtsZ inhibiendo la formación del anillo Z (Hu *et al.*, 1999). Se ha determinado *in vitro* que una fusión MalE-MinC, que mantiene la actividad biológica de MinC, previene la polimerización de FtsZ sin inhibir la actividad GTPasa (Hu *et al.*, 1999). **EzrA** podría actuar desestabilizando la polimerización de FtsZ y previniendo así la formación de anillos en sitios inapropiados (Romberg y Levin, 2003). La naturaleza bioquímica de la interacción EzrA-FtsZ no ha sido caracterizada todavía. **SulA** forma parte de la respuesta frente a daño celular SOS. SulA se une a FtsZ e inhibe tanto su ensamblaje como la hidrólisis de GTP, lo que sugiere un posible modelo en el que SulA se uniría a FtsZ previniendo la nueva adición de subunidades a FtsZ (Romberg y Levin, 2003).

1.2 Implicaciones biológicas de la aglomeración macromolecular

1.2.1 El interior bacteriano está aglomerado

El ambiente intracelular en el que FtsZ se localiza y funciona difiere fundamentalmente de las condiciones comúnmente empleadas en el laboratorio. Gran parte del trabajo experimental *in vitro* se realiza en condiciones de disolución en las que la concentración total de macromoléculas es baja (1 g/l o menos). Sin embargo, el citoplasma bacteriano posee una alta fracción de su volumen ocupado por macromoléculas (proteínas y ácidos nucleicos), siendo su concentración total de alrededor de 400 g/l (Record Jr. *et al.*, 1998; Zimmerman y Trach, 1991) (ver Figura 1.6 y Figura 1.7).

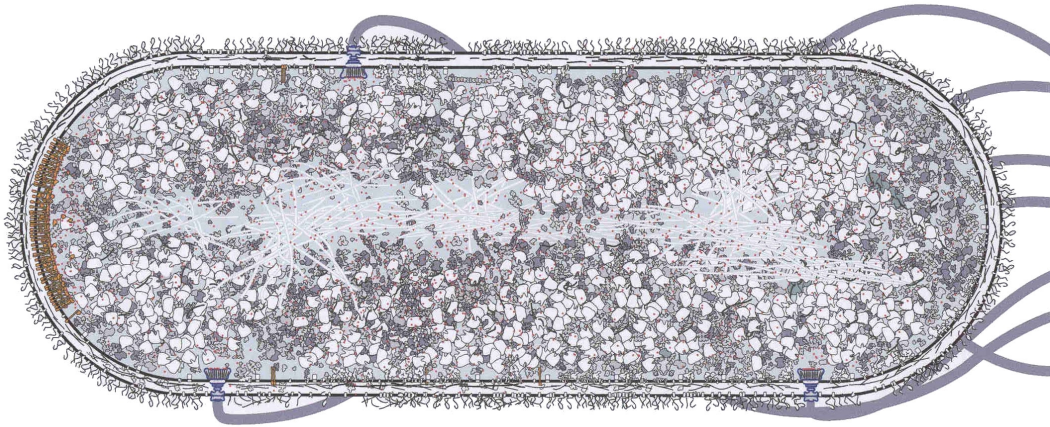


Figura 1.6. **Representación esquemática del interior de *E. coli*.** Los componentes del citoplasma están representados a escala y en una proporción realista. Figura adaptada de (Goodsell, 1991), por cortesía de Dennis Bray, Universidad de Cambridge, Reino Unido.

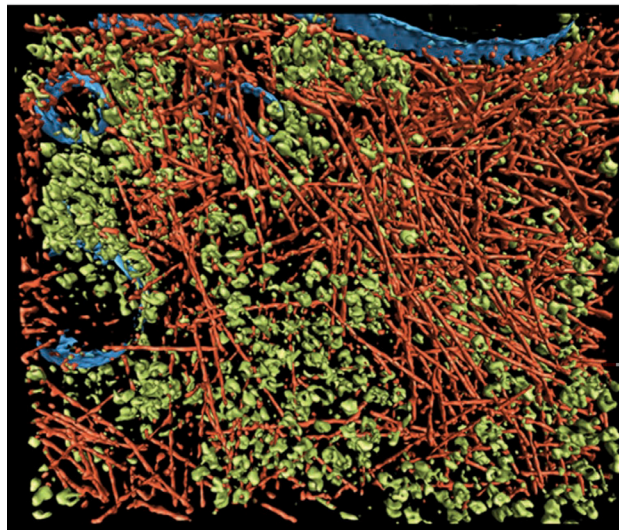


Figura 1.7. **Reconstrucción tridimensional del interior de *Dictyostelium discoideum*.** Mediante tomografía electrónica se ha reconstruido la red de filamentos de actina (en rojo; los colores han sido elegidos arbitrariamente), membranas (azul) y complejos macromoleculares, principalmente ribosomas (azul). Figura tomada de (Medalia *et al.*, 2002).

Esencialmente en todos los compartimentos fisiológicos las macromoléculas están presentes a elevadas concentraciones (del orden de cientos de g/l), por lo que podemos decir que la mayoría de las reacciones macromoleculares y procesos *in vivo* tienen lugar en medios en que las macromoléculas ocupan una fracción considerable (entre el 10 y el 40 %) del volumen total (Fulton, 1982; Record Jr. *et al.*, 1998). Este medio se denomina “aglomerado” y no “concentrado”, porque no es necesariamente una única especie la que está presente a alta concentración. El término “aglomeración macromolecular” se refiere a la influencia de las repulsiones estéricas sobre reacciones y procesos que ocurren en medios con alta concentración de macromoléculas (Minton, 1983). Este fenómeno de exclusión de volumen está demostrado, tanto teórica como experimentalmente, que puede afectar considerablemente a un gran número de procesos bioquímicos, biofísicos y fisiológicos que incluyen, entre otros, los siguientes: estabilidad y plegamiento de proteínas, conformación de ácidos nucleicos, equilibrio y cinética de asociaciones proteína-proteína y proteína-ácido nucleico, cristalización y polimerización de proteínas, actividad catalítica de enzimas y regulación del volumen celular (Ellis, 2001; Minton, 2000; Minton, 2001; Zimmerman y Minton, 1993).

1.2.2 Exclusión de volumen: consecuencias energéticas

La repulsión estérica es una de las interacciones fundamentales entre macromoléculas, aunque muchas veces este hecho no se tiene en cuenta. En una disolución aglomerada, definida como la disolución en la que las macromoléculas ocupan una fracción significativa del volumen total, la contribución de una especie molecular individual a la energía libre total de la disolución (es decir, la actividad química de este soluto) depende fuertemente del volumen accesible a esa especie molecular, o lo que

es equivalente, de la probabilidad de que una de esas moléculas colocada al azar no solape con una de las moléculas preexistentes en la disolución. Esta probabilidad (también podríamos hablar en términos de libertad estérica o entropía) es una función muy sensible al tamaño y la forma del soluto, como se ilustra en la Figura 1.8, que esquemáticamente representa un elemento de volumen conteniendo macromoléculas esféricas (en negro) que ocupan alrededor del 30 % del volumen total, como es típico en los compartimentos y fluidos biológicos.

La probabilidad de introducir con éxito una molécula trazadora (T) es proporcional a la fracción de volumen total que puede ser ocupado por el centro de T, lo que implica que cualquier molécula previamente presente debe estar alejada de T una distancia superior a la suma de los radios de T y la molécula preexistente. Este volumen, denominado *accesible*, es indicado por las zonas azules. El volumen complementario, se denomina volumen *excluido*. Si T es muy pequeña comparada con las macromoléculas presentes previamente en la región (Figura 1.8A), el volumen accesible es aproximadamente igual al volumen total no ocupado por el resto de macromoléculas. Sin embargo, si el tamaño de T es comparable al de las macromoléculas presentes previamente (Figura 1.8B), el volumen accesible es considerablemente menor y la contribución de la interacción estérica a la energía libre total es por consiguiente más grande. El volumen accesible puede visualizarse en este caso dibujando un círculo alrededor de las esferas negras, que marca la distancia mínima respecto de la esfera a la que puede situarse la molécula de prueba sin que las superficies de ambas entren en contacto, de manera que el volumen accesible a la molécula trazadora, indicado en color azul, es la parte del volumen total que no está ocupado por las esferas negras ni por los círculos. Claramente, una de las maneras en que el sistema puede reducir su energía libre es la de maximizar su volumen accesible (o, alternativamente, minimizar

el volumen excluido). Por consiguiente, una consecuencia química fundamental de la aglomeración macromolecular es que favorece los procesos que conducen a una reducción en el volumen excluido, como son las reacciones de compactación y asociación (Ellis, 2001; Minton, 2000; Minton, 2001). Sin embargo, es importante apuntar que aunque la aglomeración macromolecular potenciará la asociación de macromoléculas que tienen una tendencia inherente para asociar, no creará esta tendencia *de novo*.

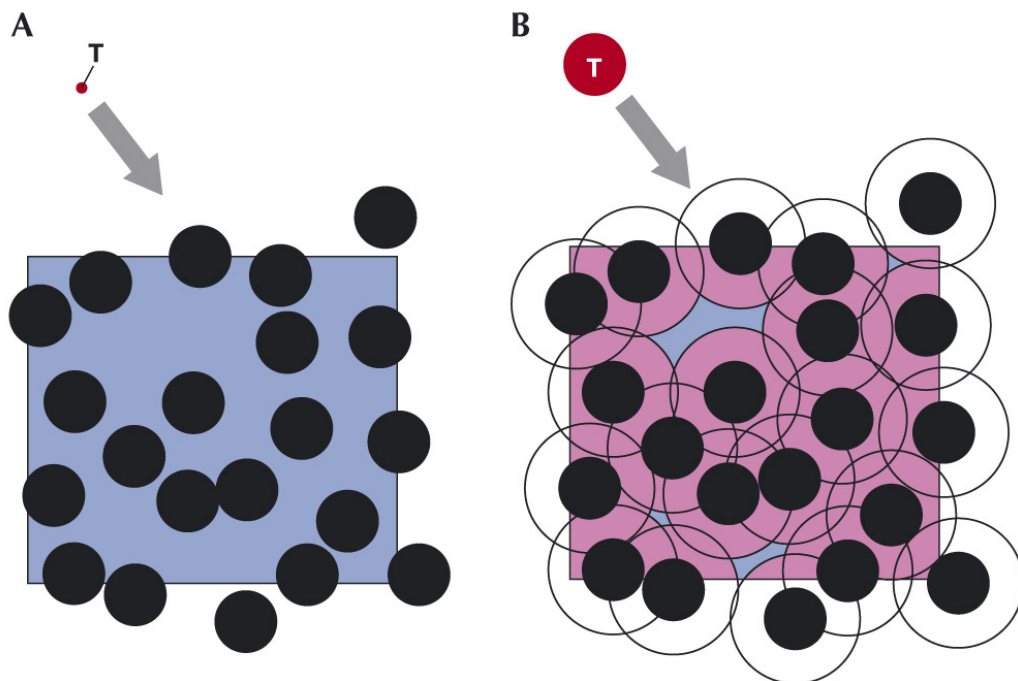


Figura 1.8. Volumen excluido (mostrado en rosa y negro) y volumen accesible (mostrado en azul) en una disolución de macromoléculas. Los dos paneles muestran el volumen accesible al centro de una molécula trazadora (T) en el caso de que sea mucho más pequeña (A) y de tamaño similar (B) al tamaño de las macromoléculas preexistentes (ver el texto). Reproducida de (Rivas *et al.*, 2004).

Además de las consecuencias termodinámicas resumidas más arriba, la exclusión de volumen puede disminuir considerablemente la difusión macromolecular en medios altamente aglomerados. Las interacciones estéricas, por tanto, también tienen una fuerte influencia sobre las velocidades de reacciones controladas por difusión en medios aglomerados y en espacios confinados (Minton, 2001), tales como los intersticios del citoesqueleto o las cavidades de las chaperoninas (Ellis, 2001).

1.2.3 Efecto de la aglomeración macromolecular sobre el ensamblaje de proteínas

Una de las consecuencias que se desprenden del apartado anterior es que las macromoléculas más grandes y elongadas se verán más afectadas en su reactividad por la aglomeración macromolecular que las macromoléculas pequeñas y compactas. Esta es la razón por la que uno de los efectos más pronunciados de la exclusión de volumen descritos sea el incremento de la velocidad y grado de formación de grandes ensamblajes macromoleculares, tales como los polímeros de proteínas (Minton, 2000). Existen varias observaciones experimentales sobre el efecto que la aglomeración macromolecular tiene sobre la polimerización de proteínas. El ensamblaje de la forma de hemoglobina implicada en la anemia falciforme fue el primer proceso de polimerización en el que se observó un considerable efecto de la aglomeración macromolecular (Ferrone *et al.*, 1985a; Ferrone *et al.*, 1985b; Minton, 1977; Ross y Minton, 1977). La adición de polímeros inertes o proteínas a soluciones de actina (Drenckhahn y Pollard, 1986; Lindner y Ralston, 1997) o tubulina (Herzog y Weber, 1978) disminuye sustancialmente la concentración crítica de formación de los polímeros y simultáneamente incrementa la velocidad de formación de las fibras. La aglomeración macromolecular tiene efectos significativos en la formación de fibras de amiloide de α -

sinucleína, un proceso que está implicado en la enfermedad del Parkinson (Uversky *et al.*, 2001). En el caso de FtsZ, se ha descrito que la aglomeración macromolecular facilita la formación magnesio-dependiente de oligómeros FtsZ-GDP (Rivas *et al.*, 2001).

La teoría de exclusión de volumen también predice que los filamentos formados en medios aglomerados tenderán a alinearse espontáneamente (Herzfeld, 1996). En un medio diluido la rotación y la traslación de los filamentos están poco impedidas y el estado isotrópico (partículas orientadas al azar) tiene una mayor entropía rotacional que el estado nemático (partículas alineadas). Dado que la entropía traslacional de ambos estados es similar la orientación al azar de los filamentos está más favorecida termodinámicamente por tener una mayor libertad en la rotación (mayor entropía) que los filamentos ordenados (Figura 1.9)

En un medio altamente aglomerado, el movimiento de las partículas está muy restringido, y los filamentos alineados son termodinámicamente más favorables porque tienen mayor libertad en la traslación (poseen una mayor entropía) al reducir al máximo el volumen excluido. Esta es la razón por la que es mucho más fácil llenar una caja con cerillas, a partir de una cierta densidad de empaquetamiento, si están alineadas que si están orientadas al azar. Así por ejemplo, se ha descrito el alineamiento de filamentos de fibrina (Torbet, 1986) y de actina (Suzuki *et al.*, 1989) en medios aglomerados. Este fenómeno constituye un interesante caso de generación de orden vía entropía (Herzfeld, 1996)



Figura 1.9. **Transiciones de fase dirigidas por entropía en condiciones de aglomeración macromolecular.** Predicción teórica del comportamiento de disoluciones de moléculas con forma esférica (arriba) y moléculas de forma cilíndrica (abajo) en función de la concentración de otras macromoléculas de la disolución. En el caso de moléculas esféricas se predice una transición de la fase fluida (izquierda) a la fase de líquido cristalino (derecha) cuando se aumenta la concentración de otras macromoléculas en la disolución. La transición en el caso de moléculas cilíndricas es de la fase isotrópica a la fase nemática, en la cual los filamentos alinean. Por cortesía de J. Herzfeld, Brandeis University, EEUU.

Objetivos

2 OBJETIVOS

Es generalmente aceptado que las reacciones de oligomerización y ensamblaje de FtsZ estudiadas *in vitro* deben jugar un papel importante en la división celular bacteriana *in vivo*, pero se desconoce la correlación entre estos procesos *in vitro* e *in vivo*. Como se ha mencionado en la Introducción, las condiciones usadas en los ensayos *in vitro* difieren sustancialmente del aglomerado citoplasma bacteriano donde FtsZ está localizada y ejerce su función.

El objetivo central de esta Tesis es el estudio de la influencia de condiciones de aglomeración macromolecular semejantes a las fisiológicas sobre la organización estructural y dinámica del ensamblaje (GTP-dependiente) de la proteína de *E. coli* FtsZ, que es esencial en división celular. Se conoce que la aglomeración macromolecular puede modificar considerablemente las propiedades cinéticas y en el equilibrio de reacciones y procesos macromoleculares (Minton, 1998), pero su papel en la división celular bacteriana está prácticamente inexplorado (excepto en (Rivas *et al.*, 2000), ver apartado 1.1.5 de la Introducción). Esta aproximación es novedosa dentro del abordaje experimental en división celular bacteriana.

Los objetivos concretos que se plantearon en este trabajo de Tesis son los siguientes:

La caracterización en medios diluidos, que contienen las concentraciones apropiadas de osmolitos fisiológicos del citoplasma bacteriano de E. coli (glutamato, acetato, potasio), de:

1. **La oligomerización de FtsZ en su forma unida a GDP**, mediante métodos de ultracentrifugación analítica (equilibrio y velocidad de sedimentación).
2. **El ensamblaje de FtsZ en presencia de GTP**, proceso más complejo y fisiológicamente más relevante. En este segundo objetivo nos planteamos:
 - Optimizar un ensayo de polimerización en presencia de un sistema enzimático de regeneración del GTP que nos permitiera mantener estables los polímeros de FtsZ durante la escala de tiempo (horas) de los estudios bioquímicos y biofísicos previstos (la hidrólisis del GTP por la actividad GTPásica intrínseca de FtsZ está ligada al proceso de desensamblaje de los polímeros de FtsZ).
 - Estudiar la dependencia del proceso de ensamblaje de FtsZ con la concentración de proteína, mediante ensayos de centrifugación diferencial y dispersión de luz. Estos experimentos nos permitirán saber si existe (o no) una concentración crítica de polimerización, información de interés para definir el mecanismo de ensamblaje de FtsZ (en condiciones de estado estacionario).
 - Caracterizar la morfología de los polímeros de FtsZ mediante microscopía electrónica y de fuerzas atómicas (AFM).
 - Determinar la distribución de tamaños de los polímeros de FtsZ en disolución, mediante el uso combinado de velocidad de sedimentación, dispersión de luz dinámica y modelado hidrodinámico.

La caracterización de la organización estructural, la energética y la dinámica de los polímeros formados por FtsZ en medios aglomerados que asemejen las condiciones existentes en el interior bacteriano. Para ello, nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

- Determinar el efecto de la aglomeración macromolecular sobre la morfología y la organización estructural de los polímeros de FtsZ, mediante microscopía electrónica de transmisión sobre muestras teñidas negativamente y sobre secciones finas de los polímeros, AFM y microscopía de fluorescencia.
- Estudiar la dependencia con la concentración de proteína y con la concentración de agentes de aglomeración del proceso de ensamblaje de FtsZ (en estado estacionario), mediante el uso combinado de métodos de centrifugación diferencial, turbidez y dispersión de luz a 90°. Esta información es importante para entender el mecanismo de polimerización de FtsZ en medios aglomerados y su relación con el ensamblaje en medios diluidos.
- Caracterizar el efecto de la aglomeración macromolecular sobre la dinámica de los polímeros de FtsZ mediante técnicas de dispersión de luz, así como sobre la cinética de hidrólisis e intercambio de GTP en el polímero de FtsZ.
- Explorar las posibles implicaciones biotecnológicas de estos estudios: desarrollo de nuevos métodos susceptibles de ser aplicados en la búsqueda de inhibidores del ensamblaje de FtsZ (posibles antibióticos) en condiciones fisiológicas de aglomeración macromolecular.
- Explorar las posibles implicaciones biológicas de estos estudios: organización estructural del anillo Z *in vivo* y mecanismos que regulan su formación.

Materiales y Métodos

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Reactivos

Los nucleótidos GDP y GTP fueron suministrados por Sigma y Roche Molecular Biochemicals, respectivamente. El nucleótido radiactivo [γ - ^{32}P]-GTP (5000 Ci/mmol) fue de Amersham Biosciences. El análogo GMPCPP (guanosina-5'-[(α,β)-metileno]trifosfato), que es hidrolizado por FtsZ alrededor de diez veces más despacio que el GTP, fue suministrado por Jena Biosciences. Se empleó el 5-isotiocianato de fluoresceína (FITC) comercializado por Molecular Probes Inc. La resina Araldita 506 fue suministrada por Tousimis. Otros reactivos químicos de grado analítico fueron de Merck o Sigma. Los agentes de aglomeración macromolecular (dextrano T70 y Ficoll 70, ambos con una masa molecular promedio de 70000 g/mol) fueron obtenidos de Amersham Biosciences. Estos últimos fueron utilizados sin una purificación posterior, después de ser dializados extensivamente frente al tampón de trabajo.

3.2 Expresión y purificación de la proteína FtsZ

E. coli FtsZ se purificó siguiendo el método de precipitación inducida por calcio, descrito previamente en (Rivas *et al.*, 2000). Brevemente, FtsZ fue sobreexpresada en una cepa de *E. coli* BL21(DE3), resistente a kanamicina y transformada con el plásmido pMFV56, que contiene el gen de *E. coli* *ftsZ* clonado en un vector pET-28A de Novagen. Las células se crecieron a 37 °C en medio LB con kanamicina 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ hasta una densidad óptica de 0.4, y se indujeron con 0.5 mM de IPTG. Las células fueron recogidas por centrifugación, resuspendidas, y posteriormente lisadas por so-

nicación. La fracción soluble, que contiene FtsZ, se separó del resto por centrifugación (100000 x g, 2 h a 4 °C).

A partir de esta fracción soluble se obtuvo una fracción muy enriquecida en FtsZ mediante dos ciclos de precipitación inducida por calcio. En el primero de los ciclos, se añadió a la fracción proteica GTP y CaCl₂ (a concentraciones finales de 1 y 20 mM respectivamente), la mezcla se incubó 15 minutos a 30 °C y posteriormente la fracción soluble se separó de la precipitada mediante centrifugación (11000 x g, 15 min a 4 °C). El precipitado se resuspendió en tampón PEM (50 mM PIPES, 5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, pH 6.5), y el sobrenadante correspondiente se sometió a un segundo ciclo de precipitación inducida por Ca²⁺.

Por último, la fracción enriquecida en FtsZ proveniente de la etapa anterior fue purificada a homogeneidad mediante cromatografía de intercambio iónico a temperatura ambiente en una columna Hi-TrapQ Sepharose de 5 ml (Amersham Biosciences), equilibrada en tampón Tris/glicerol (50 mM Tris, 5 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, 10 % glicerol, pH 8.0). FtsZ, que está cargada negativamente a este pH (pI = 5) se retiene en la columna. La proteína eluyó con un gradiente 0-100 % de KCl 1 M en el mismo tampón aproximadamente a una concentración 0.5 M de KCl. Las fracciones se recogieron y se analizaron posteriormente por el espectro de absorción y por electroforesis SDS-PAGE. Las fracciones se agruparon, y se almacenaron a – 80 °C.

3.3 Tampón fisiológico y sistema enzimático de regeneración del GTP

Muchos de los estudios *in vitro* realizados hasta el momento con FtsZ (revisados en (Addinall y Holland, 2002; Scheffers y Driessen, 2001)), han sido llevados a cabo en

tampones que contienen iones cloruro y a concentraciones de potasio que están por debajo del rango de concentraciones fisiológico de este catión. Más aun, muchos de estos estudios se realizaron a un pH ligeramente ácido (pH 6.5). Estos tampones no simulan las condiciones del ambiente intracelular bacteriano. Por ejemplo, los iones cloruro están presentes a una concentración muy baja en el citoplasma de *E. coli*. En condiciones de osmolaridad moderadas a altas, los iones potasio (de 0.2 a 0.9 M) y los iones glutamato (de 0.03 a 0.2 M) están concentrados en el interior del citoplasma de *E. coli* para prevenir la deshidratación y para mantener la presión osmótica intracelular (Record Jr. *et al.*, 1998). Se conoce que varios de estos osmolitos son moduladores *in vitro* de interacciones no covalentes ADN-proteína (Leirimo *et al.*, 1987; Record Jr. *et al.*, 1998).

Por estas razones, en gran parte de los experimentos de esta Memoria se ha empleado un tampón 20 mM HEPES, 100 mM glutamato potásico, 300 mM acetato potásico, 5 mM acetato magnésico, pH 7.4. En esta Memoria nos referiremos a este tampón como “fisiológico”, ya que contiene concentraciones apropiadas de los osmolitos mayoritarios del citoplasma bacteriano, suplementados con los nucleótidos de guanina, según lo indicado en cada experimento. Este tampón, con una concentración alta de potasio, que aumenta la actividad GTPasa de FtsZ y por tanto el grado de ensamblaje de los filamentos de FtsZ, hace difícil conseguir filamentos de FtsZ estables durante la escala de tiempos de muchos de los experimentos de esta Tesis. En estos experimentos el GTP fue regenerado añadiendo a la disolución un sistema enzimático de regeneración del GTP (1 unidad/ml de acetato quinasa de *E. coli* más 15 mM acetilfosfato, ambos de Sigma), adaptación de los estudios de tubulina/microtúbulos (MacNeal *et al.*, 1977). La enzima acetato quinasa cataliza de manera reversible la conversión de acetato en acetilfosfato acoplada a la hidrólisis de ATP

en ADP. En las condiciones de nuestros experimentos, con un exceso de acetilfosfato, la enzima cataliza la reacción inversa, la de conversión del acetilfosfato en acetato, acoplada a la síntesis de GTP a partir de GDP (la actividad no es específica del ATP).

3.4 Marcaje de FtsZ con FITC

Para el marcaje de FtsZ con la sonda fluorescente fluoresceína se utilizó 5-isotiocianato de fluoresceína (FITC). Este reactivo se une al grupo amino de las cadenas laterales de las lisinas de la proteína y también a los grupos amino terminal. FtsZ (4-6 g/l) se dializó frente a un tampón 20 mM HEPES/HCl, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, pH 8.0. Para minimizar perturbaciones en la asociación/ensamblaje debidas al marcaje, la proteína fue previamente polimerizada a 30 °C después de la adición de 20 mM Calcio y 2 mM GTP. A esta preparación se añadió un exceso de 40 veces de FITC previamente disuelto en DMSO, y la mezcla de reacción se incubó durante 15 minutos a 30 °C. El precipitado formado se resuspendió en 50 mM Tris/HCl, 100 mM KCl, pH 7.4, y el FITC libre se eliminó de la disolución por cromatografía en gel. El grado de marcaje se cuantificó mediante la expresión

$$\frac{mol_{FITC}}{mol_{FtsZ}} = \frac{\frac{\epsilon_{FtsZ,280}}{\epsilon_{FITC,495}} A_{495}}{A_{280} - 0.286A_{495}} \quad (3.1)$$

donde $\epsilon_{FtsZ,280}$ es el coeficiente de absorción molar de FtsZ a 280 nm (ver sección 3.9.1), $\epsilon_{FITC,495}$ es el coeficiente de absorción molar de FITC a 495 nm (55,600 M⁻¹cm⁻¹), A_{280} es el valor de absorción a 280 nm, y A_{495} el valor de absorción a 495 nm. El grado de marcaje de FtsZ fue de 0.9 ± 0.2 moles de FITC por mol de FtsZ.

3.5 Ultracentrifugación analítica

3.5.1 Principios básicos

El flujo de sedimentación en disolución de una especie molecular i que se encuentra girando en una ultracentrífuga analítica en celdas con forma de sector circular con una velocidad angular ω viene descrito por la ecuación de Lamm:

$$J_i = s_i w_i \omega^2 r - D_i \frac{dw_i}{dr} \quad (3.2)$$

donde J_i es el flujo de especie i en unidades de masa/(área·tiempo), w_i es su concentración (peso/volumen), ω es la velocidad angular del rotor (en radianes/seg), r es la posición radial y s_i y D_i son los coeficientes de sedimentación y difusión traslacional de la partícula respectivamente, siendo ambos coeficientes propiedades de la especie molecular i en un determinado disolvente. El coeficiente de sedimentación viene dado por,

$$s_i = \frac{M_i (1 - \bar{v}_i \rho_0)}{N_A f_{sed,i}} \quad (3.3)$$

donde M_i , \bar{v}_i y $f_{sed,i}$ son respectivamente, la masa molecular, el volumen específico parcial y el coeficiente de fricción para la especie i , ρ_0 es la densidad del soluto y N_A es el número de Avogadro. El producto $M_i (1 - \bar{v}_i \rho_0)$ es la masa molecular de flotación (M_i^*). A su vez, el coeficiente de difusión viene dado por:

$$D_i = \frac{RT}{N_A f_{dif,i}} \quad (3.4)$$

donde R es la constante universal de los gases ideales, T es la temperatura absoluta y $f_{dif,i}$ el coeficiente de fricción para la difusión.

Los dos coeficientes de fricción definidos en el párrafo anterior son función del tamaño y de la forma de la macromolécula, así como de su interacción con el disolvente y con otras moléculas de soluto. En el límite ideal, estos dos coeficientes son iguales (van Holde, 1985), por tanto, combinando las ecuaciones (3.3) y (3.4) se llega a la siguiente expresión, que ha sido nombrada ecuación de Svedberg,

$$\frac{s_i}{D_i} = \frac{M_i^*}{RT} \quad (3.5)$$

El proceso de sedimentación de una disolución inicial uniforme a alta velocidad angular, calculado de acuerdo a la ecuación (3.3), se ilustra por una serie de perfiles de sedimentación en la Figura 3.1A.

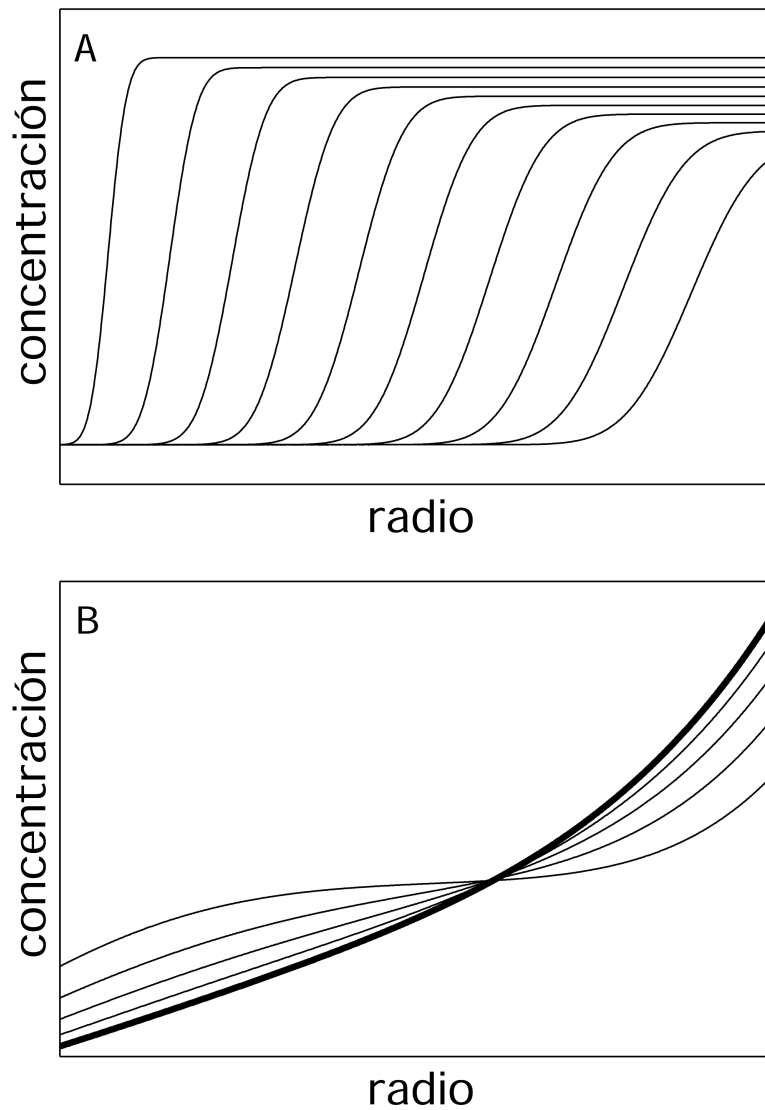


Figura 3.1. **Ejemplo de sedimentación de una macromolécula.** *A*, perfiles de velocidad de sedimentación de una macromolécula sometida a una elevada velocidad angular (velocidad de sedimentación). Los sucesivos perfiles se corresponden con diferentes tiempos. *B*, aproximación al equilibrio de sedimentación de una macromolécula sometida a velocidad angular moderada. Los sucesivos gradientes se corresponden con diferentes tiempos. El gradiente final (representado con una línea más gruesa) es el gradiente obtenido una vez que se ha alcanzado el equilibrio de sedimentación.

Al principio de la sedimentación, las moléculas de proteína están uniformemente distribuidas en la muestra. Cuando se aplica el campo centrífugo, se forma un *frente* (Figura 3.1A) entre la zona donde está presente la proteína (zona cercana al fondo) y la zona del tampón (zona cercana al menisco) debido al transporte neto de macromoléculas. Los mayores cambios se producen en la zona del menisco y del fondo de la disolución, donde el soluto está siendo depleccionado y sedimentado, respectivamente. En la región que se encuentra entre ambas la concentración de soluto decrece lentamente con el tiempo de acuerdo con la dilución causada por el incremento en la sección de la celda de centrifugación con la distancia radial.

Como en todo proceso de sedimentación, la distribución radial de cada especie que sedimenta y difunde en un campo centrífugo, tenderá a un límite en el cual el transporte neto de ellas tiende a desaparecer, donde $J_i = 0$, para todo i . En este punto, se dice que la solución se encuentra en *equilibrio de sedimentación*. Igualando por tanto, el término de la izquierda de la ecuación (3.2) a cero y combinando el resultado con la ecuación (3.5) se obtiene:

$$\frac{d \ln w_i}{d r^2} = \frac{M_i^* \omega^2}{2RT} \quad (3.6)$$

la cual debe ser integrada con respecto a r^2 para obtener una expresión para el gradiente de equilibrio de un soluto ideal sedimentando:

$$w_i(r) = w_i(r_0) \exp\left(\frac{M_i^* \omega^2}{2RT} (r^2 - r_0^2)\right) \quad (3.7)$$

donde r_0 indica una posición de referencia arbitrariamente seleccionada. El gradiente en el equilibrio se caracteriza fundamentalmente porque (1) no varía con el tiempo, (2) es independiente de las propiedades hidrodinámicas de la molécula de soluto, y (3) depende únicamente de la masa molecular de flotación (M_i^*).

En la Figura 3.1B se muestra la secuencia temporal que conduce al equilibrio de sedimentación. En los experimentos de equilibrio, el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio depende de la velocidad, del tamaño de la macromolécula y de la longitud de la columna (distancia del menisco al fondo de la celda).

Los estudios de ultracentrifugación analítica se dividen básicamente, en dos tipos: medida y análisis de los perfiles de sedimentación generados a elevada velocidad angular, referidos generalmente como experimentos de *velocidad de sedimentación* y medidas y análisis de los gradientes de equilibrio obtenidos a baja velocidad angular, referidos habitualmente como experimentos de *equilibrio de sedimentación*.

3.5.2 *Equilibrio de sedimentación*

3.5.2.1 Detalles experimentales

Los experimentos de equilibrio de sedimentación se realizaron en una ultracentrífuga analítica XL-A (Beckman-Coulter), equipada con un sistema óptico UV-Visible, usando los rotores An60Ti y An50Ti y celdas de seis agujeros (ver Figura 3.2) de ventana de cuarzo de 12mm de paso óptico, a una temperatura de 20 °C. Las muestras de FtsZ se equilibraron en tampón fisiológico (conteniendo 50 μ M GDP) mediante diálisis a 4 °C.

El equilibrio de sedimentación en columna corta (60-80 μ l de muestra y 70-90 μ l de referencia), se llevó a cabo a varias velocidades sucesivas: 12000, 15000 y 20000 rpm. Las medidas de absorbancia (0.001 cm tamaño del paso, 4-10 promedios)

fueron tomadas a la longitud de onda apropiada para cada concentración de proteína, entre 220 y 290 nm. En todos los casos, la línea base (contribución del material que no es proteína) fue obtenida a alta velocidad de sedimentación (40000 rpm).

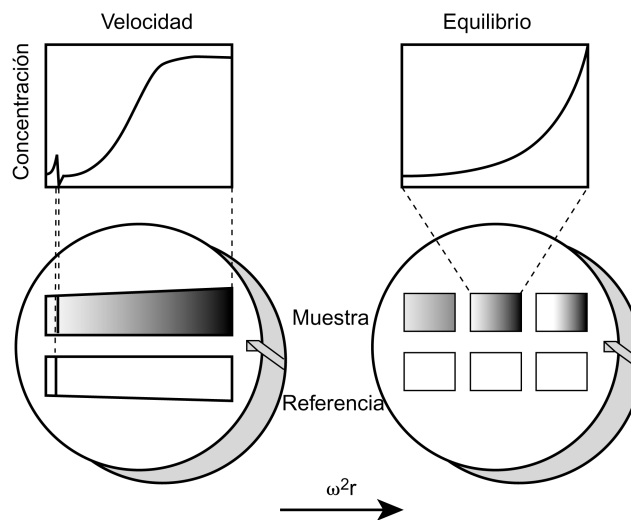


Figura 3.2. Celdas de doble sector y de seis agujeros en experimentos de velocidad y equilibrio de sedimentación. El panel de la izquierda muestra un esquema de una celda de doble sector durante un experimento de velocidad de sedimentación. La muestra se carga en el sector superior de la celda y la disolución de referencia (tampón) en el sector inferior. La muestra es centrifugada a alta velocidad angular generando un perfil de sedimentación que se mueve hacia el fondo de la celda. En el panel de la derecha se representa una celda de seis agujeros en un experimento de equilibrio de sedimentación. Se pueden cargar tres muestras en la celda, que es centrifugada a velocidad moderada, resultando en un gradiente de concentración de equilibrio para cada una de las muestras. Figura adaptada de (Cole y Hansen, 1999).

3.5.2.2 Análisis de datos experimentales

El cálculo de la masa molecular aparente promedio de flotación ($M_{w,a}^*$) para cada una de las muestras de FtsZ se realizó ajustando la ecuación que describe la distribución radial del gradiente de concentración de proteína en el equilibrio de sedimentación para un soluto ideal (3.7) a los datos experimentales, mediante los programas EQASSOC y XLAEQ (Minton, 1994). Estos valores se convirtieron en las correspondientes masas moleculares ($M_{w,a}^*$) usando $0.738 \text{ cm}^3/\text{g}$ como volumen específico parcial de FtsZ, obtenido a partir de la composición de aminoácidos de la proteína, calculando el volumen específico parcial como un promedio en peso de valores de volumen específico parcial de los aminoácidos (Laue *et al.*, 1992) mediante el programa SEDNTERP.

La representación de la dependencia de la masa molecular de la proteína con su concentración constituye un buen diagnóstico para determinar si la proteína está presente en la disolución como una o varias especies moleculares, información que es necesaria para el posterior análisis cuantitativo de los procesos de asociación (Laue *et al.*, 1992; Rivas *et al.*, 1999). Este análisis se resume en la Figura 3.3.

En el panel A de esta figura se representan los correspondientes gradientes experimentales en el equilibrio de sedimentación de una proteína de masa molecular 50000 que sedimenta bien como un dímero estable (*círculos azules*) bien como una mezcla en el equilibrio de monómeros y tetrámeros (*círculos rojos*). De acuerdo con la ecuación (3.6) el dímero de la proteína sedimenta en el equilibrio con un gradiente de concentración que se corresponde con una única distribución exponencial de concentración con la distancia radial (panel A: datos primarios de variación de la concentración con la distancia, (w (concentración en peso/volumen) vs r)).

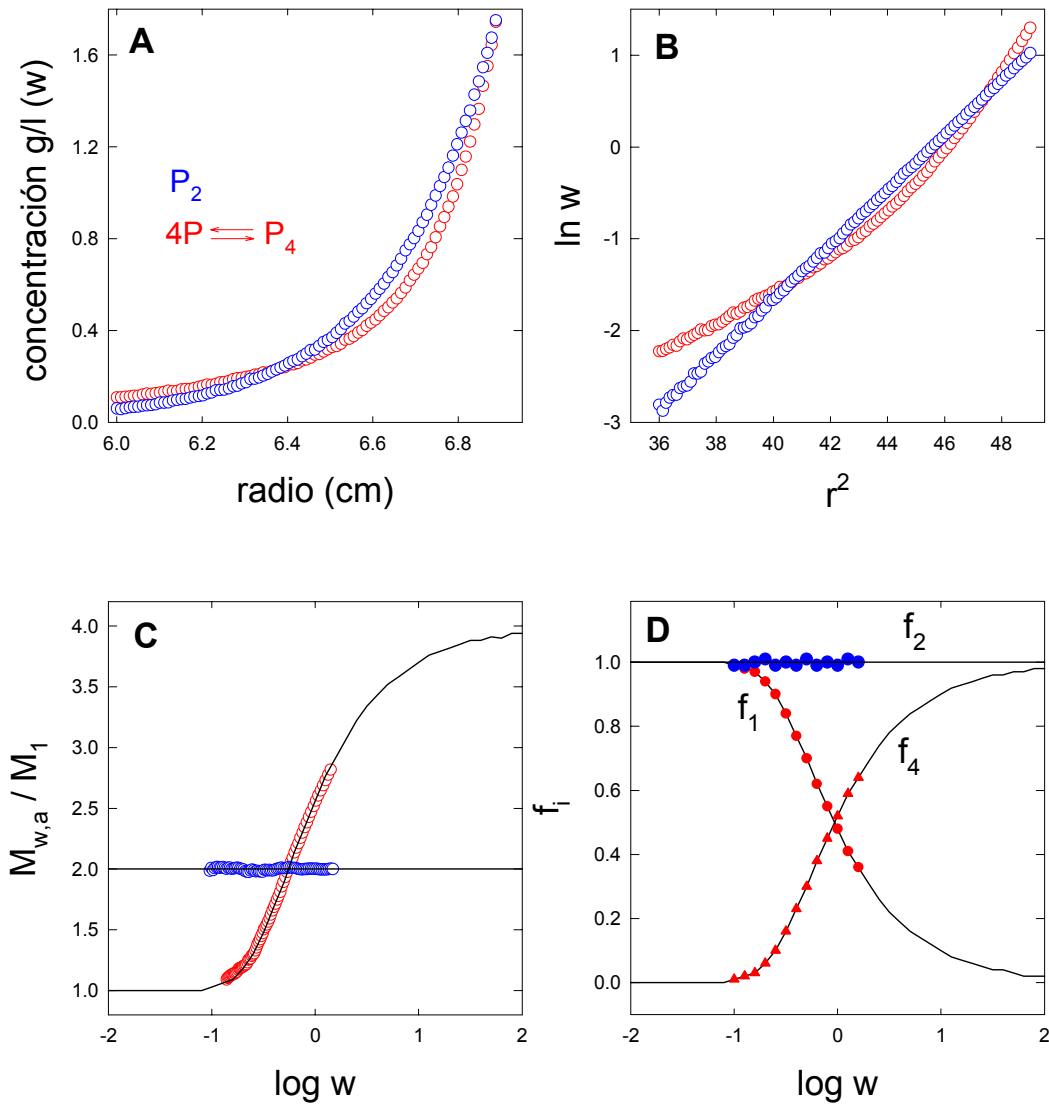


Figura 3.3. **Análisis e interpretación del equilibrio de sedimentación.** Representación de los datos primarios (w vs r , panel A) y secundarios ($\ln w$ vs r^2 , panel B) correspondientes a los gradientes en el equilibrio de sedimentación de una proteína que sedimenta bien como dímero puro (símbolos azules) bien como una mezcla en monómeros y tetrameros en el equilibrio. Las simulaciones se realizaron resolviendo numéricamente las ecuaciones (3.6) y (3.7) asumiendo que el equilibrio de sedimentación se realizó a 7000 rpm y 20 °C, la masa molecular del monómero de la proteína es 50000 Da, y la constante del equilibrio de asociación monómero-tetramero es 10 (g/l)^{-3} . Paneles C y D: variación de la masa molecular (panel C) y de la fracción molar de las distintas especies moleculares (panel D) con la concentración de proteína.

Estos datos primarios, de acuerdo con la ecuación (3.5), se corresponden con una línea recta en un gráfico de datos secundarios (panel B: $\ln w$ vs r^2), cuya pendiente es proporcional a la masa de la especie molecular en el equilibrio. Esta última relación se representa en el panel C, que nos indica que, en nuestro ejemplo, la masa molecular del dímero puro no varía con la concentración de proteína. En el caso de la mezcla de monómeros y tetrameros en el equilibrio, el gradiente de concentración experimental no se corresponde con una única distribución exponencial de concentración frente a distancia sino con dos exponenciales (*círculos rojos* en el panel A). De manera similar a lo expuesto anteriormente para la sedimentación del dímero puro, de estos datos primarios (w vs r) se derivan los correspondientes datos secundarios ($\ln w$ vs r^2) que en este caso del equilibrio monómero-tetramero no se corresponden con una línea recta (*círculos rojos* en el panel B). De las pendientes locales de esta última representación se obtiene que la masa molecular de la proteína aumenta con la concentración (panel C), como era de esperar para una mezcla de monómeros y tetrameros en el equilibrio. El panel D de esta figura muestra una manera equivalente de ilustrar esta dependencia de la masa molecular con la concentración mediante la representación de la variación de la fracción molar de cada una de las especies moleculares presentes (bien dímeros, bien monómeros y tetrameros) con la concentración de proteína.

En el caso concreto que nos ocupa en esta Tesis Doctoral (la oligomerización de GDP-FtsZ en el tampón fisiológico), de acuerdo con lo descrito en el apartado anterior, los datos secundarios de variación de masa molecular con la concentración de FtsZ se ajustaron al modelo de asociación de GDP-FtsZ en tampón de pH neutro previamente descrito en el laboratorio (Rivas *et al.*, 2000), según el cual la proteína

forma oligómeros a partir del monómero mediante un mecanismo no cooperativo ligado al catión magnesio.

3.5.3 *Velocidad de sedimentación*

3.5.3.1 Detalles experimentales

Las muestras de FtsZ se equilibraron en el tampón correspondiente, indicado en Resultados (secciones 4.1.1 y 4.2.3) mediante diálisis. El nucleótido (GDP, GTP (más sistema de regeneración)) se añadió a la proteína dializada y al tampón de referencia. Se cargó la misma cantidad de tampón y de muestra (400 μ l) en celdas de doble sector (ver Figura 3.2). En las muestras que contenían GTP y sistema de regeneración, se minimizó el tiempo que transcurre desde la carga de muestras hasta el inicio de la centrifugación puesto que el GTP es regenerado en el medio por un tiempo aproximado de 1 hora (ver Resultados, sección 4.2.1).

Los experimentos se realizaron en la ultracentrífuga analítica XL-I (Beckman-Coulter) en rotores An50Ti a una temperatura de 20 °C empleando el sistema óptico de *interferencia*. Se utilizaron distintas velocidades, dependiendo de los coeficientes de sedimentación esperados (las velocidades de cada experimento se señalan en Resultados). Con este sistema óptico se produce un patrón de interferencia al pasar un haz de luz láser por los dos sectores de la celda (sector de la referencia que contiene solo el tampón y sector de la muestra) y combinarse posteriormente. El patrón de interferencia es un patrón de franjas (ver un ejemplo de patrón de interferencia en la Figura 3.4). Las diferencias en el índice de refracción entre la solución de la muestra y de la referencia provocan un desplazamiento de las franjas, pudiéndose determinar la concentración de proteínas a partir ese desplazamiento (Rickwood, 1984). Un des-

plazamiento de una franja corresponde a una diferencia de concentración de proteína de aproximadamente 0.30 g/l.

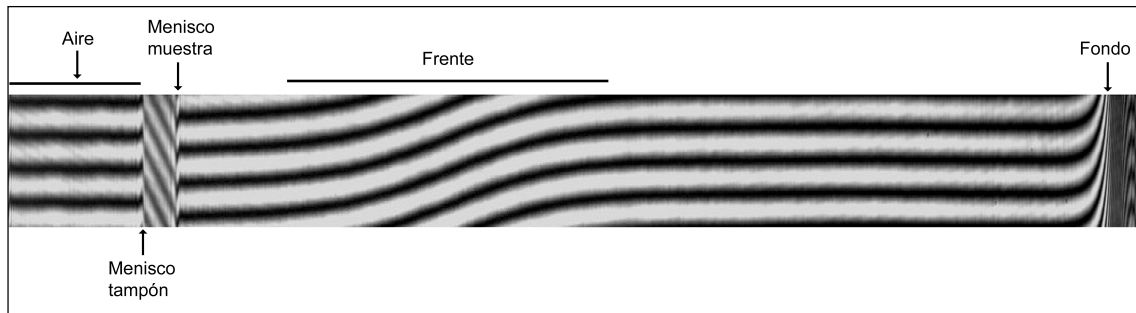


Figura 3.4. Patrón de interferencia en un experimento de velocidad de sedimentación. La sedimentación de la macromolécula es de izquierda a derecha. En este ejemplo, el sector de la referencia tiene más volumen que el sector de la muestra, y por ello hay dos meniscos. El frente de sedimentación de la macromolécula corresponde con la zona donde las franjas se han curvado. Nótese que las franjas se curvan hacia arriba en el fondo de la celda porque el material está sedimentando. Como la posición de las franjas está determinada por la concentración de la macromolécula, puede ser determinada la concentración de dicha macromolécula a lo largo de la celda.

La linealidad en la señal, la precisión y la sensibilidad para detectar proteínas con este sistema de detección es superior en muchos casos que con el sistema de absorción UV-Visible. La toma de datos es mucho más rápida, lo que permite disponer de mayor información del proceso de sedimentación y posibilita un mejor análisis de los datos. Desafortunadamente, debido a imperfecciones en el sistema de adquisición de datos (que pueden estar causadas por inestabilidades térmicas o mecánicas) los datos de la óptica de interferencia contienen errores sistemáticos que hacen que los datos sean difícilmente interpretables directamente (Schuck y Demeler,

datos sean difícilmente interpretables directamente (Schuck y Demeler, 1999). La eliminación de estos errores se realiza en el modelado de los perfiles de sedimentación (ver más abajo). Los perfiles de desplazamientos de franjas se adquirieron cada 30 segundos.

3.5.3.2 Análisis de los datos experimentales

El análisis de los perfiles de sedimentación obtenidos con la óptica de interferencia se realizó mediante el ajuste directo de los perfiles a soluciones de la ecuación de Lamm (ecuación (3.2)), que puede representarse para este propósito de la siguiente manera:

$$\frac{dw}{dt} = \frac{1}{r} \frac{d}{dr} \left(rD \frac{dw}{dr} - s\omega^2 r^2 w \right) \quad (3.8)$$

donde la relación entre el desplazamiento de franjas experimental, $a(r, t)$, con la concentración de proteína es:

$$a(r, t) = w(r, t) + \phi + \delta \quad (3.9)$$

donde w es la concentración en una posición r y tiempo t , y ϕ y δ son los errores sistemáticos y aleatorios, respectivamente. El ajuste de los perfiles de sedimentación se realiza en combinación con el cálculo de los errores sistemáticos ϕ , que como se ha comentado más arriba, se deben a imperfecciones en el sistema de adquisición de datos. Se calculan dos errores sistemáticos, un error invariante con el radio, que es un error pequeño y diferente para cada uno de los perfiles de sedimentación, y un error invariante con el tiempo, que cambia con el radio, pero que es constante para todos

los perfiles de sedimentación a lo largo de todo el proceso de sedimentación. Dado que estos errores son arbitrarios, introducidos por el sistema de detección, pueden ser sustraídos de los perfiles de sedimentación sin introducir ningún sesgo en el análisis. Finalmente, los errores calculados son sustraídos de los perfiles de sedimentación originales (Figura 3.5A)

El ajuste de los perfiles de sedimentación a las soluciones de la ecuación de Lamm no emplea valores discretos de los coeficientes de sedimentación, sino distribuciones de coeficientes de sedimentación. El método empleado en esta Memoria es el método $c(s)$ (Schuck, 2000), implementado en el programa SEDFIT. En este método, las distribuciones son calculadas mediante ajuste a distribuciones de soluciones de la ecuación de Lamm, generadas mediante la expresión:

$$a(r, t) = \int c(s)w(s, D(s), r, t)ds + \phi + \delta \quad (3.10)$$

donde $c(s)ds$ es la concentración inicial de especies con un coeficiente de sedimentación entre s y $s + ds$. La integral se resuelve siguiendo el procedimiento explicado en detalle en (Schuck, 2000). $D(s)$ denota que el coeficiente de difusión y el de sedimentación están relacionados por la ecuación (3.5). Para el cálculo de los coeficientes de difusión y de sedimentación se requiere asumir un valor promedio de la relación friccional f/f_{min} (relación friccional de una esfera anhidra equivalente, ver sección siguiente de modelado hidrodinámico, sección 3.5.4) para todas las especies presentes. El cálculo del coeficiente de difusión teniendo en cuenta la relación friccional se realiza mediante la ecuación de Stokes-Einstein, combinando las expresiones (3.4)

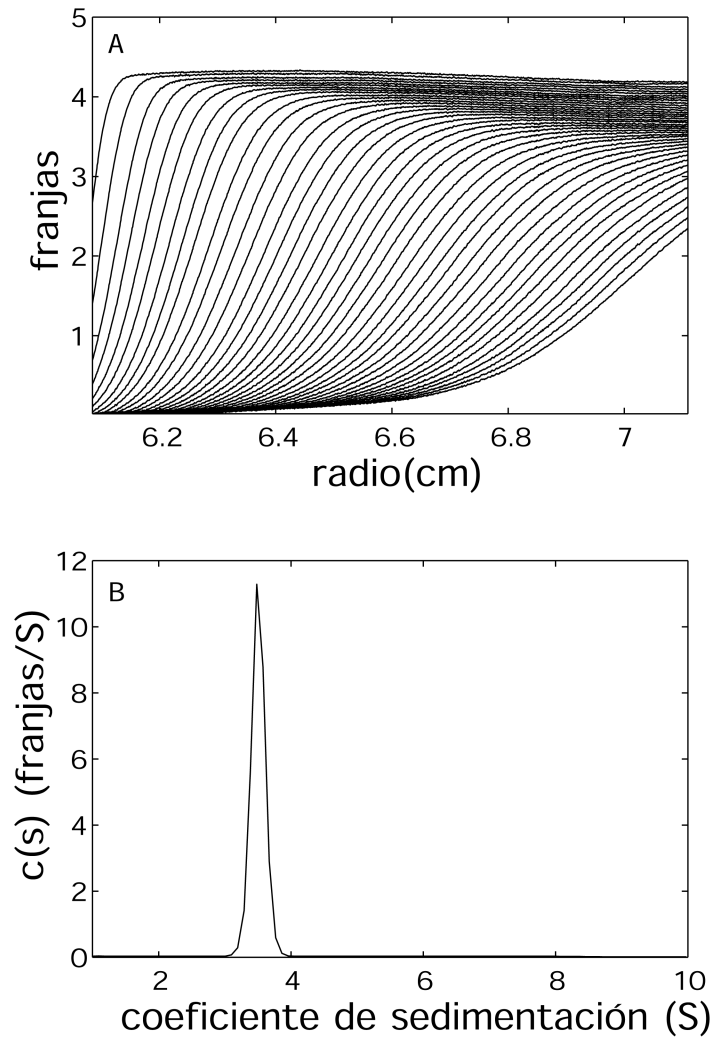


Figura 3.5. **Perfiles de sedimentación y análisis mediante una distribución de coeficientes de sedimentación $c(s)$.** *A*, perfiles de sedimentación experimentales de FtsZ después de restar los errores sistemáticos (ver el texto). Obsérvese cómo el frente de sedimentación es cada vez más ancho según avanza la sedimentación por efecto de la difusión. *B*, resultado del ajuste de los datos experimentales a soluciones de la ecuación de Lamm por el método $c(s)$. La muestra está compuesta de una única especie de 3.5 S.

y (3.15), habiendo multiplicado y dividido en el denominador por f_{min} en la ecuación (3.4),

$$D = \frac{RT}{N_A \left(\frac{f}{f_{min}} \right) 6\pi\eta_0 R_{min}} \quad (3.11)$$

donde η_0 es la viscosidad del disolvente.

Este método, por tanto, realiza un tratamiento más realista de la difusión que métodos desarrollados previamente. El valor promedio de f/f_{min} que se utiliza en el análisis final es aquel que proporciona el mejor ajuste a los datos experimentales. Se ha descrito cómo afectan los valores de f/f_{min} a la distribución de coeficientes de sedimentación $c(s)$ (Schuck *et al.*, 2002), concluyendo que la posición de los picos principales permanece esencialmente constante a diferentes valores de la relación friccional f/f_{min} y que relaciones friccionales menores dan como resultado distribuciones más estrechas. Este tratamiento supone una mejora frente a otros, como el método $ls-g^*(s)$, en el que el ajuste a la ecuación de Lamm es una aproximación que describe el comportamiento ideal de especies que sedimentan sin ninguna difusión (Schuck y Rosmanith, 2000).

Finalmente, el mejor ajuste obtenido de los perfiles de sedimentación experimentales a las soluciones de la ecuación de Lamm proporciona una distribución $c(s)$ que representa la concentración inicial de especies que sedimentan con un coeficiente de sedimentación s . En la Figura 3.5A se presenta un ejemplo de análisis por el método $c(s)$ y puede observarse como el mejor ajuste da como resultado una distribu-

ción de coeficientes de sedimentación que, en este caso, es compatible con una única especie con un coeficiente de sedimentación promedio de 3.5 S.

El coeficiente de sedimentación, como se ha indicado más arriba, es una propiedad que depende de la temperatura y de la viscosidad y densidad del medio en el que está disuelta la macromolécula. Con el propósito de efectuar comparaciones, se ha corregido el coeficiente de sedimentación (y sus distribuciones) experimental obtenido a unas condiciones de referencia, que son las de una hipotética sedimentación a 20 °C en agua, refiriéndonos a este coeficiente de sedimentación corregido como $s_{20,w}$. Para calcular la corrección se necesitan los valores de densidad y viscosidad del agua a 20 °C y a la temperatura experimental, que son bien conocidos, y la densidad y viscosidad a estas dos temperaturas del tampón empleado (los tampones empleados han sido siempre tampones acuosos). Estos últimos valores pueden calcularse a partir de los incrementos en densidad y viscosidad respecto a la del agua para cada uno de los componentes del tampón en función de su concentración, mediante el programa SEDNTERP. La variación de estos incrementos con la concentración se determina a partir de relaciones polinómicas obtenidas del ajuste de datos experimentales a distintas concentraciones para componentes comunes de los tampones empleados en Bioquímica.

3.5.3.3 Dependencia del coeficiente de sedimentación con la concentración de proteína. Estimación de la masa molecular de polímeros

El coeficiente de sedimentación se ve afectado por la concentración de la molécula que sedimenta. Cualquier interacción entre las moléculas que sedimentan alterará el comportamiento hidrodinámico. El caso más usual es aquel en el que las moléculas interfieren unas con otras en su proceso migratorio, haciendo que el coeficiente fric-

cional aumente con la concentración w , de tal manera que se pueda establecer la siguiente relación,

$$f = f^0 (1 + k_s w + \dots) \quad (3.12)$$

donde f^0 es el valor del coeficiente friccional a concentración $w = 0$ y k_s es una constante de no-idealidad hidrodinámica. Podemos establecer una relación similar para la dependencia de primer orden del coeficiente de sedimentación con la concentración:

$$s = \frac{s^0}{1 + k_s w} \quad (3.13)$$

donde s^0 es el coeficiente de sedimentación a dilución infinita. El coeficiente de sedimentación disminuirá con la concentración w , como es de esperar, este efecto es más pronunciado en macromoléculas elongadas (van Holde, 1985).

Además de poder calcular el coeficiente de sedimentación s_0 , el conocimiento de la constante de no-idealidad hidrodinámica nos permite determinar la masa molecular de partículas de gran tamaño. El cálculo de la masa molecular de partículas de masa superior a 10^6 Da presenta ciertos problemas. Por ejemplo, el análisis mediante equilibrio de sedimentación es técnicamente imposible por varias razones; el alcanzar el equilibrio de sedimentación requiere mucho tiempo, por lo que no sería aplicable a sistemas muy complejos, como FtsZ en presencia de GTP y sistema de regeneración del GTP. Para partículas asimétricas es posible determinar el valor de la masa a partir de la ecuación (Rowe, 1992):

$$M = N_A (6\pi\eta_0 s^0)^2 \left[\frac{3\bar{v}}{4\pi} \left(\frac{k_s}{2\bar{v}} - \frac{\nu_s}{\bar{v}} \right) \right]^{\frac{1}{2}} \quad (3.14)$$

donde ν_s es el volumen específico parcial de la partícula hidratada y ν_s/\bar{v} es una relación adimensional que ha sido estimada en un valor de 2.3 (Persechini y Rowe, 1984). Debido a que k_s tiene valores muy grandes, el valor exacto de la relación ν_s/\bar{v} no es de una importancia muy significativa, porque el primer término en la expresión entre paréntesis es mucho mayor que el segundo.

3.5.4 Modelado hidrodinámico

Una primera estimación de la forma aproximada de las especies moleculares de FtsZ con menor grado de oligomerización (ej., monómeros y dímeros de la proteína) se determinó como sigue. El coeficiente de fricción traslacional (f) de las especies de FtsZ se calculó a partir de los valores correspondientes de masa molecular y coeficiente de sedimentación, mediante la ecuación (3.3). El coeficiente friccional de la esfera anhidra equivalente (f_{min}) se calculó a partir de la ecuación de Stokes:

$$f_{min} = 6\pi\eta_0 R_{min} \quad (3.15)$$

donde η_0 es la viscosidad del disolvente y R_{min} es el radio de la esfera anhidra. El coeficiente f_{min} es el mínimo valor del coeficiente friccional posible para una proteína en disolución, ya que asume que la proteína es una esfera perfecta anhidra. Si la proteína está hidratada o se aleja de la forma esférica, el valor de f será mayor que f_{min} . Por consiguiente, la relación friccional f/f_{min} contiene información tanto de la

forma (grado de desviación respecto de la forma esférica) como de la hidratación de la proteína (Tanford, 1961). La relación f/f_{min} de proteínas globulares (ej., hemoglobina, albúmina) varía entre 1.1 y 1.4, mientras que estos valores son mayores de 2.0 para proteínas muy elongadas (ej., fibrinógeno) (van Holde, 1985). Dado que el grado de hidratación medido para un número considerable de proteínas globulares es de $0.3 - 0.4 \text{ g}_{\text{agua}}/\text{g}_{\text{proteína}}$ (Pessen y Kumosinski, 1985), es bastante frecuente encontrar esta relación friccional expresada como f/f_0 (siendo $f/f_0 < f/f_{min}$) en términos del radio de la esfera equivalente hidratada ($R_0 > R_{min}$), asumiendo una determinada hidratación.

A partir de las ecuaciones (3.3) y (3.15), se puede demostrar que:

$$\frac{f}{f_{min}} = \frac{s_{min}}{s} = \frac{R_S}{R_0} \quad (3.16)$$

donde R_S es el radio de Stokes de la esfera hidrodinámicamente equivalente con coeficiente friccional f (relaciones análogas a las descritas en la ecuación (3.16) pueden obtenerse para macromoléculas hidratadas).

Una limitación evidente de esta primera aproximación para estimar la forma de las especies moleculares de proteínas (en nuestro caso FtsZ) a partir de los datos de sedimentación es que las expresiones para determinar los correspondientes coeficientes friccionales se han deducido sólo de manera exacta para formas geométricas simples (y a veces poco realistas) como la esfera o el elipsoide de revolución.

Sin embargo, Kirkwood, en los años cincuenta, desarrolló una teoría que permitía conocer de manera bastante precisa los coeficientes friccionales de moléculas de formas complicadas, modelando su estructura mediante un conjunto de esferas idénticas. Para una partícula de N esferas idénticas, cada una con un

idénticas. Para una partícula de N esferas idénticas, cada una con un coeficiente friccional f_1 , el coeficiente friccional del conjunto puede ser calculado de la siguiente manera,

$$f_N = Nf_1 \left(1 + \frac{f_1}{6\pi\eta_0 N} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \frac{1}{R_{ij}} \right)^{-1} \quad (3.17)$$

donde R_{ij} es la distancia entre las subunidades i y j y el sumatorio es sobre todos los pares de esferas. Mediante las ecuaciones (3.3) y (3.4), conociendo f podemos calcular los coeficientes de sedimentación y difusión, respectivamente, de la molécula. Posteriormente, esta teoría fue generalizada, permitiendo el uso de subunidades de diferentes tamaños que permitieran modelar estructuras macromoleculares de forma más compleja (para una revisión, ver (García de la Torre y Bloomfield, 1981)). García de la Torre ha implementado esta teoría en el programa informático HYDRO (García de la Torre *et al.*, 1994), además de desarrollar nuevas estrategias en la obtención de propiedades hidrodinámicas de macromoléculas (García de la Torre *et al.*, 2000; García de la Torre *et al.*, 2001).

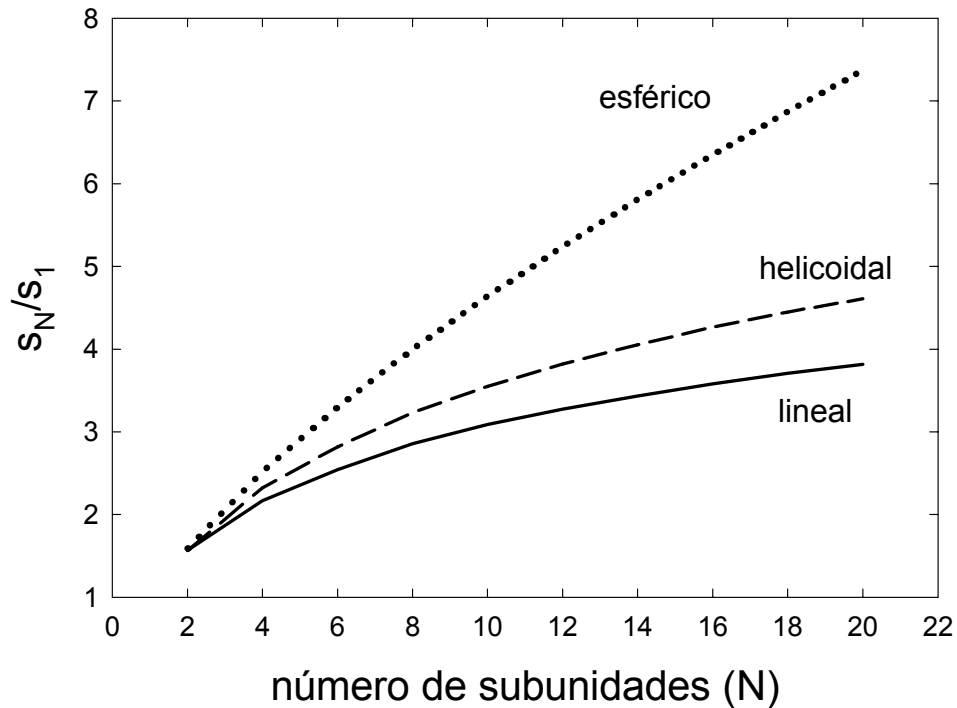


Figura 3.6. Relación del coeficiente de sedimentación de polímeros de distintas geometrías en función del número de subunidades. El eje y representa la relación entre el coeficiente de sedimentación de un polímero y el correspondiente valor del monómero. Se realizó el cálculo para polímeros lineales y helicoidales de subunidades idénticas, usando la ecuación de Kirkwood, ecuación (3.17) y para polímeros esféricos (una única esfera equivalente al polímero). Estos datos han sido reproducidos de un estudio de la polimerización de actina (Attri *et al.*, 1991).

En el cálculo de las propiedades hidrodinámicas de modelos de polímeros de FtsZ se ha utilizado el programa HYDRO, que configura la geometría del modelo de esferas a partir de las coordenadas de los centros de las esferas y sus radios de Stokes. El primer paso en el cálculo fue la elaboración de modelos de los polímeros con esferas de idéntico tamaño. El coeficiente de sedimentación de un monómero de FtsZ es $s_{20,w} = 2.3$ S (valor corregido por temperatura, densidad y viscosidad del tampón), obtenido a partir de un experimento de velocidad de sedimentación (Figura 4.13). Para determinar el tamaño de la esfera apropiado para modelar una molécula de FtsZ se calculó el coeficiente de sedimentación de esferas de distintos radios y mediante interpolación se obtuvo el radio de la esfera con un coeficiente de sedimentación igual al de un monómero de FtsZ. El valor encontrado fue 4.17 nm.

Se introdujeron en el programa las coordenadas de modelos lineales de una y dos cadenas de subunidades. La distancia entre los centros de cada esfera era igual a dos veces el radio de la esfera, 8.34 nm. Los coeficientes de sedimentación se obtuvieron a 20 °C y en agua, empleando un volumen específico parcial de 0.738 cm³/g . La masa molecular de cada modelo fue calculada como el producto del número de subunidades por el peso molecular de una molécula de FtsZ (40000 g/mol).

3.6 Dispersión de luz dinámica

La dispersión de luz dinámica, también llamada dispersión de luz cuasielástica y espectroscopía de correlación del fotón, es una técnica que permite calcular los coeficientes de difusión. Para ello, un láser es enfocado sobre una pequeña región de la muestra. La mayoría de la luz atraviesa la muestra, pero una pequeña proporción de la luz incidente es dispersada y detectada a un ángulo de 90°, en este caso, respecto de la dirección del haz incidente. El movimiento browniano de las partículas en disolución

produce fluctuaciones (en la escala de los microsegundos a los milisegundos) en la intensidad de la luz dispersada como consecuencia de la entrada y salida de estas partículas de la región analizada. La frecuencia de estas fluctuaciones en la intensidad de la luz dispersada está relacionada con la difusión de las moléculas (Murphy, 1997). El análisis de las fluctuaciones en la intensidad de luz dispersada se realiza mediante la obtención de la *función de autocorrelación*. Esta función describe la correlación entre las intensidades de luz dispersada a tiempo $t = 0$ y las intensidades a un tiempo posterior $t = t + \tau$, donde τ es el tiempo de correlación (van Holde *et al.*, 1998). La intensidad de luz dispersada depende de la posición de las partículas en el volumen analizado. Por ello, a tiempos cortos, la correlación es alta, porque la posición de las partículas está muy relacionada con la posición que tenían anteriormente. A tiempos largos, la correlación es menor, y por ello la función de autocorrelación disminuye con el tiempo, siendo esta disminución más rápida cuanto mayor sea el coeficiente de difusión de las partículas. La relación entre ambas propiedades se establece en la siguiente ecuación:

$$g(t) = 1 + e^{-Dq^2t} \quad (3.18)$$

donde $g(t)$ es la función de autocorrelación, D es el coeficiente de difusión de la molécula, q es el vector de dispersión de luz, $q = \frac{4\pi n}{\lambda} \text{sen} \frac{\theta}{2}$, donde n es el índice de refracción del disolvente, λ la longitud de onda de la luz incidente, y θ el ángulo de dispersión de la luz.

3.6.1.1 Detalles experimentales

Los experimentos de dispersión de luz dinámica se realizaron en el instrumento *DynaPro-MS/X* de Proteins Solutions. Este instrumento utiliza un tiempo de correlación τ de 500 ns, y una longitud de onda λ de 824.7 nm. El tampón (50 mM Tris/HCl, 500 mM KCl, 5 mM MgCl₂, pH 7.4), acetilfosfato, y GTP fueron filtrados con una jeringa por un filtro de poro de 100 nm. Las proteínas FtsZ (después de dializar frente al tampón) y acetato quinasa fueron centrifugadas a 10000 x g en una centrífuga de mesa para eliminar partículas de polvo. Se prepararon diferentes muestras, en las que se varió la concentración de FtsZ, permaneciendo constante el resto de concentraciones (1 unidad/ml acetato quinasa, 15 mM acetilfosfato, 1 mM GTP). Después de la adición de GTP, se añadieron 20 μ l de muestra en la cubeta de dispersión de luz a 90°, registrándose las funciones de autocorrelación a 20 °C. En el análisis se utilizó la función de autocorrelación que resultaba de promediar ~20 adquisiciones (tiempo de cada adquisición: 10 s).

3.6.1.2 Análisis de los datos experimentales

El análisis de los datos obtenidos se realizó mediante ajuste de las funciones de autocorrelación a la ecuación (3.21) (ver Figura 3.7), utilizando el programa SEDFIT. En el ajuste se generan distribuciones de funciones de autocorrelación de manera análoga a lo expuesto en las distribuciones de coeficientes de sedimentación (ver más arriba, sección 3.5.3.2), mediante la expresión,

$$g_{exp}(D, t) = \int c(D)g(D, t)dD \quad (3.19)$$

donde $g_{exp}(D, t)$ es la función de autocorrelación determinada experimentalmente, y $c(D)dD$ es la concentración inicial de especies con un coeficiente de difusión entre D y $D + dD$. La integral se resuelve siguiendo el procedimiento explicado en detalle en (Schuck, 2000).

En muchas ocasiones, se presentan los datos como distribuciones de tamaños, en lugar de distribuciones de coeficientes de difusión. La relación entre la difusión y el tamaño de partícula viene dada por la ecuación de Stokes-Einstein, que resulta de la combinación de las ecuaciones (3.4) y (3.15), y que ya fue descrita en función de la relación friccional en la ecuación (3.11),

$$D = \frac{RT}{N_A 6\pi\eta_0 R_S} \quad (3.20)$$

donde R_S es el radio de Stokes. Este radio así calculado es el radio de una esfera que tuviera el mismo coeficiente de difusión que la proteína.

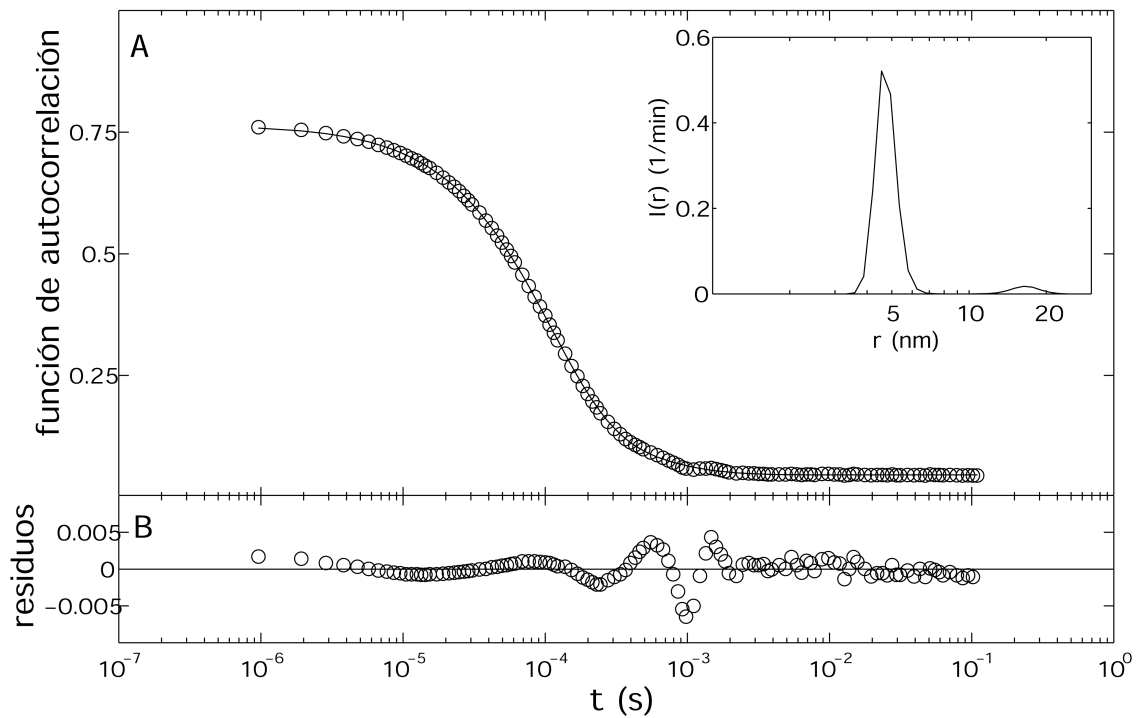


Figura 3.7. **Función de autocorrelación de un experimento de dispersión de luz dinámica.** *A*, función de autocorrelación obtenido para una muestra de FtsZ (*círculos*) y función de correlación resultante del mejor ajuste (*línea continua*). El decaimiento de la función de correlación sigue un comportamiento exponencial, pero aquí es un decaimiento sigmoideal, al haberse representado el tiempo en escala logarítmica. En el panel interior se representa la distribución de radios de Stokes de la muestra. *B*, residuos del mejor ajuste de los datos experimentales.

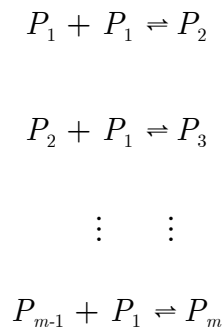
3.7 Ensamblaje de FtsZ

3.7.1 Teoría

Los ensamblajes que producen grandes estructuras macromoleculares suceden normalmente de manera cooperativa. En términos de equilibrio termodinámico, el proceso puede ser reducido a dos etapas:

1. Ensamblaje para la formación de un núcleo de polimerización (**Nucleación**)
2. Crecimiento del polímero de forma cooperativa (**Elongación**)

La etapa inicial de nucleación puede ser resumida de la siguiente manera:



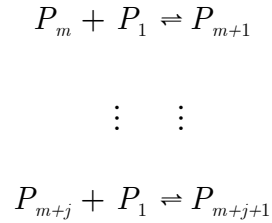
con una constante de equilibrio:

$$K_m = \frac{[P_i]}{[P_{i-1}][P_1]} \quad (3.21)$$

donde m es el número de subunidades en el núcleo. En este modelo cooperativo de ensamblaje la constante de asociación K_m es independiente de i . El núcleo representa un punto de partida o *esqueleto* para el crecimiento del polímero. La adición de

monómeros a este núcleo resulta en la elongación del polímero (Hall y Minton, 2002).

El esquema de esta etapa de elongación es el siguiente:



La incorporación de subunidades en esta etapa está asociada a incrementos iguales de energía libre, es decir, a una misma constante de elongación K_g :

$$K_g = \frac{[P_{m+j+i}]}{[P_{m+j}][P_1]} \quad (3.22)$$

La condición que debe cumplirse para que el ensamblaje sea cooperativo es que $K_g \gg K_m$. En tales sistemas de polimerización debe observarse una concentración crítica C_c por debajo de la cual toda la proteína existe como una mezcla de unidades de menor tamaño que el núcleo (que denominaremos especies solubles, que pueden ser monómeros u oligómeros). Por encima de la concentración crítica toda la proteína existe como una mezcla de especies solubles que presentan una concentración aproximadamente igual a C_c y de especies poliméricas cuya concentración es $C_t - C_c$, donde C_c es la concentración total de la proteína (Andreu y Timasheff, 1986) (ver Figura 3.9).

En este esquema de ensamblaje cooperativo, se ha descrito que la concentración crítica C_c es aproximadamente igual a K_g^{-1} , la constante de disociación aparente de la reacción de elongación del polímero (Oosawa y Asakura, 1975). En la cinética del proceso, puede observarse un periodo de lenta formación de los polímeros que corresponde al proceso de nucleación, seguido de una cinética rápida de formación en la fase de elongación.

Se conocen distintos polímeros que ensamblan de manera cooperativa, como los polímeros de actina y tubulina. Los polímeros que se forman en un ensamblaje cooperativo son de varias cadenas, y establecen solo un tipo de contacto (*i.e.*, el contacto longitudinal, es decir, contactos entre subunidades del mismo protofilamento) durante la fase de nucleación, mientras que la fase de elongación es más favorable porque se forman dos o más tipos de uniones (el contacto longitudinal y el contacto lateral) al añadirse subunidades en los extremos del polímero en crecimiento. Sin embargo, la formación de polímeros de una sola cadena sigue un mecanismo no cooperativo, uno de cuyos ejemplos es el ensamblaje isodésmico (en el que la adición de cada subunidad al polímero tiene la misma afinidad y ésta no se ve influenciada por el tamaño del polímero en formación (Rivas *et al.*, 2000; Romberg *et al.*, 2001)).

Polímeros que ensamblan cooperativamente y forman parte de estructuras del citoesqueleto, como actina y microtúbulos, presentan una característica muy deseable para la función que deben desempeñar: son fuertes en la parte central pero pueden ser fácilmente remodelados por los extremos. La fragmentación de los polímeros de actina es órdenes de magnitud más desfavorable que la disociación de subunidades de los extremos, debido a que se requiere la rotura de más enlaces en la fragmentación (Romberg *et al.*, 2001).

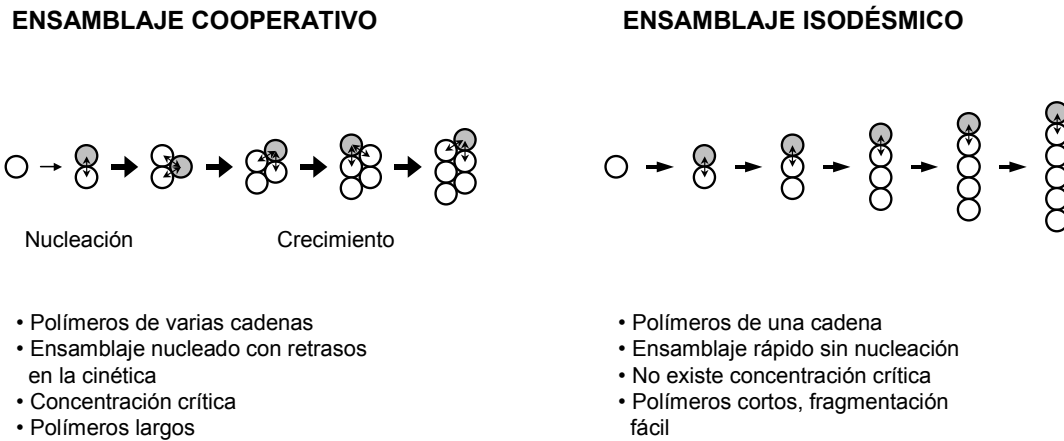


Figura 3.8. **Propiedades de ensamblajes cooperativos e isodésimicos.** En la parte izquierda, los polímeros cooperativos tienen varias cadenas y ensamblan en dos fases. Durante la fase de nucleación, solo se forma un enlace entre subunidades. Después de la nucleación, el crecimiento es más favorable porque se forman dos o más enlaces durante la adición de nuevas subunidades. En la parte derecha, los polímeros isodésimicos son polímeros de una sola cadena y por ello ensamblan a través de la formación de un enlace que es idéntico a cada paso del ensamblaje. No hay una fase de nucleación, por tanto. Se enumeran las características de los dos tipos de ensamblaje.

3.7.2 *Determinación de la concentración crítica*

La medida de la concentración crítica se realizó por cuantificación de la masa del polímero formado mediante distintas técnicas detalladas a continuación: dispersión de luz a 90°, turbidez o sedimentación. Si se representa la concentración del polímero frente a la concentración total de proteína, el punto de corte con el eje x corresponde al valor de la concentración crítica C_c (Andreu y Timasheff, 1986; Oosawa y Asakura, 1975) (Figura 3.9).

3.7.3 *Ensamblaje de FtsZ en tampón fisiológico*

3.7.3.1 Dispersión de luz a 90°

La formación de los polímeros de FtsZ en estas condiciones pudo seguirse por dispersión de luz a 90°. En esta técnica la luz incidente se dirige hacia la muestra, y la intensidad de la luz dispersada se mide a un ángulo de 90° respecto del haz incidente, empleando para ello un fluorímetro. La intensidad de luz dispersada es proporcional a la concentración de polímero, pero insensible a la distribución de tamaños de los filamentos, siempre que los filamentos sean suficientemente largos en comparación con la longitud de onda de la luz incidente. Acorde con lo estudiado para el ensamblaje de actina (Wegner y Engel, 1975), y según los tamaños de FtsZ observados por microscopía electrónica, los polímeros de FtsZ cumplen estas condiciones. En los experimentos de dispersión de luz a 90° se empleó un fluorímetro Jobin Yvon Fluorolog-3, con longitudes de onda de excitación y de emisión de 350 nm, con rendijas de 0.5 nm en excitación y de 1 nm en emisión. Todas las reacciones fueron realizadas a 30 °C. Volúmenes de 400 µl de FtsZ (0.1-1 g/l) se incubaron en el tampón fisiológico (con o sin sistema de regeneración del GTP) en una cubeta de fluores-

encia. Después de 5 minutos de equilibrado, se añadió GTP 1 mM o GMPCPP 0.1 mM, y se registró el aumento en la señal de dispersión de luz.

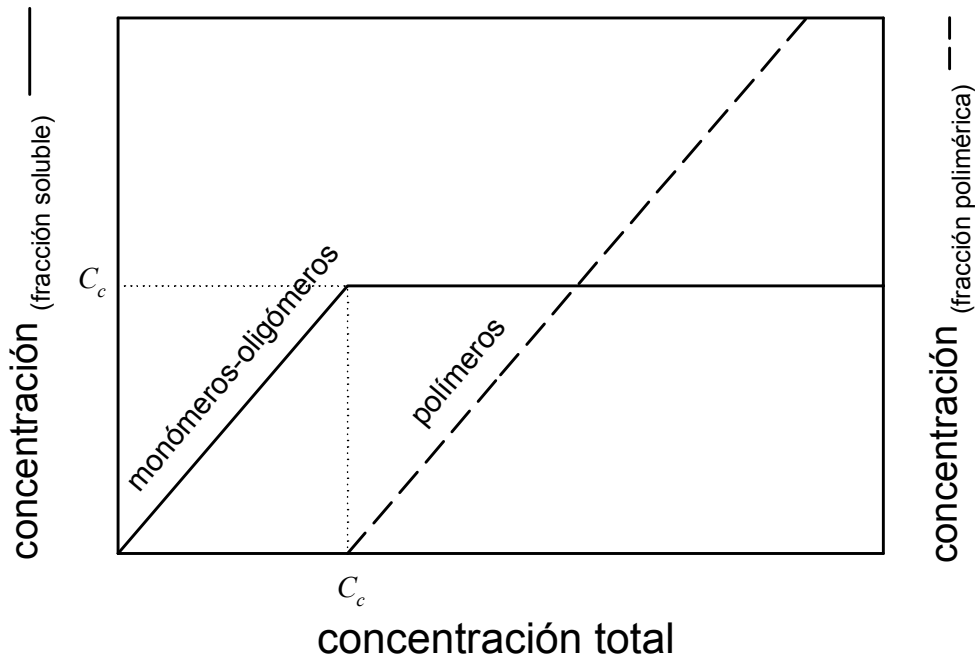


Figura 3.9. **Determinación de la concentración crítica a partir de un ensayo de centrifugación diferencial.** La fracción soluble (que pueden ser monómeros u oligómeros) y la fracción polimerizada se separan mediante un ensayo de centrifugación y se cuantifica el contenido en proteína de ambas fracciones. La concentración crítica se puede obtener de la intersección con el eje x de la recta de concentración de la fracción polimérica o del valor de concentración de la fracción soluble a concentraciones totales mayores que la concentración crítica.

3.7.3.2 Centrifugación diferencial

Debido a que los polímeros de FtsZ tienen un coeficiente de sedimentación mucho mayor que el de FtsZ no ensamblada, podemos separar ambas especies por centrifugación. La fracción de FtsZ presente en los polímeros se puede determinar a partir de la concentración de FtsZ en el sobrenadante.

Se cuantificó el ensamblaje de FtsZ por un ensayo de alta velocidad de centrifugación. La proteína se incubó en tampón fisiológico con GTP y sistema de regeneración (1 unidad/ml acetato quinasa + 15 mM acetilfosfato) en un volumen de 100 μ l. Los polímeros formados se centrifugaron a $\sim 240000 \times g$ (80000 rpm) en una ultracentrífuga de mesa Optima MAX (Beckman-Coulter Inc) durante 15 minutos a 30 °C. Se determinó la concentración de FtsZ en el sobrenadante (tomando cuidadosamente 95 μ l) así como también en las muestras originales (controles) por el método colorimétrico del BCA (ver sección 3.9.1). La cantidad de FtsZ en el polímero se pudo determinar por tanto como la cantidad de FtsZ en los controles menos la cantidad de FtsZ en el sobrenadante.

3.7.4 *Ensamblaje de FtsZ en medios aglomerados*

3.7.4.1 Dispersión de luz a 90° y turbidez

Los polímeros formados en condiciones de aglomeración macromolecular se estudiaron por dos técnicas de dispersión de luz: dispersión de luz a 90° (como está descrito más arriba), que detecta tanto los filamentos finos como las redes o cintas de FtsZ, y turbidez.

La turbidez es una medida de la luz dispersada total por atenuación del haz incidente. La turbidez es proporcional a la concentración de proteína polimerizada si, bajo ciertas restricciones, se cumple que la longitud de los filamentos, L , es

$L > 3.5\lambda$, es decir, que debería ser mayor de 1.2 μm para una longitud de onda de 350 nm (Andreu y Timasheff, 1986). Los polímeros de FtsZ observados al microscopio electrónico satisfacen, de manera general, esta condición.

Los experimentos de turbidez se realizaron en un espectrofotómetro UV-Visible Ultrospec 3000*pro* (Amersham Biosciences), empleando normalmente una longitud de onda de 350 nm, aunque ocasionalmente se emplearon otras longitudes de onda en el rango entre 320-400 nm. FtsZ (0.1-2 g/l) se incubó en un volumen de 400 μl a 30 °C en una cubeta de espectrofotómetro en el tampón fisiológico (con o sin sistema de regeneración del GTP). Después de 5 minutos de equilibrado, se añadió GTP 1 mM o GMPCPP 0.1 mM.

3.7.4.2 Centrifugación diferencial

La relativa baja viscosidad y densidad del Ficoll 70 (Wenner y Bloomfield, 1999), que reduce los coeficientes de sedimentación aparentes de las especies de FtsZ por un factor de 5 en soluciones de 200 g/l de Ficoll, permite el uso de un ensayo de baja velocidad para separar las redes o cintas de polímeros formados en presencia de Ficoll de los protofilamentos finos. 100 μl de una concentración dada de FtsZ se centrifugaron a 25000 \times g (15000 rpm en centrífuga Hettich) durante 10 minutos a 30 °C. El sobrenadante solo contenía proteína soluble y protofilamentos, a juzgar por imágenes de microscopía electrónica, y el precipitado contenía mayoritariamente las redes o cintas de polímeros anchos. Experimentos control en ausencia de agentes de aglomeración demostraron que bajo estas condiciones de sedimentación > 95 % de los filamentos de FtsZ formados en presencia de GTP estaban en la fracción soluble. Por tanto, se dispone de un ensayo que discrimina entre filamentos finos y redes de polímeros de una manera cuantitativa.

3.8 Microscopía

3.8.1 Microscopía electrónica

Los polímeros de FtsZ (concentración de proteína en el rango 0.05-1 g/l), en ausencia o presencia de altas concentraciones de agentes de aglomeración (es decir, en medios diluidos y aglomerados), se visualizaron en un microscopio electrónico JEOL-1200 o LEO 910. Brevemente, en el microscopio electrónico se incide una radiación electrónica sobre la muestra, y con ayuda de unas lentes electromagnéticas se forma una imagen magnificada del (espécimen. Debido al alto vacío y a la radiación electrónica en el microscopio, las muestras fueron protegidas con tinción negativa, que se basa en la aplicación a la muestra de una solución salina de un metal pesado (acetato de uranilo 2 %), de tal manera que la muestra se deshidrata pero queda inmersa en una capa de metal que la protege. La imagen que se genera procede fundamentalmente del contraste entre la capa de metal y de la ausencia de éste allí donde se encuentre la muestra biológica. En definitiva, se obtiene un “negativo” del espécimen estudiado (Valpuesta *et al.*, 2003).

Las muestras se incubaron sobre una rejilla de cobre, con una capa de Formvar y sombreadas con carbono, durante 30 s. Después de eliminado el exceso de líquido, se incubó la rejilla en acetato de uranilo 2 % durante otros 30 s, se lavó con otra gota de acetato de uranilo 2 %, dejando secar a continuación.

3.8.1.1 Preparación de secciones finas

Los polímeros de FtsZ formados en presencia de Ficoll 200 g/l y GTP o GMPCPP fueron incluidos en Araldita, una resina, para posteriormente ser cortados y poder visualizar las secciones final al microscopio electrónico. FtsZ 1 g/l se incubó a 37 °C

en presencia de GTP 1 mM o GMPCPP 0.1 mM y Ficoll 200 g/l durante 5 minutos. Después se añadió glutaraldehído al 1 % para fijar covalentemente los polímeros formados, y la muestra se incubó otros 2 minutos. Los polímeros fueron recogidos por centrifugación a 20000 X g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Los precipitados fueron sometidos a un nuevo tratamiento de fijación en glutaraldehído al 3 % y ácido tánico 0.2 % por una hora, y fijados posteriormente con OsO₄ 1 % durante otra hora más. Los precipitados fueron teñidos en bloque en acetato de uranilo 2 % extensivamente. Una vez terminada la tinción en bloque, el precipitado fue deshidratado en alcohol, con etanol al 50, 75, 95 y 100 % sucesivamente. Los precipitados se incluyeron en Araldita 506, y la polimerización de la Araldita se realizó a 80 °C durante 2 días. Las secciones finas se obtuvieron cortando los precipitados incluidos en Araldita con un microtomo con cuchillo de diamante y se depositaron sobre rejillas de cobre sombreadas con carbono. Las secciones se tiñeron con KMnO₄ 2 % y tinción plomo Sato (Reedy y Reedy, 1985).

3.8.2 Microscopía de fuerzas atómicas

La microscopía de fuerzas atómicas es una técnica que proporciona información topográfica de las muestras analizadas. La superficie de la muestra es explorada por una fina punta, registrando interacciones repulsivas de corto alcance entre los átomos de la punta y la muestra. Estas interacciones provocan la inclinación del brazo que sostiene la punta, inclinación que puede seguirse haciendo reflejar un haz láser sobre el brazo. La magnitud de la fuerza de interacción depende de la distancia entre la punta y la muestra y de las propiedades mecánicas y químicas de la muestra. La distancia de la punta a la muestra y el desplazamiento lateral de la punta en la exploración de la superficie de la muestra son controlados con precisión de décimas de Å mediante un

material piezoeléctrico sobre el que va montada la muestra. En *modo de contacto*, la distancia vertical de la punta a la muestra es controlada de manera que la punta se mantiene siempre a la misma distancia de la muestra, mientras que en *modo dinámico*, el brazo vibra, acercándose y alejándose de la superficie. En los dos modos se registra con precisión la topografía de la superficie, y por tanto, de la muestra (Stolz *et al.*, 2000). El principio físico en el que se basa la técnica y el sistema de detección permite la exploración de la topografía de superficies sumergidas en disolución, por ello, la microscopía de fuerzas atómicas es fundamentalmente diferente del resto de técnicas microscópicas utilizadas en Biología, no siendo necesario el empleo de un alto vacío ni preservar la muestra con agentes de tinción o técnicas de congelación.

En esta Memoria, las imágenes de microscopía de fuerzas atómicas fueron tomadas en un microscopio de Nonatec Electrónica, operando en *modo dinámico*, tal como se describe en (Moreno-Herrero *et al.*, 2002). El movimiento del piezo se calibró con rejillas calibradas de silicio. Se utilizaron puntas de nitruro de silicio (DI instruments) con una constante de fuerza de 0.2 N/m. Una gota de la solución con los polímeros de FtsZ (formados después de la adición de 0.1 mM GMPCPP a la proteína en tampón fisiológico en ausencia o en presencia de 100-200 g/l de Ficoll) se incubó sobre una superficie circular de mica recién exfoliada adherida a una superficie de Teflon, y después de unos minutos, las muestras se lavaron extensivamente con una mezcla de tampón y GMPCPP. Las imágenes de filamentos en ausencia de agentes de aglomeración se tomaron con una gota de esta solución sobre la muestra. En ausencia de agentes de aglomeración, se consiguió mayor resolución en las imágenes dejando secar la muestra durante 15 minutos bajo una corriente de aire.

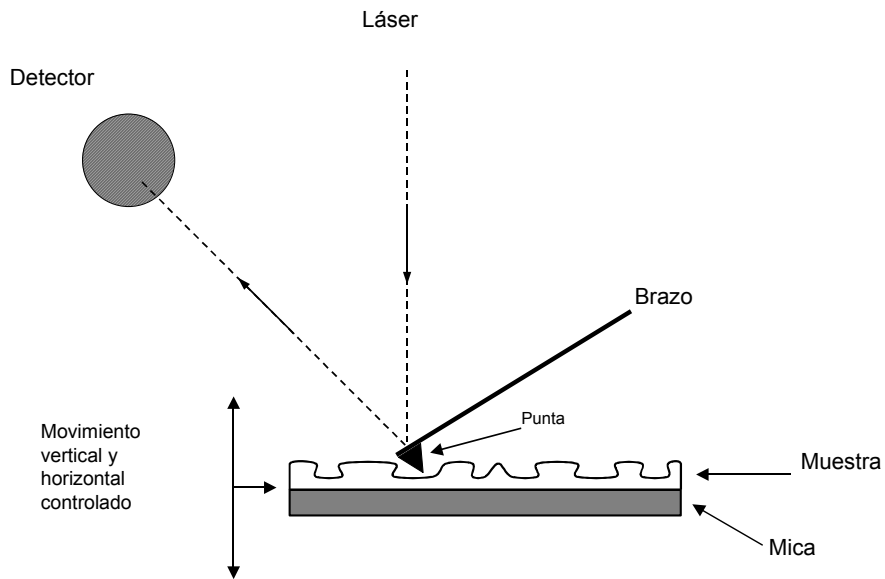


Figura 3.10. **Esquema de un microscopio de fuerzas atómicas.** La muestra, que puede encontrarse en un medio líquido, se encuentra encima de una lámina de mica. La superficie de la muestra es explorada por una fina punta anclada a un brazo. El brazo se mueve en respuesta de la interacción entre la punta y la muestra, y el movimiento es detectado por el reflejo de un haz láser sobre el brazo, de manera que puede explorarse toda la superficie de la muestra registrando su topografía. El soporte sobre el que se encuentra la muestra es de un material piezoeléctrico, controlándose con mucha precisión el movimiento lateral y vertical.

En el estudio de la dinámica de despolimerización de los polímeros (Figura 4.7) se incubó FtsZ en tampón 50 mM Tris/HCl, 500 mM KCl, 5 mM MgCl₂, pH 7.4. FtsZ 0.05 g/l a la que se añadió GTP 1 mM fue incubada sobre la mica durante 1 minuto. Se tomaron imágenes de la misma región cada 2-3 minutos.

3.8.3 Microscopía de fluorescencia

Las muestras de FtsZ marcada con FITC se depositaron directamente sobre un portaobjetos, y los polímeros se visualizaron usando un microscopio de epifluorescencia equipado con un filtro para FITC y objetivos de inmersión en aceite de 40X/63X/100X (aumentos). Las imágenes se capturaron con una cámara CCD (del inglés, *Charge-Coupled Device*). En microscopía de epifluorescencia se ilumina la muestra, produciéndose la excitación del fluoróforo y se registra la emisión en dirección contraria a la del haz de luz de excitación.

3.9 Otros procedimientos

3.9.1 Cuantificación de la concentración de proteína, dextrano y Ficoll

La proteína se cuantificó por el método colorimétrico del ácido bicinónico (BCA, del inglés *BiCinchoninic Acid*) de Pierce o por espectrofotometría.

El método colorimétrico del BCA se basa en la reducción del Cu²⁺ a Cu⁺ por proteína en un medio alcalino, y posterior detección del ión Cu⁺ usando ácido bicinónico (Smith *et al.*, 1985). El producto del ensayo es coloreado y exhibe una fuerte absorbancia a 562 nm. Se empleó FtsZ calibrada espectrofotométricamente (Rivas *et al.*, 2000) y albúmina de suero bovino como patrón secundario, obteniendo una relación de color FtsZ/albúmina de 0.80 ± 0.03 (en concordancia con (Lu *et al.*, 1998)).

FtsZ también se cuantificó espectrofotométricamente utilizando un coeficiente de extinción molar para el complejo FtsZ-GDP a 280 nm de $13,800 \pm 900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Este coeficiente es válido para FtsZ unida a 1.1 ± 0.1 moléculas de GDP (Rivas *et al.*, 2000).

La concentración de dextrano y Ficoll se determinó refractométricamente en un refractómetro de luz visible. El método se basa en que los cambios en el índice de refracción de una disolución es linealmente proporcional a los cambios en concentración de estas macromoléculas. Se empleó un valor de incremento específico del índice de refracción con la concentración de 0.134 y 0.140 ml g⁻¹ (Weast, 1982-1983) para Ficoll y dextrano respectivamente.

3.9.2 Experimentos de intercambio de GTP

El intercambio de GTP se siguió por un ensayo de unión a filtro de nitrocelulosa, tal como se describe en (Mingorance *et al.*, 2001). En ausencia o presencia de Ficoll 150 g/l, se provocó la polimerización de FtsZ 0.5 g/l con 0.1 mM [γ -³²P]-GTP en tampón fisiológico. Después de 1 minuto a 30°, se añadió GTP no marcado (hasta una concentración total de 1 mM). Para cuantificar el nucleótido marcado unido a la proteína, se filtraron las muestras a distintos tiempos a través de un filtro de nitrocelulosa, reteniéndose la proteína, y se lavó con tampón. Se cuantificó la radiactividad en los filtros haciendo un conteo Cerenkov en un contador de centelleo. La actividad específica se determinó comparando con alícuotas de GTP marcado usadas como estándar. La unión del nucleótido marcado, medida en ausencia de proteína, era muy baja y fue restada de los datos. Se comprobó que la proteína era retenida en el filtro cuantificando la concentración de proteína en el eluido.

3.9.3 Cuantificación de la actividad GTPasa

El fosfato producido en la hidrólisis de GTP por FtsZ fue cuantificado por el ensayo colorimétrico del verde malaquita. El fosfato se compleja con una mezcla de molibdato, alcohol polivinílico y verde de malaquita, formándose un complejo coloreado fácilmente cuantificable espectrofotométricamente (Hoenig *et al.*, 1989).

Las muestras de FtsZ (0.1-2 g/l), en ausencia o en presencia de agentes de aglomeración, se incubaron a 30° durante 5 minutos, momento en el cual se añadió GTP 0.5 mM. Se tomaron alícuotas a diferentes tiempos y se añadió la mezcla de reacción, parándose en ese momento la actividad enzimática por desnaturalización de la proteína. El fosfato se cuantificó midiendo la absorción a 620 nm frente a una curva patrón estándar de fosfato.

3.9.4 Electroforesis

Las electroforesis se realizaron en geles discontinuos de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE, del inglés *Sodium Dodecil Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*), de acuerdo esencialmente con (Laemmli, 1970). Se empleó un gel separador al 10 % de acrilamida en 0.38 M Tris-HCl, pH 9, 0.1 % SDS. Las bandas de proteína se visualizaron después de teñir con azul de Coomassie al 1 % en 45 % metanol y 10 % ácido acético.

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 FtsZ-GDP tiene una baja tendencia a oligomerizar en tampón fisiológico

4.1.1 *Análisis por ultracentrifugación analítica (equilibrio y velocidad de sedimentación)*

Hemos estudiado mediante equilibrio y velocidad de sedimentación la influencia de concentraciones fisiológicas de iones presentes en el citoplasma bacteriano (tampón “fisiológico”, ver Materiales y métodos, sección 3.3) sobre el estado de asociación de la proteína de división celular de *E. coli* FtsZ unida a GDP (FtsZ-GDP). Previamente en el laboratorio se había caracterizado el comportamiento de FtsZ-GDP en un tampón 50 mM Tris, 50 mM KCl, pH 7.4 (Rivas *et al.*, 2000). En dicho estudio, se había descrito que FtsZ-GDP oligomeriza de manera indefinida a partir del monómero en un proceso no cooperativo ligado al catión Mg^{2+} . Esta oligomerización es dependiente de fuerza iónica, observándose un debilitamiento de la interacción monómero-monómero (es decir, una menor tendencia a oligomerizar) con el aumento de la fuerza iónica.

En la Figura 4.1 y Figura 4.2 se muestran el gradiente de equilibrio y la dependencia del estado de asociación de FtsZ en el tampón fisiológico con la concentración de proteína, respectivamente. Los resultados indican que la especie predominante en el rango de concentraciones estudiado (0.1-2.5 g/l) tiene un tamaño promedio correspondiente al de un dímero de FtsZ, con una tendencia a formar monómeros y

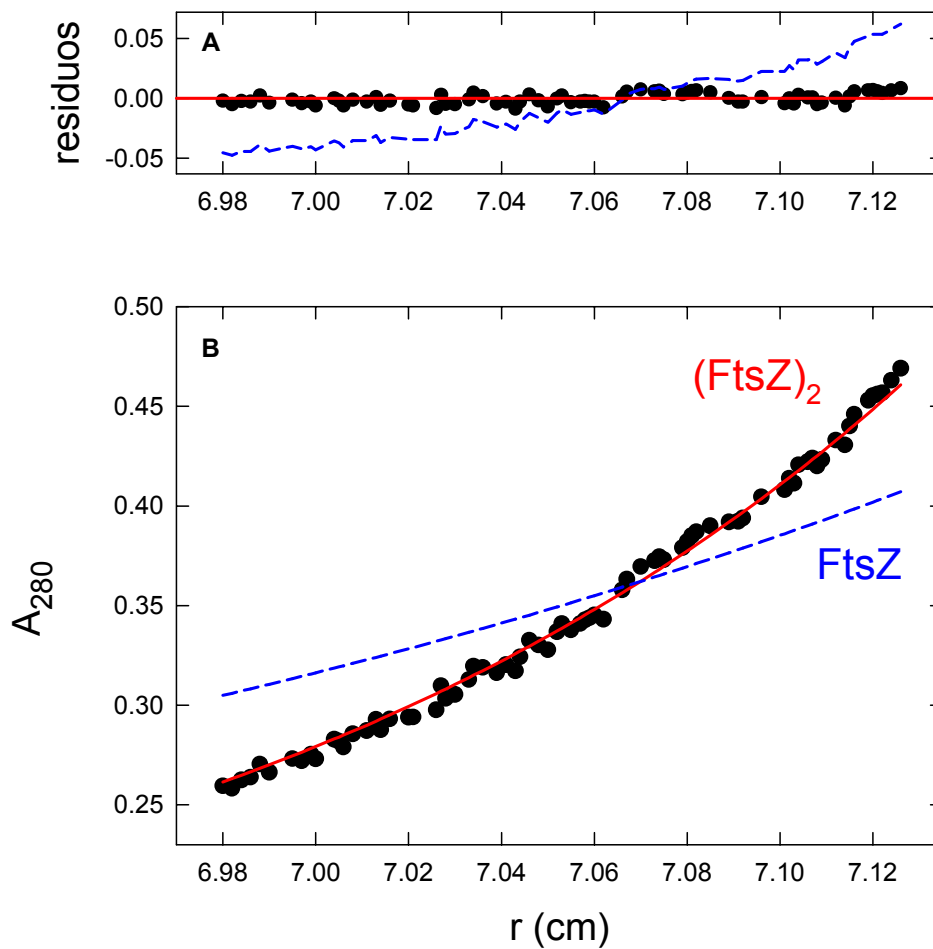


Figura 4.1. **Gradiente de equilibrio de sedimentación de *E. coli* FtsZ-GDP en tampón fisiológico.** La proteína FtsZ (25 μ M) se equilibró en el tampón fisiológico con 50 μ M GDP. Los datos fueron obtenidos a 15000 rpm y 20 °C. B, los círculos corresponden a los datos experimentales y la *línea continua roja* al mejor ajuste con una masa molecular promedio de $M_{w,a}=80000$. La *línea discontinua* muestra el gradiente teórico del monómero de FtsZ en el equilibrio de sedimentación. Las diferencias entre los datos experimentales y los ajustes se muestran en el panel superior, *panel A*.

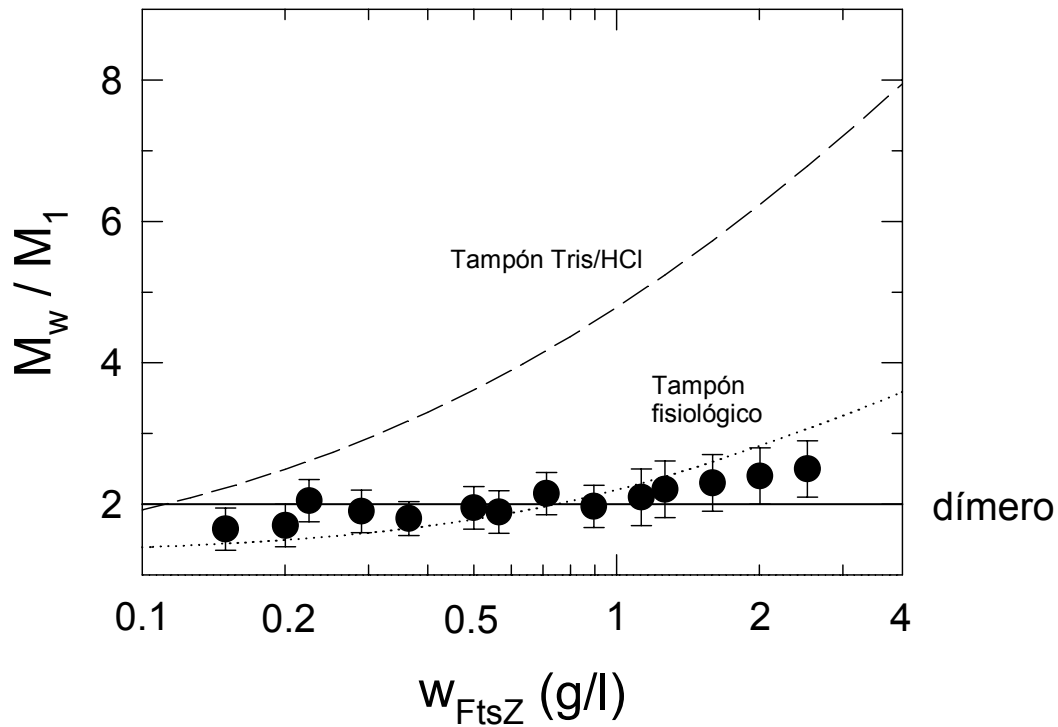


Figura 4.2. Auto-asociación de la proteína de *E. coli* FtsZ-GDP en tampón fisiológico determinada por equilibrio de sedimentación. La proteína FtsZ se equilibró en el tampón fisiológico con 50 μ M GDP, y su estado de asociación se determinó a partir de datos de equilibrio de sedimentación tal como se describió en Materiales y Métodos. Los círculos muestran los datos de equilibrio de sedimentación obtenidos a 15000 rpm y 20 $^{\circ}$ C, y la línea discontinua corresponde al mejor ajuste a un modelo de asociación indefinida no cooperativa ligada a Mg^{2+} de FtsZ en 50 mM Tris/HCl, 50 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 50 μ M GDP, pH 7.4, descrito en (Rivas et al., 2000). La línea de puntos muestra el mejor ajuste para un modelo de asociación isodésmico a partir de los monómeros de FtsZ ($K = 6 \cdot 10^3 M^{-1}$).

oligómeros mayores, si se disminuye o incrementa la concentración de FtsZ, respectivamente.

En la Figura 4.3 se representa la distribución de coeficientes de sedimentación de FtsZ. La distribución corresponde a picos con coeficientes de sedimentación $s_{20,w}$ de 2.5 y 3.5 S, que son compatibles con el monómero y dímero de FtsZ, respectivamente.

A partir de estos coeficientes de sedimentación se puede obtener la relación friccional f/f_0 (desviación respecto de la esfera equivalente hidratada, ver sección 3.5.4 de Materiales y Métodos), dando un resultado de 1.59 para el monómero y 1.81 para el dímero. La estructura tridimensional del monómero de *M. jannaschii* FtsZ obtenida mediante cristalografía de Rayos X indica que la forma no se desvía significativamente de la forma esférica. Puesto que la relación friccional depende tanto de la forma de la proteína como de su grado de hidratación, podría ocurrir que la estructura del monómero de *E. coli* en solución fuera más elongada que la estructura cristalográfica de *M. jannaschii* o que el grado de hidratación fuera mayor que el supuesto en el cálculo del radio de la esfera hidratada equivalente ($0.3 \text{ g}_{\text{agua}}/\text{g}_{\text{proteína}}$).

A la vista de estos resultados, FtsZ sería compatible con monómeros y dímeros en equilibrio. Sin embargo, mediante equilibrio de sedimentación, se obtuvo que la especie predominante a la concentración empleada en los experimentos de velocidad de sedimentación tenía un tamaño correspondiente al de un dímero de FtsZ. Se repitió el experimento de velocidad de sedimentación incubando la proteína el mismo tiempo (24 horas) y en las mismas condiciones en las que se realiza el experimento de equilibrio de sedimentación, para determinar si se trataba de un equilibrio lento, pero se obtuvo el mismo resultado que sin la incubación de 24 horas. El desplazamiento hacia el monómero que se ha producido en el equilibrio de asociación de FtsZ en las

condiciones del experimento de velocidad de sedimentación podría deberse a un efecto de presión hidrostática como consecuencia de la alta velocidad angular (el experimento de equilibrio se realiza a una velocidad angular menor).

Estos resultados están de acuerdo con los del artículo previo del grupo, en el que aumentando la fuerza iónica del medio de 50 a 500 mM KCl disminuía la masa molecular promedio y el coeficiente de sedimentación de FtsZ-GDP (Rivas *et al.*, 2000). En el medio que reproduce la osmolaridad intracelular, FtsZ en su forma unida a GDP tiene una baja tendencia a oligomerizar en disolución.

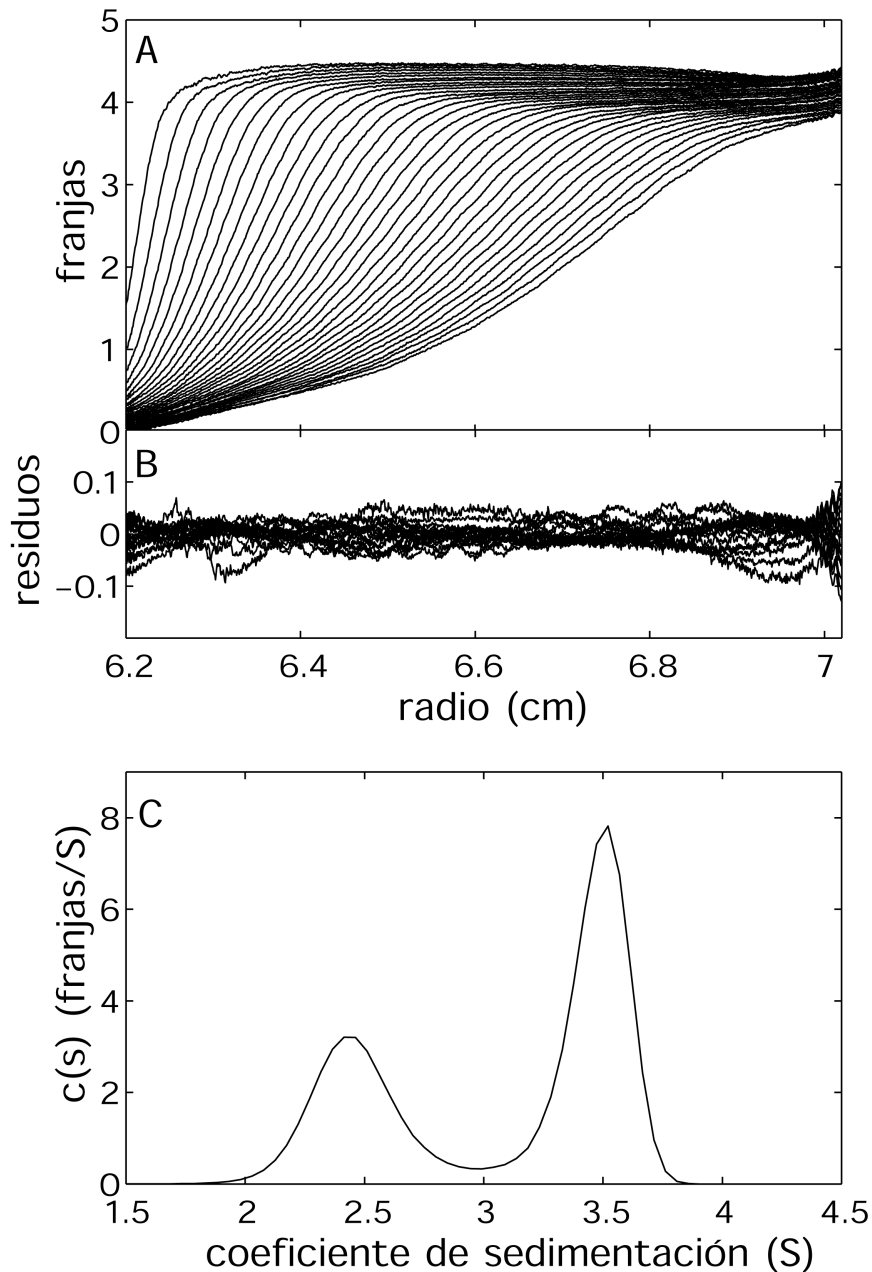


Figura 4.3. Análisis por velocidad de sedimentación de FtsZ-GDP en tampón fisiológico.

A, datos de velocidad de sedimentación de FtsZ 1 g/l equilibrada en tampón fisiológico y 50 μ M GDP, sedimentando a 50000 rpm, 20 °C. Por claridad, se muestra uno de cada cinco perfiles de sedimentación. B, representación de los residuos (de uno de cada cinco perfiles) del mejor ajuste a los datos experimentales. El mejor ajuste se encontró para un valor de la relación friccional, f/f_{min} de 1.78, y la desviación de los datos experimentales respecto del ajuste (raíz cuadrada de la media de las diferencias cuadráticas) fue 0.028. C, distribución de coeficientes de sedimentación resultante del mejor ajuste a los datos experimentales.

4.2 FtsZ en presencia de GTP en tampón fisiológico ensambla en filamentos dinámicos

4.2.1 Análisis mediante dispersión de luz a 90°

FtsZ, después de la adición de GTP 1 mM, ensambló rápidamente tal como se observó por dispersión de luz a 90° (Figura 4.4). En las mismas condiciones la adición de GDP no indujo la polimerización (Figura 4.4). Debido a la alta concentración de iones potasio presente en el tampón, la actividad GTPasa de FtsZ se vio incrementada, causando la rápida despolimerización de los polímeros de FtsZ después de agotado el GTP, como se describió en (Mukherjee y Lutkenhaus, 1998; Mukherjee y Lutkenhaus, 1999; Rivas *et al.*, 2000). Para evitar la rápida despolimerización de los polímeros, se añadió un sistema enzimático de regeneración del GTP (ver Materiales y métodos, sección 3.3). Con este sistema los polímeros de FtsZ (formados a 1 g/l de proteína), eran estables a 30 °C al menos durante una 1 hora (Figura 4.4). Este tiempo aumenta si se disminuye la concentración de proteína o si se aumenta la concentración de GTP en el medio.

4.2.2 Morfología de los polímeros mediante microscopía electrónica y de fuerzas atómicas

Los filamentos formados con GTP y sistema de regeneración pudieron ser vistos por microscopía electrónica a partir de muestras teñidas negativamente (Figura 4.5B). Los filamentos tienen longitudes y curvaturas variables con una anchura de 5-6 nm, no muy distinto de lo obtenido para los filamentos formados en presencia de GTP sin sistema de regeneración (Figura 4.5A). Se encontraron filamentos de FtsZ de anchura 6-8 nm cuando la proteína se incubó con GMPCPP, un análogo que es hidrolizado

más lentamente que el GTP (Figura 4.5C). Los filamentos formados en el tampón fisiológico después de la adición de GMPCPP también se analizaron en solución por microscopía de fuerzas atómicas (Figura 4.6). Los filamentos tienen un alto grado de curvatura, con una anchura de 4-5 nm.

Mediante microscopía de fuerzas atómicas (Figura 4.7) se ha podido además estudiar el comportamiento dinámico que los polímeros de FtsZ en presencia de GTP exhiben en experimentos de dispersión de luz a 90° (Figura 4.4). En la Figura 4.7 se representa la evolución de los polímeros de FtsZ polimerizada en tampón 50 mM Tris/HCl, 500 mM KCl, 5 mM MgCl₂, pH 7.4 (ver sección siguiente, sección 4.2.3, para más detalles sobre el uso de este tampón) de un mismo campo microscópico en 6 imágenes tomadas cada 10 minutos. En el panel Figura 4.7A se puede comprobar cómo los filamentos tienen tendencia a agregar lateralmente. Cuando se va consumiendo el GTP presente en el medio, se pierde masa de los polímeros, se pierden subunidades. Un análisis detallado de la presencia de subunidades de FtsZ dentro de los polímeros desvela que la despolimerización se produce a lo largo de todo el filamento, no solo por los extremos, habiendo casos en los que un filamento desaparece por completo entre una imagen y la siguiente (aunque se representan imágenes distantes 10 minutos entre sí, se adquirieron imágenes cada 2-3 minutos). Cuando la densidad de filamentos sobre la mica es menor, los filamentos reestructuran su forma, mostrando una tendencia a formar estructuras circulares, en algunos casos abiertas y en otros cerradas (Figura 4.7D y E).

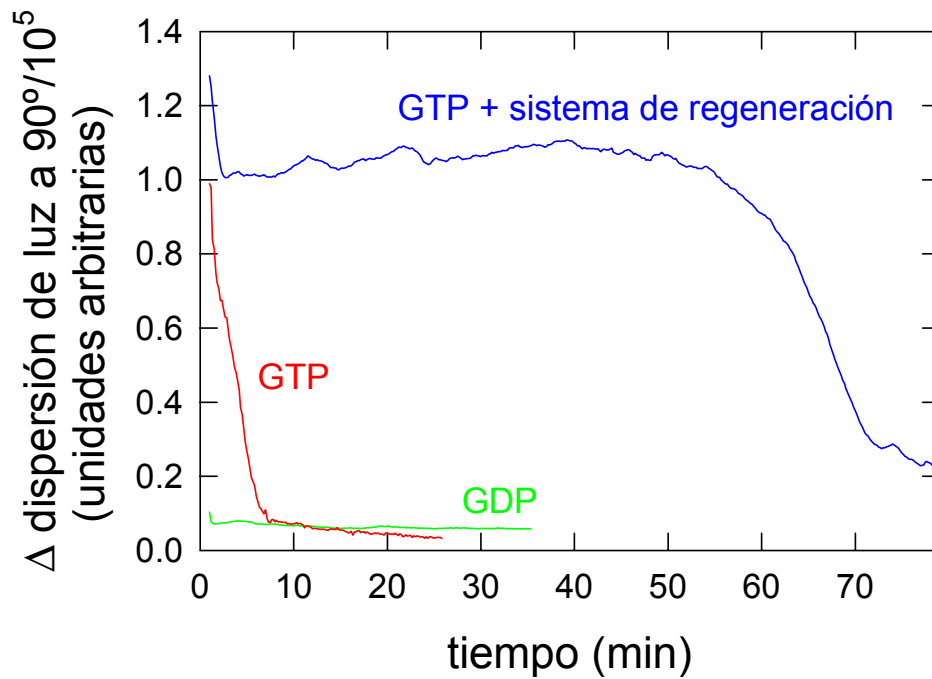


Figura 4.4. Ensamblaje de FtsZ en tampón fisiológico analizado por dispersión de luz a 90°. FtsZ (0.5 g/l) se incubó a 30 °C en tampón fisiológico sin sistema de regeneración (*línea roja*), o con sistema de regeneración, tal como se ha descrito en el texto (*línea azul*). GTP se añadió a una concentración final de 2 mM (correspondiente al incremento en la señal de dispersión de luz), y la polimerización se siguió por dispersión de luz a 90°, como se describió en Materiales y Métodos. Los datos correspondientes a la dispersión de luz cuando se añadió GDP en lugar de GTP se muestran en la *línea verde*.

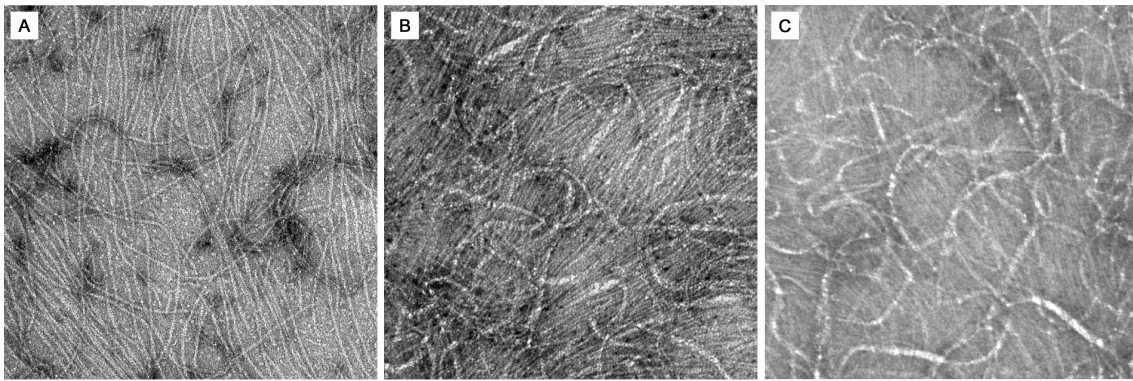


Figura 4.5. **Análisis del ensamblaje de FtsZ en ausencia de agentes de aglomeración por microscopía electrónica.** Micrografías electrónicas de polímeros de FtsZ teñidos negativamente en tampón fisiológico más GTP 1 mM, sin (*panel A*) o con (*panel B*) un sistema de regeneración del GTP (1 unidad/ml acetato quinasa y 10 mM acetilfosfato), y después de la adición de GMPCPP 0.1 mM (*panel C*). La barra negra corresponde a 100 nm.

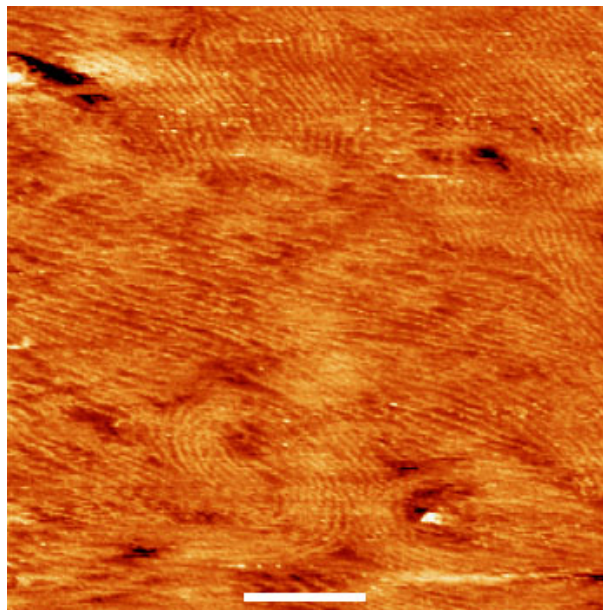


Figura 4.6. **Análisis del ensamblaje de FtsZ en tampón fisiológico por microscopía de fuerzas atómicas.** Imagen de polímeros de FtsZ formados después de la adición de 0.1 mM GMPCPP en tampón fisiológico. La escala vertical (el color negro corresponde a zonas profundas y el blanco a zonas altas) es de 6 nm. La barra blanca de escala corresponde a 100 nm.

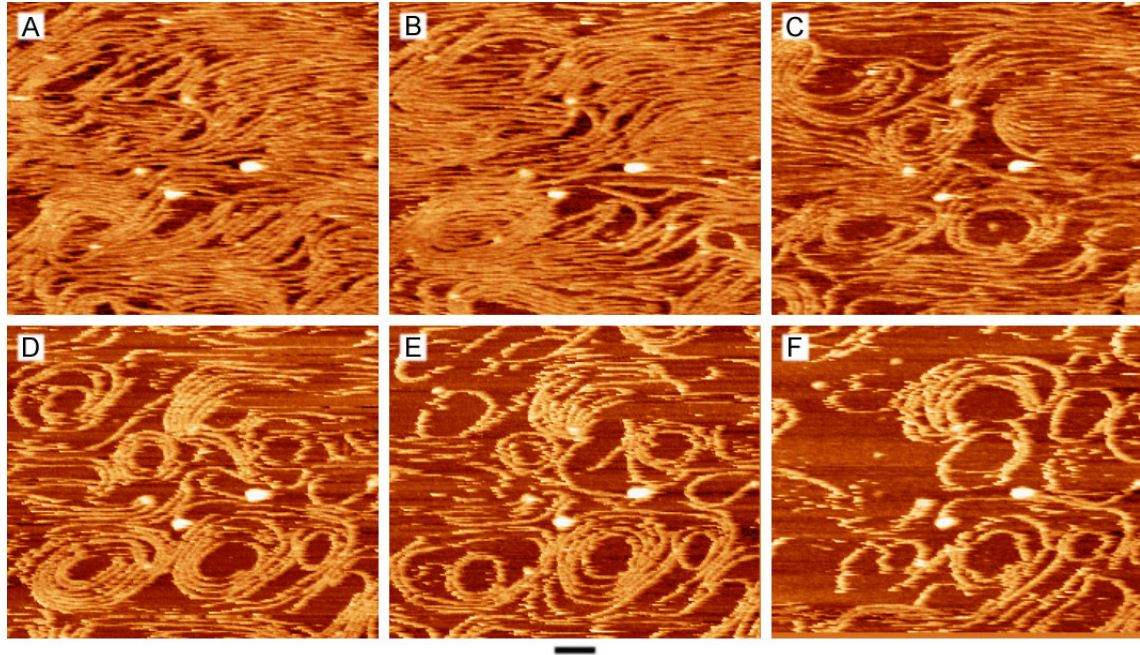


Figura 4.7. **Dinámica de despolimerización de los polímeros de FtsZ analizada por microscopía de fuerzas atómicas.** FtsZ 0.05 g/l ensambló en presencia de 1 mM GTP en tampón 50 mM Tris/HCl, 500 mM KCl, 5 mM MgCl₂, pH 7.4. Las imágenes (*paneles A-F*) fueron adquiridas en *modo dinámico* cada 2-3 minutos, esencialmente según lo descrito en la sección 3.8.2 de Materiales y Métodos. En todos los casos, la barra de escala negra (debajo del *panel E*) corresponde a 100 nm.

4.2.3 *Determinación de la distribución de tamaños de los protofilamentos de FtsZ en disolución: Análisis mediante velocidad de sedimentación y dispersión de luz dinámica*

En las secciones previas de este apartado de la Tesis hemos descrito el ensamblaje cooperativo de FtsZ en presencia de GTP para formar filamentos dinámicos finos. El análisis de las imágenes de dichos polímeros obtenidas mediante microscopía electrónica y de fuerzas atómicas nos ha permitido estimar la longitud de los protofilamentos de FtsZ. Con la primera de estas técnicas se observan protofilamentos de longitud variable en presencia de GTP y sistema de regeneración cuyo valor medio es de $\sim 400 \pm 200$ nm (que se corresponde con $\sim 90 \pm 45$ subunidades de FtsZ). Los polímeros observados mediante microscopía de fuerzas atómicas son más largos (micras en el caso de algunos filamentos de la imagen Figura 4.7A, y longitudes entre 400 y 1000 nm para las estructuras en forma de anillo de la imagen Figura 4.7D y F). Sin embargo, ninguna de estas dos aproximaciones constituye en sentido estricto una determinación de la longitud (tamaño) de los protofilamentos que FtsZ forma en disolución. Pensamos que es importante conocer esta información para comprender el proceso de ensamblaje de FtsZ en disolución *in vitro* y que puede ser relevante desde el punto de vista fisiológico y, por ello, decidimos abordar este problema mediante el uso de métodos hidrodinámicos (en concreto, velocidad de sedimentación combinada con dispersión de luz dinámica). Estas metodologías, que no habían sido utilizadas con anterioridad para estudiar el ensamblaje de FtsZ (Romberg y Levin, 2003), son herramientas experimentales bien establecidas para determinar el grado de homogeneidad (en cuanto a tamaños) y la distribución de especies en sistemas macromolecu-

lares en asociación reversible en disolución ((Murphy, 1997; Schuck, 2003); ver también secciones 3.5 y 3.6 en Materiales y Métodos).

Los experimentos que se describen a continuación en este apartado de la Tesis se realizaron en su mayor parte en un tampón Tris/HCl pH 7.4, 500 mM KCl (tampón Tris-500KCl), con 1 mM GTP y sistema de regeneración del nucleótido, en presencia de concentraciones definidas de magnesio libre (entre 0.1 μ M y 4 mM). La razón de no haber usado el tampón fisiológico en esta sección de la Tesis se debe a que en dicho tampón se produce un proceso no controlado de agregación de FtsZ en presencia de agentes quelantes de cationes divalentes (EGTA ó EDTA) que nos impedía estudiar el efecto del magnesio (a concentraciones por debajo de 1-5 μ M) sobre el comportamiento en velocidad de sedimentación de FtsZ en presencia de GTP (ver más adelante en este apartado). Sin embargo, estimamos que los datos obtenidos en esta sección pueden ser analizados en el contexto general de esta Tesis ya que este segundo tampón es similar, en cuanto a fuerza iónica, al tampón fisiológico empleado en la mayor parte de los experimentos descritos. De hecho, el comportamiento en velocidad de sedimentación de FtsZ en el tampón fisiológico (en presencia de concentraciones definidas de magnesio *sin* añadir agentes quelantes de cationes) es esencialmente el mismo que el observado en este tampón neutro con alta fuerza iónica en presencia de magnesio (datos no mostrados).

En la Figura 4.8A se muestran los perfiles de velocidad de sedimentación de FtsZ 1.5 g/l en tampón Tris-500KCl, en presencia de 10 mM MgCl₂, 1 mM GTP y sistema de regeneración, condiciones experimentales que promueven la polimerización de la proteína. La simple observación de los perfiles nos indica que FtsZ sedimenta mayoritariamente como un frente agudo de sedimentación, que parece homogéneo, compatible con un valor de coeficiente de sedimentación de 12.3 ± 0.5 S

(Figura 4.8C). Las imágenes de microscopía electrónica de alícuotas de la misma muestra teñidas negativamente durante el proceso de sedimentación confirman que FtsZ está mayoritariamente polimerizada en filamentos finos similares a los mostrados en la Figura 4.5. El experimento de velocidad de sedimentación se realizó a distintas velocidades (entre 15000 y 40000 rpm) observándose el mismo comportamiento en sedimentación de FtsZ e idéntico valor para el coeficiente de sedimentación aparente (datos no mostrados). Estos resultados descartan un posible efecto de la presión hidrostática a la que está sometida la muestra, por acción del campo centrífugo, sobre el proceso de ensamblaje, fenómeno responsable de la inhibición, por ejemplo, de la formación de anillos de tubulina a elevada fuerza centrífuga (Erickson, 1974).

De acuerdo con lo descrito en el apartado 3.5 (Materiales y Métodos) tanto los perfiles de velocidad de sedimentación como los correspondientes valores de coeficiente de sedimentación dependen de la concentración macromolecular, siendo esta dependencia más acusada en macromoléculas elongadas, que sería el caso de los polímeros de FtsZ. Además, si la dependencia de la sedimentación de la macromolécula con la concentración es grande podría conducir a que los frentes de sedimentación fueran anormalmente agudos, ya que las moléculas del comienzo del frente de sedimentación se mueven en un medio de más alta concentración, por lo que se retardarían, mientras que las moléculas del final del frente lo hacen en un medio mucho más diluido, por lo que se moverían más rápidamente. Este fenómeno podría compensar (y enmascarar) el ensanchamiento del frente de sedimentación característico de la sedimentación de sistemas heterogéneos (más de una especie molecular presente), lo que resultaría en una falsa apariencia de homogeneidad (Schachman, 1951; Schachman, 1959). De estas consideraciones se deduce que es importante conocer la

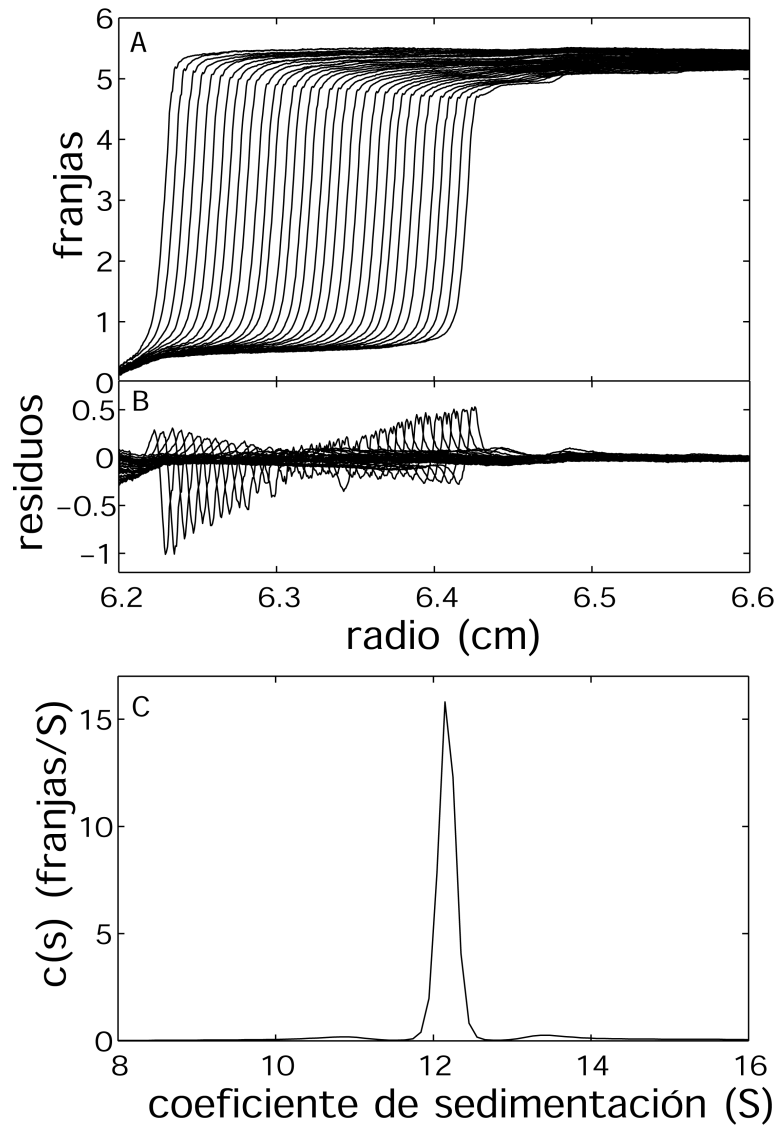


Figura 4.8. Análisis por velocidad de sedimentación del ensamblaje de FtsZ-GTP. *A*, datos de velocidad de sedimentación de FtsZ 1.5 g/l equilibrada en un tampón 50 mM Tris/HCl, 500 mM KCl, pH 7.4 (tampón Tris-500KCl), añadiendo posteriormente 5 mM $MgCl_2$, GTP 1 mM y sistema de regeneración (1 unidad/ml acetato quinasa, 15 mM acetilfosfato) sedimentando a 35000 rpm, 24 °C. *B*, representación de los residuos del mejor ajuste a los datos experimentales. El mejor ajuste se encontró para un valor de la relación friccional, f/f_{min} de 3, y la desviación de los datos experimentales respecto del ajuste (raíz cuadrada de la media de las diferencias cuadráticas) fue 0.098. *C*, distribución de coeficientes de sedimentación resultante del mejor ajuste, con un pico de máximo $s_{20,w} = 12.3$ S.

dependencia con la concentración de proteína de los perfiles de velocidad de sedimentación (y los coeficientes de sedimentación) de FtsZ.

En la Figura 4.9 se muestran las distribuciones $c(s)$ de coeficientes de sedimentación de FtsZ en función de la concentración de proteína, en el intervalo 0.05 – 1.5 g/l, obtenidos en las mismas condiciones experimentales previamente indicadas (tampón Tris-500 KCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM GTP con sistema de regeneración).

A la concentración de proteína más baja (~ 0.05 g/l) la distribución $c(s)$ de coeficientes de sedimentación, aunque de baja calidad por estar en el límite de detección del sistema de interferencia, se corresponde con un pico mayoritario de 2-3 S, compatible con monómeros y/o dímeros de FtsZ (panel A). Este dato concuerda con el resultado descrito previamente en esta Tesis de que la concentración crítica de ensamblaje de FtsZ en tampones de pH neutro y alta fuerza iónica es de 0.05-0.06 g/l (ver sección 4.2.4 y Figura 4.15). Este valor de concentración crítica obtenido mediante sedimentación se confirmó con el perfil de sedimentación observado a una concentración de ~ 0.1 g/l (panel B), que indica que FtsZ sedimenta como una mezcla heterogénea de especies moleculares, con dos picos mayoritarios. El primero de ellos ($\sim 30\%$ de la proteína de partida) es bastante homogéneo, se corresponde con un valor de coeficiente de sedimentación aparente de 3 S (compatible con monómeros/dímeros de FtsZ). El segundo de los picos ($\sim 60\%$ de la proteína inicial) se corresponde con un máximo de coeficiente de sedimentación de 11.8 S, compatible con el valor previamente descrito para el coeficiente de sedimentación de los filamentos de FtsZ a una concentración de 1.5 g/l (Figura 4.8 y Figura 4.9D). Sin embargo, este pico de proteína polimerizada a baja concentración no es tan agudo como el observado previamente a 1 g/l, y está peor resuelto que aquel, lo que indica heterogeneidad de la muestra.

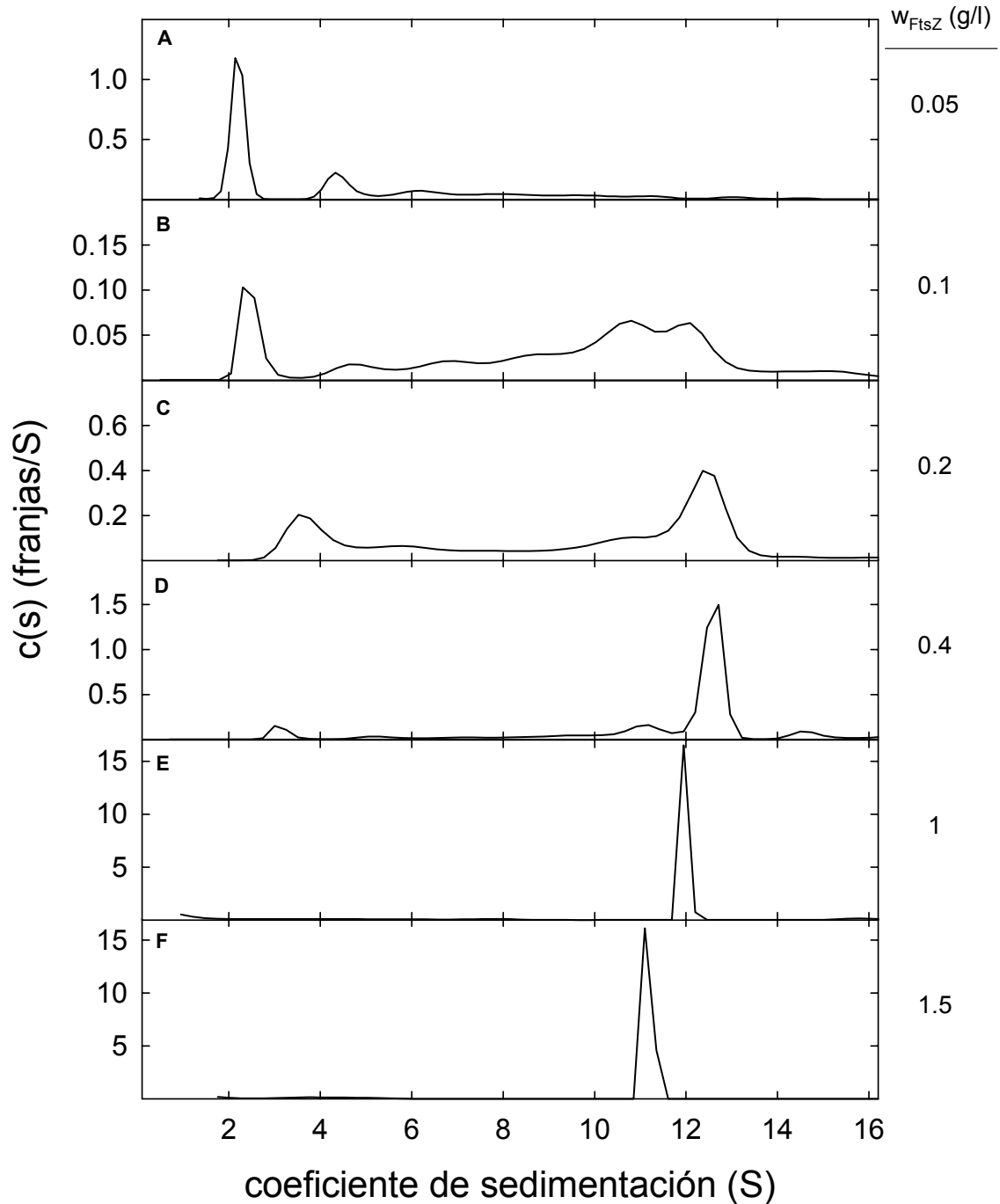


Figura 4.9. Efecto de la concentración de proteína sobre la distribución de coeficientes de sedimentación de FtsZ en presencia de GTP. El experimento de velocidad de sedimentación se realizó a 40000 rpm y 20 °C con muestras de FtsZ en tampón Tris-500 KCl conteniendo 5 mM MgCl₂, 1 mM GTP y sistema de regeneración del GTP. Los distintos paneles corresponden a distintas concentraciones de FtsZ, que están indicadas a la derecha de cada panel.

Al aumentar la concentración de FtsZ (0.2 y 0.4 g/l, Figura 4.9, paneles B y C, respectivamente) se observa una disminución en la fracción de proteína no ensamblada, que sedimenta más lentamente, y un correspondiente incremento de la fracción de proteína que sedimenta en la región 12 S. Los paneles D y E de la Figura 4.9 muestran la distribución de coeficientes de sedimentación de FtsZ a 1.0 y 1.5 g/l, siendo ambos unos perfiles muy agudos y simétricos con valores de coeficiente de sedimentación de 12.3 y 11.4 S, respectivamente.

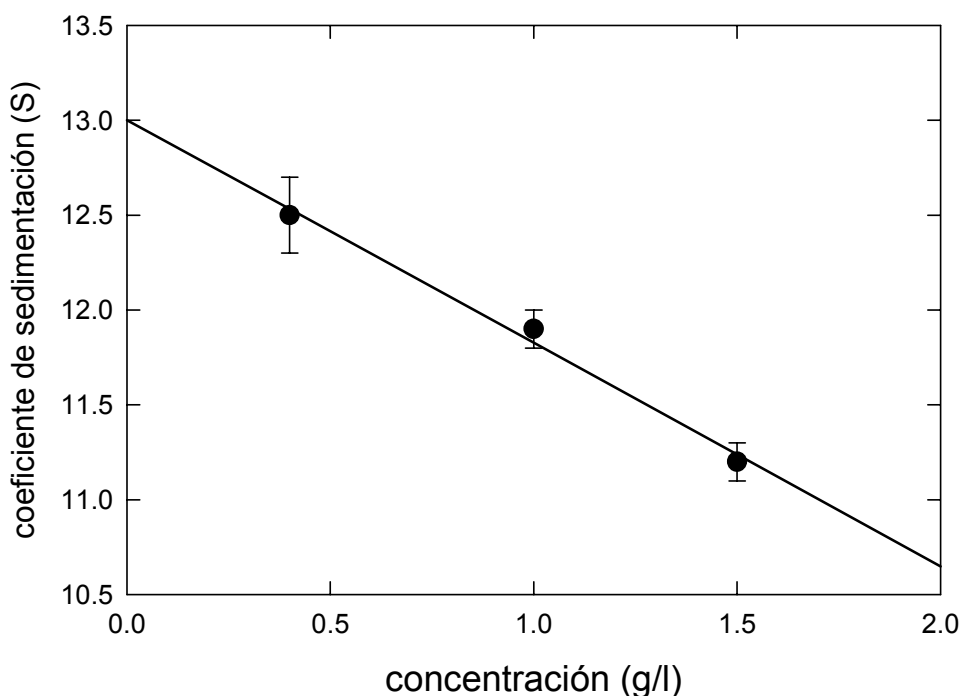


Figura 4.10. **Variación del coeficiente de sedimentación de los polímeros de FtsZ con la concentración de proteína.** Los círculos negros se corresponden con el máximo de los picos representados en los *paneles D, E y F* de la Figura 4.9. La línea continua representa el mejor ajuste a la ecuación (3.13) ($s^0 = 13.5$ S, $k_s = 110$ ml/g) a los datos experimentales (ver sección 3.5.3.3).

La Figura 4.10 resume cómo varían los coeficientes de sedimentación del pico mayoritario más rápido con la concentración de FtsZ. El ajuste de la (3.13) (sección 3.5.3.2, Materiales y Métodos) a los datos experimentales se corresponde con unos valores de 13.0 ± 0.3 S para el coeficiente de sedimentación a dilución infinita (s^0) y de 110 ± 10 ml/g para el factor de no idealidad (k_s). Este factor es del orden de magnitud del determinado para grandes filamentos (~ 200 S) de miosina (470 y 334 ml/g, en ausencia y en presencia de magnesio, respectivamente; (Persechini y Rowe, 1984)), y mucho más grande que el determinado tanto para proteínas elongadas ($k_{s \text{ fibrinógeno}} = 18$ ml/g; (Rowe, 1992)), como globulares ($k_{s \text{ seroalbúmina}} = 4$ ml/g; (Rowe, 1992)).

En la Figura 4.11 se muestra la dependencia de la relación entre los coeficientes de sedimentación del polímero y el monómero de FtsZ (s_N/s_1) con el número de subunidades del polímero (N), calculada mediante modelado hidrodinámico con el programa HYDRO (ver sección 3.5.4 de Materiales y Métodos) para un filamento de FtsZ sencillo (una cadena, *línea continua*) o doble (dos cadenas, *línea discontinua*). A partir de los resultados de sedimentación de los filamentos de FtsZ mencionados en los párrafos previos, y teniendo en cuenta el valor del coeficiente de sedimentación del monómero de FtsZ determinado en esta Tesis (2.5 S), podemos calcular que la relación (s_N/s_1) experimental es de 5.6 ± 0.3 , valor que sería compatible con un filamento doble (que sería el protofilamento esperado en un ensamblaje cooperativo típico) compuesto por 26-36 monómeros de FtsZ (13-18 por cadena) de masa $1.4 \cdot 10^6$. Si consideramos un filamento sencillo, la relación (s_N/s_1) sería compatible con filamentos de 120-220 monómeros. Este tamaño relativo para el polímero de FtsZ se correspondería con valores de masa molecular de $4.8\text{-}8.8 \cdot 10^6$ Da.

Conociendo s^0 (coeficiente de sedimentación a dilución infinita) y k_s (constante de no-idealidad hidrodinámica) podemos estimar la masa de los polímeros a partir de la ecuación (3.14). El resultado es $1.8 \pm 0.1 \cdot 10^6$ Da, esencialmente el mismo resultado que obtenemos con modelos de polímeros de doble cadena.

La dependencia con la concentración del comportamiento de FtsZ en velocidad de sedimentación también se observó en experimentos preliminares de dispersión de luz dinámica. La Figura 4.12 muestra las funciones de autocorrelación a diferentes concentraciones de FtsZ, donde es claro que a medida que aumentamos la concentración de FtsZ los tiempos de decaimiento de la función de correlación son mayores, lo que se corresponde con aumentos de tamaño de las partículas que dispersan luz. Sin embargo, las curvas correspondientes a las concentraciones más altas empleadas (1.0 y 1.5 g/l) prácticamente se superponen, lo que indica que el tamaño de los polímeros de FtsZ es comparable en ambos casos. De estos experimentos preliminares de dispersión de luz se pudieron medir los coeficientes de difusión (D), información que combinada con los correspondientes valores de coeficiente de sedimentación nos permitió (mediante la ecuación en Materiales y Métodos) extraer también una estimación aproximada del rango de tamaños de los polímeros de FtsZ presentes. Así, por ejemplo, en la región más baja de concentración en la que se detectan polímeros de FtsZ (0.1 – 0.2 g/l) el valor de D es de $1.0 \pm 0.3 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, que se corresponde con un valor estimado de masa molecular para el polímero de FtsZ de $1.1 \pm 0.2 \cdot 10^6$ Da. En la región de concentración más alta estudiada (1.0 – 1.5 g/l), se obtuvo un valor de coeficiente de difusión D de $5.0 \pm 1.0 \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, que se corresponde con una masa molecular de $1.8 \pm 0.2 \cdot 10^6$ Da.

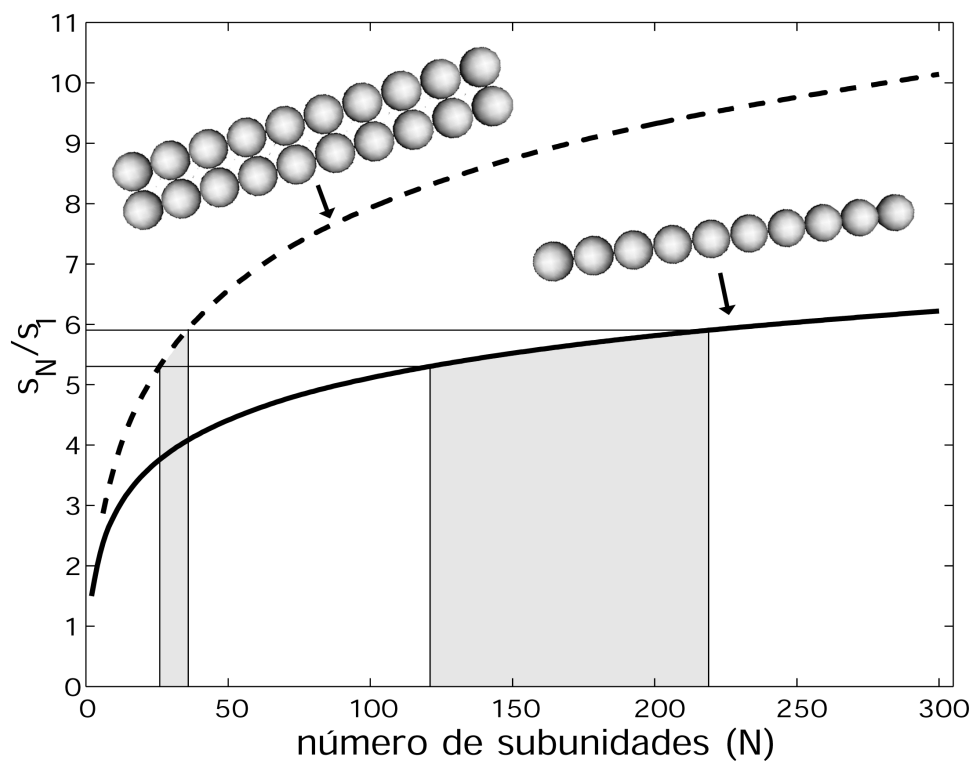


Figura 4.11. **Dependencia del coeficiente de sedimentación de un polímero con el número de subunidades.** El eje y representa la relación entre el coeficiente de sedimentación de un polímero de N subunidades y el correspondiente valor del monómero. Se representa el mejor ajuste a los datos de modelos de esferas de polímeros de una sola cadena (*línea continua*) o de dos cadenas (*línea discontinua*), construidos mediante modelado hidrodinámico usando HYDRO (ver sección 3.5.4 de Materiales y Métodos). Los datos utilizados en el ajuste han sido omitidos por claridad. La relación $s_N/s_1 = 5.6 \pm 0.3$, encontrada experimentalmente en muestras de polímeros de FtsZ, es compatible con modelos de dos cadenas de 26-35 subunidades (13-18 por cadena) o con modelos sencillos de 120-220 subunidades (zona sombreada en gris).

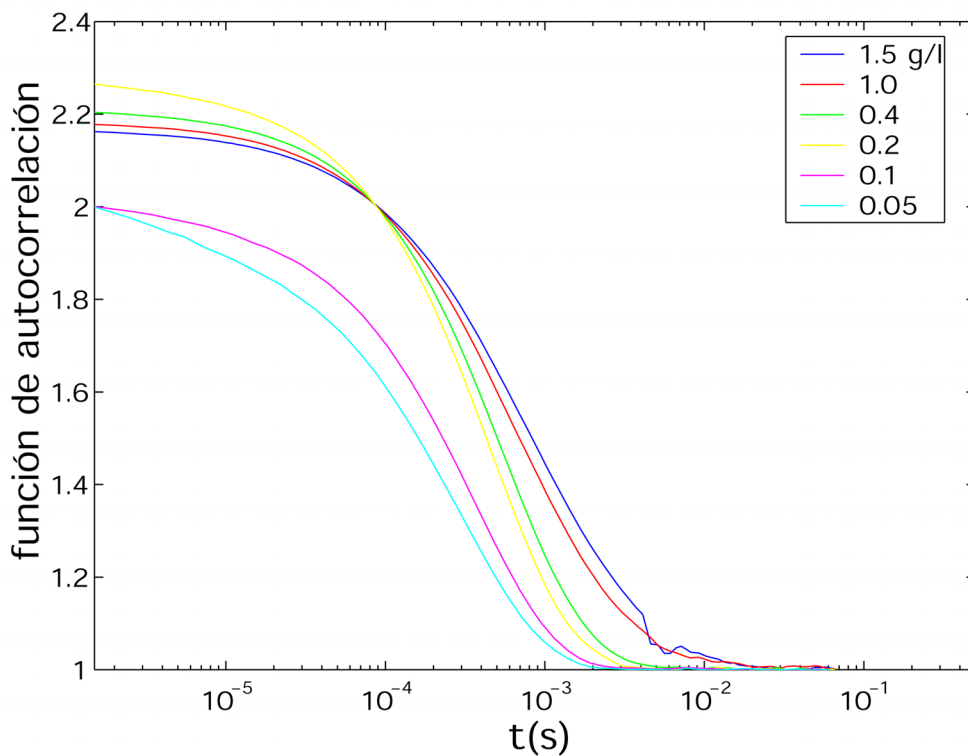


Figura 4.12. **Dependencia con la concentración de proteína de las funciones de autocorrelación de polímeros de FtsZ obtenidas en un experimento de dispersión de luz dinámica.** Las muestras de FtsZ, equilibradas en tampón Tris-500KCl con 5 mM MgCl₂, se prepararon según lo indicado en Materiales y Métodos (sección 3.6.1.1), y la polimerización se indujo con la adición de 1 mM GTP al medio. Las distintas concentraciones de FtsZ empleadas se muestran en la leyenda de la figura. Se han normalizado los datos de la función de correlación por motivos de claridad en la representación, para apreciar cómo los tiempos de decaimiento aumentan según aumenta la concentración de proteína.

Ambos valores son comparables con los previamente estimados mediante modelado hidrodinámico para filamentos de doble cadena y mediante la aplicación de la ecuación de Rowe, ecuación (3.14).

4.2.3.1 Efecto del magnesio

Tanto en la Introducción como en otras secciones de esta Tesis (por ejemplo, sección 4.1.1 de Resultados) se ha dicho que el catión Mg^{2+} es uno de los ligandos fisiológicos que controla los procesos de asociación y ensamblaje de FtsZ *in vitro*. Sin embargo, en la mayor parte de los experimentos descritos hasta ahora se ha mantenido constante la concentración de dicho catión en los niveles que se consideran fisiológicos (mM). Por ello, nos propusimos estudiar el efecto del Mg^{2+} (en el intervalo de concentración libre entre 0.1 μM y 5 mM) sobre el ensamblaje de FtsZ monitorizado mediante velocidad de sedimentación. La Figura 4.13 muestra el efecto de la concentración libre de magnesio sobre la distribución de coeficientes de sedimentación de FtsZ (~ 1 g/l) en presencia de 1 mM GTP y sistema de regeneración. A concentraciones de catión libre de ~ 0.1 μM , FtsZ (panel A) sedimenta esencialmente como una especie molecular de coeficiente de sedimentación 2.3 S, compatible con el monómero de FtsZ (ver Figura 4.3). A medida que se aumenta la concentración de Mg^{2+} entre 10 y 100 μM el perfil de distribución de coeficientes de sedimentación se hace bimodal, con una progresiva disminución del pico correspondiente a las especies 3 S y la consiguiente aparición de especies moleculares de ~ 7 S (10 μM Mg^{2+} , panel B) ó ~ 9 S (50 y 100 μM Mg^{2+} , paneles C y D, respectivamente). Cuando la concentración libre de Mg^{2+} es de 250 μM (panel E), la especie molecular de ~ 9 S pasa a ser el pico minoritario (alrededor del 20 % de la proteína inicial), mientras que una nueva especie de ~ 11 S constituye alrededor del 80 % de la muestra. Sin embargo, a concentraciones de Mg^{2+} de 1 y 5 mM (paneles F y G, respectivamente), el perfil de sedimenta-

ción está esencialmente constituido por una especie molecular de ~12 S, que se corresponde con la sedimentación de los filamentos de FtsZ previamente descritos.

La abundancia relativa (o fracción) de cada una de las especies moleculares de FtsZ presentes en función de la concentración libre de Mg^{2+} se resume en la Figura 4.14. A concentraciones intermedias de Mg^{2+} , la aparición de los picos de sedimentación de 7 y 9 S, podría corresponderse con tamaños intermedios de filamentos de FtsZ. De estos resultados se deduce que, como en el caso de la tubulina eucariota (Lee y Timasheff, 1975) se requiere una concentración de catión divalente milimolar para que el óptimo ensamblaje de FtsZ en disolución.

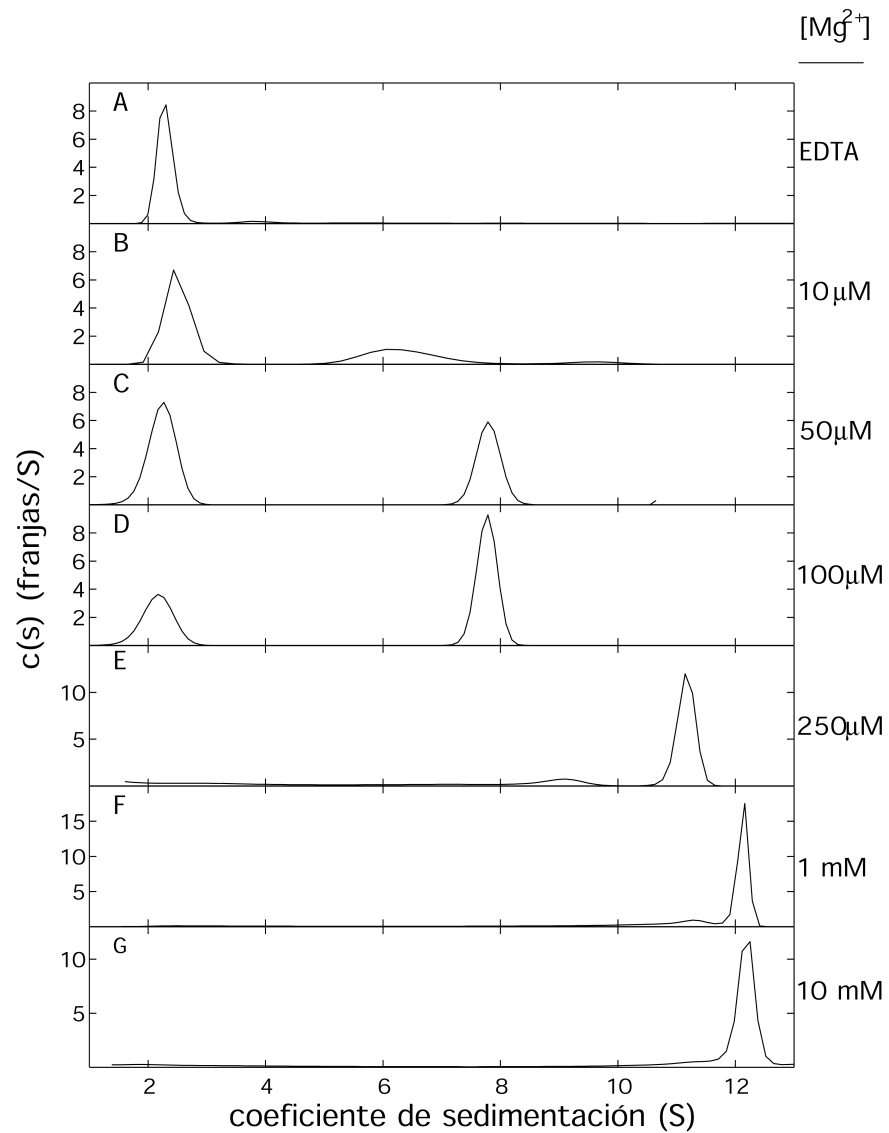


Figura 4.13. Efecto de la concentración de Mg^{2+} sobre la distribución de coeficientes de coeficientes de sedimentación de FtsZ 1.5 g/l en presencia de GTP. Los experimentos se realizaron con una concentración fija de FtsZ (1.5 g/l) en tampón Tris-500KCl con 1 mM GTP y sistema de regeneración del GTP a 24 °C, conforme a lo descrito en Materiales y Métodos (sección 3.5.3.1). Las concentraciones de Mg^{2+} están indicadas a la derecha de cada panel (el primer panel no contiene Mg^{2+} , sino EDTA 1 mM).

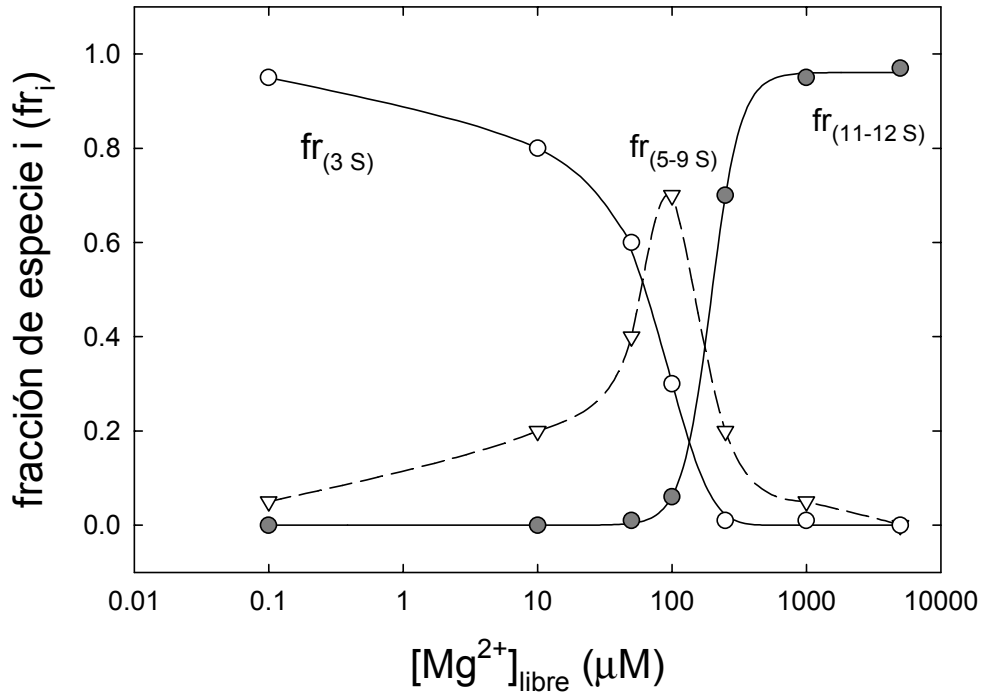


Figura 4.14. Efecto de la concentración de Mg^{2+} sobre la abundancia relativa de las especies moleculares de FtsZ. Por claridad se han agrupado las distintas especies de FtsZ en 3 grupos de acuerdo con las distribuciones de coeficientes de sedimentación mostradas en la figura anterior, Figura 4.13. Los círculos blancos se corresponden con las especies con coeficiente de sedimentación cercano a 3 S, los triángulos invertidos blancos con especies de entre 5 y 9 S, y los círculos grises con especies de entre 11-12 S.

4.2.4 Determinación de la concentración crítica del ensamblaje

Las fracciones soluble y polimerizada de FtsZ formada en presencia de GTP y el sistema de regeneración fueron separadas por centrifugación de alta velocidad y cuantificadas (ver Materiales y métodos, sección 3.7.3.2). La cantidad de filamentos formados depende de la concentración de FtsZ, dando una concentración crítica para la formación de filamentos (C_{fil}) de 0.05 ± 0.01 g/l ($1.25 \mu\text{M}$, Figura 4.15). Se analizaron muestras similares por dispersión de luz a 90° . La dispersión de luz a 90° presenta una meseta en los primeros minutos, y el valor medio en esta meseta se representó en función de la concentración de FtsZ, obteniendo un valor muy similar de C_{fil} de 0.04 ± 0.01 g/l (Figura 4.15, *círculos azules*). También se analizó el ensamblaje por dispersión de luz a 90° en ausencia de sistema de regeneración. El valor de C_{fil} determinado usando los incrementos de dispersión de luz fue prácticamente idéntico que el obtenido en presencia del sistema de regeneración del GTP (Figura 4.15, *círculos rojos*) El valor experimental encontrado para C_{fil} cuando el GTP es reemplazado por el GMPCPP fue ligeramente menor (0.03 ± 0.01 g/l; Figura 4.15, *círculos verdes*). Estos resultados indican que el ensamblaje de FtsZ ocurre de manera cooperativa. En contraste con el GTP, en presencia de GDP prácticamente toda la proteína (98 %) se recuperó en la fracción soluble en un ensayo de centrifugación como el de la Figura 4.15, como se esperaría si el dímero fuera la especie más abundante de FtsZ-GDP en disolución (ver Figura 4.2)

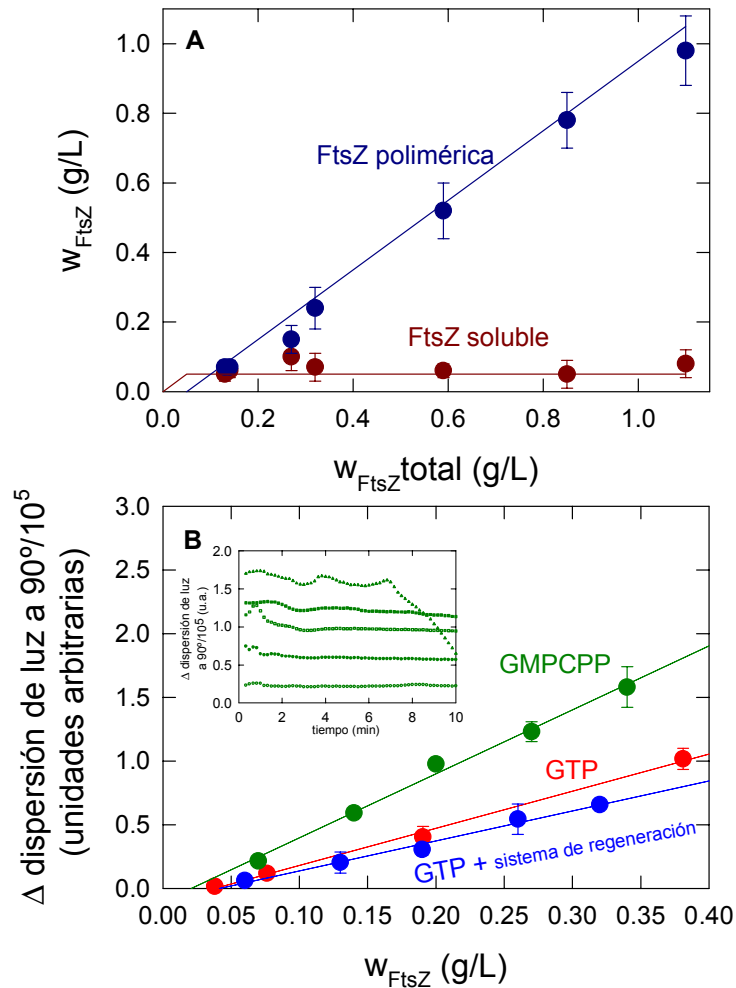


Figura 4.15. Ensamblaje de FtsZ en tampón fisiológico analizado por ensayos de dispersión de luz y de centrifugación. Determinación de la concentración crítica aparente para la formación de filamentos finos (C_{fil}). A, ensayo de centrifugación de alta velocidad. FtsZ soluble (círculos marrones) y polimerizada (círculos azules) fue separada por centrifugación tal como se describe en la sección 3.7.3.2 de Materiales y Métodos. Las líneas continuas corresponden al mejor ajuste a un modelo de transición de primer orden ($C_{fil} = 0.05$ g/l). B, ensayo de dispersión de luz a 90° , sin (círculos rojos) o con (círculos azules) un sistema de regeneración del GTP, o con GMPCPP (círculos verdes). En el panel interior se muestra la señal de dispersión de luz a 90° para las distintas concentraciones de FtsZ en presencia de GMPCPP en función del tiempo.

4.3 La aglomeración macromolecular favorece la formación GTP-dependiente de polímeros dinámicos de FtsZ

4.3.1 Morfología de los polímeros por microscopía electrónica

El citoplasma bacteriano es un ambiente altamente aglomerado de macromoléculas, una condición que no ha sido tenida en cuenta en anteriores estudios sobre la formación de filamentos de FtsZ. Para aproximarse a las condiciones del interior bacteriano se estudió la polimerización de FtsZ en presencia de altas concentraciones de macromoléculas inertes, como Ficoll o dextrano, ambos con un tamaño de 70000 Da (ver Materiales y Métodos, sección 3.1), que ya han sido usados en otros sistemas para simular el aglomerado ambiente fisiológico ((Ellis, 2001; Minton, 2001)).

Analizamos primero el efecto de la aglomeración macromolecular sobre el comportamiento de FtsZ en ausencia de los iones potasio, condiciones en las que FtsZ une GTP pero no polimeriza ((Mingorance *et al.*, 2001)). Los filamentos de FtsZ no se observaron en muestras con tinción negativa vistas al microscopio electrónico en presencia de altas concentraciones (100-200 g/l) de Ficoll (Figura 4.16). Este resultado se confirmó también por un ensayo de centrifugación de baja velocidad y por ensayos de turbidez (no mostrado).

Como se describió en la sección 4.2, FtsZ forma filamentos en presencia de GTP o GMPCPP (Figura 4.5 y Figura 4.6). La apariencia de los polímeros de FtsZ, observados en micrografías electrónicas después de tinción negativa, cambió bruscamente en presencia de altas concentraciones de dextrano o Ficoll. La adición de 200 g/l de Ficoll resultó en la formación de polímeros, algunos de ellos interconectados, con una anchura de 40-100 nm (Figura 4.16). Considerando que las dimensiones de un monómero de FtsZ son de 4-5 nm (Löwe y Amos, 1998), estos polímeros corres-

ponderían a una anchura de 8-25 protofilamentos sencillos. Se obtuvieron resultados similares cuando se utilizó 200 g/l de dextrano para simular la aglomeración macromolecular (Figura 4.16). Estos polímeros se observaron también cuando la proteína se incubó con 0.1 mM GMPCPP en lugar de GTP (Figura 4.16). Sin embargo, los polímeros desaparecieron después de una hora, a menos que se use un sistema de regeneración del GTP, sugiriendo que son estructuras dinámicas (Figura 4.16). Este último resultado concuerda con el hecho de que en presencia de GDP la aglomeración macromolecular no fue capaz de promover la formación de polímeros de FtsZ tanto en tampones con fuerza iónica baja como alta (no mostrado), a pesar de favorecer la oligomerización de FtsZ-GDP a fuerzas iónicas bajas (Rivas *et al.*, 2001).

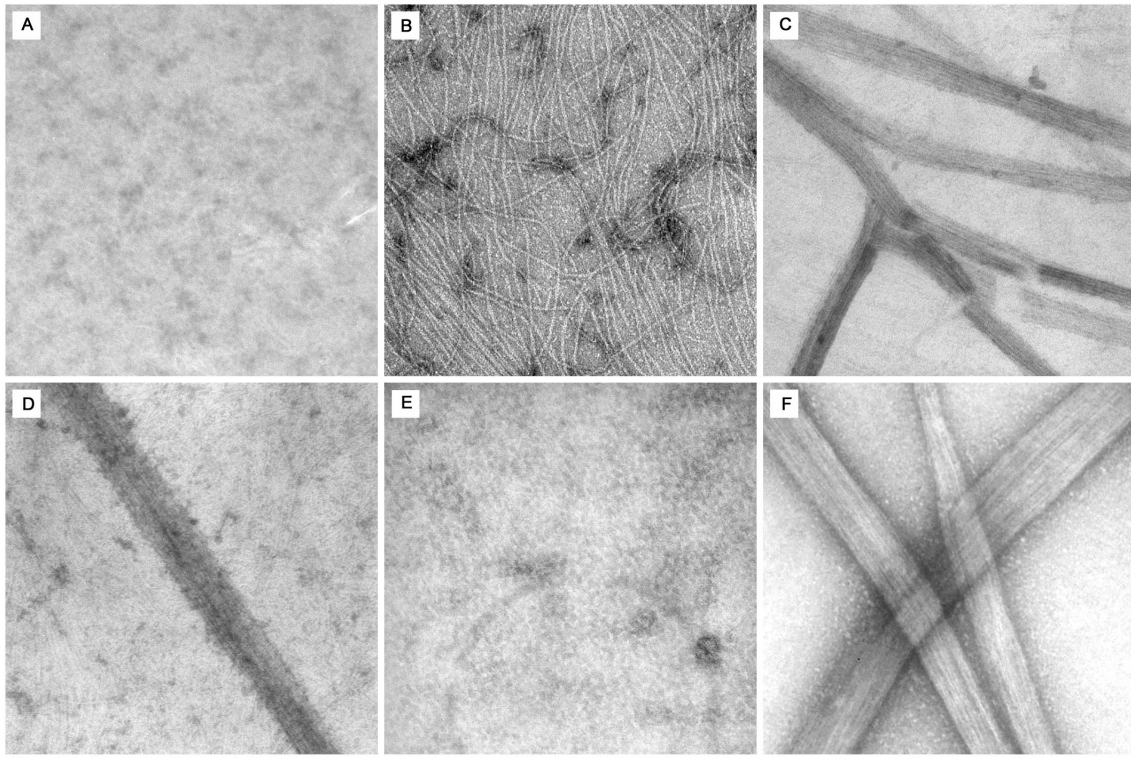


Figura 4.16. Análisis del ensamblaje inducido por agentes de aglomeración por microscopía electrónica. *A*, muestras teñidas negativamente de FtsZ 1 g/l en tampón 50 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, pH 7.4 (que no contiene iones potasio y no promueve el ensamblaje de FtsZ, ver (Mingorance *et al.*, 2001)) más 1 mM GTP y 200 g/l Ficoll. El resto de micrografías corresponden a muestras de FtsZ en tampón fisiológico teñidas negativamente. *B*, FtsZ 0.5 g/l más 1 mM GTP. *C*, FtsZ 0.2 g/l más 2 mM GTP y 220 g/l Ficoll 70. *D*, FtsZ 0.1 g/l más 2 mM GTP y 200 g/l Dextrano T70. *E*, FtsZ 0.5 g/l más 0.5 mM GTP y 200 g/l Ficoll 70 después de una hora de incubación a 30 °C. *F*, FtsZ 0.5 g/l más 0.1 mM GMPCPP y 200 g/l Ficoll 70. En todos los casos, la barra de escala corresponde a 100 nm.

4.4 Los polímeros de FtsZ formados en medios aglomerados son compatibles con cintas bidimensionales

4.4.1 Análisis por microscopía de fuerzas atómicas y secciones finas

Para obtener más información estructural sobre los polímeros se emplearon técnicas de secciones finas y posterior visualización por microscopía electrónica y microscopía de fuerzas atómicas. Las imágenes microscopía de fuerzas atómicas muestran que la anchura de las redes de polímeros inducidos por agentes de aglomeración es de 40-100 nm, correspondiente a una asociación lateral de 8-25 protofilamentos, y su altura de 4 nm (Figura 4.17).

Este tamaño es compatible con estructuras en dos dimensiones compuestas de una única capa de polímeros de FtsZ. La estructura se asimilaría a la de una *cinta*. La anchura observada es compatible a la observada por microscopía electrónica (Figura 4.16). Las interconexiones vistas en las preparaciones de microscopía también se vieron en las preparaciones de microscopía de fuerzas atómicas. El análisis realizado con secciones finas de las redes de polímeros arroja sin embargo otros resultados. Las secciones que pueden ser con más probabilidad secciones transversales de los polímeros muestran polímeros de sección circular (Figura 4.18). La anchura de los polímeros empleados en esta técnica es también compatible con las anchuras determinadas por microscopía electrónica y microscopía de fuerzas atómicas. La sección transversal de los polímeros corresponde a unas proporciones de aprox. 50 nm x 70 nm. Los resultados de ambas técnicas serán discutidos en la sección 5.2 de la Discusión).

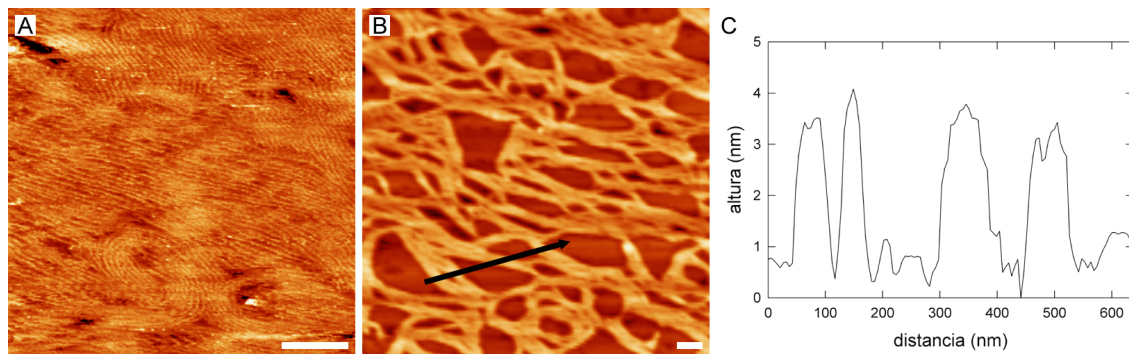


Figura 4.17. **Análisis del ensamblaje inducido por agentes de aglomeración por microscopía de fuerzas atómicas.** *A y B*, imagen de microscopía de fuerzas atómicas de los polímeros de FtsZ formados en ausencia de Ficoll (*panel A*) o en presencia de Ficoll 200 g/l (*panel B*) después de la adición de 0.1 mM GMPCPP en tampón fisiológico. La escala de alturas es 6 nm (*panel A*) y 14 nm (*panel B*). En *A y B*, la barra de escala blanca situada en el *panel A* corresponde a 100 nm. *C*, perfil de distancias de una región seleccionada de la imagen *B* (*flecha negra*). El *eje vertical* corresponde a la altura de las estructuras observadas en *B*, mientras que el *eje horizontal* indica la distancia (relacionada con la anchura del filamento) sobre la región seleccionada.

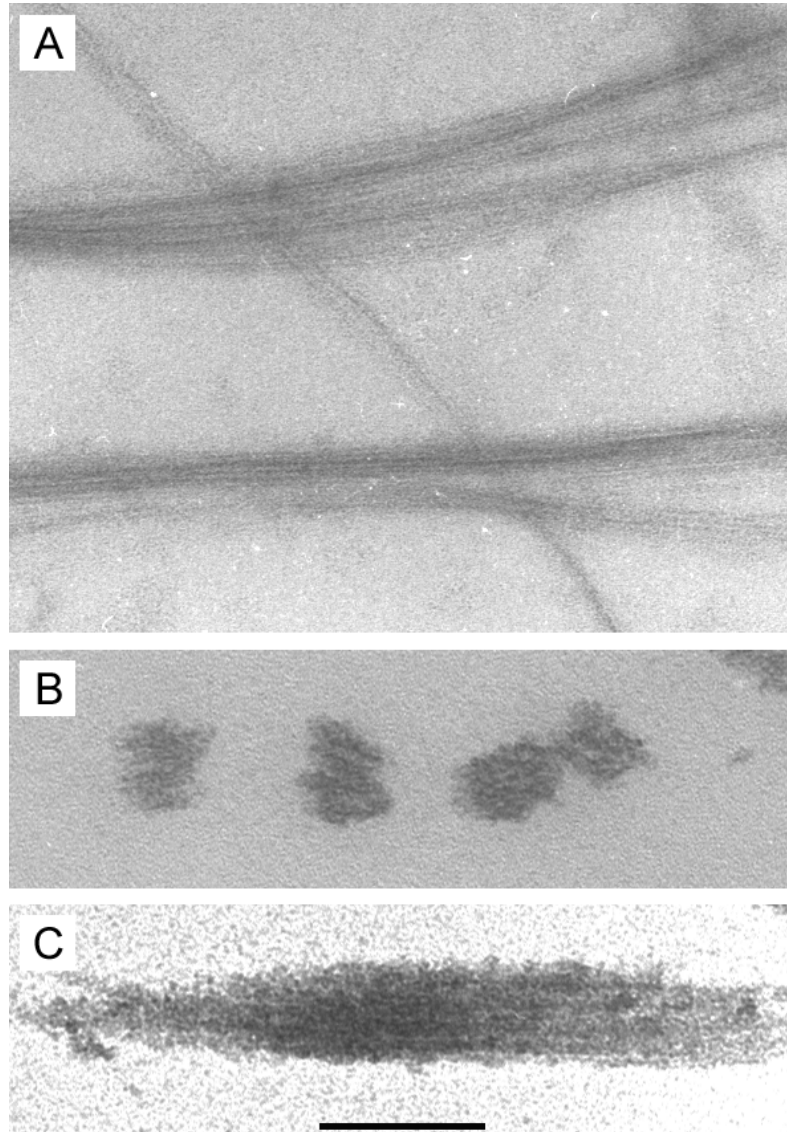


Figura 4.18. **Análisis estructural de los polímeros por microscopía electrónica de secciones finas.** FtsZ 1 g/l en tampón fisiológico con GTP 1 mM. Los polímeros fueron tratados con glutaraldehído 1 %, y se tomaron imágenes de estos polímeros teñidos negativamente (*panel A*). *B* y *C*, secciones finas (transversales, *B*, y longitudinales, *C*) de los filamentos, preparadas según lo descrito en Materiales y Métodos (sección 3.8.1.1).

4.4.2 *Análisis mediante microscopía de fluorescencia*

Los polímeros de FtsZ inducidos por agentes de aglomeración eran suficientemente grandes para poder observarse bajo el microscopio de fluorescencia empleando FtsZ marcada con el fluoróforo FITC (Figura 4.19). En ausencia de agentes de aglomeración, FtsZ marcada fluorescentemente no formó ninguna estructura que pudiera ser visualizada bajo el microscopio de fluorescencia (Figura 4.19). La microscopía de fluorescencia se había utilizado anteriormente para visualizar polímeros de FtsZ formados en presencia de Ca^{2+} (Yu y Margolin, 1997), condiciones en las que los polímeros están compuestos de varios filamentos, y se pudo comprobar que también en estas condiciones podían observarse polímeros de FtsZ marcada con FITC (Figura 4.19).

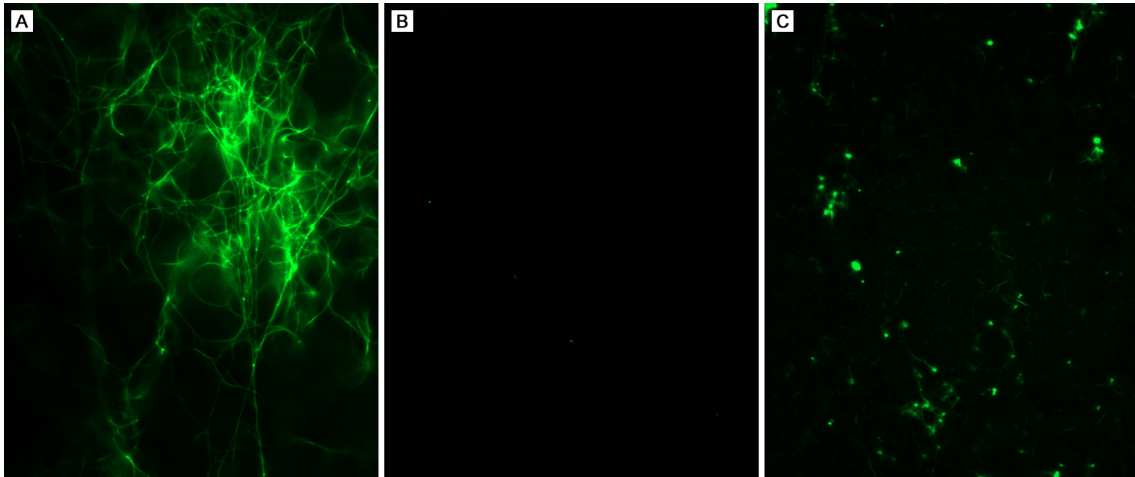


Figura 4.19. **Formación de polímeros inducidos por agentes de aglomeración: análisis por microscopía de fluorescencia.** Una mezcla de FtsZ marcada (0.05 g/l) y no marcada (0.5 g/l) se incubó con 150 g/l Ficoll 70 y 5 mM GTP en tampón fisiológico (*panel A*, 40 aumentos (40X)), con 2 mM GTP en tampón de ensamblaje MES/KCl (50 mM MES, 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂, pH 6.5) (*panel B*, 63X), o con Ca²⁺ 10 mM en tampón MES/KCl (*panel C*, 63X).

4.5 La aglomeración macromolecular promueve la formación de cintas de FtsZ a partir de filamentos de FtsZ preformados

4.5.1 Determinación de la concentración crítica de formación de las redes (C_{red}) de FtsZ

La formación de los filamentos de FtsZ en medios diluidos no produce un aumento significativo de la turbidez (Rivas *et al.*, 2000). Las medidas de turbidez se usaron, sin embargo, para seguir la formación de polímeros de FtsZ en presencia de altas concentraciones de Ficoll. Estos polímeros compuestos de varios protofilamentos sí provocan un aumento significativo en la señal de turbidez al formarse cuando se añade GTP o GMPCPP (Figura 4.20).

A concentraciones de Ficoll en el rango 100-200 g/l y en presencia de GTP o GMPCPP se encontró que el aumento en la señal de turbidez era proporcional a la concentración de FtsZ (Figura 4.20 y Figura 4.21), y era estable por un tiempo dependiente de la concentración de FtsZ (30 minutos a 2 g/l y más de 1 hora a 0.2 g/l) (Figura 4.24). Se determinó la concentración crítica aparente de formación de los polímeros de FtsZ (C_{red}) en presencia de Ficoll a partir de la intersección con el eje x en la Figura 4.21. El valor de C_{red} es de 0.05 ± 0.01 g/l, para 100 y 200 g/l de Ficoll (Figura 4.21). Ensayos de centrifugación de baja velocidad y de dispersión de luz a 90° proporcionaron valores similares de 0.06 ± 0.01 g/l a 200 g/l Ficoll (Figura 4.21). Estos valores de C_{red} son prácticamente idénticos a los valores de concentración crítica de formación de filamentos de FtsZ (C_{fil}) determinados en ausencia de agentes de aglomeración macromolecular (ver sección 4.2.4).

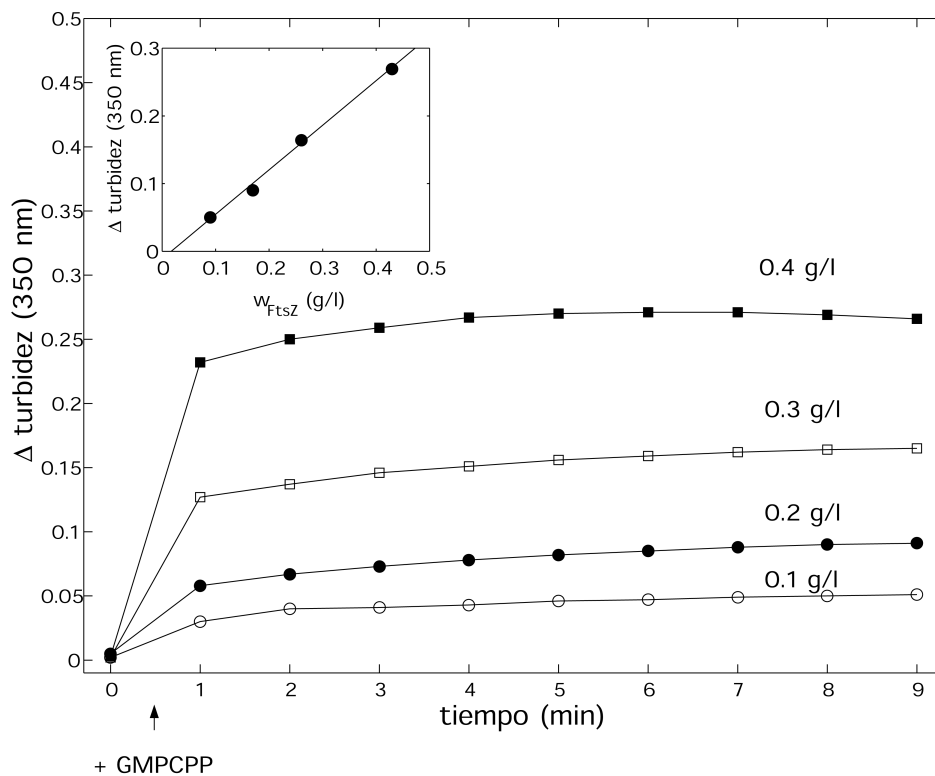


Figura 4.20. Dependencia con la concentración de proteína del ensamblaje de FtsZ inducido por aglomeración macromolecular. Perfiles de turbidez en función del tiempo en muestras de FtsZ después de la adición de 0.1 mM GMPCPP en tampón fisiológico con 210 g/l de Ficoll 70. El recuadro interior muestra la dependencia de la señal de turbidez con la concentración de proteína. Las concentraciones de FtsZ (en g/l) eran 0.1 (círculos blancos), 0.2 (círculos negros), 0.3 (cuadrados blancos) y 0.4 (cuadrados negros).

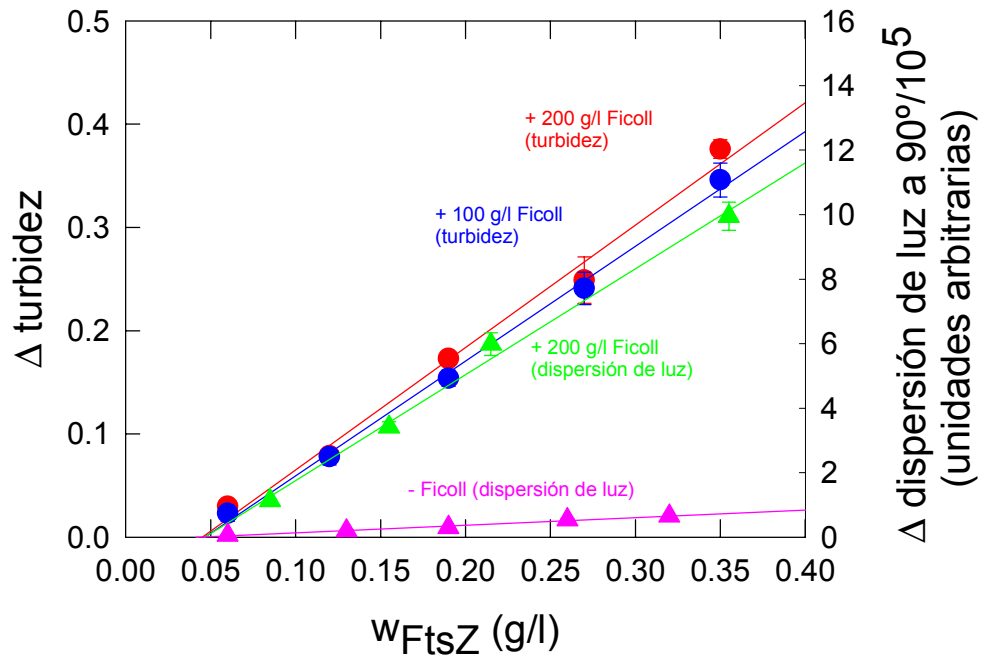


Figura 4.21. **Determinación de la concentración crítica aparente de formación de polímeros de FtsZ en presencia de agentes de aglomeración.** Se representa la dependencia de la señal de turbidez a 350 nm con la concentración de FtsZ, que aparece al formarse polímeros después de la adición de GTP a FtsZ en tampón fisiológico con sistema de regeneración del GTP y 100 g/l (*círculos azules*), 200 g/l (*círculos rojos*) de Ficoll 70. Los triángulos corresponden a la señal de dispersión de luz a 90° con (*triángulos verdes*) o sin (*triángulos rojos*) 200 g/l Ficoll 70. Los valores de concentración crítica que se obtienen de la intersección con el eje x son indicadas en el texto.

Usando varios ensayos independientes (Figura 4.15, Figura 4.21) hemos determinado que la concentración crítica aparente para la formación de redes de polímeros de FtsZ en presencia de agentes de aglomeración (C_{red}) es similar al valor de C_{fil} (el correspondiente a la concentración crítica de formación de filamentos) medido en ausencia de agentes de aglomeración. Estas observaciones indican que, dentro del rango fisiológico de concentraciones de FtsZ (0.1-1 g/l (Lu *et al.*, 1998; Rueda *et al.*, 2003)), la aglomeración macromolecular, más que favorecer el ensamblaje de FtsZ para formar filamentos finos (ver reacción 2 en Figura 5.1) promueve el alineamiento de filamentos finos de FtsZ para formar redes de polímeros anchos (reacción 3 en Figura 5.1). Tal como ha sido descrito para la polimerización de tubulina y actina (Herzog y Weber, 1978; Lindner y Ralston, 1997), y de acuerdo con la teoría de exclusión de volumen (Hall, 2002; Hall y Minton, 2002), la formación cooperativa de filamentos de FtsZ debe también estar potenciada en un medio aglomerado debido al incremento de concentración local de FtsZ en el volumen no excluido o accesible (actividad química). El posible efecto activador de la aglomeración macromolecular sobre la formación de filamentos finos permanece enmascarado, tal vez porque incluso en ausencia de aglomeración macromolecular la concentración crítica medida C_{fil} es bastante baja, y más aun porque el efecto simultáneo del volumen excluido en la formación de las redes de polímeros es mayor.

De los resultados obtenidos en ausencia de potasio, pero con agentes de aglomeración añadidos (Figura 4.16A), podemos concluir que, bajo estas condiciones en las que los filamentos finos no pueden formarse, no hay ensamblajes superiores de FtsZ en estructuras de mayor orden. Cuando los filamentos pueden formarse, el ensamblaje en redes de polímeros, resultado de alinear protofilamentos, se produce abruptamente después de la adición de suficiente concentración de agentes de aglo-

meración. Esto se puede derivar de las observaciones (Figura 4.22) que indican que la formación de polímeros anchos de FtsZ a una concentración fija de proteína (1 g/l), muy por encima de la concentración crítica para la formación de filamentos (0.05 g/l), experimenta una transición abrupta evidenciada en ensayos de sedimentación de las redes de polímeros a concentraciones de Ficoll cercanas a 80 g/l. Aunque FtsZ permanece como filamentos finos y no forma estructuras de orden superior por debajo de esta concentración de Ficoll, aproximadamente el 95 % de la proteína se encuentra en forma de redes de polímeros cuando la concentración de Ficoll es mayor.

La transición abrupta de filamentos finos no alineados hacia redes de filamentos alineados se asemeja a una transición de fase dependiente del grado de exclusión de volumen. Como ya se dijo en la Introducción (sección 1.2.3 y Figura 1.9), el aumento en el grado de exclusión de volumen provoca una transición de fase en estructuras filamentosas para dar lugar a un estado más ordenado en el que estas estructuras se alinean, en un proceso dirigido por la entropía.

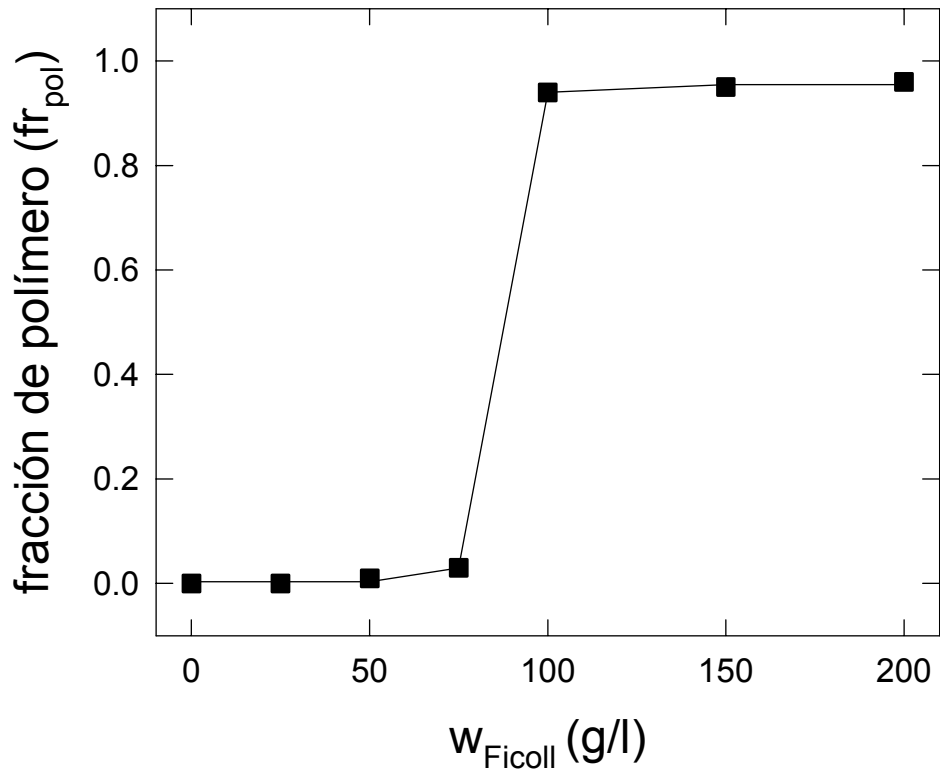


Figura 4.22. Dependencia con la concentración de Ficoll de la fracción de polímeros de **FtsZ**. Mediante un ensayo de centrifugación de baja velocidad, descrito en la sección 3.7.4.2 de Materiales y Métodos, se analizó la formación de redes de polímeros de FtsZ (1 g/l) en función de la concentración de Ficoll.

4.6 La aglomeración macromolecular retrasa la dinámica de los polímeros de FtsZ, la hidrólisis y el intercambio de GTP

4.6.1 Dinámica de despolimerización

En presencia de concentraciones altas de agentes de aglomeración macromolecular se encontró que los polímeros de FtsZ, aunque más estables que los filamentos finos de FtsZ, también eran dinámicos en su proceso de despolimerización (Figura 4.23). Se había descrito previamente que altas concentraciones de calcio (en el rango milimolar) favorecían la formación de redes de polímeros de FtsZ (como las que se pueden ver en la Figura 4.19) más estables (Yu y Margolin, 1997), y que hidrolizan GTP a una velocidad menor (Mingorance *et al.*, 2001).

Quisimos investigar la dinámica de despolimerización de las redes de polímeros inducidos por agentes de aglomeración bajo condiciones más próximas al citoplasma bacteriano.

Para caracterizar con más detalle el comportamiento dinámico de las redes de polímeros de FtsZ, se realizó un experimento para medir el efecto del Ficoll sobre el proceso de desensamblaje de los polímeros. Como se muestra en las medidas de turbidez en la Figura 4.24, la aglomeración macromolecular estabiliza las redes de polímeros de FtsZ. Por otra parte, los filamentos finos de FtsZ, seguidos por dispersión de luz a 90° (los filamentos finos no son capaces de aumentar significativamente la señal de turbidez), rápidamente desensamblan en ausencia de Ficoll. Las redes de polímeros son todavía más estables a baja concentración de FtsZ (0.2 g/l) (Figura 4.24).

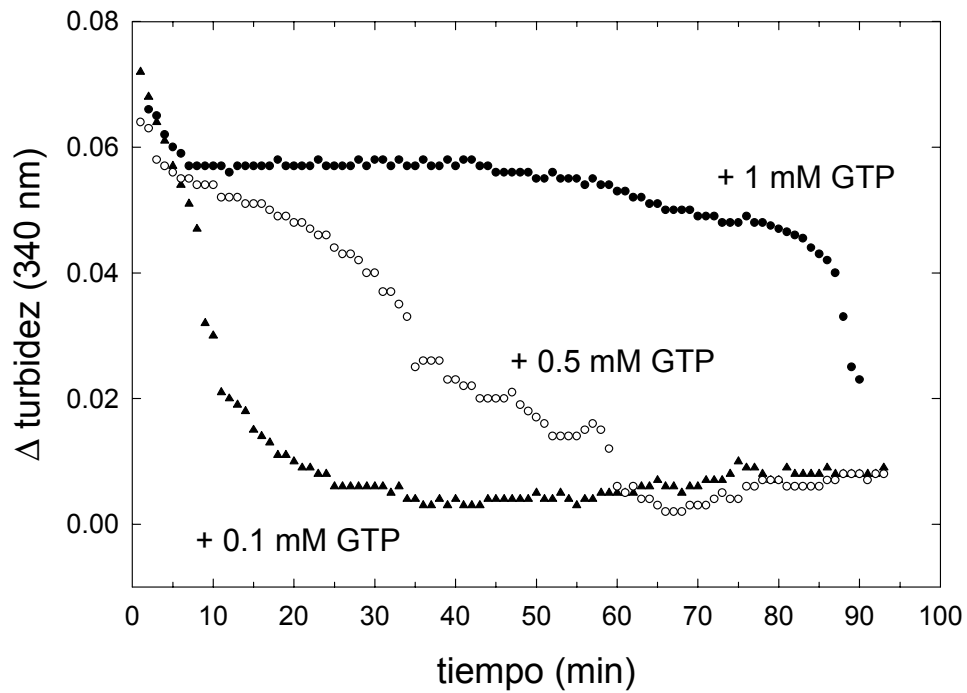


Figura 4.23. Dependencia con la concentración de GTP de la dinámica de los polímeros inducidos por Ficoll. Perfiles de turbidez a 340 nm de los polímeros de FtsZ (0.2 g/l) después de la adición de 1 (círculos negros), 0.5 (círculos blancos) o 0.1 (cuadrados negros) mM GTP en tampón fisiológico sin un sistema de regeneración del GTP en presencia de 200 g/l Ficoll 70 a 25 °C.

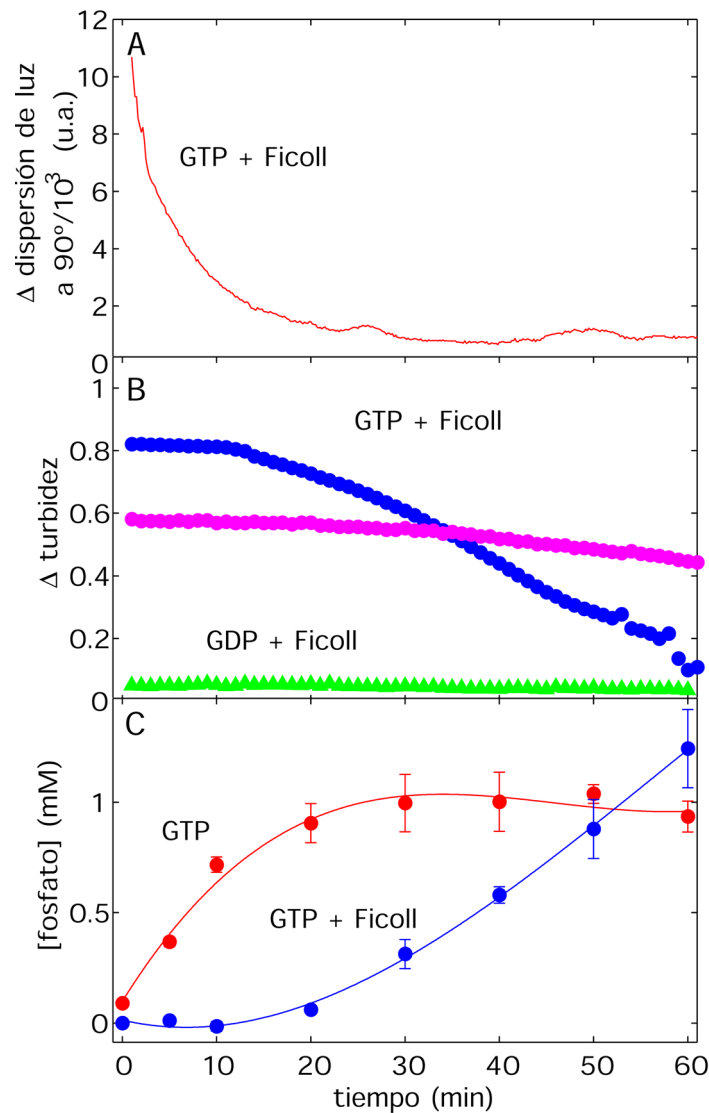


Figura 4.24. Efecto de la aglomeración macromolecular en la dinámica de ensamblaje/desensamblaje de FtsZ. Actividad GTPasa de los polímeros de FtsZ. *A*, la línea roja representa la curva de dispersión de luz a 90° de polímeros de FtsZ (2 g/l) después de la adición de 2 mM GTP en tampón fisiológico a 30°C en ausencia de Ficoll. *B*, perfiles de turbidez a 320 nm de los polímeros de FtsZ en tampón fisiológico con 200 g/l Ficoll 70 después de la adición de 5 mM GTP (círculos azules, 2 g/l FtsZ; círculos violetas, 0.2 g/l FtsZ, señal multiplicada por 10 para una comparación apropiada) o GDP (triángulos verdes, 2 g/l FtsZ). *C*, dependencia con el tiempo del fosfato formado en la hidrólisis del GTP por FtsZ (2 g/l) con 5 mM GTP a 25°C en tampón fisiológico en presencia (círculos azules) o en ausencia (círculos rojos) de 200 g/l de Ficoll 70.

4.6.2 Hidrólisis e intercambio de GTP

La actividad GTPasa de los polímeros inducidos por Ficoll (Figura 4.24C, *círculos azules*, Figura 4.25) o dextrano (Figura 4.25), cuando se compara con la de los filamentos finos (Figura 4.24C, *círculos rojos*), se ve sustancialmente retardada, resultando en una reducción de la actividad hidrolítica. Como era de esperar de la influencia de la aglomeración macromolecular en la dinámica de despolimerización, estos efectos son todavía mayores a concentraciones de proteína más bajas (Figura 4.24B, *círculos violeta*). El intercambio de GTP en los polímeros formados en presencia de Ficoll se midió en un experimento de pulso y caza con nucleótido radiactivo. Los resultados muestran que el intercambio en los polímeros inducidos por Ficoll (14 s) es más lento que en el caso de los filamentos finos (≤ 3 s) (Figura 4.26). Sorprendentemente, el intercambio de GTP ocurre en un periodo durante el cual no se observa una liberación de fosfato (Figura 4.25). Este resultado podría ser compatible con un intercambio de nucleótido por disociación del polímero del GTP no hidrolizado, tal como fue propuesto en (Mingorance *et al.*, 2001).

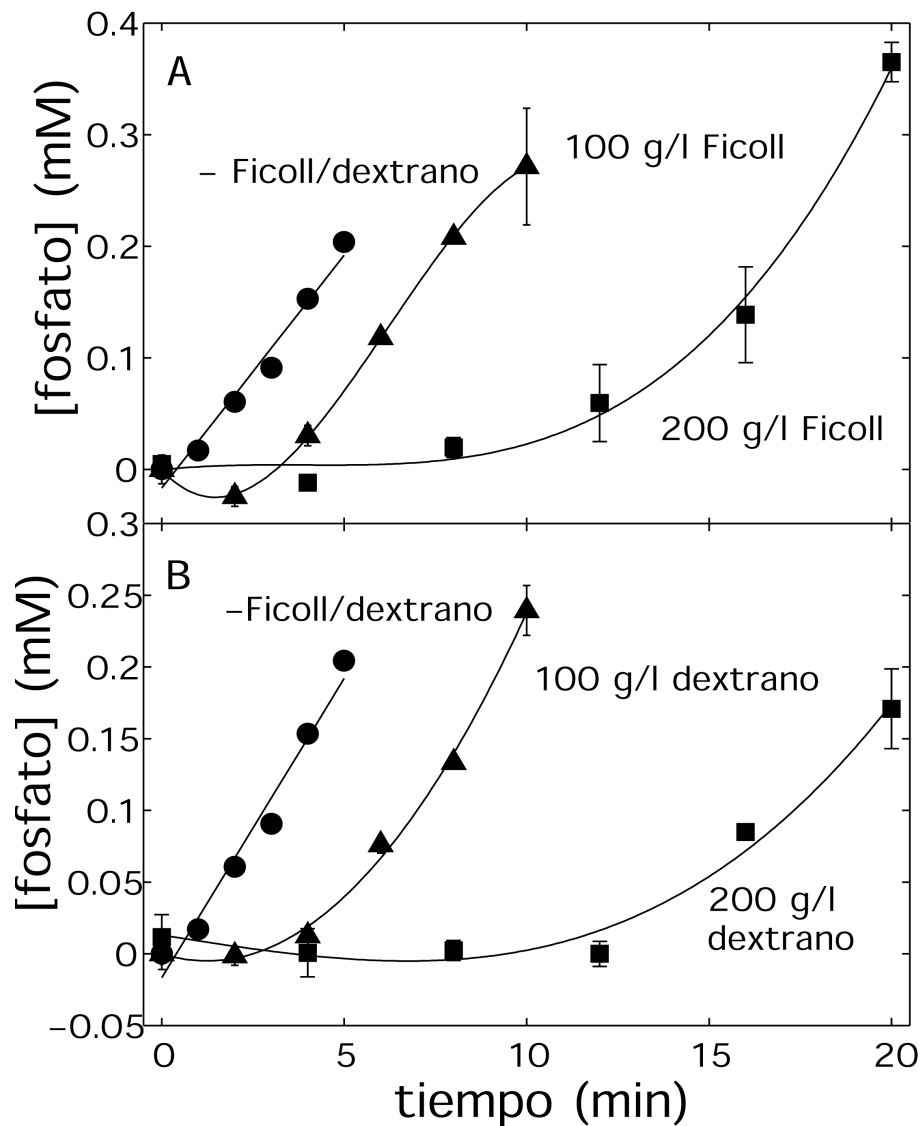


Figura 4.25. Efecto de la concentración de agentes de aglomeración sobre la hidrólisis de GTP. La cantidad de fosfato formado en la hidrólisis enzimática de 1.5 mM GTP por parte de FtsZ 2 g/l en ausencia de Ficoll o dextrano (círculos). A, la hidrólisis tuvo lugar en presencia de 100 g/l (triángulos) o 200 g/l (cuadrados) de Ficoll 70. B, 100 g/l (triángulos) o 200 g/l (cuadrados) de dextrano T70.

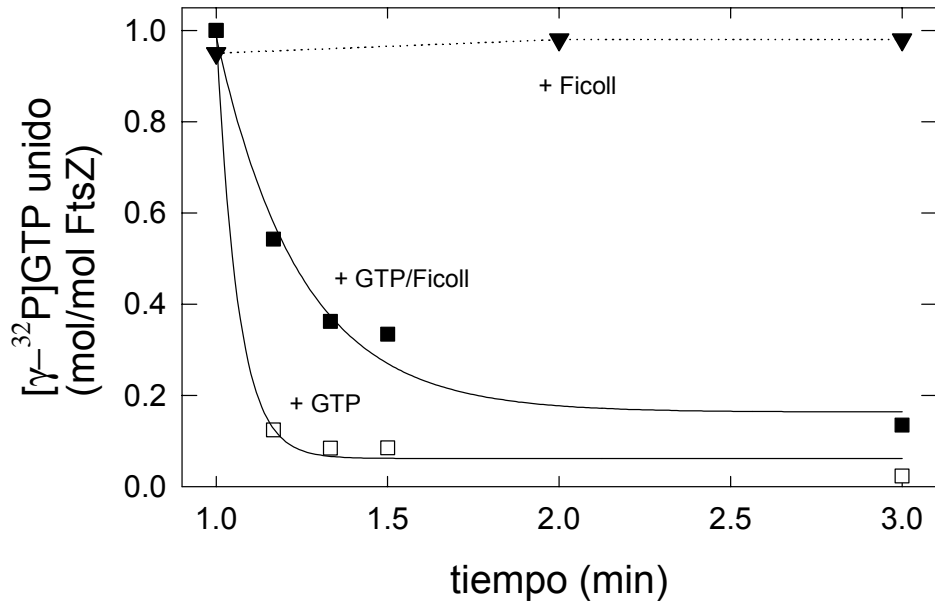


Figura 4.26. **Intercambio de nucleótido de los polímeros de FtsZ.** Se muestran los datos obtenidos en ausencia (*cuadrados blancos*) y en presencia (*cuadrados negros*) de 150 g/l Ficoll. La polimerización de la proteína se llevó a cabo con la adición de 0.1 mM $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-GTP}$ a muestras de FtsZ 0.5 g/l en tampón fisiológico. Después de 1 minuto a 30 °C, se añadió GTP no marcado a las mezclas de reacción (hasta una final 1 mM de GTP total) y la cantidad de nucleótido radiactivo unido a la proteína se midió utilizando un ensayo de unión a filtro de celulosa. Los *triángulos negros* representan el experimento control sin la adición de GTP no marcado en presencia de 150 g/l Ficoll. Las *líneas continuas* son los mejores ajustes a funciones de decaimiento de primer orden.

Discusión

5 DISCUSIÓN

5.1 Sobre la oligomerización y el ensamblaje de FtsZ en tampón fisiológico.

En la primera parte de la Tesis hemos caracterizado los procesos de oligomerización de GDP-FtsZ (forma inactiva de la proteína) y de ensamblaje de GTP-FtsZ (forma activa de la proteína) en disoluciones diluidas de pH neutro que contienen las concentraciones apropiadas de osmolitos mayoritarios del citoplasma bacteriano (tampón fisiológico, ver apartado 3.3 en Materiales y Métodos). Los resultados obtenidos demuestran que, en estas condiciones experimentales, GDP-FtsZ tiene una baja tendencia a oligomerizar. Sin embargo, en presencia de GTP, FtsZ ensambla cooperativamente para formar protofilamentos finos, que son dinámicos y despolimerizan tras la hidrólisis del GTP. Los polímeros son capaces de desensamblar a lo largo de toda su longitud, y a medida que disminuye la densidad de filamentos, éstos tienden a curvarse y formar anillos abiertos y cerrados. Como desarrollaremos a continuación, en esta Memoria hemos determinado por primera vez el tamaño aproximado de los protofilamentos que FtsZ forma en disolución ($1\text{-}2\cdot 10^6$ Da; siendo la masa del monómero $40\cdot 10^3$ Da), información de la que se desprende la posibilidad de que sean protofilamentos relativamente pequeños (agrupados en forma de cintas bidimensionales – ver apartado 5.2) los que formen el anillo Z *in vivo*.

El análisis mediante ultracentrifugación analítica (equilibrio y velocidad de sedimentación) indica que las especies moleculares de GDP-FtsZ predominantes en disolución ($[\text{FtsZ}] < 4$ g/l) son monómeros y dímeros en equilibrio. Estos resultados concuerdan con un trabajo anterior del laboratorio en el que se observó que al aumentar la fuerza iónica del medio de 50 a 500 mM KCl disminuía la masa molecular

promedio y el coeficiente de sedimentación de FtsZ-GDP (Rivas *et al.*, 2000). Aunque la débil dependencia del estado de asociación de FtsZ con la concentración de proteína no permite un análisis cuantitativo completo, los datos podrían ser compatibles con un mecanismo isodésmico de asociación de monómeros, pero con una constante de afinidad mucho más baja ($K \sim 6 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$, línea de puntos en la **Figura 4.2**) que la descrita en un tampón Tris/HCl pH 7.4 con 50 mM KCl (Rivas *et al.*, 2000) ($K \sim 10^6 \text{ M}^{-1}$, línea discontinua en Figura 4.2). En conclusión, la proteína FtsZ unida a GDP posee una débil tendencia a formar oligómeros en disoluciones que simulan las condiciones de osmolaridad intracelulares (tampón fisiológico).

En presencia de GTP (o GMPCPP), FtsZ forma filamentos dinámicos, cuya estabilidad está ligada a la hidrólisis del GTP. Estas propiedades dinámicas del ensamblaje de FtsZ no permiten el uso de muchos métodos bioquímicos y biofísicos para la caracterización cuantitativa del proceso. Para evitar en lo posible dichas dificultades se utilizó un sistema enzimático de regeneración del GTP (ver Materiales y Métodos, sección 3.3). Este procedimiento permitió obtener filamentos estables durante un tiempo de al menos 1-2 horas (ver sección 4.2.1). El uso de este sistema de regeneración del GTP es más representativo de la situación *in vivo*, donde los polímeros de FtsZ están sujetos a una proporción constante, relativamente alta, de GTP/GDP (Small y Addinall, 2003).

En estas condiciones experimentales se observó que la formación de los filamentos de FtsZ en presencia de GTP (o GMPCPP) en función de la concentración de proteína puede describirse aproximadamente como una transición de primer orden (transición todo-nada desde especies solubles hasta polímeros a partir de un determinado valor de concentración de proteína; (Hall y Minton, 2002)), característica de un proceso cooperativo, con una concentración crítica aparente (C_{fil}) de 0.05 g/l (1.25

μM). Estos filamentos dispersan luz pero no provocan un aumento significativo de la turbidez en la solución. El valor de concentración crítica aparente encontrado está de acuerdo con los valores descritos en la literatura determinados mediante ensayos de centrifugación ($2.5 \mu\text{M}$; (Mukherjee y Lutkenhaus, 1998)) y dispersión de luz a 90° ($1.5 \mu\text{M}$; (Mukherjee y Lutkenhaus, 1999)). Este y otros grupos (Huecas y Andreu, 2003; White *et al.*, 2000), como nosotros, han postulado que el mecanismo de ensamblaje de FtsZ es cooperativo. Por el contrario, (Romberg *et al.*, 2001) describieron el ensamblaje de FtsZ como aparentemente isodésmico, tras la observación de polímeros de una sola cadena que, a diferencia de lo descrito por otros grupos (incluidos los resultados presentados en esta Memoria), no presentaban una concentración crítica de ensamblaje en ensayos de centrifugación (Romberg *et al.*, 2001). Más recientemente, el mismo laboratorio, ha descrito el ensamblaje de FtsZ como aparentemente cooperativo (Caplan y Erickson, 2003).

La morfología de los filamentos que FtsZ forma en disolución diluida a pH neutro se caracterizó mediante microscopía electrónica y microscópica de fuerzas atómicas. Los polímeros que se visualizan al microscopio electrónico tras tinción negativa consisten predominantemente en filamentos de longitud y curvatura variable con un ancho de 5-6 nm. Al aumentar la concentración de proteína o en presencia de GMPCPP se observan también filamentos de 6-8 nm de ancho, que podrían ser asociaciones laterales del filamento más fino. La formación de polímeros más anchos está favorecida cuando el ensamblaje se realiza a pH ácido, entre 6.0 y 6.5 (Mukherjee y Lutkenhaus, 1999; Oliva *et al.*, 2003; Rivas *et al.*, 2000). Los polímeros observados mediante microscopía de fuerzas atómicas a pH neutro se corresponden esencialmente con filamentos finos (de alrededor de 4 nm de ancho) con una clara tendencia a curvarse (ver Figura 4.7). Estos resultados apuntan, en principio, a que

una parte de los protofilamentos observados mediante ambas microscopías (en las condiciones de disolución empleadas en esta Tesis) son más compatibles con filamentos de una sola cadena que dobles. Esta posibilidad contrasta con el hecho de que el ensamblaje de FtsZ se produzca mediante un mecanismo cooperativo (ver más arriba en esta Discusión).

¿Es posible explicar cuantitativamente que un polímero de cadena sencilla ensamble de manera cooperativa? Como ya comentamos en esta Memoria (ver 3.7.1) el ensamblaje cooperativo es típico de sistemas en los que se forman polímeros de varias cadenas (ej., tubulina y actina), mientras que la formación de polímeros de una sola cadena sigue un mecanismo no cooperativo (Romberg *et al.*, 2001). De las consideraciones expuestas en 3.7.1 se sigue que el requerimiento termodinámico (condiciones de equilibrio) para el ensamblaje cooperativo es que la constante de asociación aumente cuando se incrementa el tamaño del polímero. Este aumento puede darse en una o varias etapas (Andreu y Timasheff, 1986; Hall y Minton, 2002). En principio, es difícil ver cómo este incremento de la afinidad del equilibrio de asociación puede tener lugar en una polimerización estrictamente lineal de subunidades idénticas. Sin embargo, los protofilamentos de FtsZ observados en este trabajo tienen tendencia a curvarse y, sobre todo, no pueden considerarse polímeros en el equilibrio en sentido estricto. En el proceso de ensamblaje de FtsZ existe siempre una etapa irreversible (procesos de no-equilibrio), que es la hidrólisis de GTP. El hecho de haber utilizado un sistema enzimático de regeneración del GTP hace que la concentración de GTP durante el proceso se mantenga esencialmente constante, por lo que en realidad observamos es el producto de ensamblaje de un proceso de equilibrio en estado estacionario (Engel, 1983). Por consiguiente, la concentración crítica de FtsZ para formar los filamentos no está de hecho determinada por una constante de equilibrio verdadera

sino por una constante de equilibrio en estado estacionario. El ensamblaje de filamentos de actina y de microtúbulos también está ligado a una etapa de hidrólisis de nucleótido (Engel, 1983). Estas etapas irreversibles son las responsables de algunas de las peculiares características de los procesos de ensamblaje de estos polímeros. Así, por ejemplo, el mecanismo de polimerización cabeza-cola (*treadmilling*) propuesto por (Wegner, 1976) para explicar el ensamblaje de los filamentos de actina incluye una etapa irreversible de hidrólisis de nucleótido. En el caso del ensamblaje de FtsZ, los ciclos de hidrólisis de GTP y posibles cambios conformacionales en las subunidades de FtsZ asociados a dicha hidrólisis, podrían introducir complejidades no formuladas explícitamente hasta ahora en el mecanismo de polimerización cooperativo (Romberg y Levin, 2003; Romberg *et al.*, 2001). Sin embargo, hasta la fecha no existe ningún modelo plausible que concilie las observaciones morfológicas de filamentos de FtsZ de cadena sencilla con la formación cooperativa del protofilamento de FtsZ en disolución, por lo que la cuestión queda abierta. ¿Sería factible la posibilidad de que existieran distintos modos de ensamblaje de FtsZ en disolución y que las interacciones entre FtsZ y los materiales empleados en los análisis microscópicos desplazaran el balance entre estos modos de asociación hacia la forma de cadena sencilla, impidiendo la observación de formas multicadena?

Por último, el análisis mediante velocidad de sedimentación (combinado con modelado hidrodinámico y dispersión de luz dinámica) de los filamentos de FtsZ ha permitido obtener, por primera vez, información acerca de la distribución de tamaños de estos polímeros en disolución. Los datos de masa molecular son bastante concordantes, y se mueven en el intervalo de tamaños entre $1-2 \cdot 10^6$ Da. Estos valores serían compatibles con filamentos de FtsZ de doble cadena de 20-40 subunidades, que se correspondería con una distribución de longitudes del polímero entre 40 y 80 nm. En

el caso de considerar que los filamentos fueran de cadena sencilla, habría que asumir un grado de curvatura en los mismos. La distribución de tamaños (y longitudes) determinada en esta Memoria para los protofilamentos de FtsZ en disolución es menor que la, en principio, esperada a partir de las imágenes obtenidas mediante microscopía de fuerzas atómicas y, en muchas de las preparaciones analizadas mediante microscopía electrónica tras tinción negativa. Estas discrepancias pueden estar relacionadas con el hecho de que interacciones de determinados sustratos de las preparaciones microscópicas con FtsZ puedan facilitar procesos de asociación entre moléculas de FtsZ adsorbidas a superficies, en un fenómeno relacionado con el confinamiento molecular (Minton, 1995). Otra posible causa de dichas diferencias en tamaño pueden deberse a fenómenos de fragmentación y sellado de los filamentos formados en condiciones de estado estacionario que dieran lugar a las distribuciones de tamaño de los polímeros de FtsZ en disolución, como ocurre en el caso de los filamentos de actina (Sept *et al.*, 1999). Sin embargo, nuestros datos concuerdan razonablemente bien con las estimaciones de longitud de los polímeros de FtsZ (longitud del filamento promedio 92 nm, lo que se corresponde con 23 subunidades de FtsZ) obtenidas por el grupo de Erickson mediante microscopía electrónica de transmisión, STEM (Romberg *et al.*, 2001). El hecho de que FtsZ forme filamentos en disolución relativamente cortos puede ser tener relevancia biológica, ya que podría implicar que la estructura del anillo Z activa en división esté formada por protofilamentos cortos de FtsZ que, en un medio aglomerado, ensamblan de manera espontánea para formar cintas o redes de filamentos.

5.2 Sobre la influencia de la aglomeración macromolecular en la organización estructural y dinámica de los polímeros de FtsZ.

El estudio que constituye la parte central de esta Memoria de Tesis ha proporcionado la primera evidencia experimental de que altas concentraciones de macromoléculas inertes, que simulan el aglomerado ambiente intracelular bacteriano, tienen una considerable influencia sobre la organización estructural y dinámica de los polímeros de FtsZ formados *in vitro*.

En esta Tesis hemos encontrado que la aglomeración macromolecular favorece el ensamblaje de FtsZ para formar cintas bidimensionales dinámicas. En este estudio se ha demostrado que en presencia de altas concentraciones (100-200 g/l) de macromoléculas inertes la anchura de los polímeros de FtsZ formados aumenta significativamente. Estos polímeros contribuyen significativamente a un aumento de la turbidez en la solución, lo que contrasta con la ausencia de turbidez de los filamentos de FtsZ formados en disoluciones diluidas previamente descritos.

La estructura de los polímeros de FtsZ formados en presencia de GMPCPP y de altas concentraciones de Ficoll fue estudiada por microscopía de fuerzas atómicas, concluyendo que los polímeros estaban compuestos de 8-25 protofilamentos dispuestos en dos dimensiones formando una única capa de protofilamentos. Sin embargo, cuando estos mismos polímeros se incluyeron en una resina para su posterior corte en secciones finas, al ser visualizados al microscopio electrónico presentaban una sección aproximadamente circular correspondiente a una red de filamentos dispuestos en tres dimensiones. Estas discrepancias han podido ser originadas por las enormes diferencias que existen en el tratamiento de las muestras. En el caso de la microscopía de

fuerzas atómicas, FtsZ polimeriza en una gota de solución y posteriormente se adhiere a la mica (ver sección 3.8.2 de Materiales y Métodos). Los filamentos adheridos se visualizan directamente, sin tratamientos adicionales. Sin embargo, para obtener imágenes de las secciones finas de polímeros, FtsZ debe seguir un tratamiento agresivo, en el que el tampón fisiológico en el cual ensamblan los polímeros es sustituido varias veces por otros medios (ver Materiales y Métodos, sección 3.8.1.1), entre los que se incluye una deshidratación en alcohol absoluto. También es necesario el uso de un agente fijador, glutaraldehído, que une covalentemente los subunidades de proteína entre sí. En microscopía de fuerzas atómicas, la fuerza que se ha ejercido sobre los polímeros en las exploraciones es del orden de piconewtons (pN). Fuerzas de este orden se han utilizado en estudios de alta resolución de proteínas sin provocar deformaciones en la muestra. Las imágenes fueron tomadas en modo dinámico, menos perturbador que el modo contacto, ya que el movimiento lateral de la punta se realiza mientras la punta se encuentra alejada de la superficie. Se obtuvieron varias imágenes sucesivas en la misma región de la superficie, y no se obtuvieron cambios significativos, señal de que la fuerza de la punta no estaba alterando la estructura de los polímeros observados. Las imágenes fueron independientes del sentido de barrido de la punta y del área explorada (la exploración de áreas pequeñas supone un mayor contacto de la punta con los polímeros). Por último, el valor encontrado para la altura de la monocapa de proteína fue de 4 nm, muy próximo al valor del diámetro de FtsZ determinado con técnicas independientes como la cristalografía de rayos X (Löwe y Amos, 1998), indicativo de que la fuerza de la punta no provoca deformaciones en las moléculas de FtsZ. En resumen, de lo anteriormente expuesto se puede concluir que la estructura que mejor representa a los polímeros formados en un tampón fisiológico

en presencia de altas concentraciones de Ficoll es la obtenida mediante microscopía de fuerzas atómicas (cintas bidimensionales de FtsZ).

En esta Tesis se ha determinado mediante distintos ensayos independientes que la concentración crítica aparente de formación de las cintas bidimensionales de protofilamentos de FtsZ (C_{red}) en presencia de altas concentraciones de agentes de aglomeración macromolecular (100-200 g/l) es, dentro del error experimental, la misma que la correspondiente concentración crítica obtenida en medios diluidos para la formación de filamentos (C_{red}). Estas observaciones indican que la aglomeración macromolecular está promoviendo principalmente el alineamiento de filamentos de FtsZ en polímeros bidimensionales (cintas) (reacción 3 de la Figura 5.1), en lugar de potenciar el ensamblaje de FtsZ en filamentos de una cadena (reacción 2 de la Figura 5.1), o al menos la influencia de la aglomeración macromolecular sobre esta segunda reacción es mucho menos pronunciada. Los resultados que muestran que las mismas concentraciones de Ficoll o dextrano no inducen la formación de redes de polímeros de FtsZ al añadir GTP en condiciones en las que no está favorecida el ensamblaje de FtsZ en filamentos (i.e, ausencia de K^+ , ver la Figura 4.16) favorecen esta interpretación. La aglomeración macromolecular tampoco induce la aparición de redes de polímeros de FtsZ-GDP en tampón Tris/HCl, 50 mM KCl, tampón en el cual FtsZ-GDP tiene un grado de oligomerización mayor que en tampón fisiológico ((Rivas *et al.*, 2001), Figura 4.2).

La formación de las cintas mediante alineamiento de protofilamentos preformados en lugar de a partir de subunidades de FtsZ explicaría la dependencia con la concentración de Ficoll de la abundancia relativa de la fracción de cintas de polímeros de FtsZ. Este comportamiento es típico de un sistema donde los filamentos existen como filamentos aislados por debajo de un determinado grado de exclusión de

volumen, y cuando éste aumenta, los filamentos se alinean para formar estructuras de orden superior. Por tanto, el alineamiento de los filamentos para formar estructuras ordenadas de polímeros (cintas) está gobernado por efectos de exclusión de volumen en soluciones altamente aglomeradas (ver sección 1.2.3 de la Introducción) (Herzfeld, 1996). El hecho de que los filamentos de FtsZ se alineen formando cintas debe radicarse en la propia estructura de FtsZ. Los lados de los filamentos no deben ser equivalentes y por tanto, hay unos lados que son los que interaccionan con otros filamentos, de manera que los filamentos ensamblan en cintas siempre en la misma orientación, quedando siempre los mismos lados expuestos a la disolución. Si FtsZ no tuviera esta capacidad intrínseca para formar cintas, la aglomeración macromolecular induciría el alineamiento de los filamentos en todas las direcciones, no sólo en dos de ellas.

Las cintas de FtsZ formadas en condiciones de alta aglomeración macromolecular son más estables que los filamentos formados en medios diluidos (por lo que tardan más tiempo en despolimerizar), presentan una cinética de hidrólisis retardada y el intercambio de GTP es a su vez más lento. Nuestros resultados apoyan la idea de que el intercambio de nucleótido se produce en el polímero, tal como se había propuesto previamente (Mingorance *et al.*, 2001), dado que la dinámica de desensamblaje está ligada a la hidrólisis de GTP, y el intercambio de GTP se produce en la fase en que no hay hidrólisis de GTP, y por tanto, los polímeros no han comenzado a desensamblar.

5.3 Implicaciones biológicas

Pensamos que, en el citoplasma celular, las cintas de polímeros de FtsZ encontradas en este trabajo son más fisiológicamente relevantes que los polímeros de FtsZ observados en disoluciones diluidas, como las empleadas en ensayos previos *in vitro*.

Nuestros resultados indican que, por encima de una concentración crítica de Ficoll o dextrano, la formación de cintas de FtsZ se ve favorecida en el proceso de ensamblaje de FtsZ y que los filamentos no son las especies predominantes. Aunque la estructura de FtsZ en anillo ha sido visualizada en la célula bien por inmunofluorescencia o por fluorescencia de fusiones GFP-FtsZ, los intentos de analizar dicha estructura en secciones finas por microscopía electrónica no han funcionado (J. Mingerance y M. Vicente, resultados no publicados). Sin embargo, un polímero de dos dimensiones, con la altura de una subunidad de FtsZ, como las estructuras observadas en la Figura 4.17, sería muy difícil de discriminar en secciones transversales bajo el microscopio electrónico cuando estuviera anclado a la membrana.

El alineamiento de los filamentos de FtsZ en cintas en dos dimensiones tiene ciertas consecuencias importantes. Si todas las subunidades de FtsZ en las *cintas* estuvieran en la misma orientación, todas podrían establecer interacciones idénticas, y por lo tanto, podrían participar todas simultáneamente en la constricción. Además, todas podrían tener la misma superficie expuesta al medio y por ello serían capaces de establecer los mismos contactos con la membrana y con los dominios citoplasmáticos de proteínas de membrana que participan en la división celular. Finalmente, todas las subunidades de las *cintas* podrían estar accesibles de la misma manera a factores de regulación. Esto significa que la dinámica y la estabilidad del anillo podrían estar controlada en muchos puntos (tantos como subunidades de FtsZ). En un polímero en tres dimensiones, por el contrario, la accesibilidad de las subunidades en el interior se vería muy restringida, siendo las subunidades en el exterior las únicas capaces de entrar en contacto con la superficie de la membrana.

Una cuestión crucial para poder evaluar la relevancia biológica de estos resultados es si hay suficiente FtsZ en la bacteria que rodee todo el perímetro interno de la

membrana citoplasmática y que ensamble en cintas que se incorporen al anillo Z. El promedio de moléculas de FtsZ por célula de *E. coli* varía en la literatura entre 4000 (Rueda *et al.*, 2003) y 15000 (Lu *et al.*, 1998) en diferentes cepas. Dado que la concentración intracelular de FtsZ no cambia durante el ciclo celular de *E. coli* (Rueda *et al.*, 2003) el número más bajo de moléculas en células en división es de 6000 aproximadamente. Como FtsZ polimeriza de modo cooperativo (Figura 4.15), la población de FtsZ en la célula estaría distribuida en dos clases, una forma soluble y otra polimérica. Del valor de C_{fil} (la concentración crítica para el ensamblaje de FtsZ en filamentos) medido en esta Tesis (1.25 μM) y el valor más bajo descrito para la concentración intracelular de FtsZ (3.5 μM (Rueda *et al.*, 2003)) podemos calcular que aproximadamente una tercera parte de la proteína FtsZ dentro de la célula debería estar en forma soluble, mientras que las dos terceras partes restantes podrían formar parte de las formas poliméricas. Considerando una distancia axial entre monómeros de 4.3 nm (Erickson *et al.*, 1996), y un perímetro de $\sim 3 \mu\text{m}$, si asumimos un promedio de 4000 monómeros de FtsZ en forma polimérica (dos terceras partes del total de FtsZ en células en división), esto sería suficiente para rodear la célula seis veces en un anillo continuo, lo que sería compatible con la estructura en cintas incluso considerando el conjunto de suposiciones más desfavorables. Utilizando una fusión GFP-FtsZ y microscopía de fluorescencia, Stricker *et al.* (Stricker *et al.*, 2002) calcularon que solo el 30 % de GFP-FtsZ se encuentra en el anillo. Esto sería incompatible con una cinta continua de más de dos monómeros de ancho rodeando a la bacteria. Sin embargo, no hay una evidencia de que el comportamiento de GFP-FtsZ y FtsZ nativa sea idéntico.

Nuestros estudios sugieren que, en el aglomerado citoplasma bacteriano, los dos estados principales en los que FtsZ se encontraría serían FtsZ soluble y FtsZ en

polímeros tipo cinta (ver Figura 5.1). Dentro de *E. coli*, FtsZ en su estado de unión a GDP, de estar presente, tendría una baja tendencia a asociar en oligómeros de mayor orden y mucha menor tendencia a formar polímeros. Sin embargo, ya que la relación GTP/GDP es alta en condiciones fisiológicas (Neurard y Nygaard, 1987), es más probable encontrar FtsZ como FtsZ-GTP, y principalmente como polímeros. Esto a su vez dispararía el ensamblaje en cintas bajo condiciones de aglomeración macromolecular. Paradójicamente no se observan anillos de FtsZ en las primeras etapas del ciclo celular (Rueda *et al.*, 2003), de lo que se deduce que antes de la formación del anillo de FtsZ las especies tienen que permanecer solubles en el citoplasma. La formación de las cintas *in vitro* puede ser inhibida en cualquiera de estas etapas; por ejemplo, la *reacción 2* en la Figura 5.1 no se produce en ausencia de iones potasio o de iones magnesio (ver Figura 4.16). Se han propuesto varios mecanismos que previenen de la formación de filamentos de FtsZ *in vivo*, entre ellos un mecanismo que evitaría el ensamblaje en las etapas previas del ciclo celular de *Bacillus subtilis* es la proteína que secuestra FtsZ, EzrA (Margolin, 2003), que une preferentemente protómeros de FtsZ. EzrA podría jugar un papel similar al de los inhibidores del ensamblaje descritos para tubulina (*i.e.* stadmira (Andersen, 2000)) y para actina (*i.e.* ADF/cofilina (Pollard, 1999)) en células eucariotas. En *E. coli* hay dos mecanismos específicos que determinan la localización espacial de los anillos de FtsZ y que puede funcionar previniendo el ensamblaje espontáneo de FtsZ en cintas: oclusión del nucleoide y el sistema *min* (ver revisiones (Lutkenhaus, 2002; Margolin, 2001)). Ambas conllevan regulación negativa y pueden funcionar inhibiendo localmente la polimerización de FtsZ y el ensamblaje de FtsZ en cintas.

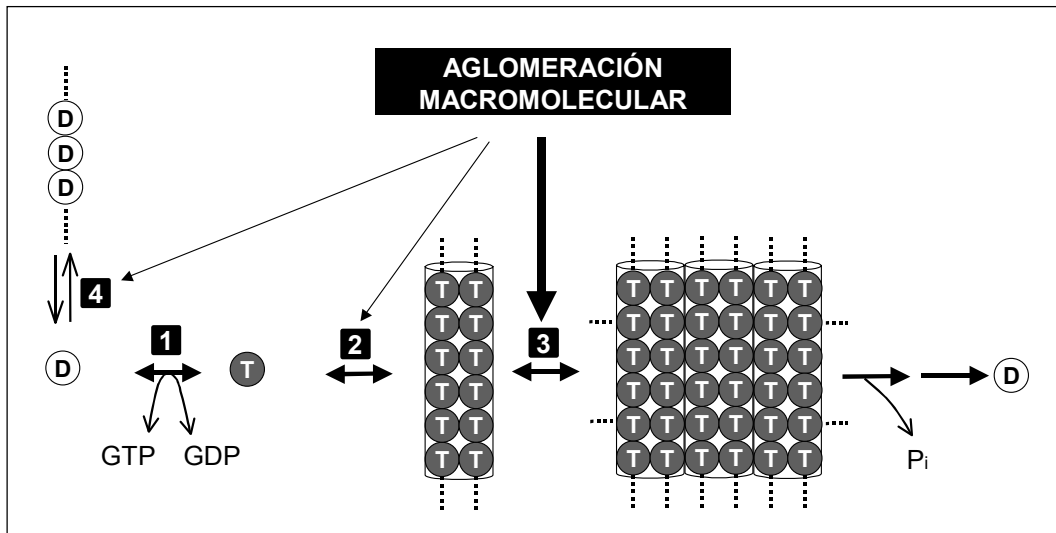


Figura 5.1. Modelo para el ensamblaje de FtsZ bajo condiciones que simulan el **aglomerado interior bacteriano**. Este esquema resume las reacciones de ensamblaje de FtsZ en presencia de GTP, en ausencia y presencia de agentes de aglomeración macromolecular caracterizadas en esta Memoria; el intercambio de nucleótido en FtsZ soluble (reacción 1), la formación cooperativa de filamentos de FtsZ (reacción 2), y el ensamblaje en cintas (reacción 3). La reacción 4 muestra la oligomerización dependiente de Mg^{2+} en condiciones de baja fuerza iónica, previamente estudiada (Rivas *et al.*, 2000). La aglomeración macromolecular juega un papel más importante en el potenciamiento de la reacción de ensamblaje en la que el volumen ocupado por la especie final de FtsZ es menor (reacción 3), y por tanto, el volumen accesible es mayor. *In vivo*, el anillo Z puede ensamblar a partir de cintas de FtsZ sin requerir interacciones adicionales.

5.4 Consideraciones futuras

De acuerdo con lo descrito en esta Memoria, pensamos que los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral son importantes para entender el comportamiento de FtsZ *in vitro* (nivel estructural, bioquímico y biofísico), son relevantes para una mejor comprensión de eventos centrales de la división celular en bacterias (nivel biológico) y, por último, son de interés práctico para la optimización de métodos de búsqueda de inhibidores del ensamblaje de FtsZ con potencial actividad antibiótica (nivel biotecnológico). Consideramos que esta es una aproximación novedosa en el estudio de la división celular bacteriana.

El trabajo presentado en esta Memoria deja abiertas una serie de cuestiones en los niveles más arriba mencionados, que enumeramos a continuación:

5.4.1 Aspectos estructurales, bioquímicos y biofísicos

Este trabajo de Tesis Doctoral hemos demostrado que FtsZ ensambla de manera cooperativa para formar protofilamentos finos en medios diluidos que contienen las apropiadas concentraciones de osmolitos fisiológicos. Sin embargo, es evidente que nuestro trabajo se ha centrado en aspectos termodinámicos de este proceso, en condiciones de equilibrio o de estado estacionario. ¿Cuál es el mecanismo cinético de formación de dichos protofilamentos en disolución? La resolución a esta pregunta requerirá un abordaje mediante métodos de cinética rápida. Otras cuestiones abiertas son las siguientes: ¿Es el protofilamento básico una estructura de cadena simple o doble?; en el primero de los casos, ¿es posible formular cuantitativamente un modelo cooperativo para el ensamblaje de polímeros de una sola cadena? ¿Qué implicaciones tiene la curvatura de los polímeros de FtsZ observada mediante microscopía de fuerzas atómicas (Figura 4.7). Por último, pensamos que sería importante obtener informa-

ción adicional, mediante métodos complementarios independientes (ej., dispersión de luz láser multiángulo, anisotropía de fluorescencia resuelta en el tiempo), que confirme (o no) que los filamentos de FtsZ en disolución son relativamente pequeños.

En cuanto a los estudios sobre la organización estructural y dinámica de los polímeros de FtsZ en medios aglomerados, el trabajo de esta Memoria deja abiertas una serie de preguntas: ¿Cuál es la organización estructural de las cintas que FtsZ forma en medios aglomerados? (¿Cómo se disponen los filamentos dentro de las cintas?) ¿Cómo es el ciclo de hidrólisis/ensamblaje-desensamblaje de FtsZ en condiciones que favorecen la formación de estructuras tipo las cintas descritas en esta Memoria? ¿Son los protofilamentos finos estructuras transitorias o estables en medios aglomerados? ¿La transición de fase asociada al proceso espontáneo de formación de cintas en medios aglomerados se puede explicar simplemente como un fenómeno de exclusión de volumen? ¿Cómo afectan a dicha transición posibles efectos de carga inducidos por polielectrolitos cargados que son componentes mayoritarios del citoplasma bacteriano, como el nucleoide (Tang *et al.*, 1997)? ¿Podrían estos procesos de transición de fase conducir a la formación de microcompartimentos en el citoplasma bacteriano (Walter y Brooks, 1995)? ¿Cómo simular de manera más realista el aglomerado interior bacteriano (adición de ribosomas, nucleoides, proteínas solubles mayoritarias del citoplasma, etc.)?

5.4.2 Aspectos biológicos

En esta Memoria hemos descrito que las cintas de FtsZ tienden a formarse espontáneamente en medios aglomerados en los que existan condiciones que promuevan el ensamblaje de FtsZ. Nuestra propuesta es que estas cintas son unos excelentes candidatos a formar parte del anillo Z de división. Sin embargo, estos resultados conducen

a que debemos postular que en células en reposo (no-división) deben existir mecanismos regulatorios que prevengan el ensamblaje de FtsZ, y por consiguiente eviten el que se localice un septo a destiempo durante el ciclo de división. Algunas cuestiones sin resolver relacionadas son, por ejemplo: ¿Cuál es y cómo se controla el estado en reposo (no-división) de FtsZ? ¿Qué dispara el ensamblaje de FtsZ *in vivo*? ¿El proceso de transición de fase de FtsZ observado *in vitro* en medios aglomerados ocurre también *in vivo* o no? ¿Qué papel juegan en el control de FtsZ estructuras de membrana? (¿Qué factores controlan la unión de FtsZ a la membrana citoplásmica y qué factores controlan la disociación de FtsZ de la membrana?)

5.4.3 Aspectos biotecnológicos

En las condiciones experimentales que simulan el ambiente intracelular bacteriano de manera más realista que las condiciones que se han usado de manera cotidiana en los estudios *in vitro* es donde es más apropiado preguntarnos que otras sustancias facilitan o inhiben el ensamblaje/desensamblaje de FtsZ mediante los ensayos sencillos y fácilmente adaptables a la modalidad de alto rendimiento que se han descrito en esta Memoria. Estos incluirían la turbidez y en medios más complejos, métodos de fluorescencia (espectroscopia o microscopía) empleando FtsZ marcada. Una aproximación similar se ha desarrollado con éxito para la identificación de inhibidores endógenos del ensamblaje de los microtúbulos (Belmont y Mitchison, 1996).

Conclusiones

6 CONCLUSIONES

Oligomerización y ensamblaje de *E. coli* FtsZ en medios fisiológicos diluidos

1. FtsZ, en presencia de GDP, tiene baja tendencia a oligomerizar en disoluciones que simulan las condiciones de osmolaridad intracelulares (tampón fisiológico). El análisis mediante ultracentrifugación analítica (equilibrio y velocidad de sedimentación) indica que las especies moleculares de GDP-FtsZ predominantes en disolución son mezclas de monómeros y dímeros en el equilibrio.
2. En presencia de GTP, FtsZ ensambla para dar lugar a polímeros dinámicos, cuya estabilidad está ligada a la hidrólisis del GTP. En presencia de un sistema enzimático optimizado de regeneración del GTP (acetato quinasa + acetilfosfato) los polímeros son estables durante horas, lo que permite la caracterización bioquímica y biofísica de los mismos.
3. La dependencia con la concentración de proteína del grado de ensamblaje de FtsZ en el tampón fisiológico puede describirse como una transición de primer orden, característica de un proceso cooperativo, con una concentración crítica aparente (C_{fil}) de 0.05 g/l (1.25 μ M) a 30 °C.

4. De acuerdo con las imágenes de microscopía electrónica tras tinción negativa y microscopía de fuerzas atómicas (AFM), los polímeros de FtsZ en el tampón fisiológico son en su mayoría filamentos finos (predominan los de 4-5 nm de ancho) de longitud y curvatura variable, cuyas dimensiones son compatibles con filamentos de FtsZ de cadena sencilla o doble.

5. El análisis del ensamblaje de FtsZ mediante velocidad de sedimentación (combinado con modelado hidrodinámico y dispersión de luz dinámica) ha permitido determinar, por primera vez, la distribución de tamaños de los filamentos de FtsZ en disolución. La masa molecular obtenida es de $\sim 1-2 \times 10^6$ Da, compatible con filamentos de FtsZ de doble cadena de 20-40 subunidades (que se corresponderían con una distribución de longitudes de los filamentos entre 40 y 80 nm). Filamentos curvos de cadena sencilla serían también compatibles con los resultados experimentales obtenidos.

6. El hecho de que FtsZ ensamble en disoluciones fisiológicas diluidas para formar filamentos de masa molecular relativamente pequeña sugiere la posibilidad de que la estructura del anillo Z activa en división esté formada por protofilamentos de FtsZ de tamaño discreto que, en un medio aglomerado (ver conclusiones siguientes), ensamblan de manera espontánea para formar cintas o redes de filamentos.

Ensamblaje de *E. coli* FtsZ en medios aglomerados

7. Altas concentraciones de macromoléculas inertes (100-200 g/l), que simulan el aglomerado ambiente intracelular, favorecen el ensamblaje GTP-dependiente de FtsZ para formar cintas bidimensionales dinámicas de entre 8 y 25 protofilamentos, de acuerdo con las imágenes de microscopía electrónica y AFM. Sin embargo, la aglomeración macromolecular no promueve el ensamblaje de FtsZ en su forma unida a GDP.

8. A diferencia de los filamentos finos de FtsZ en tampón fisiológico diluido, el tamaño de las cintas que FtsZ forma en medios aglomerados permite su visualización mediante microscopía de fluorescencia (empleando como trazador FtsZ marcada con un fluoróforo). Este fácil ensayo es de interés biotecnológico en la búsqueda de inhibidores del ensamblaje de FtsZ (con potencial actividad antimicrobiana) en condiciones más próximas a las fisiológicas.

9. La concentración crítica para la formación de las cintas de FtsZ (C_{red}) en medios aglomerados es, dentro del error experimental, la misma que la correspondiente concentración crítica para la formación de filamentos en medios diluidos (C_{fil}). Esta correlación indica que la aglomeración macromolecular está principalmente promoviendo el alineamiento de protofilamentos de FtsZ para formar las cintas.

10. La dependencia del ensamblaje de FtsZ en cintas con la concentración de macromolécula inerte (una medida de la fracción de volumen excluido) puede describirse como un proceso de transición de fase, con una concentración crítica aparente por debajo de la cual no se forman las cintas de FtsZ y por encima de la que esencialmente toda la proteína FtsZ está formando parte de las cintas. Este resultado, que está de acuerdo con las predicciones de la teoría de volumen excluido, reforzaría la idea de que las cintas de FtsZ se producen espontáneamente en medios aglomerados a partir de protofilamentos preformados.

11. Las cintas de FtsZ formadas en medios aglomerados son más estables (tardan más tiempo en despolimerizar) que los filamentos finos obtenidos en disoluciones diluidas, presentan una cinética de hidrólisis del GTP retardada y el intercambio de GTP es más lento. Nuestros resultados apoyan la idea, previamente propuesta por Mingorance *et al.*, de que el intercambio de nucleótido se produce en el polímero.

12. Si consideramos la concentración intracelular de FtsZ y la concentración crítica de ensamblaje determinada en esta Memoria se puede estimar que habría suficientes moléculas de FtsZ en el momento de la división para rodear el perímetro de la bacteria al menos seis veces en un anillo continuo, lo que sería compatible con la estructura de cintas descrita en este trabajo. Por ello, pensamos que, en el citoplasma celular, las cintas de polímeros de FtsZ son fisiológicamente más relevantes que los polímeros de FtsZ observados en disoluciones diluidas.

13. Dado que las cintas de FtsZ tienden a ensamblarse de manera espontánea en medios aglomerados (en presencia de GTP), proponemos que estas estructuras forman el anillo Z en el sitio de división.

14. Postulamos que, en células en reposo (no-división), deben existir mecanismos de regulación que eviten el ensamblaje de las cintas de FtsZ (y del anillo Z), lo que impediría la formación de un septo a destiempo durante el ciclo de división.

Bibliografía

7 BIBLIOGRAFÍA

- Addinall, S.G. y Holland, B. (2002) The Tubulin Ancestor, FtsZ, Draughtsman, Designer and Driving Force for Bacterial Cytokinesis. *J Mol Biol*, **318**, 219-236.
- Amos, L.A. y Amos, B. (1991) *Molecules of the Cytoskeleton*. The Guilford Press, New York.
- Andersen, S.S. (2000) Spindle assembly and the art of regulating microtubule dynamics by MAPs and Stathmin/Op18. *Trends Cell Biol*, **10**, 261-267.
- Andreu, J.M., Oliva, M.A. y Huecas, S. (2004) FtsZ folding, self-association, activation and assembly. Comparison with tubulin and implications for bacterial cell division. Vicente, M., Tamames, J., Valencia, A. y Mingorance, J. (eds.), *Molecules in Time and Space*. Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Andreu, J.M., Oliva, M.A. y Monasterio, O. (2002) Reversible Unfolding of FtsZ Cell Division Proteins from Archaea and Bacteria. *J Biol Chem*, **277**, 43262-43270.
- Andreu, J.M. y Timasheff, S.N. (1986) The Measurement of Cooperative Protein Self-Assembly by Turbidity and Other Techniques. *Methods Enzymol*, **130**, 47-59.
- Attri, A.K., Lewis, M.S. y Korn, E.D. (1991) The Formation of Actin Oligomers Studied by Analytical Ultracentrifugation. *J Biol Chem*, **266**, 6815-6824.
- Beech, P.L., Nheu, T., Schultz, T., Herbert, S., Lithgow, T., Gilson, P.R. y McFadden, G.I. (2000) Mitochondrial FtsZ in a chromophyte alga. *Science*, **287**, 1276-1279.
- Belmont, L.D. y Mitchison, T.J. (1996) Identification of a Protein That Interacts with Tubulin Dimers and Increases the Catastrophe Rate of Microtubules. *Cell*, **84**, 623-631.
- Beuria, T.K., Krishnakumar, S.S., Sahar, S., Singh, N., Gupta, K., Meshram, M. y Panda, D. (2003) Glutamate-induced Assembly of Bacterial Cell Division Protein FtsZ. *J Biol Chem*, **278**, 3735-3741.
- Bi, E.F. y Lutkenhaus, J. (1991) FtsZ ring structure associated with division in *Escherichia coli*. *Nature*, **354**, 161-164.

- Bramhill, D. y Thompson, C.M. (1994) GTP-dependent polymerization of Escherichia coli FtsZ protein to form tubules. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 5813-5817.
- Bray, D. (2001) *Cell movements. From molecules to motility*. Garland Publishing, New York.
- Buddelmeijer, N. y Beckwith, J. (2002) Assembly of cell division proteins at the E. coli cell center. *Curr Opin Microbiol*, **5**, 553-557.
- Caplan, M.R. y Erickson, H.P. (2003) Apparent Cooperative Assembly of the Bacterial Cell Division Protein FtsZ Demonstrated by Isothermal Titration Calorimetry. *J Biol Chem*, **278**, 13784-13788.
- Carballido-Lopez, R. y Errington, J. (2003) A dynamic bacterial cytoskeleton. *Trends Cell Biol*, **13**, 577-583.
- Cole, J.L. y Hansen, J.C. (1999) Analytical Ultracentrifugation as a Contemporary Biomolecular Research Tool. *Journal of Biomolecular Techniques*, **10**, 163-176.
- de Boer, P., Crossley, R. y Rothfield, L. (1992) The essential bacterial cell-division protein FtsZ is a GTPase. *Nature*, **359**, 254-256.
- de Pereda, J.M., Leynadier, D., Evangelio, J.A., Chacon, P. y Andreu, J.M. (1996) Tubulin secondary structure analysis, limited proteolysis sites, and homology to FtsZ. *Biochemistry*, **35**, 14203-14215.
- Den Blaauwen, T., Buddelmeijer, N., Aarsman, M.E., Hameete, C.M. y Nanninga, N. (1999) Timing of FtsZ assembly in Escherichia coli. *J Bacteriol*, **181**, 5167-5175.
- Desai, A. y Mitchison, T.J. (1998) Tubulin and FtsZ structures: functional and therapeutic implications. *Bioessays*, **20**, 523-527.
- Drenckhahn, D. y Pollard, T.D. (1986) Elongation of actin filaments is a diffusion-limited reaction at the barbed end and is accelerated by inert macromolecules. *J Biol Chem*, **261**, 12754-12758.
- Ellis, R.J. (2001) Macromolecular crowding: obvious but underappreciated. *TIBS*, **26**, 597-604.
- Engel, J. (1983) Thermodynamics and kinetics of self-assembly. Hoppe, W., Lohmann, W., Markl, H. y Ziegler, H. (eds.), *Biophysics*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, pp. 408-412.

- Erickson, H.P. (1974) Assembly of microtubules from preformed, ring-shaped protofilaments and 6-S tubulin. *J Supramol Struct*, **2**, 393-411.
- Erickson, H.P., Taylor, D.W., Taylor, K.A. y Bramhill, D. (1996) Bacterial cell division protein FtsZ assembles into protofilament sheets and minirings, structural homologs of tubulin polymers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 519-523.
- Errington, J., Daniel, R.A. y Scheffers, D.-J. (2003) Cytokinesis in Bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*, **67**, 52-65.
- Ferrone, F.A., Hofrichter, J. y Eaton, W.A. (1985a) Kinetics of sickle hemoglobin polymerization. I. Studies using temperature-jump and laser photolysis techniques. *J Mol Biol*, **183**, 591-610.
- Ferrone, F.A., Hofrichter, J. y Eaton, W.A. (1985b) Kinetics of sickle hemoglobin polymerization. II. A double nucleation mechanism. *J Mol Biol*, **183**, 611-631.
- Fulton, A.B. (1982) How crowded is cytoplasm? *Cell*, **30**, 345-347.
- García de la Torre, J., Huertas, M.L. y Carrasco, B. (2000) Calculation of Hydrodynamic Properties of Globular Proteins from Their Atomic-Level Structure. *Biophys J*, **78**, 719-730.
- García de la Torre, J., Navarro, S., Martínez, M.C.L., Díaz, F.G. y Cascales, J.J.L. (1994) HYDRO: A Computer Program for the Prediction of Hydrodynamic Properties of Macromolecules. *Biophys J*, **67**, 530-531.
- García de la Torre, J.G. y Bloomfield, V.A. (1981) Hydrodynamic properties of complex, rigid, biological macromolecules: theory and applications. *Q Rev Biophys*, **14**, 81-139.
- García de la Torre, J.G., Llorca, O., Carrascosa, J.M. y Valpuesta, J.M. (2001) HYDROMIC: prediction of hydrodynamic properties of rigid macromolecular structures obtained from electron microscopy images. *Eur Biophys J*, **30**, 457-462.
- Goodsell, D.S. (1991) Inside a living cell. *Trends Biochem Sci*, **16**, 203-206.
- Gueiros-Filho, F.J. y Losick, R. (2002) A widely conserved bacterial cell division protein that promotes assembly of the tubulin-like protein FtsZ. *Genes Dev*, **16**, 2544-2556.
- Hale, C.A., Rhee, A.C. y De Boer, P.A.J. (2000) ZipA-induced bundling of FtsZ Polymers mediated by an interaction between C-terminal domains. *J Bacteriol*, 5252-5266.

- Hall, D. (2002) On the role of the macromolecular phase transitions in biology in response to change in solution volume or macromolecular composition: action as an entropy buffer. *Biophys Chem*, **98**, 233-248.
- Hall, D. y Minton, A.P. (2002) Effects of inert volume-excluding macromolecules on protein fiber formation. I. Equilibrium models. *Biophys Chem.*, **98**, 93-104.
- Herzfeld, J. (1996) Entropically driven order in crowded solutions: from liquid crystals to cell biology. *Accounts of chemical research*, **29**, 31-36.
- Herzog, W. y Weber, K. (1978) Microtubule Formation by Pure Brain Tubulin *in vitro*. The Influence of Dextran and Poly(ethylene glycol). *Eur J Biochem*, **91**, 249-254.
- Hoenig, M., Lee, R.J. y Ferguson, D.C. (1989) A microtiter plate assay for inorganic phosphate. *J Biochem Biophys Methods*, **19**.
- Hu, Z., Mukherjee, A., Pichoff, S. y Lutkenhaus, J. (1999) The MinC component of the division site selection system in *Escherichia coli* interacts with FtsZ to prevent polymerization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 14819-14824.
- Huecas, S. y Andreu, J.M. (2003) Energetics of the cooperative assembly of cell division protein FtsZ and the nucleotide hydrolysis switch. *J Biol Chem*, **278**, 46146-46154.
- Jones, L.J.F., Carballido-López, R. y Errington, J. (2001) Control of Cell Shape in Bacteria: Helical, Actin-like Filaments in *Bacillus subtilis*. *Cell*, **104**, 913-922.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Laue, T.M., Shah, B.D., Ridgeway, T.M. y Pelletier, S.L. (1992) Computer-Aided Interpretation of Analytical Sedimentation Data for proteins. Harding, S., Rowe, A. y Horton, J. (eds.), *Analytical Ultracentrifugation in Biochemistry and Polymer Science*. Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, pp. 90-125.
- Lee, J.C. y Timasheff, S.N. (1975) The reconstitution of microtubules from purified calf brain tubulin. *Biochemistry*, **14**, 5183-5187.
- Leirimo, S., Harrison, C., Cayley, D.S., Burgess, R.R. y Record Jr., M.T. (1987) Replacement of potassium chloride by potassium glutamate dramatically enhances protein-DNA interactions *in vitro*. *Biochemistry*, **26**, 2095-2101.

- Lindner, R.A. y Ralston, G.B. (1997) Macromolecular crowding: effects on actin polymerisation. *Biophys Chem*, **66**, 57-66.
- Löwe, J. y Amos, L.A. (1998) Crystal structure of the bacterial cell-division protein FtsZ. *Nature*, **391**, 203-206.
- Löwe, J. y Amos, L.A. (1999) Tubulin-like protofilaments in Ca²⁺-induced FtsZ sheets. *Embo J*, **18**, 2364-2371.
- Lu, C., Reedy, M. y Erickson, H.P. (2000) Straight and Curved Conformation of FtsZ Are Regulated by GTP Hydrolysis. *J Bacteriol*, **182**, 164-170.
- Lu, C., Stricker, J. y Erickson, H.P. (1998) FtsZ from *Escherichia Coli*, *Azotobacter vinelandii*, and *Thermotoga maritima* -quantitation, GTP hydrolysis, and assembly. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, **40**, 71-86.
- Lutkenhaus, J. (2002) Dynamic proteins in bacteria. *Curr Opin Microbiol*, **5**, 548-552.
- MacNeal, R.K., Webb, B.C. y Purich, D.L. (1977) Neurotubule assembly at substoichiometric nucleotide levels using a GTP regeneratig system. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **74**, 440-447.
- Margolin, W. (2000) Themes and variations in prokaryotic cell division. *FEMS Microbiol Rev*, **24**, 531-548.
- Margolin, W. (2001) Spatial regulation of cytokinesis in bacteria. *Curr Opin Microbiol*, **4**, 647-652.
- Margolin, W. (2003) Bacterial Division: The Fellowship of The Ring. *Current Biology*, **13**, R16-R18.
- Medalia, O., Weber, I., Frangakis, A.S., Nicastro, D., Gerisch, G. y Baumeister, W. (2002) Macromolecular Architecture in Eukaryotic Cells Visualized by Cryoelectron Tomography. *Science*, **298**, 1209-1213.
- Meinhardt, H. y de Boer, P.A.J. (2001) Pattern formation in *Escherichia coli*: A model of the pole-to-pole oscillations of Min proteins and the localization of the division site. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 14202-14207.
- Menéndez, M., Rivas, G., Díaz, J.F. y 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**, 167-176.

- Mingorance, J., Rueda, S., Gómez-Puertas, P., Valencia, A. y Vicente, M. (2001) *Escherichia coli* FtsZ polymers contain mostly GTP and have a high nucleotide turnover. *Mol Microbiol*, **41**, 83-91.
- Minton, A.P. (1977) Non-ideality and the thermodynamics of sickle-cell hemoglobin gelation. *J Mol Biol*, **110**, 89-103.
- Minton, A.P. (1983) The effect of volume occupancy upon the thermodynamic activity of proteins: some biochemical consequences. *Mol Cell Biochem*, **55**, 119-140.
- Minton, A.P. (1994) Schuster, T. y Laue, T. (eds.), *Modern analytical ultracentrifugation*. Birkhauser Boston, Inc., Cambridge, MA, pp. 81-93.
- Minton, A.P. (1995) Confinement as a determinant of macromolecular structure and reactivity. II. Effects of weakly attractive interactions between confined macromolecules and confining structures. *Biophys J*, **68**, 1311-1322.
- Minton, A.P. (1998) Molecular Crowding: Analysis of effects of high concentrations of inert cosolutes on biochemical equilibria and rates in terms of volume exclusion. *Methods Enzymol*, **295**, 127-149.
- Minton, A.P. (2000) Implications of macromolecular crowding for protein assembly. *Curr Opin Struct Biol*, **10**, 34-39.
- Minton, A.P. (2001) The influence of macromolecular crowding and macromolecular confinement on biochemical reactions in physiological media. *J Biol Chem*, **276**, 10577-10580.
- Møller-Jensen, J., Jensen, R.B., Löwe, J. y Gerdes, K. (2002) Prokaryotic DNA segregation by an actin-like filament. *Embo J*, **21**, 3119-3127.
- Moreno-Herrero, F., de Pablo, P.J., Fernández-Sánchez, R., Colchero, J., Gómez-Herrero, A. y Baró, A. (2002) Scanning force microscopy jumping and tapping modes in liquids. *Appl Phys Lett*, **81**, 2620-2622.
- Mosyak, L., Zhang, Y., Glasfeld, E., Haney, S., Stahl, M., Seehra, J. y Somers, W.S. (2000) The bacterial cell-division protein ZipA and its interaction with an FtsZ fragment revealed by X-ray crystallography. *Embo J*, **19**, 3179-3191.
- Mukherjee, A., Dai, K. y Lutkenhaus, J. (1993) *Escherichia coli* cell division protein FtsZ is a guanine nucleotide binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 1053-1057.

- Mukherjee, A. y Lutkenhaus, J. (1998) Dynamic assembly of FtsZ regulated by GTP hydrolysis. *Embo J*, **17**, 462-469.
- Mukherjee, A. y Lutkenhaus, J. (1999) Analysis of FtsZ assembly by light scattering and determination of the role of divalent metal cations. *J Bacteriol*, **181**, 823-832.
- Murphy, R.M. (1997) Static and dynamic light scattering of biological macromolecules: what can we learn? *Curr Opin Biotechnol*, **8**, 25-30.
- Neurard, J. y Nygaard, P. (1987) *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology*. American Society for Microbiology, Washington, D. C., pp. 445-473.
- Nogales, E., Wolf, S.G. y Downing, K.H. (1998) Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography. *Nature*, **391**, 199-203.
- Ohashi, T., Hale, C.A., de Boer, P.A.J. y Erickson, H.P. (2002) Structural Evidence that the P/W Domain of ZipA Is an Unstructured, Flexible Tether between the Membrane and the C-Terminal FtsZ-Binding Domain. *J Bacteriol*, **184**, 4313-4315.
- Oliva, M.A., Huecas, S., Palacios, J.M., Martin-Benito, J., Valpuesta, J.M. y Andreu, J.M. (2003) Assembly of archaeal cell division protein FtsZ and a GTPase-inactive mutant into double-stranded filaments. *J Biol Chem*, **278**, 33562-33570.
- Oosawa, F. y Asakura, S. (1975) *Thermodynamics of the Polymerization of Protein*. Academic Press, London.
- Persechini, A. y Rowe, A.J. (1984) Modulation of myosin filament conformation by physiological levels of divalent cation. *J Mol Biol*, **172**, 23-39.
- Pessen, H. y Kumosinski, T.F. (1985) Measurements of protein hydration by various techniques. *Methods Enzymol*, **117**, 219-255.
- Pollard, T.D. (1999) *Guidebook to the Cytoskeletal and Motor Proteins*. Oxford University Press, New York.
- Pollard, T.D. y Cooper, J.A. (1986) Actin and actin-binding proteins. A critical evaluation of mechanisms and functions. *Annu Rev Biochem*, **55**, 987-1035.
- RayChaudhuri, D. (1999) ZipA is a MAP-Tau homolog and is essential for structural integrity of the cytokinetic FtsZ ring during bacterial cell division. *Embo J*, **18**, 2372-2383.

- RayChaudhuri, D. y Park, J.T. (1992) *Escherichia coli* cell-division gene *ftsZ* encodes a novel GTP-binding protein. *Nature*, **359**, 251-254.
- Record Jr., M.T., Courtenay, E.S., Cayley, S. y Guttman, H.J. (1998) Biophysical compensation mechanisms buffering *E. coli* protein-nucleic acid interactions against changing environments. *TIBS*, **23**, 190-1994.
- Reedy, M.K. y Reedy, M.C. (1985) Rigor crossbridge structure in tilted single filament layers and flared-X formations from insect flight muscle. *J Mol Biol*, **185**, 145-176.
- Rickwood, D. (ed.). (1984) *Centrifugation (a practical approach)*. IRL Press, Eynsham Oxford.
- Rivas, G., Fernandez, J.A. y Minton, A.P. (2001) Direct observation of the enhancement of noncooperative protein self-assembly by macromolecular crowding: Indefinite linear self-association of bacterial cell division protein FtsZ. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 3150-3155.
- Rivas, G., Ferrone, F. y Herzfeld, J. (2004) Life in a crowded world. *EMBO Rep*, **5**, 23-27.
- Rivas, G., López, A., Mingorance, J., Ferrándiz, M.J., Zorrilla, S., Minton, A.P., Vicente, M. y Andreu, J.M. (2000) Magnesium-induced linear self-association of the FtsZ bacterial cell division protein monomer. *J Biol Chem*, **275**, 11740-11749.
- Rivas, G., Stafford, W. y Minton, A.P. (1999) Characterization of heterologous protein-protein interactions using analytical ultracentrifugation. *Methods*, **19**, 194-212.
- Romberg, L. y Levin, P.A. (2003) Assembly Dynamics of the Bacterial Cell Division Protein FtsZ: Poised at the Edge of Stability. *Annu Rev Microbiol*, **57**.
- Romberg, L. y 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**, 282-288.
- Romberg, L., Simon, M. y Erickson, H.P. (2001) Polymerization of FtsZ, a bacterial homolog of tubulin: Is assembly cooperative? *J Biol Chem*, **276**, 11743-11753.
- Ross, P.D. y Minton, A.P. (1977) Analysis of non-ideal behavior in concentrated hemoglobin solutions. *J Mol Biol*, **112**, 437-452.

- Rothfield, L.I. y Justice, S.S. (1997) Bacterial cell division: the cycle of the ring. *Cell*, **88**, 581-584.
- Rowe, A. (1992) The Concentration Dependence of Sedimentation. Harding, S., Rowe, A. y Horton, J. (eds.), *Analytical Ultracentrifugation in Biochemistry and Polymer Science*. Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, pp. 394-406.
- Rueda, S. (2002) Formación y persistencia del anillo de FtsZ de división bacteriana en *Escherichia coli*. *Facultad de Farmacia*. Universidad Complutense de Madrid, Madrid.
- Rueda, S., Vicente, M. y Mingorance, J. (2003) Concentration and assembly of the division ring proteins FtsZ, FtsA, and ZipA during the *Escherichia coli* cell cycle. *J Bacteriol*, **185**, 3344-3351.
- Schachman, H.K. (1951) Ultracentrifuge studies on tobacco mosaic virus. *J Amer Chem Soc*, **73**, 4808-4811.
- Schachman, H.K. (1959) *Ultracentrifugation in Biochemistry*. Academic Press, New York.
- Scheffers, D.-J., de Witt, J.G., den Blaauwen, T. y Driessen, A.J.M. (2002) GTP Hydrolysis of Cell Division Protein FtsZ: Evidence that the Active Site Is Formed by the Association of Monomers. *Biochemistry*, **41**, 521-529.
- Scheffers, D.-J. y Driessen, A.J.M. (2002) Immediate GTP Hydrolysis upon FtsZ polymerization. *Mol Microbiol*, **43**, 1517-1521.
- Scheffers, K.-J. y Driessen, A.J.M. (2001) The polymerization mechanism of the bacterial cell division protein FtsZ. *FEBS Letters*, **25254**, 1-5.
- Schuck, P. (2000) Size-Distribution Analysis of Macromolecule by Sedimentation Velocity Ultracentrifugation and Lamm Equation Modeling. *Biophys J*, **78**, 1606-1619.
- Schuck, P. (2003) On the analysis of protein self-association by sedimentation velocity analytical ultracentrifugation. *Anal Biochem*, **320**, 104-124.
- Schuck, P. y Demeler, B. (1999) Direct Sedimentation Analysis of Interference Optical Data in Analytical Ultracentrifugation. *Biophysical Journal*, **76**, 2288-2296.

- Schuck, P., Perugini, M.A., Gonzales, N.R., Howlett, G.J. y Shubert, D. (2002) Size-Distribution Analysis of Proteins by Analytical Ultracentrifugation: Strategies and Application to Model Systems. *Biophys J*, **82**, 1096-1111.
- Schuck, P. y Rosmanith, P. (2000) Determination of the sedimentation coefficient distribution by least-squares boundary modeling. *Biopolymers*, **54**, 328-341.
- Sept, D., Xu, J., Pollard, T.D. y McCammon, J.A. (1999) Annealing accounts for the length of actin filaments formed by spontaneous polymerization. *Biophys J*, **77**, 2911-2919.
- Small, E. y Addinall, S.G. (2003) Dynamic FtsZ polymerization is sensitive to the GTP to GDP ratio and can be maintained at steady state using a GTP-regeneration system. *Microbiology*, **149**, 2235-2242.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J. y Klenk, D.C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, **150**, 76-85.
- Stolz, M., Stoffer, D., Aebi, U. y Goldsbury, C. (2000) Monitoring biomolecular interactions by time-lapse atomic force microscopy. *J Struct Biol*, **131**, 171-180.
- Stricker, J., Maddox, P., Salmon, E.D. y Erickson, H.P. (2002) Rapid assembly dynamics of the *Escherichia coli* FtsZ-ring demonstrated by fluorescence recovery after photobleaching. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 3171-3175.
- Suzuki, A., Yamazaki, M. y Ito, T. (1989) Osmoelastic coupling in biological structures: formation of parallel bundles of actin filaments in a crystalline-like structure caused by osmotic stress. *Biochemistry*, **28**, 6513-6518.
- Tanford, C. (1961) *Physical Chemistry of macromolecules*. Wiley, N. York.
- Tang, J.X., Ito, T., Tao, T., Traub, P. y Janmey, P.A. (1997) Opposite effects of electrostatics and steric exclusion on bundle formation by F-actin and other filamentous polyelectrolytes. *Biochemistry*, **36**, 12600-12607.
- Torbet, J. (1986) Fibrin assembly in human plasma and fibrinogen/albumin mixtures. *Biochemistry*, **25**, 5309-5314.
- Uversky, V.N., Cooper, E.M., Bower, K.S., Li, J. y Fink, A.L. (2001) Accelerated α -synuclein fibrillation in crowded milieu. *FEBS Lett*, **515**, 99-103.
- Valpuesta, J.M., Martín-Benito, J. y Ruiz Castón, J. (2003) La microscopía electrónica de transmisión aplicada a la determinación estructural de macromoléculas

- biológicas. Gómez-Moreno Calera, C. y Sancho Sanz, J. (eds.), *Estructura de proteínas*. Ariel Ciencia, Barcelona, pp. 357-390.
- van den Ent, F., Amos, L. y Löwe, J. (2001a) Bacterial ancestry of actin and tubulin. *Curr Opin Microbiol*, 634-638.
- van den Ent, F., Amos, L.A. y Löwe, J. (2001b) Prokaryotic origin of the actin cytoskeleton. *Nature*, **413**, 39-44.
- van den Ent, F. y Löwe, J. (2000) Crystal structure of the cell division protein FtsA from *Thermotoga maritima*. *Embo J*, **19**, 5300-5307.
- van den Ent, F., Moller-Jensen, J., Amos, L.A., Gerdes, K. y Lowe, J. (2002) F-actin-like filaments formed by plasmid segregation protein ParM. *Embo J*, **21**, 6935-6943.
- van Holde, K.E. (1985) *Physical Biochemistry*. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, NJ.
- van Holde, K.E., Johnson, W.C. y Ho, P.S. (1998) *Principles of Physical Biochemistry*. Prentice-Hall, Inc., Upper Saddle River, New Jersey.
- Vitha, S., McAndrew, R.S. y Osteryoung, K.W. (2001) FtsZ ring formation at the chloroplast division site in plants. *J Cell Biol*, **153**, 111-120.
- Walter, H. y Brooks, D.E. (1995) Phase separation in cytoplasm, due to macromolecular crowding, is the basis for microcompartmentation. *FEBS Lett*, **361**, 135-139.
- Weast, R.C. (ed.). (1982-1983) *CRC Handbook of Chemistry and Physics*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
- Wegner, A. (1976) Head to tail polymerization of actin. *J Mol Biol*, **108**, 139-150.
- Wegner, A. y Engel, J. (1975) Kinetics of the cooperative association of actin to actin filaments. *Biophys Chem*, **3**, 215-225.
- Wenner, J.R. y Bloomfield, V.A. (1999) Crowding effects on *EcoRV* Kinetics and Binding. *Biophys J*, **77**, 3234-3241.
- White, E.L., Ross, L.J., Reynolds, R.C., Seitz, L.E., Moore, G.D. y Borhani, D.W. (2000) Slow polymerization of *Mycobacterium tuberculosis* FtsZ. *J Bacteriol*, **182**, 4028-4034.
- Woldringh, C.L., Mulder, E., Valkenburg, J.A., Wientjes, F.B., Zaritsky, A. y Nanninga, N. (1990) Role of the nucleoid in the toporegulation of division. *Res Microbiol*, **141**, 39-49.

- Yu, X.-C. y Margolin, W. (1997) Ca^{2+} -mediated GTP-dependent dynamic assembly of bacterial cell division protein FtsZ into asters and polymer networks *in vitro*. *Embo J*, **16**, 5455-5463.
- Zhang, B., Zhang, Y., Wang, Z. y Zheng, Y. (2000) The role of Mg^{2+} cofactor in the guanine nucleotide exchange and GTP hydrolysis reactions of Rho family GTP-binding proteins. *J Biol Chem*, **275**, 25299-25307.
- Zimmerman, S.B. y Minton, A.P. (1993) Macromolecular crowding: biochemical, biophysical and physiological consequences. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, **22**, 27-65.
- Zimmerman, S.B. y Trach, S.O. (1991) Estimations of macromolecular concentrations and excluded volume effects for the cytoplasm of *Escherichia coli*. *J Mol Biol*, **222**, 599-620.