

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Física de la Materia Condensada



Dinámica de los Filamentos de FtsZ y Búsqueda Racional de Inhibidores Sintéticos con Actividad Antibacteriana

Memoria para optar al grado de Doctor
Presentada por:

Erney Ramírez Aportela

Director:

Dr. Pablo Chacón Montes

Instituto de Química-Física Rocasolano
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



Madrid, 2016

El trabajo recogido en la presente memoria ha sido realizado por Erney Ramírez Aportela bajo la dirección del Dr. Pablo Chacón Montes en el Departamento de Química Física Biológica del Instituto de Química-Física Rocasolano, IQFR-CSIC.

La realización de este trabajo ha sido posible gracias a las ayudas para el desarrollo de tesis doctorales en el marco del Programa: Junta para la Ampliación de Estudios (JAEpredoc-2011) concedida por el MINISTERIO DE CIENCIA E INNOVACIÓN (Agencia Estatal Consejo Superior de Investigaciones Científicas).



Opta al Grado de Doctor

V⁰B⁰ Director de Tesis

Erney Ramírez Aportela

Pablo Chacón Montes

A MIS PADRES

Agradecimientos

Después de varios años de trabajo quiero agradecer a los que me han acompañado durante esta estancia y a los principales responsables de los resultados que aquí se recogen. En primer lugar quiero agradecer a mi director de tesis Dr. Pablo Chacón, porque allá por el año 2009 me acogió en su grupo sin conocerme y comenzamos a dar los primeros pasos en lo que después se convertiría en una tesis doctoral. Muchas gracias Pablo por tu paciencia infinita y ayuda con cada una de las dificultades que surgieron a lo largo de estos años. También quiero agradecer al Dr. José Manuel Andreu por darme un espacio en su grupo y compartir sus enormes conocimientos.

Agradecer a mis compañeros y excompañeros de laboratorio Mon, Nacho, Santi y Pieter. A los del grupo 308 del CIB que me han ayudado siempre que me ha dado la idea de ser experimental, Albert, Laura, David, Lidia, Sonia, Marian, Alejandro. A otras buenas personas con las que he compartido estos años en el CIB, Mariano, Chiara, Ruth, Benet, Eli, Gonzalo, Paco, Juan, Gisella y a los doctores Isabel Barasoain y Fernando Díaz. También agradecer a todos los que cada martes me hacían la vida más amena con ese partidillo de fútbol.

Agradecer a todos los cristalógrafos y no cristalógrafos del "Roca" que cada día compartimos comida, pelis, padel, chistes: a María, Rocío, Ioanna, Noe, Mer, Elsa, Maite, Martín, Juanlu, Patri, Ana, Siseth, Ivanna. Un agradecimiento especial a la cristalógrafa más guapa, a ti Tere, porque en este último período le has dado sentido a cada uno de mis días y has hecho de cada uno de ellos el mejor.

Muchas gracias a TODOS mis amigos cubanos porque cada encuentro con ustedes es como insertar en Madrid un pedacito de la isla. Todos son especiales, pero no puedo dejar de mencionar a mis compañeros de batallas en los primeros años, Yeri y Jávico, y a Adi por cada comida, café o caña compartida.

Por último quiero agradecer a mi familia. En especial a las dos personas más importantes de mi vida y que aunque han estado lejos en estos años de tesis, nadie ha estado más cerca que ellos. Infinita gratitud a MIS PADRES!!!

ÍNDICE

1. Introducción	1
1.1. La proteína de división celular FtsZ	1
1.1.1. Estructura de FtsZ.....	2
1.1.2. Ensamblaje de FtsZ.....	4
1.1.3. Región desestructurada C-terminal de FtsZ y su importancia en las interacciones laterales	6
1.1.4. Función de los polímeros de FtsZ.....	8
1.2. Simulaciones de Dinámica Molecular	9
1.2.1. Simulaciones de DM de FtsZ	13
1.3. FtsZ constituye una diana para la búsqueda de nuevos antibióticos	15
1.3.1. Sitio de unión de nucleótido	16
1.3.2. Sitio de PC	17
1.4. Aplicación de cribado virtual y ajuste molecular (“docking”) en la búsqueda de nuevos inhibidores.....	17
1.4.1. Ajuste molecular (“docking”) proteína-ligando	17
1.4.2. Cribado virtual	18
1.4.2.1. Basado en la estructura del ligando	19
1.4.2.2. Basado en la estructura del receptor	19
1.4.3. El cribado virtual y docking aplicado a la búsqueda de inhibidores de FtsZ	20
2. Objetivos	23
3. Materiales y Métodos.....	27
3.1. Simulaciones de DM.....	27
3.1.1. Simulaciones de DM de filamentos de SaFtsZ.....	28
3.1.1.1. Preparación de los filamentos de SaFtsZ.....	29
3.1.1.2. Equilibración y producción de DM de los filamentos	30
3.1.1.3. Análisis de las simulaciones de filamentos de SaFtsZ	30
3.1.2. Simulaciones de DM del monómero de SaFtsZ	33
3.2. Búsqueda de nuevos inhibidores de FtsZ.....	33
3.2.1. Cribado virtual basado en receptor	33
3.2.2. Búsqueda de compuestos con estructuras similares a la de ligandos activos	35
3.2.3. Ajuste Molecular “Docking”	35
3.2.4. Simulaciones de DM de los ligandos en los sitios de unión de FtsZ.....	36
3.2.4.1. Preparación y equilibración de los sistemas proteína-ligando.....	36

3.2.4.2. Simulaciones de DM de los complejos proteína-ligando	37
3.2.5. Modelado molecular usando Maestro de Schrödinger	37
3.2.5.1. Preparación de la proteína y los ligandos	37
3.2.5.2. “Docking” con Maestro	38
3.2.5.3. Simulaciones de DM con Maestro.....	38
3.3. Validación experimental de los compuestos procedentes del cribado virtual.....	39
3.3.1. Reactivos utilizados, medios de cultivos y tampones empleados	39
Reactivos utilizados.....	39
3.3.2. Purificación de FtsZ	40
3.3.2.1. Expresión de BsFtsZ.....	41
3.3.2.2. Purificación de BsFtsZ	42
3.3.3. Determinación de la concentración de BsFtsZ obtenida en la purificación	44
3.3.3.1. Método de doble longitud de onda	44
3.3.3.2. Método de extracción del nucleótido.....	45
3.3.4. Polimerización de BsFtsZ por dispersión de luz	45
3.3.5. Compuestos sintetizados y análogos del compuesto obtenido por cribado virtual del sitio de nucleótido VS18.....	45
3.3.6. Preparación y control de los compuestos del cribado virtual en el sitio de PC.....	46
3.3.6.1. Preparación de los compuestos.....	46
3.3.6.2. Determinación de la solubilidad de cada compuesto.....	47
3.3.7. Ensayos de competición de los ligandos con la sonda fluorescente DFMBBA-NBD en el sitio de unión de PC	47
3.3.8. Experimentos <i>in vivo</i> con células bacterianas	48
3.3.8.1. Determinación de la actividad antibacteriana.....	48
3.3.8.2. Efecto de los compuestos en el perfil fenotípico de división bacteriana	49
3.3.8.3. Estudio del efecto de los compuestos en la localización del anillo Z.....	49
3.4. Determinación de la morfología de los polímeros de BsFtsZ por dispersión de rayos-X a ángulos bajo y crio-EM.....	50
3.4.1. Experimentos de dispersión de rayos-X a ángulos bajos (SAXS)	50
3.4.1.1. SAXS de polímeros de BsFtsZ y BsFtsZ- Δ Ct.....	51
3.4.2. Modelos para la dispersión de rayos-X de polímeros de FtsZ	52
3.4.3. Crio-EM de polímeros de BsFtsZ y BsFtsZ- Δ Ct	52
4. Resultados y Discusión	57
4.1. Dinámica de los filamentos de SaFtsZ	57
4.1.1. Flexibilidad y curvatura dependiente del nucleótido.....	57

4.1.2. Interacciones en las interfaces entre monómeros reguladas por nucleótido.....	66
4.1.3. El Mg ²⁺ como elemento esencial en la estabilidad.....	69
4.1.4. Efecto estabilizante de los iones de Ca ²⁺	70
4.2. El interruptor molecular entre los dominios N y C-terminal	71
4.3. Moléculas que bloquean el interruptor molecular.....	74
4.3.1. Mecanismo de estabilización de los filamentos por PC	74
4.3.2. Sonda fluorescente DFMBA-NBD.....	76
4.3.3. Validación experimental del interruptor de FtsZ con la sonda fluorescente DFMBA-NBD	81
4.4. Ciclo de ensamblaje/desensamblaje de FtsZ	83
4.5. Auto-organización de los polímeros de FtsZ analizados por SAXS y crio-EM.....	85
4.5.1. Polímeros de BsFtsZ medidos por SAXS.....	85
4.5.2. Diferencias en la dispersión de rayos-X de los polímeros de BsFtsZ (1-315) que carecen de la cola C-terminal.	88
4.5.3. Detección por SAXS del efecto estabilizante o inhibitorio de moléculas pequeñas en el ensamblaje de BsFtsZ.	90
4.5.4. Modelos de filamentos de FtsZ para estudiar la dispersión de rayos-X.....	92
4.5.5. Crio-EM de polímeros de BsFtsZ y BsFtsZ-ΔCt.....	101
4.6. Búsqueda de nuevos inhibidores específicos de FtsZ.....	103
4.6.1. Sitio de unión de nucleótido	104
4.6.1.1. Flexibilidad del sitio de unión	104
4.6.1.2. Unión con GDP. Validación del protocolo de “docking”	105
4.6.1.3. Ligandos sintéticos validados experimentalmente: Compuestos polifenólicos (UCM05)	108
4.6.1.3.1. Optimización de los compuestos basada en diseño racional	108
4.6.1.3.2. Modelos estructurales de los complejos BsFtsZ-UCM44 y BsFtsZ-28	113
4.6.1.4. Ligandos procedentes del cribado virtual: VS18.....	117
4.6.1.4.1. Búsqueda de nuevos ligandos basada en la estructura de VS18.....	118
4.6.1.4.2. Búsqueda de derivados basada en la estructura de VS25	119
4.6.1.4.3. Simulaciones de DM de VS33	121
4.6.2. Cribado virtual en el sitio de PC.....	122
5. Conclusiones	133
6. Bibliografía	139

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de FtsZ.	3
Figura 2. Representación de la estructura cristalográfica de FtsZ de <i>S. aureus</i> con GDP unido.	5
Figura 3. Cambio conformacional observado en el monómero de FtsZ.	6
Figura 4. Representación esquemática de las condiciones periódicas de contorno en dos dimensiones.	12
Figura 5. Representación de dos sitios de unión de FtsZ.	16
Figura 6. Definición de los ángulos de curvatura y torsión.	32
Figura 7. PAGE-SDS de purificación de BsFtsZ.	43
Figura 8. Vector de dispersión.	50
Figura 9. Estructuras correspondientes a las trayectorias de DM de los filamentos de GDP, GTP y GDP+PC.	58
Figura 10. Estructuras de dímeros representativos obtenidos de la media de los últimos 100 ns.	59
Figura 11. Caracterización de las distintas conformaciones de las interfaces.	61
Figura 12. Evolución temporal del ángulo principal de curvatura θ_1 para las cuatro interfaces centrales de un filamento de GTP y de GDP+PC.	62
Figura 13. Conformaciones de monómeros representativos dentro de los filamentos con GDP, GTP y PC, durante los últimos 100 ns de simulación.	64
Figura 14. Superficies de contacto de las interfaces.	67
Figura 15. Representación de los contactos atómicos en las interfaces monómero-monómero.	68
Figura 16. Vista detallada de la interfaz en un filamento con GTP.	70
Figura 17. Superficies de contactos y representación de los contactos entre pares de átomos en las interfaces monómero-monómero de los filamentos simulados con Ca^{2+}	71
Figura 18. Relajación del interruptor de ensamblaje de FtsZ y estudio del cierre de la hendidura entre dominios.	73
Figura 19. Superficies de contactos y representación de los contactos entre pares de átomos en las interfaces monómero-monómero de los filamentos de GDP + PC.	76
Figura 20. Sondas fluorescentes representativas derivadas del compuesto PC que han sido sintetizadas y validadas experimentalmente.	77
Figura 21. Trayectorias de DM de los complejos SaFtsZ-sonda.	79
Figura 22. Modos de unión de las sondas fluorescentes en la hendidura entre dominios.	80
Figura 23. Ensamblaje de FtsZ monitorizado con la sonda fluorescente DFMBBA-NBD.	82

Figura 24. Esquema del ciclo de ensamblaje/desensamblaje que integra la dinámica de los filamentos dependiente del nucleótido y del interruptor de ensamblaje.	85
Figura 25. Perfiles de SAXS para monómeros de FtsZ en la forma nativa y la forma truncada en condiciones de no polimerización.	86
Figura 26. Perfiles de SAXS de la proteína BsFtsZ en condiciones de polimerización.	87
Figura 27. Experimentos de dispersión de luz para la proteína BsFtsZ y la forma truncada BsFtsZ- Δ Ct con GMPCPP.	89
Figura 28. Perfiles de SAXS de la proteína truncada BsFtsZ- Δ Ct.	90
Figura 29. Efecto modulador de moléculas pequeñas sobre polímeros de BsFtsZ.	91
Figura 30. Perfiles de dispersión para modelos de filamentos individuales de FtsZ con curvatura variable.	93
Figura 31. Perfiles de dispersión para modelos de filamentos curvos de FtsZ con longitud variable.	95
Figura 32. Perfiles de dispersión para modelos de múltiples filamentos rectos de FtsZ.	96
Figura 33. Perfiles de dispersión para modelos de múltiples filamentos curvos de FtsZ.	98
Figura 34. Perfiles de SAXS de los modelos de polímeros de FtsZ que mejor reproducen los perfiles experimentales.	99
Figura 35. Crio-EM de polímeros de BsFtsZ y BsFtsZ- Δ Ct.	102
Figura 36. Dinámica de la proteína BsFtsZ en la forma apo.	105
Figura 37. Dinámica de BsFtsZ con GDP unido.	107
Figura 38. Validación experimental de UCM05.	109
Figura 39. Validación experimental de UCM44 y UCM53.	111
Figura 40. Validación experimental del compuesto 28	112
Figura 41: Modos de unión de UCM44 identificados por DM.	114
Figura 42. Modelo molecular del reconocimiento del compuesto 28 por el sitio de unión de nucleótido.	116
Figura 43. Curva de desplazamiento del mant-GTP por el compuesto VS18.	117
Figura 44. Modelo molecular del reconocimiento del compuesto VS33 por el sitio de unión de nucleótido.	121
Figura 45. Curvas de desplazamientos de los compuesto VSE1, VSE3, VSE15, VSE22 y VSE40.	128
Figura 46. Efecto <i>in vivo</i> de VSE3.	129

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Valores de anisotropía de fluorescencia de los compuestos 6, 14, 15 y 16.....	78
Tabla 2. Comparación de los Puentes de Hidrógenos del complejo BsFtsZ-GDP.....	107
Tabla 3. Afinidad y actividad antibacteriana de la serie de compuestos sintetizados.....	110
Tabla 4. Nuevos compuestos derivados de VS18.	118
Tabla 5. Nuevos compuestos derivados de VS25.	120
Tabla 6. Compuestos procedentes del cribado virtual del sitio de PC.	123

Listado de símbolos y acrónimos

λ	Longitud de onda.
Å	Ångström
4D	Tetradimensional
BsFtsZ	FtsZ de <i>Bacillus subtilis</i>
BsFtsZ- Δ t	FtsZ de <i>Bacillus subtilis</i> truncada en el extremo Carboxi-terminal
Cr	Concentración crítica
C-terminal	Carboxi-terminal
CTL	Segmento Carboxi-terminal (del inglés: <i>C-terminal linker</i>)
CTT	Péptido conservado en el extremo Carboxi-terminal (del inglés: <i>C-terminal tail</i>)
CTV	Región variable en el extremo Carboxi-terminal (del inglés: <i>C-terminal variable</i>)
DFMBA	2,6-difluoro-3-hydroxybenzamida
DM	Dinámica molecular
DMSO-D6	Dimetilsulfóxido deuterado
DMSO	Dimetilsulfóxido
Crio-EM	Criomicroscopía electrónica (del inglés: <i>Cryo-electron microscopy</i>)
EcFtsZ	FtsZ de <i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilen-diaminotetraacético
GDP	Guanosín difosfato (del inglés: <i>Guanosine diphosphate</i>)
GFP	Proteína fluorescente verde (del inglés: <i>Green fluorescent protein</i>)
GMPCPP	Guanosina-5'-[(2, β)-metilén]trifosfato
GTP	Guanosín trifosfato (del inglés: <i>Guanosine triphosphate</i>)
Hepes	Ácido (4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazin-etanosulfónico
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
MES	Ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico
MIC	Concentración mínima inhibitoria (del inglés: <i>Minimum inhibitory concentration</i>)
MjFtsZ	FtsZ de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
NBD	7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol
N-terminal	Amino-terminal
ns	Nanosegundo
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBC	Condiciones periódicas de contorno (del inglés: <i>Periodic boundary conditions</i>).
PDB	Base de datos de estructuras de proteínas (del inglés: <i>Protein data bank</i>)
PC	PC190723, 3-[(6-Cloro[1,3]tiazolo[5,4-B]piridin-2-Yl)metoxi]-2,6-difluorobenzamida
PME	Método para calcular la sumatoria de Ewald (del inglés: <i>Particle Mesh Ewald</i>)
RESP	Potencial electrostático restringido (del inglés: <i>Restrained electrostatic potential</i>)
Rg	Radio de giro
RMN	Resonancia magnética nuclear
RMSD	Desviación cuadrática media (del inglés <i>Root mean square deviation</i>)
SaFtsZ	FtsZ de <i>Staphylococcus aureus</i>
SAXS	Dispersión de rayos X a ángulos bajos (del inglés: <i>Small angle X-ray scattering</i>).
Tris	Tris-hidroximetil-aminometano

Resumen

La proteína del citoesqueleto FtsZ se ensambla en filamentos que forman el anillo citoquinético de la mayoría de las bacterias, reclutan a otras proteínas de la división celular y contribuyen en la fuerza de constricción para la citoquinesis (Osawa et al., 2008). Debido a su ubicuidad e importancia en la división celular bacteriana, FtsZ es una diana atractiva para el desarrollo de nuevos antibióticos (Schaffner-Barbero et al., 2012).

FtsZ está formada por dos subdominios globulares conectados por una hélice central (H7). Además contiene una región desestructurada en el extremo C-terminal que está implicada en la interacción entre FtsZ y proteínas moduladoras (Buske and Levin, 2012). Al igual que su homólogo eucariota, FtsZ forma protofilamentos con GTP (Nogales et al., 1998a) y el ensamblaje/desensamblaje de los polímeros está regulado por la hidrólisis del nucleótido. El sitio catalítico GTPasa se forma durante el ensamblaje de la proteína (Lowe and Amos, 1999).

Los monómeros de FtsZ pueden estar en dos estados: estado inactivo con baja afinidad para formar polímeros y estado activo con alta afinidad para la polimerización (Chen and Erickson, 2011, Huecas et al., 2008, Martin-Galiano et al., 2010). La forma inactiva ha sido observada en estructuras cristalográficas de diferentes especies (Oliva et al., 2007), con la hendidura entre los dominios N y C-terminal en una conformación cerrada. La reciente estructura cristalográfica de FtsZ de *Staphylococcus aureus* (SaFtsZ) (Elsen et al., 2012, Tan et al., 2012, Matsui et al., 2012) muestra un filamento recto formado por monómeros con la hendidura abierta. La comparación entre las estructuras de SaFtsZ y FtsZs de otras especies apoya el mecanismo de apertura de la hendidura como un interruptor molecular para el ensamblaje. Sin embargo, alguna prueba del cambio conformacional entre los estados de FtsZ en una misma especie es necesario.

FtsZ tiene dos sitios principales de gran interés en la búsqueda de nuevos antibióticos, el sitio de unión del nucleótido y la hendidura entre el dominio N y C-terminal. El compuesto PC190723 se une a la hendidura entre dominios y modula el ensamblaje de FtsZ (Andreu et al., 2010, Elsen et al., 2012). Precisamente el descubrimiento de este compuesto, efectivo frente a *S. aureus* resistente a metilicina ha validado a FtsZ como una diana óptima para el descubrimiento de nuevos fármacos.

En esta tesis, nosotros estudiamos la dinámica de FtsZ usando simulaciones de dinámica molecular a partir de las estructuras cristalográficas de filamentos representativos. En consonancia con datos experimentales hemos encontrado diferentes curvaturas de los filamentos en dependencia del nucleótido unido. Mientras los filamentos con GTP se curvan en una dirección preferencial encerrando el nucleótido, con GDP exhiben una distribución heterogénea de interfaces abiertas y cerradas entre monómeros. Nosotros identificamos al ión Mg^{2+} como un elemento esencial en el cierre del sitio de nucleótido y en la estabilización de los filamentos con GTP, mientras la pérdida de contactos del monómero inferior con el bucle T7 en los filamentos con GDP produce interfaces abiertas que en principio son más propensas a despolimerizar. Además hemos observado el cierre espontáneo de la hendidura entre el dominio C-terminal y la H7 en el monómero aislado y en el extremo (-) de los filamentos, actuando como un interruptor molecular acoplado a la polimerización de la FtsZ. Este resultado valida el cambio conformacional propuesto entre monómeros con la hendidura cerrada y baja afinidad para la polimerización y la conformación activa de FtsZ con la hendidura abierta dentro de los filamentos. Finalmente encontramos que la unión del antibiótico PC190723 en los filamentos con GDP, mantiene la hendidura abierta y alostéricamente induce el cierre de las interfaces entre monómeros de una forma similar a los filamentos con GTP. Gracias a la integración del interruptor molecular con la dependencia de la estabilidad del filamento en la

dinámica interfacial entre monómeros regulada por nucleótido, este estudio ofrece una detallada interpretación del ciclo de ensamblaje y desensamblaje de FtsZ, así como de su inhibición.

Además hemos colaborado en el diseño de análogos fluorescentes del PC para estudiar el cambio conformacional durante el ensamblaje. La sonda con nitrobenzoxadiazole (NBD) se une específicamente a la forma ensamblada de FtsZ más que a los monómeros. Durante el proceso de ensamblaje/desensamblaje, la anisotropía de la sonda cambia debido a la unión o disociación a FtsZ, reportando así la apertura o cierre de la hendidura entre dominios. Estos resultados corroboran el mecanismo de interruptor molecular de la hendidura para el ensamblaje de FtsZ.

Las características estructurales de los polímeros de FtsZ de *B. Subtilis* (BsFtsZ) y la proteína truncada (BsFtsZ- Δ t) que carece del extremo desestructurado C-terminal, han sido además estudiadas por SAXS y criomicroscopía electrónica. Los polímeros de BsFtsZ- Δ t mostraron diferencias respecto a los de la proteína nativa. Los experimentos muestran que BsFtsZ forma grandes agregados de filamentos curvos con un espaciado lateral (~ 70 Å) entre protofilamentos vecinos. Sin embargo, los filamentos de la proteína truncada forma manojos de filamentos rectos unidos lateralmente. Nosotros proponemos que el espaciado de 70 Å entre los protofilamentos de BsFtsZ se debe a la extensión C-terminal. Mientras que los filamentos de BsFtsZ- Δ Ct se unen generando manojos rectos, la asociación lateral flexible a través del C-terminal explica la curvatura de los filamentos de BsFtsZ.

El cribado virtual de grandes librerías de compuestos es una buena aproximación para identificar nuevos agentes antibacterianos. Mediante esta técnica se han identificado distintas cabezas de serie para el sitio de unión de nucleótido (UCM05 y VS18), sin embargo los compuestos probados en el sitio de unión de PC, con estructuras diferentes a este no mostraron efecto en células.

UCM05 interacciona con el sitio de nucleótido de BsFtsZ ($K_d = 2.3$ μ M) e inhibe el crecimiento de bacterias Gram-positivas de *B. subtilis* (MIC = 100 μ M). Para tratar de mejorar la afinidad de unión de UCM05 y el efecto antibacteriano nuevos derivados seleccionados por experimentos de docking y dinámica molecular se sintetizaron. El cambio del grupo naftaleno por el bifenilo mejoró la afinidad de unión y efecto antibacteriano respecto a UCM05. Por ejemplo, el derivado de bifenilo **28** destaca como un potente inhibidor de FtsZ [$K_d = 0.5$ μ M, MIC (*B. subtilis*) = 5 μ M y MIC (MRSA) = 7 μ M].

VS18 interacciona con el sitio de nucleótido de BsFtsZ ($K_d = 90.9$ μ M). Sin embargo, VS18 no presenta actividad antibacteriana en *B. subtilis* (MIC > 600 μ M). Su estructura química fue usada para la búsqueda de compuestos con modificaciones químicas mediante cribado virtual. De los compuestos seleccionados del cribado, 29 mejoran la afinidad de unión por el sitio validando el protocolo seguido. El más prometedor es el compuesto VS33, que se une al sitio de nucleótido ($K_d = 6.7$ μ M) y afecta la división celular bacteriana [MIC (*B. subtilis*) = 50 μ M and MIC (MRSA) = 20 μ M].

Los posibles modos de unión de los compuestos **28** y VS33 han sido estudiados por docking y simulaciones de dinámica molecular. Estos estudios nos han proporcionado información sobre el mecanismo de inhibición por competición de estos compuestos.

Summary

The cytoskeletal protein FtsZ forms filaments that organize into the bacterial Z-ring, which recruits other cell-division proteins and helps provide some of the constrictive force for cytokinesis (Osawa et al., 2008). Given its ubiquity and its central role in bacterial cell division, FtsZ is an attractive target for the development of new antibiotics (Schaffner-Barbero et al., 2012).

FtsZ is composed of two globular subdomains, connected by a long helix (H7) sandwiched between them. Furthermore, FtsZ contains an unstructured extreme C-terminal implicated in interactions between FtsZ and modulatory proteins (Buske and Levin, 2012). Similar to its eukaryotic relative tubulin, FtsZ form protofilaments with GTP (Nogales et al., 1998a) and has a built-in molecular switch that is triggered by nucleotide γ -phosphate hydrolysis and permits assembly-disassembly regulation. The GTPase catalytic site is formed during filament assembly (Lowe and Amos, 1999).

Monomers of FtsZ can exist in two states: the inactive state with low affinity to form polymers and the active state with high affinity for polymerization (Chen and Erickson, 2011, Huecas et al., 2008, Martin-Galiano et al., 2010). The inactive form of FtsZ monomers has been observed in most crystal structures from different species (Oliva et al., 2007), with the cleft between N and C-terminal domains in a closed conformation. The crystal packing from the recently reported *Staphylococcus aureus* FtsZ (SaFtsZ) structure, (Elsen et al., 2012, Tan et al., 2012, Matsui et al., 2012) exhibits a straight filament formed by open-cleft monomers. A structural comparison of SaFtsZ with other FtsZs supports the cleft opening mechanism of the FtsZ assembly switch. However, proof involving the same FtsZ protein, such as a closed-cleft monomeric structure of SaFtsZ molecule or an open filamentous structure of other FtsZs, is required.

The functional importance of FtsZ makes it an interesting drug target for treating infections caused by bacteria. The main cavities available for ligands binding in an FtsZ monomer are the nucleotide-binding cup in the N-terminal domain and the cleft between N and C-terminal domains. The antibiotic PC190723 binds into the cleft and modulates FtsZ assembly by stabilizing its polymers (Andreu et al., 2010, Elsen et al., 2012). FtsZ has been validated as the target of the *in vivo* effective antibacterial compound PC190723 (Haydon et al., 2008).

In this thesis, we study the FtsZ dynamics using unbiased atomistic molecular simulations from representative filament crystal structures. In agreement with experimental data, we find different filament curvatures that are supported by a nucleotide-regulated hinge motion between consecutive FtsZ monomers. Whereas GTP-FtsZ filaments bend and twist in a preferred orientation, thereby burying the nucleotide, the differently curved GDP-FtsZ filaments exhibit a heterogeneous distribution of open and closed interfaces between monomers. We identify a coordinated Mg^{2+} ion as the key structural element in closing the nucleotide site and stabilizing GTP filaments, whereas the loss of the contacts with loop T7 from the neighboring monomer in the GDP filaments leads to open interfaces that are more prone to depolymerization. We monitored the FtsZ monomer assembly switch, which involves opening/closing of the cleft between the C-terminal domain and the H7 helix, and observed the relaxation of isolated and filament minus-end monomers into the closed-cleft inactive conformation. This result validates the proposed switch between the low-affinity monomeric closed-cleft conformation and the active open-cleft FtsZ conformation within filaments. Finally, we observed how the antibiotic PC190723 suppresses the disassembly switch and allosterically induces closure of the intermonomer interfaces, thus stabilizing the filament. These molecular dynamics studies provide detailed structural and dynamic insights into modulation of both the intrinsic

curvature of the FtsZ filaments and the molecular switch coupled to the high-affinity end-wise association of FtsZ monomers.

Also, we have collaborated on the design of fluorescent analogs of PC190723 to probe the FtsZ structural assembly switch. Among them, nitrobenzoxadiazole (NBD) probes specifically bind to assembled FtsZ rather than to monomers. During the FtsZ assembly-disassembly process, the fluorescence anisotropy of the probes changes upon binding and dissociating from FtsZ, thus reporting open and closed FtsZ interdomain clefts. These results demonstrate the structural mechanism of the FtsZ assembly switch. Molecular dynamic simulations of SaFtsZ model complexes with the NBD probes indicated the binding mode of these compounds and suggest a binding site extension along the interdomain cleft. Moreover, we have employed these fluorescent probes to set up a fluorescence anisotropy based displacement assay able to detect new allosteric modulators of FtsZ.

The structural features of FtsZ polymers of *B. subtilis* (BsFtsZ) and truncated BsFtsZ (BsFtsZ- Δ t), lacking the entire C-terminal tail, have been studied by SAXS and Cryo-electron microscopy. BsFtsZ- Δ t showed several striking differences respecting to the full-length protein polymers. Experiments indicate that BsFtsZ polymers are formed by aggregation or annealing of curved filaments bundles with lateral spacing (~ 70 Å) between neighboring protofilaments. However, the truncated protein filaments are held straight in bundles by their close lateral contacts. We propose that the 70 Å spacing between BsFtsZ filaments forming loose bundles is provided by the C-terminal extension. The parallel BsFtsZ- Δ t filaments possibly stick to each other generating the straight bundles, whereas a flexible lateral association allows filament curvature in the full length BsFtsZ.

Virtual screening of large compound libraries is a popular approach to identify new antibacterial agents. Using this technique, it has been identified several hits compounds for the nucleotide-binding site (UCM05 y VS18), however, the compounds tested in the binding site PC, with different structures did not show effect on cells.

UCM05 interacts with the nucleotide-binding site of BsFtsZ ($K_d = 2.3$ μ M) and inhibits the growth of the Gram-positive bacterium *B. subtilis* (MIC = 100 μ M). In order to improve the binding affinity and the antibacterial efficacy of UCM05, new derivatives selected by docking and molecular dynamics experiments were synthesized. The change in the naphthalene core for biphenyl improves the binding affinity and antibacterial efficacy compared to UCM05. For instance, biphenyl derivative **28** stands out as a potent FtsZ inhibitor ($K_d = 0.5$ μ M) with high antibacterial activity [MIC (*B. subtilis*) = 5 μ M and MIC (MRSA) = 7 μ M].

VS18 interacts with the nucleotide-binding site of BsFtsZ ($K_d \approx 90.9$ μ M). However, VS18 does not have antibacterial activity on *B. subtilis* (MIC > 600 μ M). Its chemical structure is used as a starting point for chemical modifications in virtual screening. Of the selected compounds, **29** improve affinity for the binding site respecting to VS18, validating the protocol followed. The most promising compound is el derivado VS33, which replaces the nucleotide ($K_d \approx 6.7$ μ M) and affects bacterial-cell division [MIC (*B. subtilis*) = 50 μ M and MIC (MRSA) = 20 μ M].

The possible binding modes of compounds **28** and VS33 were analyzed by docking and molecular dynamics simulations studies. They provided a simple explanation of the competitive inhibition mechanism for these compounds.

1. Introducción

1. Introducción

1.1. La proteína de división celular FtsZ

FtsZ es una proteína esencial en la división celular bacteriana que se encuentra conservada en la mayoría de los organismos procariotas. Además se han identificado homólogos de FtsZ en cloroplastos de algunas algas, como *Guillardia theta* (Fraunholz et al., 1998), en plantas superiores como *Arabidopsis thaliana* (Vitha et al., 2001) y en mitocondrias de las algas *Mallomonas splendens* y *Cyanidioschyzon merolae* (Beech et al., 2000, Takahara et al., 2000). Solo en escasos organismos procariotas no se encuentra FtsZ. Por ejemplo no está presente en bacterias intracelulares de la familia *Chlamydiaceae* (Vaughan et al., 2004) y *Verrucomicrobia*, que se dividen utilizando la maquinaria de la célula hospedadora, ni en las especies de bacterias de vida libre *Ureoplasma uralyticum* (Glass et al., 2000) y *Rhodopirellula baltica* (Glockner et al., 2003) en las cuales se desconoce cómo se lleva a cabo el proceso de división. Tampoco se encuentra presente en el filo *Crenarchaeota* (Natale et al., 2000), que usa el producto de los genes del operón *cdv* como única maquinaria de división celular.

Estudios de fluorescencia de anticuerpos anti-FtsZ y fusiones con la proteína fluorescente GFP demostraron que FtsZ ensambla en una estructura en forma de anillo (anillo Z) en el interior de la membrana citoplasmática marcando el sitio de división de la bacteria (Bi and Lutkenhaus, 1991, Levin and Losick, 1996, Addinall and Lutkenhaus, 1996). En estos experimentos se observó que FtsZ ensambla gradualmente en la mitad celular y eventualmente se fusiona para formar el anillo Z. La disposición dinámica de los filamentos en el anillo Z y su función aún no son bien conocidas (Erickson et al., 2010, Meier and Goley, 2014, Hajduk et al., 2016, Haeusser and Margolin, 2016). Estudios de microscopía de fluorescencia de súper-resolución han descrito un anillo Z discontinuo formado por agrupaciones relativamente cortas de protofilamentos de FtsZ (Strauss et al., 2012, Buss et al., 2013, Holden et al., 2014, Rowlett and Margolin, 2014, Coltharp et al., 2016). Por el contrario, resultados de crio-microscopía electrónica (crio-EM) han indicado la formación de una capa continua de filamentos de FtsZ a una distancia de $150 \pm 20 \text{ \AA}$ por debajo de la membrana en *E. coli* (Szwedziak et al., 2014). Mediante recuperación de la señal de fluorescencia después de fotoblanqueo (FRAP, del inglés *Fluorescence Recovery After Photobleaching*) se determinó que los anillos son estructuras dinámicas que intercambian FtsZ con el medio cada un promedio de entre 8 y 30 segundos (Anderson et al., 2004).

Aproximadamente el 30% de FtsZ está en el anillo mientras que el resto parece estar en su mayoría en el citoplasma (Anderson et al., 2004). Existen varias proteínas (MinC, SlmA y MipZ) que actúan como reguladores negativos evitando la formación del anillo Z en un lugar distinto a la mitad celular (Cho et al., 2011, Hu et al., 1999, Thanbichler and Shapiro, 2006). En *B. subtilis* y *E. coli* se conocen dos sistemas de regulación negativa, Min (del inglés *minicell*) y NO (del inglés *nucleoid occlusion*). También se sabe de la existencia de otros reguladores en bacterias *C. crescentus* como MipZ.

Además de formar el anillo Z, FtsZ es esencial para la 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 células hijas. Aunque FtsZ no tiene afinidad por la membrana se han observado diferentes proteínas que interaccionan con FtsZ y son las encargadas de anclar el anillo Z a la membrana plasmática, como FtsA y ZipA. FtsA es homóloga estructural de la actina y después de FtsZ es la proteína más conservada en la división celular (van den Ent and Lowe, 2000). FtsA interacciona por un lado con el dominio C-terminal de FtsZ y por otro lado se ancla a la bicapa lipídica a través de una hélice anfipática (Erickson, 2001, Hale and de Boer, 1999). ZipA también se requiere para la unión de FtsZ a la membrana en *E. coli*. ZipA es una proteína de membrana (Margolin, 2000) cuya estructura primaria se encuentra poco conservada en los organismos procariontes. Al igual que FtsA, se une por un lado a la membrana plasmática a través de un dominio transmembrana y por otro a residuos muy conservados de FtsZ. En *E. coli*, ZipA y FtsA ayudan a la formación y estabilización del anillo Z (Pichoff and Lutkenhaus, 2002) mientras que en *B. subtilis* FtsA es imprescindible para el correcto ensamblaje del anillo Z (Jensen et al., 2005).

1.1.1. Estructura de FtsZ

A pesar de la baja similitud de secuencia entre FtsZ y la tubulina eucariota ($\approx 20\%$) son homólogas estructurales (de Pereda et al., 1996). Las estructuras a alta resolución de FtsZ de *M. Jannaschii* (MjFtsZ) y α - y β - tubulina confirmaron la homología estructural entre ambas proteínas (Lowe and Amos, 1998, Nogales et al., 1998b), aunque la unidad funcional de FtsZ es el monómero y la de tubulina es un heterodímero. Ambas proteínas son GTPasas auto-activadas (de Boer et al., 1992, RayChaudhuri and Park, 1992, Mukherjee et al., 1993). En presencia de GTP, FtsZ ensambla formando protofilamentos parecidos a los de tubulina y en ambas el sitio de nucleótido se completa cuando la proteína polimeriza (de Boer et al., 1992, RayChaudhuri and Park, 1992).

El análisis estructural y filogenético divide a las subunidades de FtsZ en cinco regiones: una región desestructurada y pobremente conservada en el extremo N-terminal, un núcleo globular altamente conservado, un segmento desestructurado (CTL) que une el núcleo globular con un corto y bien conservado péptido de unión a FtsA (CTT) y finalmente un pequeño número de residuos variables (CTV) (Lowe and Amos, 1998, Margolin, 2005, Vaughan et al., 2004) (Figura 1 A y B).

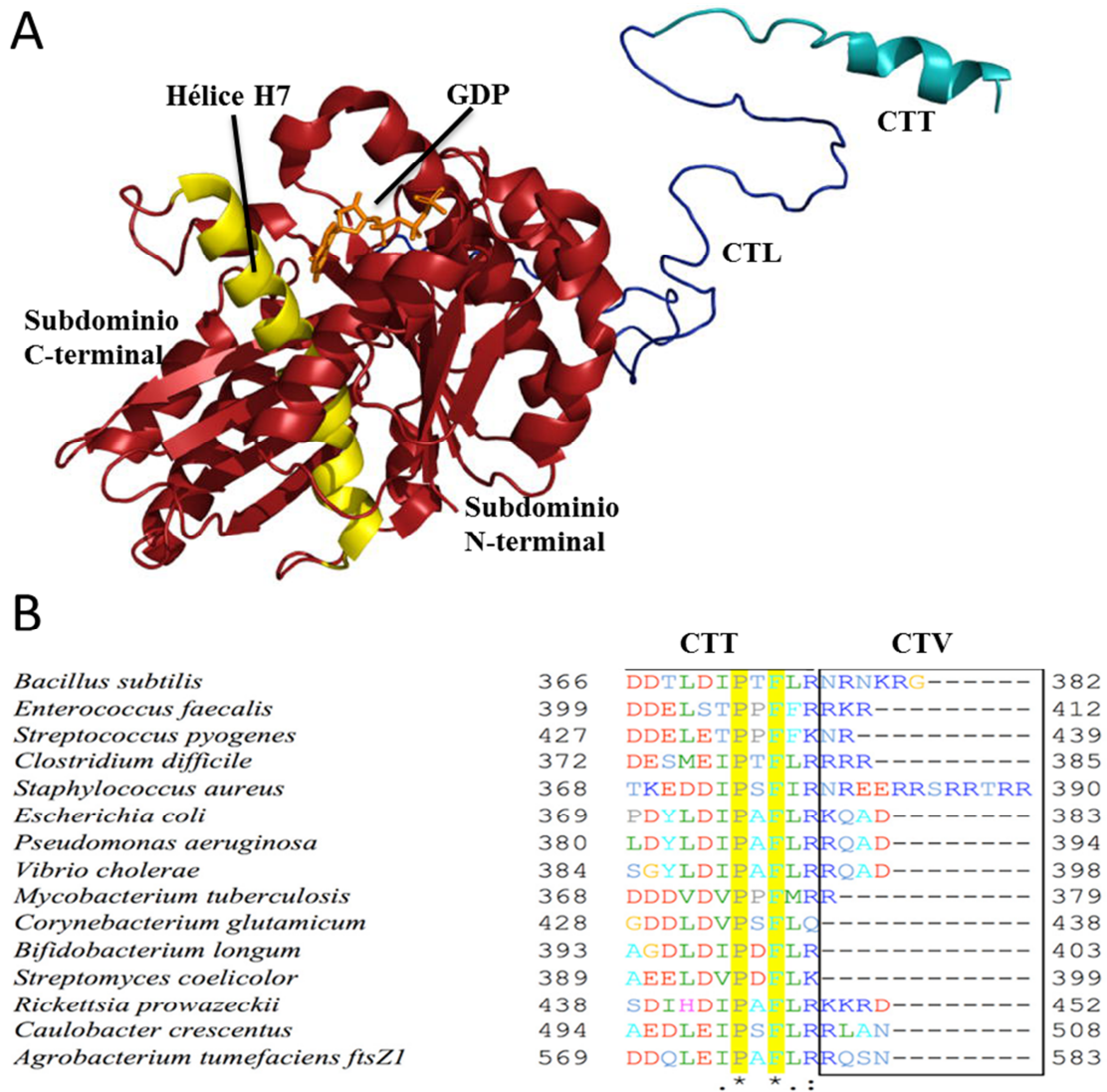


Figura 1. Estructura de FtsZ. A) Estructura de FtsZ de *B. subtilis* (PDB: 2rho). En rojo se representa el núcleo globular con GDP (naranja) unido, excepto la hélice H7 (amarillo) que divide el subdominio N-terminal y el subdominio C-terminal. En azul oscuro se representa el segmento desestructurado (CTL) que une el núcleo globular con el péptido de unión a FtsA y ZipA (CTT), representado en color cian. El CTT se representa como un α -hélice basado en la estructura del cristal del complejo CTT de *E. coli* con ZipA (PDB: 1f47). La región desestructurada N-terminal (los 11 primeros residuos) no se muestran. Figura de Buske *et al.*, 2015. B) Alineamiento de los últimos residuos del C-terminal de FtsZ de 15 organismos diferentes. La región del CTV es encerrada en un recuadro. Figura de Buske *et al.*, 2012.

El núcleo globular a su vez está dividido en dos subdominios (N y C-terminal) conectados por una hélice central (H7) (Figura 1A). El subdominio N-terminal contiene el sitio de unión de nucleótido y el subdominio C-terminal contiene el bucle “catalítico” T7 implicado en la hidrólisis del GTP.

1.1.2. Ensamblaje de FtsZ

FtsZ es una proteína que une nucleótidos de guanina y ensambla en filamentos por asociación cabeza-cola de subunidades individuales (Figura 2) (RayChaudhuri and Park, 1992, Mukherjee et al., 1993, Huecas and Andreu, 2004). El ensamblaje de FtsZ es dinámico y está asociado a la hidrólisis del GTP. Mientras el GTP favorece la formación de polímeros, el GDP favorece el desensamblaje por la pérdida de su estabilidad (Huecas and Andreu, 2004, Huecas and Andreu, 2003). En los polímeros de FtsZ la hidrólisis del GTP se activa al insertarse el bucle T7 de la subunidad de arriba, que contiene los residuos catalíticos, en el sitio de unión del nucleótido de la subunidad inmediatamente inferior (Lowe and Amos, 1999). Por lo tanto, la actividad GTPasa depende de la polimerización de la proteína (Oliva et al., 2004, Scheffers et al., 2002) (Figura 2 A y B).

El Mg^{2+} tiene un papel relevante en la polimerización y en el comportamiento dinámico de los polímeros (Mukherjee and Lutkenhaus, 1999). El ión Mg^{2+} está coordinado con los fosfatos β y γ del GTP (Lowe and Amos, 1998) y aunque puede ser sustituido por Ca^{2+} durante el ensamblaje (Yu and Margolin, 1997), el comportamiento dinámico de los polímeros se ve reducido (Mukherjee and Lutkenhaus, 1999). En dependencia de las condiciones experimentales, *in vitro* se pueden observar protofilamentos de FtsZ con diferentes morfologías: rectos, curvos, hélices y anillos (Chen and Erickson, 2005, Mukherjee and Lutkenhaus, 1994, Mingorance et al., 2005).

A diferencia de la tubulina, en condiciones estándares *in vivo* FtsZ no forma estructuras altamente ordenadas como microtúbulos (Buske et al., 2015). Sin embargo *in vitro* los filamentos de FtsZ interactúan lateralmente formando manojos y láminas (Buske and Levin, 2012, Romberg and Levin, 2003). Imágenes de microscopía de súper-resolución y crio-EM soportan un modelo en el cual los protofilamentos de FtsZ interactúan lateralmente *in vivo* de forma débil y variando su espesor, alrededor de una circunferencia (Buss et al., 2013, Fu et al., 2010, Li et al., 2007, Pilhofer and Jensen, 2013, Strauss et al., 2012).

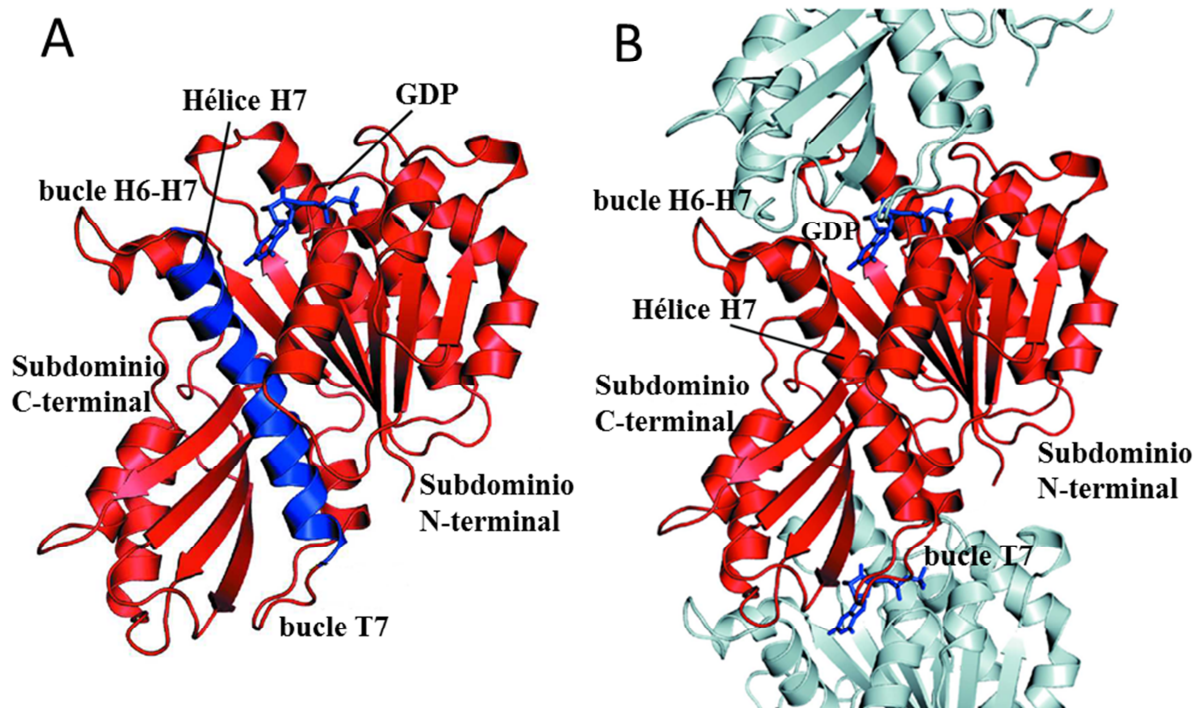


Figura 2. Representación de la estructura cristalográfica de FtsZ de *S. aureus* con GDP unido. A) Se representa en rojo el monómero de FtsZ de *S. aureus*, excepto la hélice H7 (residuos 179-202) y el GDP que están en azul. B) Se muestra la interfaz de polimerización de FtsZ de *S. aureus*. La estructura de un monómero se representa en rojo y las moléculas de los monómeros contiguos en gris. La molécula de GDP se representa en azul. El bucle T7 de la subunidad de arriba se inserta en el sitio de nucleótido de la subunidad de abajo. Figura de Matsui *et al.*, 2012.

El ensamblaje de FtsZ es cooperativo, siendo necesario una concentración mínima de monómeros para que comience la polimerización de la proteína (Huecas and Andreu, 2003, Huecas *et al.*, 2008). En una primera fase (nucleación) se forma un núcleo de polimerización y seguidamente ocurre el crecimiento del polímero de forma cooperativa a partir de ese núcleo (elongación). La formación de protofilamentos simples de FtsZ mediante un ensamblaje cooperativo puede estar asociado a la existencia de un cambio conformacional en el monómero, de forma que aumente su afinidad de interacción. Así, podríamos encontrar el monómero en dos estados diferentes, uno inactivo de baja afinidad y uno activo de alta afinidad para la polimerización (Huecas *et al.*, 2008, Miraldi *et al.*, 2008, Dajkovic *et al.*, 2008). Algunos trabajos han relacionado este cambio conformacional en el monómero con la unión del GTP, por lo que FtsZ actuaría como un interruptor molecular regulado para la polimerización (Martin-Galiano *et al.*, 2010, Chen and Erickson, 2011). Esta hipótesis queda en entredicho debido a que la mayoría de las estructuras cristalográficas de FtsZ, tanto con GTP o GDP corresponden a la conformación inactiva del monómero (Oliva *et al.*, 2004).

No fue hasta hace unos pocos años que se han obtenido estructuras cristalográficas de FtsZ de *S. aureus* (SaFtsZ), en las cuales el empaquetamiento del cristal corresponde a un filamento funcional recto formado por monómeros con el C-terminal rotado (Figura 3A) (Elsen et al., 2012, Tan et al., 2012, Matsui et al., 2012). Estos monómeros contienen la hendidura entre la hélice H7 y el dominio C-terminal en una conformación abierta no vista hasta entonces. La comparación estructural de esta FtsZ con la de *B. subtilis* (BsFtsZ) (Figura 3B) indica el cambio conformacional entre los diferentes estados del monómero, sosteniendo la teoría del interruptor molecular. Sin embargo, probarlo requiere de experimentos que demuestren el cambio conformacional en el monómero de FtsZ de una misma especie.

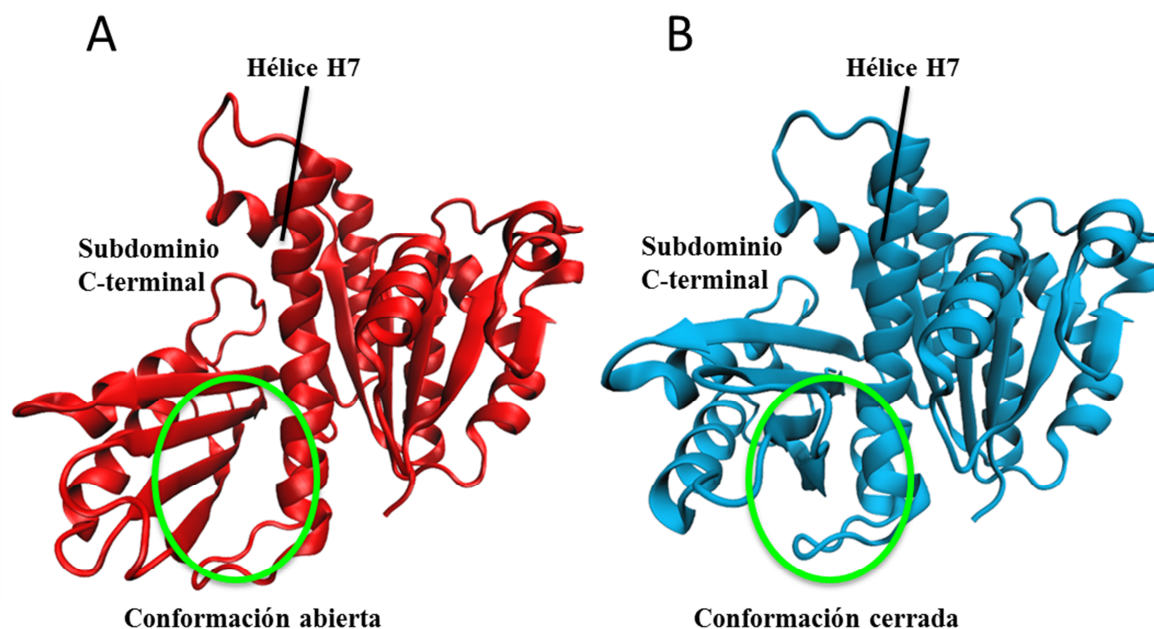


Figura 3. Cambio conformacional observado en el monómero de FtsZ. A) Estructura de FtsZ de *S. aureus* con la hendidura formada entre el dominio C-terminal y la hélice H7 en la conformación abierta (PDB: 3vo8). B) Estructura de FtsZ de *B. subtilis* con la hendidura en la conformación cerrada (PDB: 2rhl).

1.1.3. Región desestructurada C-terminal de FtsZ y su importancia en las interacciones laterales

El dominio C-terminal de FtsZ es fundamental para el ensamblaje de la proteína y para las interacciones entre protofilamentos de FtsZ (Lowe and Amos, 1999, Oliva et al., 2003). Además participa en la unión con otras proteínas, como es el caso de las proteínas de unión a membrana ZipA y FtsA (Ma and Margolin, 1999, Mosyak et al., 2000, Haney et al., 2001).

Como se indicó anteriormente el extremo del dominio C-terminal de FtsZ contiene un segmento desestructurado (CTL) que une el núcleo globular con un corto y conservado péptido de unión a FtsA (CTT) y finalmente un pequeño número de residuos variables (CTV) (Lowe and Amos, 1998, Margolin, 2005, Vaughan et al., 2004).

El segmento desestructurado (CTL) varía su longitud en las distintas especies bacterianas (por ejemplo en *B. subtilis* y *E. coli* tiene aproximadamente 50 residuos, pero puede alcanzar hasta 300 en otras especies de bacterias) (Vaughan et al., 2004). Este segmento es necesario para el ensamblaje de la proteína y para la formación del anillo citoquinético (Gardner et al., 2013, Buske and Levin, 2013) y juega un rol crítico en la unión de los filamentos a las proteínas de unión a membrana (Buske et al., 2015). El segmento intrínsecamente desestructurado se requiere también para la regulación del entrecruzamiento en la pared celular (Sundararajan et al., 2015). Estudios realizados en *B. subtilis* y *E. coli* muestran que diferentes longitudes del segmento CTL (entre 25 y 95 residuos) pueden funcionar en estas especies y solo producen un pequeño deterioro de la función de FtsZ. Sin embargo longitudes por encima de 100 aminoácidos afectan la función *in vivo* de FtsZ (Gardner et al., 2013, Buske and Levin, 2013). La reducción de la longitud del segmento en un 50% (de ~ 50 a ~ 25 residuos en BsFtsZ) solo tiene un pequeño efecto en el ensamblaje de BsFtsZ, pero la sustitución del segmento en FtsZ de *E. coli* (EcFtsZ) por un segmento mucho más corto (< 24 residuos) resulta en una proteína no funcional (Gardner et al., 2013, Buske and Levin, 2013).

El péptido CTT es crítico para las interacciones entre FtsZ y diferentes proteínas moduladoras. FtsA y ZipA requieren de este péptido para su interacción con FtsZ en *E. coli* (Ma and Margolin, 1999, Mosyak et al., 2000, Haney et al., 2001). En *Caulobacter crescentus*, la supresión de este péptido afecta la interacción FtsZ-FtsA y produce la localización de FtsZ en diferentes zonas (Din et al., 1998). Algunas mutaciones en el péptido son resistentes a la sobreexpresión del inhibidor de división MinC/MinD y al menos hay un mutante incapaz de unir MinC *in vitro* (Shen and Lutkenhaus, 2009). EzrA, un inhibidor del ensamblaje de FtsZ en *B. subtilis* no interacciona con la proteína truncada en los últimos 16 residuos que incluye el péptido conservado (Singh et al., 2007). La mayoría de los residuos del péptido CTT, implicados en la interacción con proteínas moduladoras están bien conservados en FtsZ de diferentes especies como es el caso de los residuos Asp-373, Ile-374, Phe-377 y Leu-378 (*E. coli*) que están implicados en la interacción con FtsA, MinC y ZipA (Figura 1B) (Buske and Levin, 2012).

A diferencia del CTT, el CTV es altamente variable tanto en secuencia como en longitud (Figura 1B). En BsFtsZ, esta región está compuesta por 6 residuos, pero se extiende hasta 10 residuos en SaFtsZ. Además esta región puede tener carga negativa, positiva o ser neutra. Buske y Levin, demostraron que en *B. subtilis* el CTV es suficiente y necesario para promover interacciones laterales entre protofilamentos de FtsZ en ausencia de proteínas moduladoras. Además, cambios en el CTV de BsFtsZ afectan la estabilidad del anillo Z, lo que sugiere que las interacciones laterales tienen importantes implicaciones *in vivo* (Buske and Levin, 2012).

1.1.4. Función de los polímeros de FtsZ

Aunque no hay duda de la importancia de la FtsZ, existe bastante controversia sobre el papel que juegan los polímeros de FtsZ en la división celular bacteriana. Hay varios modelos diferentes para explicar la función de los polímeros. En el “modelo andamio” los polímeros de FtsZ que forman el anillo Z servirían como armazón para la unión y ensamblaje de otras proteínas del divisoma que serían las responsables de la constricción de la membrana (Li et al., 2007). Este modelo no explica por qué FtsZ anclada a una membrana es capaz de producir por sí misma constricción en liposomas (Osawa et al., 2008). Sin embargo, recientes estudios de microscopía de súper-resolución *in vivo* en *E. coli* en los cuales no se observa una relación entre la velocidad del cierre del septum y variaciones del anillo Z (incluyendo la actividad GTPasa de FtsZ, la densidad molecular del anillo y los tiempos de ensamblaje/desensamblaje del anillo Z) apoyan este modelo (Coltharp et al., 2016).

Hay otros dos modelos que asumen que FtsZ puede por sí misma producir la fuerza de constricción necesaria; el modelo “deslizante” (Lan et al., 2009, Monahan et al., 2009) y el de “pinzamiento iterativo” (Lu et al., 2000, Li et al., 2007, Erickson, 2009). En el primero se propone que la fuerza de constricción procede de las interacciones laterales entre protofilamentos adyacentes, que se deslizan favorecidos por un aumento de las interacciones. Estos protofilamentos al estar anclados a la membrana a través de FtsA y ZipA producen la fuerza para la constricción de la membrana. Szwedziak y colaboradores encapsularon FtsZ y FtsA de *Thermotoga maritima* en liposomas de tamaño similar a las células y obtuvieron imágenes de alta resolución de anillos en los perímetros de liposomas que coinciden con los sitios de constricción. Ellos proponen que los anillos encontrados fomentan un mecanismo de constricción basado en el deslizamiento lateral de las hebras de la espiral que forman el anillo Z (Szwedziak et al., 2014). En el modelo de “pinzamiento iterativo” se propone que la fuerza

de constricción viene dada por un cambio conformacional en los polímeros de FtsZ debido a la hidrólisis del GTP. El intercambio de nucleótido produciría una transición de una conformación “recta” con GTP a una conformación “curva” con GDP. Este modelo sustentaría la constricción de liposomas solo por FtsZ.

1.2. Simulaciones de Dinámica Molecular

La dinámica molecular (DM) es una herramienta esencial en el estudio de biomoléculas (Orozco, 2014, Hospital et al., 2015, Bermudez et al., 2016, Guvench, 2015) y clave en el desarrollo de nuevos fármacos (Ghanakota and Carlson, 2016, McRobb et al., 2016, Fox et al., 2016, Aci-Seche et al., 2016). La primera simulación de DM de una proteína fue realizada por McCammon y cols. (Mccammon et al., 1977) y desde entonces se han usado para estudiar procesos dinámicos complejos en los sistemas biológicos como son la estabilidad de las proteínas, cambios conformacionales, reconocimiento molecular de biomoléculas, entre otros.

La DM simula la evolución en el tiempo de un sistema de partículas a partir de una configuración inicial mediante la integración numérica de las ecuaciones del movimiento de Newton, $F = m * a$, donde F es la fuerza ejercida sobre una partícula, m la masa de la partícula y a la aceleración. Para la simulación de DM de proteínas la configuración inicial se puede tomar de estructuras determinadas por rayos-X, resonancia magnética nuclear (RMN) o modelos por homología. El resultado es una trayectoria en la cual las posiciones y velocidades de los átomos varían con el tiempo.

La trayectoria se obtiene resolviendo la ecuación diferencial contenida en la segunda ley de Newton:

$$\frac{d^2 x_i}{dt^2} = \frac{F_i}{m_i}$$

que describe el movimiento de una partícula i de masa m_i a lo largo de la coordenada x_i , siendo F_i la fuerza aplicada y t el tiempo.

La fuerza que actúa sobre cada átomo en un instante de tiempo t se determina mediante la derivada de la energía potencial con respecto a las coordenadas:

$$F = - \frac{\delta E_{pot}}{\delta x}$$

Al conjunto de funciones de potencial y parámetros necesarios para determinar la energía del sistema a lo largo del tiempo se le denomina campo de fuerzas. Sumando sobre cada átomo las fuerzas de interacción con las demás partículas del sistema se obtiene la fuerza total a partir de la cual podemos determinar las aceleraciones de las partículas, que se combinan posteriormente con las posiciones y velocidades a tiempo t para calcular las posiciones y velocidades a tiempo $t + \delta t$. Hay varios algoritmos para integrar las ecuaciones de movimiento, pero el más utilizado en el estudio de biomoléculas es el algoritmo de Verlet (Verlet, 1967) del que existen varias versiones además del método original, el del salto de la rana (leapfrog) (Hockney et al., 1974) y el de la velocidad de Verlet (Swope et al., 1982).

Los campos de fuerzas pueden haber sido determinados empíricamente o por cálculos *ab initio*. Diferentes modelos de campos de fuerzas se han desarrollado como son los populares AMBER (Weiner et al., 1984, Hornak et al., 2006), GROMOS (Oostenbrink et al., 2004, Scott et al., 1999), CHARMM (MacKerell et al., 1998, MacKerell et al., 2004), OPLS (Jorgensen et al., 1996, Kaminski et al., 2001), entre otros. Aunque cada campo de fuerzas usa sus propios parámetros y términos de energía, la mayoría consideran la energía potencial del sistema como la suma de las energías de los átomos enlazados covalentemente (energía de enlace, energía de los ángulos de enlaces, energía de los ángulos de torsión) y las energías de las interacciones de los átomos no enlazados (Coulomb y Van der Waals).

La elección del tiempo de integración δt es crucial, ya que durante este tiempo las fuerzas no se recalculan y el sistema tiende a seguir en el mismo estado. Un tiempo de integración demasiado grande daría lugar a inestabilidades por solapamiento de altas energías entre átomos. En el caso de las biomoléculas, los movimientos de frecuencia más rápida son aquellos debidos a las vibraciones de los enlaces, que tienen lugar en la escala del femtosegundo. Sin embargo estos movimientos rápidos son de menos interés ya que contribuyen poco al movimiento global. Por lo tanto se suele fijar la longitud de los enlaces covalentes a sus valores de equilibrio, para lo cual se pueden usar varios algoritmos como SHAKE (Ryckaert et al., 1977, Krautler et al., 2001), RATTLE (Andersen, 1983) y LINC (Hess et al., 1997). Al evitar estos rápidos movimientos se puede incrementar el tiempo de integración a 2 fs sin introducir inestabilidades y reduciendo el coste computacional.

Para tener en cuenta el efecto del solvente en las simulaciones de DM existen dos modelos teóricos: 1) se trata al solvente de forma explícita, en el cual las moléculas de agua y los iones se sitúan alrededor del soluto y los parámetros de estas moléculas están

representados en el campo de fuerzas (Bizzarri and Cannistraro, 2002); en esta categoría se encuentran los modelos SPC (Berendsen et al., 1987), TIP3P (Jorgensen et al., 1983), TIP4P (Jorgensen and Madura, 1985), etc. y 2) el solvente se considera de forma implícita (modelos del continuo) (Tomasi and Persico, 1994, Tomasi et al., 2005, Cramer and Truhlar, 1999).

Los diferentes campos de fuerzas y modelos de solventes están implementados en una variedad de paquetes de programas utilizados para realizar simulaciones de DM, tales como GROMACS (Van der Spoel et al., 2005b, Hess et al., 2008b), Desmond (Bowers et al., 2006), CHARMM (Brooks et al., 2009, Brooks et al., 1983), AMBER (Case et al., 2005, Salomon-Ferrer et al., 2013) y NAMD (Phillips et al., 2005).

Una de las limitaciones de la DM es el tiempo de cálculo. Para acelerarlo se aplican: 1) distancias de corte para las interacciones y 2) condiciones de contorno.

1) Se establece una distancia de corte a partir de la cual las interacciones entre pares de átomos no enlazados no se calculan, esto afecta principalmente al término electrostático; por ello es recomendable el uso de métodos como el sumatorio de Ewald (PME) (Essmann et al., 1995) que permite corregir el sistema al sumar las interacciones con infinitos sistemas réplicas del original. El método se basa en dividir la suma de las interacciones en dos sumatorios: el espacio directo y el espacio recíproco.

2) Se definen condiciones periódicas de contorno (PBC) (Figura 4) reduciendo el número de partículas de solvente del sistema y evitando un efecto abrupto en los bordes de la caja definida para los cálculos. Las PBC permiten el cálculo de la simulación como si el sistema fuera infinito en el espacio. La Figura 4 ilustra el concepto de las PBC. La caja sombreada en azul representa el sistema que estamos simulando mientras que las cajas que lo rodean son copias exactas con todo detalle: cada partícula en la simulación tiene un duplicado exacto en cada celda que la rodea. Incluso las velocidades son las mismas. El resultado es que aunque un átomo se vaya de la celda de la simulación, éste se reemplaza por otro que entra por la cara contraria, exactamente con la misma velocidad. De esta manera el número de átomos en la celda se conserva y además ninguna partícula sufre los efectos de las fuerzas del límite de la simulación. La forma y tamaño de las cajas depende de la geometría del sistema, usándose cajas octaédricas y rectangulares para el estudio de proteínas.

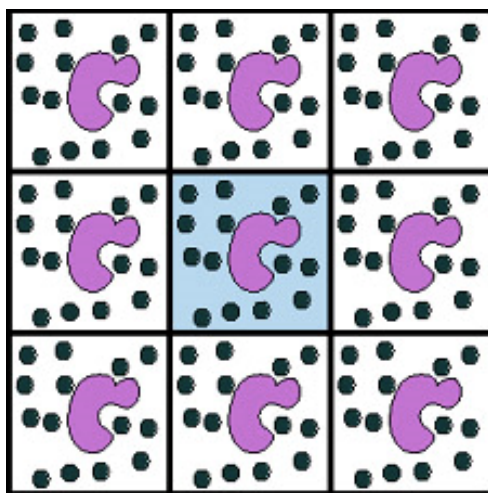


Figura 4. Representación esquemática de las condiciones periódicas de contorno (PBC) en dos dimensiones.

Otra consideración importante es el tamaño de la caja que debe ser tal que el soluto no pueda interactuar con una copia de sí mismo representada en el espacio, por lo cual debe haber suficiente disolvente en cada dirección del soluto para que la distancia desde cualquier punto de éste hasta cualquiera de sus copias vecinas sea mayor que la distancia de corte (cutoff) establecida para las interacciones de átomos no enlazados.

Etapas de un protocolo de simulación de DM

El protocolo para las simulaciones de DM se divide en tres fases principales: (1) Preparación de los sistemas, (2) calentamiento y equilibrado y (3) producción.

1) Preparación de los sistemas: En primer lugar es necesario establecer una configuración inicial del sistema. Dicha estructura puede adquirirse de datos experimentales de rayos-X, RMN o de modelos teóricos. Se realiza la minimización de energía del sistema. Aplicando la mecánica molecular, se realiza la búsqueda de conformaciones en mínimos energéticos mediante el ajuste de ángulos, distancia de enlaces y otras variables del campo de fuerzas seleccionado, eliminando posibles fallos en la configuración inicial tales como choques estéricos entre átomos o valores inapropiados en sus ángulos. Entre los principales algoritmos de minimización están el de máxima pendiente o *steepest descent* y el del gradiente conjugado. El método *steepest descent*, usado como aproximación inicial en sistemas muy alejados de un mínimo energético, utiliza el cómputo de la fuerza para guiar el sistema por el camino más rápido sobre la superficie energética hasta el siguiente mínimo local. El método del gradiente conjugado, al almacenar información de las conformaciones por las que va pasando durante la búsqueda, es más eficiente que el anterior para optimizar la conformación dado un mínimo energético cercano (Abad et al., 2012).

2) Calentamiento y equilibrado: El objetivo del equilibrado es llevar al sistema a un estado de equilibrio a partir de la configuración inicial. Durante esta fase se monitorizan varios parámetros como la energía potencial, la temperatura y la densidad hasta que llegan a un valor estable. Una buena estrategia para conseguir un equilibrado óptimo es aplicar restricciones al sistema (por ejemplo mantener fijo el esqueleto peptídico de la proteína), y liberarlas lentamente para facilitar su adaptación a las condiciones deseadas. En este paso se establecen las PBC (Makov and Payne, 1995). Las PBC consideran que los átomos cercanos a la superficie de la caja están sometidos a los potenciales creados por átomos homólogos de las paredes opuestas y viceversa, pudiendo en algún caso cruzar de un lado a otro si esto fuese necesario, reduciendo el efecto de los bordes. Se asignan velocidades iniciales a los átomos de la estructura que previamente ha sido minimizada. Este paso normalmente se realiza de forma aleatoria a partir de una distribución Maxwell-Boltzmann a la temperatura elegida. Finalmente, es preciso mantener fijas algunas de las condiciones de simulación: número de partículas (N), volumen (V), temperatura (T), presión (P) o energía total del sistema (E). En función de sus combinaciones se puede distinguir entre simulaciones microcanónicas (NVE), isotérmico-isobáricas (NPT) y canónicas (NVT), siendo NPT y NVT las más empleadas en DM de proteínas.

3) Producción y análisis de trayectorias: Una vez que el sistema se encuentra en equilibrio comienza la fase de producción en la cual permitimos la evolución del sistema. Las coordenadas y velocidades de los átomos en el tiempo son almacenadas obteniéndose una trayectoria que será utilizada para el análisis y la obtención de información; a partir de esta trayectoria se pueden determinar los valores promedios de las propiedades del sistema. Muchos de los paquetes empleados en las simulaciones de DM contienen diferentes herramientas para el análisis de las trayectorias. También se suelen usar herramientas para la visualización de las estructuras entre las que se encuentran VMD (Humphrey et al., 1996) y CHIMERA (Pettersen et al., 2004), las cuales además pueden ser utilizadas para el cálculo de diferentes parámetros de los sistemas simulados.

1.2.1. Simulaciones de DM de FtsZ

La proteína de división celular FtsZ y otras proteínas del citoesqueleto bacteriano han sido ampliamente estudiadas utilizando simulaciones de DM (Chu and Voth, 2005, Wells and Aksimentiev, 2010). Los diferentes estudios de FtsZ han empleado monómeros o dímeros de estructuras cristalográficas de archaeas o micobacterias (Hsin et al., 2012, Li et al., 2013,

Gonzalez de Prado Salas et al., 2014, Natarajan and Senapati, 2013, Mendieta et al., 2009, Jamous et al., 2014, Martin-Garcia et al., 2012) cuyas estructuras se encuentran en la conformación inactiva, con la hendidura entre los dominios N y C-terminal en la conformación cerrada.

Natarajan y Senapati y Jamous y cols. (Natarajan and Senapati, 2013, Jamous et al., 2014) estudiaron el efecto del nucleótido y del ión Mg^{2+} en monómeros de FtsZ, sin embargo lo ideal sería estudiarlo en el filamento ya que el sitio de nucleótido se encuentra en la interfaz de polimerización. Otros trabajos han utilizado el dímero de MjFtsZ para estudiar el efecto de diferentes iones monovalentes (Na^+ o K^+) en la interfaz de polimerización (Mendieta et al., 2009) o han construido filamentos de hasta 5 monómeros para estudiar las características de las interfaces entre subunidades (Martin-Garcia et al., 2012). En estas investigaciones los autores observaron la importancia del potasio en la localización de las moléculas de agua en la interfaz, aunque las simulaciones de DM realizadas son de solo 5 y 8 ns respectivamente. En el trabajo de Hsin y cols. (Hsin et al., 2012) se estudió el efecto del nucleótido por simulaciones de DM de 320 ns del dímero de MjFtsZ con GTP y GDP. Los autores verifican diferentes ángulo de curvatura (en una dirección preferente) en dependencia del nucleótido unido, en correspondencia con algunos estudios experimentales previos (Osawa et al., 2008, Osawa et al., 2009, Osawa and Erickson, 2011). De Prado Salas y cols. (Gonzalez de Prado Salas et al., 2014) determinaron la curvatura y torsión de los filamentos mediante un modelo basado en datos de simulaciones de DM de un pentámero de MjFtsZ. En el trabajo destacan la importancia de la torsión en la distribución y función de los filamentos de FtsZ.

Aunque estos trabajos han aportado nuevos conocimientos sobre varios aspectos de la dinámica de FtsZ, tienen varios inconvenientes. Uno de los problemas es que en algunos casos las simulaciones de filamentos no fueron suficientemente largas, pero sin lugar a dudas el principal inconveniente es que en ningún caso estuvieron basados en estructuras de filamentos funcionales de FtsZ con el interruptor molecular en la conformación activa necesaria para la polimerización de la proteína (Huecas et al., 2008, Miraldi et al., 2008, Dajkovic et al., 2008).

Precisamente, en esta tesis nosotros nos planteamos estudiar los cambios conformacionales de los filamentos de SaFtsZ con diferentes nucleótidos realizando extensas simulaciones de DM basadas en las estructuras cristalográficas de los filamentos funcionales

de FtsZ (Tan et al., 2012, Matsui et al., 2012), en las cuales el interruptor molecular se encuentra activado para la polimerización de la proteína.

1.3. FtsZ constituye una diana para la búsqueda de nuevos antibióticos

El incremento en la utilización de los antibióticos, su mal uso y otros factores relacionados, han dado lugar en las últimas décadas a la emergencia de cepas resistentes (Davies and Davies, 2010). Las bacterias han desarrollado diversos mecanismos de resistencias para sobrevivir a la acción de los antibióticos. Según el centro para la prevención y control de enfermedades infecciosas de Estados Unidos (CDC), al menos dos millones de personas se infectan cada año en Estados Unidos por gérmenes multirresistentes y al menos 23000 personas mueren anualmente como consecuencia directa de esta infección (Burns, 2014). Además del gran problema para la salud que supone el desarrollo y aumento de la resistencia a los antimicrobianos se encuentra el incremento del coste económico que supone la lucha frente a estos patógenos. El ECDC estimó que los costes derivados de las resistencias antimicrobianas en la UE suponían un gasto de 1.5 billones de euros (ECDC and Group, 2009).

La inhibición de la división celular y principalmente de FtsZ ha demostrado ser una prometedora estrategia para contrarrestar la resistencia de las bacterias a los antibióticos actuales. En los últimos años, diferentes compuestos han sido reportados como moduladores de la dinámica de ensamblaje/desensamblaje de FtsZ, algunos de los cuales mostraron buenas perspectivas en la actividad antibacteriana contra importantes patógenos humanos e incluso fueron eficaces en modelos de infección *in vivo* (Sass and Brotz-Oesterhelt, 2013). El descubrimiento del compuesto PC190723 (PC) que se une a FtsZ y es efectivo frente a *S. aureus* resistente a meticilina ha validado esta proteína como una diana para el descubrimiento de nuevos fármacos (Haydon et al., 2008).

El mecanismo de acción de muchos de los compuestos que interaccionan con FtsZ y modulan la dinámica de ensamblaje/desensamblaje de la proteína aún está por determinar y en muchos casos se desconoce el sitio de unión a FtsZ (Schaffner-Barbero et al., 2012). Se han descrito dos sitios principales para la unión de ligandos que afectan la función de FtsZ, el sitio de unión de nucleótido y el sitio de unión de PC (Figura 5). Sin embargo no se pueden descartar otros posibles sitios de unión ya que se ha demostrado que algunos ligandos que interaccionan con FtsZ y poseen actividad antimicrobiana no se unen a ninguno de los dos

anteriores (Ruiz-Avila, 2013).

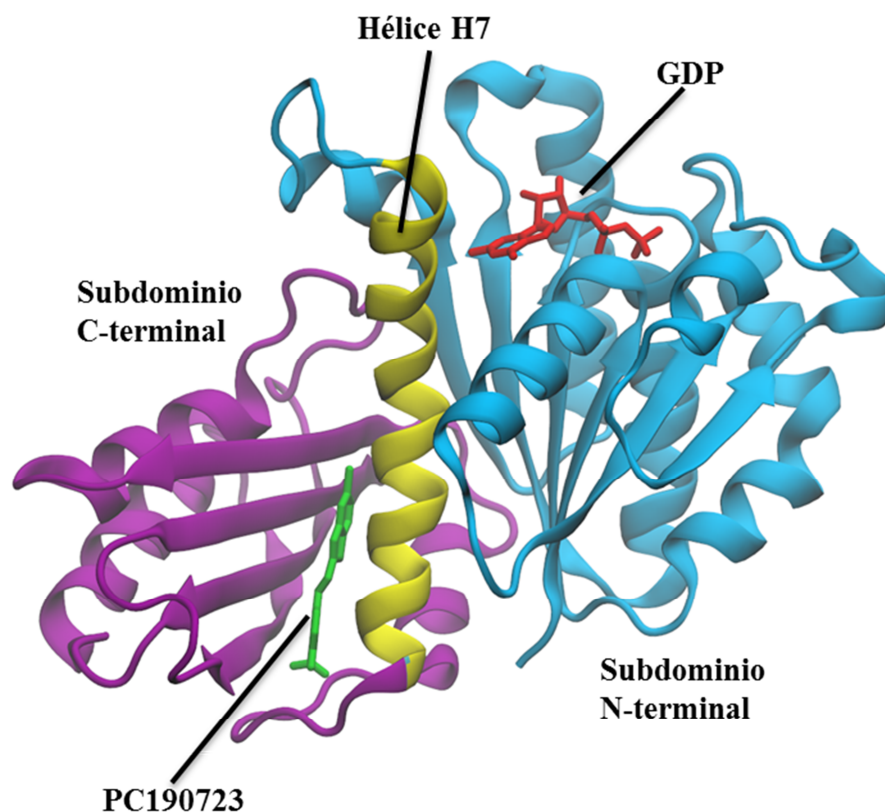


Figura 5. Representación de dos sitios de unión de FtsZ. Se muestra la estructura cristalográfica del complejo SaFtsZ-GDP-PC. El GDP (rojo) y el PC190723 (verde) se representan en sus respectivos sitios de unión. El sitio de nucleótido se encuentra en el subdominio N-terminal y se completa con la polimerización de la proteína. El PC190723 se inserta en la hendidura formada entre el dominio C-terminal y la hélice H7.

1.3.1. Sitio de unión de nucleótido

El sitio de unión de nucleótido es conservado en FtsZ de las distintas especies bacterianas (Oliva et al., 2007). En presencia de GTP la proteína ensambla, mientras que la hidrólisis del GTP produce su desensamblaje. La actividad GTPasa de FtsZ es crucial para la dinámica de los polímeros, por lo que perturbar esta dinámica constituye una buena estrategia para interferir en la función natural de FtsZ e inhibir el crecimiento bacteriano. El sitio de nucleótido de FtsZ es por tanto atractivo para la búsqueda de inhibidores específicos.

La alta homología estructural y de secuencia en la zona de unión del nucleótido entre la tubulina eucariota y FtsZ hace difícil la búsqueda de inhibidores selectivos a FtsZ, sin embargo algunos compuestos derivados de GTP con sustituciones en el carbono 8 (C8 derivados) (Lappchen et al., 2008) han demostrado que se puede inhibir la polimerización y

actividad GTPasa de FtsZ sin afectar el ensamblaje de tubulina. Desafortunadamente estos análogos de GTP no presentan actividad antimicrobiana, pero su estudio ha sido importante para el diseño y búsqueda de nuevos inhibidores selectivos para FtsZ. Otros compuestos no análogos de GTP también han sido descritos como inhibidores de la actividad GTPasa de FtsZ, entre ellos la crisofaentina A, que compite por el sitio con el GTP y posee una potente actividad antimicrobiana (Keffer et al., 2013)

1.3.2. Sitio de PC

En el año 2008 se identificó el derivado de benzamida PC como un inhibidor de FtsZ con potente y selectiva actividad antibacteriana frente a *S. aureus* (Haydon et al., 2008). La estructura cristalográfica del complejo SaFtsZ-PC muestra un nuevo sitio de unión de inhibidores en FtsZ diferente al sitio de unión de nucleótido (Tan et al., 2012, Matsui et al., 2012, Elsen et al., 2012). El PC se une en la hendidura entre la hélice H7 y el dominio C-terminal en FtsZ (Figura 5) y promueve la polimerización (Andreu et al., 2010). Su mecanismo de acción es similar al de taxol en tubulina actuando como agente estabilizante (Andreu et al., 2010), aunque los sitios de unión en FtsZ y tubulina no son iguales (Matsui et al., 2012).

Basados en las características del PC se han descrito los compuestos 8J (Haydon et al., 2010) y posteriormente el “compuesto 1” (Stokes et al., 2013) con mejoras importantes en la actividad antimicrobiana frente a MRSA. Además se han desarrollado varias prodrogas (TXY436, TXY541, TXA709) que mejoran las características farmacocinéticas del PC (Kaul et al., 2013a, Kaul et al., 2013b, Kaul et al., 2015).

1.4. Aplicación de cribado virtual y ajuste molecular (“docking”) en la búsqueda de nuevos inhibidores

1.4.1. Ajuste molecular (“docking”) proteína-ligando

El ajuste molecular (del inglés *docking*; que es el término que utilizaremos en adelante) se ha convertido en un componente esencial de los programas de descubrimiento de fármacos *in silico* a pesar de que sigue siendo un área de investigación en desarrollo. Esta técnica se utiliza para predecir la posición, orientación y conformación nativa de una molécula pequeña (ligando) en el centro activo de la proteína de interés (Halperin et al., 2002, Sousa et al., 2006, Ferreira et al., 2015, Meng et al., 2011).

En términos generales, el “docking” puede describirse como la combinación de un algoritmo de búsqueda que trata de sugerir distintas disposiciones del ligando y una función de puntuación cuyo objetivo es la identificación del modo de unión nativo. El número de posibles modos de unión de un ligando con la superficie de la proteína es virtualmente infinito. Por ello, el algoritmo de búsqueda debe ser lo suficientemente rápido y efectivo como para cubrir homogéneamente el espacio conformacional, incluyendo poses que estén muy próximas al modo de unión nativo. La función de puntuación por su parte necesita capturar adecuadamente la termodinámica de la interacción proteína-ligando para poder distinguir los modos de unión correctos (los cuales idealmente deben corresponder con el mínimo global de la función) del resto de los modos de unión propuestos por el algoritmo de búsqueda.

Cuando el ligando y la proteína se unen adaptan mutuamente sus conformaciones, por lo que el cambio conformacional que se produce para la interacción debería tenerse en cuenta en los algoritmos de “docking”. Sin embargo, el gran número de grados de libertad hace que se produzca una explosión combinatoria del espacio conformacional. Por ello la mayoría de los algoritmos de “docking” solo tratan la flexibilidad del ligando y mantienen la proteína rígida. Esto puede no ser un problema en ciertos sistemas donde solo se producen pequeños cambios conformacionales tras la unión, pero en los casos donde se desconocen los efectos que sufre la proteína por su interacción con el ligando es necesario utilizar un método que tenga en cuenta su flexibilidad. En los últimos años se han explorado diferentes alternativas para tratar la flexibilidad de la proteína, entre ellas la realización de simulaciones de DM para un conjunto de complejos proteína-ligando, habitualmente obtenidos de poses generadas y evaluadas en un “docking” previo. Una aproximación interesante es utilizada por el programa ICM (Totrov and Abagyan, 1997) que acopla un conjunto de conformaciones del receptor en una sola simulación de “docking” reduciendo así el tiempo de muestreo. Esta estrategia se denomina “docking” 4-dimensional (4D) (Bottegoni et al., 2009). Las diferentes conformaciones se pueden obtener previamente de estructuras cristalográficas, modelos generados por análisis de modos normales de vibración o simulaciones de DM.

1.4.2. Cribado virtual

Tradicionalmente la búsqueda de nuevos fármacos se ha desarrollado mediante el cribado de proteínas usando robots especializados (Agresti et al., 2010). Este proceso tiene varios inconvenientes como la baja velocidad de cribado y el alto coste de los compuestos.

Ante estos inconvenientes del cribado experimental, el uso de métodos computacionales para la selección de posibles candidatos a fármacos entre extensas librerías de compuestos (Irwin and Shoichet, 2005, Gromiha et al., 2009, Gromiha et al., 1999), representa una rápida y efectiva aproximación (Bajorath, 2002). En la actualidad hay muchos programas de cribado virtual disponibles; entre los más utilizados están Glide (Friesner et al., 2004, Halgren et al., 2004), ICM (Totrov and Abagyan, 1997), GOLD (Jones et al., 1995, Jones et al., 1997), Lead Finder (Stroganov et al., 2008, Novikov et al., 2012), Autodock Vina (Trott and Olson, 2010), rDock (Ruiz-Carmona et al., 2014), FlexX (Rarey et al., 1996), DOCK (Kuntz et al., 1982), VSDMIP (Gil-Redondo et al., 2009, Cabrera et al., 2011) CRDOCK (Cortes Cabrera et al., 2012), entre otros.

El cribado virtual nos permite explorar bases de datos de varios millones de estructuras químicas en períodos de tiempo del orden de semanas. Existen muchas bases de datos públicas o de libre acceso, como Pubchem (Kim et al., 2016), Zinc (Irwin and Shoichet, 2005) o DrugBank (Wishart et al., 2006).

Para realizar el cribado virtual existen dos aproximaciones; una basada en ligando, donde solo se tiene en cuenta la estructura de los ligandos activos y otra basada en receptor, donde se considera además la estructura del sitio de interacción de la proteína. Ambas se han convertido en una parte clave del proceso de descubrimiento de nuevos fármacos.

1.4.2.1. Basado en la estructura del ligando

El cribado virtual basado en la estructura del ligando se basa en el uso de compuestos activos como plantillas para la búsqueda de otros nuevos. Los métodos empleados en este tipo de búsqueda se pueden agrupar en tres clases: 1) búsqueda por similitud; se basa en el Principio de Similitud de Propiedades (Maggiara and Johnson, 1990), que establece que compuestos similares presentan propiedades similares; 2) búsqueda de farmacóforos, que consiste en definir una serie de características tridimensionales que deben cumplir los ligandos; el patrón farmacofórico se obtiene a partir de un conjunto de ligandos activos (Kim et al., 2010, Horvath, 2011); y 3) métodos basados en aprendizaje automático, en los cuales se genera una regla de clasificación a partir de ligandos activos e inactivos (Karthikeyan and Vyas, 2015, Durrant and Amaro, 2015).

1.4.2.2. Basado en la estructura del receptor

Para este tipo de aproximación lo primero que se necesita como indica su nombre es la

estructura molecular del receptor (proteína diana), que puede ser determinada por cristalografía de rayos-X, RMN o modelado por homología (Davis et al., 2003, Oshiro et al., 2004, Kasimova et al., 2002). En este método suele hacerse uso de los algoritmos de “docking” proteína-ligando para determinar el modo de unión de todos los compuestos existentes en una base de datos con la proteína (Alvarez, 2004, McInnes, 2007, Klebe, 2006). Estos algoritmos deben ser lo suficientemente rápidos como para tratar con un gran número de potenciales soluciones. Las conformaciones que se obtienen se usan para aproximar la energía libre de unión o la afinidad relativa de cada compuesto. Al final del proceso un limitado número de compuestos que potencialmente se unen (desde decenas a miles) pueden ser probados experimentalmente.

1.4.3. El cribado virtual y docking aplicado a la búsqueda de inhibidores de FtsZ

El uso de métodos computacionales es ampliamente utilizado en las primeras etapas del descubrimiento de nuevos fármacos (Jorgensen, 2004, Bajorath, 2002). El cribado virtual de librerías de ligandos ha sido una estrategia usada en la búsqueda de nuevos compuestos con afinidad por FtsZ. Inhibidores de la actividad GTPasa de FtsZ han sido predichos mediante el cribado de una librería de productos naturales (Chan et al., 2013) utilizando la estructura de MjFtsZ (PDB: 1w5b) (Oliva et al., 2004) con el programa ICM versión 3-6-1c (Neves et al., 2012).

Estudios de modelado molecular usando la estructura del cristal de FtsZ también han sido utilizados para optimizar ligandos obtenidos por cribado virtual y mejorar su afinidad por el sitio de unión y actividad antibacteriana. El diseño racional por modelado molecular es una buena estrategia cuando la estructura de la proteína ha sido determinada y se pueden realizar experimentos de “docking”. Por ejemplo, el análisis de la unión del GTP en la estructura de FtsZ revela posiciones en el nucleótido que pueden ser modificadas para obstruir su unión (Lappchen et al., 2005). Experimentos de “docking” con berberina predicen que se une en la hendidura entre dominios de FtsZ e identifica la posición C9-metoxo de la berberina como un posible sitio para realizar modificaciones y optimizar su actividad (Sun et al., 2014).

El uso de modelado molecular también ha sido utilizado para optimizar ligandos que afectan la interacción de FtsZ con otras proteínas. Por ejemplo experimentos de “docking” se han empleado en la optimización de la estructura de un compuesto que inhibe la interacción de FtsZ con ZipA, afectando su función (Sutherland et al., 2003).

2. Objetivos

2. Objetivos

Los objetivos generales de esta tesis incluyen: i) estudiar la dinámica de ensamblaje/desensamblaje de los filamentos de FtsZ mediante simulaciones de DM, ii) caracterizar estructuralmente estos filamentos en solución mediante dispersión de rayos-X a ángulo bajos (SAXS) y microscopía electrónica y iii) el descubrimiento y diseño racional de nuevos inhibidores de la división bacteriana teniendo como diana la FtsZ. Para ellos se plantean los siguientes objetivos concretos:

- ✓ Estudio de la dinámica de ensamblaje/desensamblaje de los filamentos de FtsZ mediante simulaciones de DM con la estructura cristalográfica de SaFtsZ, en la cual el empaquetamiento del cristal corresponde a un filamento funcional recto formado por monómeros con el C-terminal rotado.
 - Se caracterizará la morfología y estabilidad de los filamentos en presencia de los nucleótidos GTP y GDP.
 - Se analizarán los elementos estructurales responsables de la estabilidad de los filamentos y en particular, se caracterizarán las interfaces de interacción entre monómeros dentro de filamentos de GTP y GDP.
- ✓ Estudio del interruptor molecular propuesto para FtsZ, localizado entre el dominio C-terminal y la hélice H7, y su rol en el ensamblaje de los filamentos.
 - Se estudiará mediante simulaciones de DM los posibles cambios conformacionales del interruptor.
 - Mediante técnicas de “docking” y DM se colaborará en el diseño racional de una sonda fluorescente derivada del inhibidor PC.
 - Se correlacionarán los cambios observados en las simulaciones con los cambios de anisotropía de la sonda fluorescente al unirse en la hendidura del interruptor de FtsZ.
- ✓ Estudio del efecto estabilizador del antibiótico PC.
 - Se caracterizará la morfología y estabilidad de los filamentos con GDP y PC

unido.

- Se comparará las interacciones entre monómeros en las interfaces de los filamentos con GDP+PC con las interacciones en los filamentos que carecen de PC.

- ✓ Caracterización estructural de los filamentos y agregados de orden superior de FtsZ en solución por SAXS y crio-EM.
 - Se caracterizará la curvatura y organización de los filamentos de BsFtsZ con los nucleótidos GTP y GMPCPP.
 - Con la construcción de BsFtsZ truncada (1-315) se evaluará el papel que juega la cola C-terminal en la auto-organización de los polímeros de FtsZ.

- ✓ Búsqueda de nuevos inhibidores específicos de FtsZ, que constituyan cabezas de serie para el desarrollo de nuevos antibióticos.
 - Se seleccionarán los mejores candidatos del cribado virtual de la librería de ligandos comerciales Zinc y de una pequeña biblioteca sintética del grupo de la profesora M. Luz López Rodríguez (UCM) en el sitio de unión de nucleótido y serán validados experimentalmente. Los compuestos que resulten activos experimentalmente serán optimizados con ayuda de “docking” y cribado virtual.
 - Una vez comprobada la unión de los nuevos ligandos y probado su efecto en el ensamblaje de FtsZ, se estudiará *in silico* su modo de unión.
 - Se realizará un procedimiento similar en el sitio de unión de PC utilizando la quimioteca Zinc.

3. Materiales y Métodos

3. Materiales y Métodos

3.1. Simulaciones de DM

Los fundamentos generales de las simulaciones de DM han sido detallados en la Introducción. En este trabajo se utilizó la DM para estudiar la flexibilidad de los filamentos de FtsZ en dependencia del nucleótido unido y comprobar la estabilidad de diferentes ligandos en su sitio de unión correspondiente. Todas las simulaciones han sido realizadas en el superordenador MareNostrum del Centro de Supercomputación de Barcelona (BSC) utilizando el paquete de programas GROMACS, versión 4.6 (Van Der Spoel et al., 2005a, Hess et al., 2008a) y el campo de fuerzas Amber99sb (Hornak et al., 2006), con excepción de las simulaciones realizadas con los compuestos **28** y VS33 en el sitio de unión de nucleótido. En estos casos específicos, debido a la falta de recursos (no teníamos tiempo de simulación en un supercomputador) las simulaciones de DM se realizan con el programa Desmond (Bowers et al., 2006) y el campo de fuerzas OPLS-2005 (Jorgensen et al., 1996, Kaminski et al., 2001) (detalles en sección 3.2.5). Como se detalla en la Introducción las simulaciones de DM constan de diferentes etapas: preparación de los sistemas, equilibrado y producción.

Preparación de los sistemas para su modelización

La configuración inicial para las simulaciones de los filamentos de FtsZ se tomó de la estructura cristalográfica de SaFtsZ (PDB: 3vo8 y 3vob) que corresponde a un filamento recto. Para la interacción de los ligandos en el sitio de unión del nucleótido se partió de la estructura del cristal de BsFtsZ (PDB: 2vxy) que es la obtenida a mayor resolución hasta la fecha (1.7 Å). Nótese que los ensayos funcionales también se realizan con la proteína BsFtsZ (detalles en sección 3.3). En el caso de las simulaciones en el sitio de unión de PC, se utiliza la estructura de SaFtsZ (PDB: 4dxd) que es la primera estructura resuelta con la hendidura entre el dominio C-terminal y la hélice H7 en la conformación abierta con el PC unido.

Los parámetros para la modelización de los ligandos GTP y GDP se toman de la base de datos de parámetros de Amber (Amber parameter database). Los parámetros para el resto de los ligandos se determinan con ayuda de la herramienta AmberTool del paquete de programas Amber (Salomon-Ferrer et al., 2013). Las cargas parciales se obtienen mediante la optimización de las moléculas con cálculos *ab-initio* de mecánica cuántica, usando el nivel de teoría HF/6-31+G*, y el método de Potencial Electroestático Restringido (RES). Los otros parámetros se basan en el campo de fuerza generalizado de Amber (GAFF) (Wang et al.,

2004).

En todos los casos el sistema fue minimizado utilizando los métodos *steepest descent* y gradiente conjugado.

Calentamiento y equilibrado

Un paso importante en las simulaciones de DM es el equilibrado de los sistemas hasta alcanzar el estado estacionario. Nosotros hemos realizado el equilibrado en varias etapas; en una primera etapa los sistemas son calentados hasta la temperatura de interés y posteriormente se continúa equilibrando en las condiciones de simulación. En todas las etapas se aplican inicialmente restricciones a los sistemas y se van liberando lentamente monitorizando en cada instante de tiempo, diferentes parámetros como la energía y la temperatura. Los tiempos de equilibración, especialmente para los filamentos de SaFtsZ, son largos.

Producción

Una vez superado el equilibrado pasamos a la fase de producción. En esta fase es importante el tiempo de simulación, llegando a un compromiso entre los recursos computacionales y la capacidad de racionalizar los resultados. En nuestras simulaciones de los filamentos de FtsZ los tiempos de simulación alcanzan los 300 ns y en algunos casos llegan hasta los 500 ns. Otro aspecto a tener en cuenta es la reproducibilidad de los resultados. Para cada uno de nuestros sistemas se han realizado al menos 2 simulaciones de DM. El análisis de los datos de las simulaciones de DM y la visualización de las estructuras se realizan con herramientas de programas GROMACS (Van Der Spoel et al., 2005a, Hess et al., 2008a) y los programas de visualización VMD (Humphrey et al., 1996) y CHIMERA (Pettersen et al., 2004). Además hemos realizado scripts para el análisis de las trayectorias de los filamentos de SaFtsZ.

3.1.1. Simulaciones de DM de filamentos de SaFtsZ

Las propiedades dinámicas de los filamentos de SaFtsZ se estudian en tres estados diferentes: a) con GTP unido en el sitio de nucleótido, con GDP en lugar de GTP y con GDP más PC. Filamentos formados por 7 monómeros de FtsZ se construyen para cada uno de los estados, y en cada caso dos simulaciones de 300 ns se ejecutan con el fin de confirmar la reproducibilidad de los resultados. En el caso de GDP, debido a la mayor flexibilidad de los

filamentos, las simulaciones son extendidas hasta 500 ns. El tamaño de los filamentos y el tiempo de cálculo empleado nos permiten observar conformaciones representativas de los filamentos en presencia de los diferentes ligandos.

3.1.1.1. Preparación de los filamentos de SaFtsZ

Las coordenadas iniciales para la construcción de los filamentos se toman de la estructura tridimensional cristalográfica de SaFtsZ unida a GDP (PDB: 3vo8) y en complejo con PC (PDB: 3vob). Estas estructuras son las únicas donde el empaquetamiento del cristal muestra un filamento recto formado por monómeros con la hendidura entre los dominios N y C-terminal en la conformación abierta (Matsui et al., 2012). Debido a estas características se consideran funcionalmente relevantes ya que: i) facilitan la formación de una interfaz compacta entre los monómeros del filamento, encerrando más al nucleótido que otras estructuras como las de los dímeros de archaeal en las cuales la asociación entre monómeros es más abierta (Oliva et al., 2004) y ii) permite la unión del PC en la hendidura entre dominios lo cual explica el efecto estabilizante de los polímeros de FtsZ por el ligando. Para el filamento con GTP, se reemplazan las coordenadas del GDP por el GTP y Mg^{2+} , adquirido a partir de la estructura del cristal de MjFtsZ (PDB: 1W5A) (Oliva et al., 2004). Mediante operaciones de simetría del cristal se construyen filamentos rectos de 7 monómeros en tres condiciones diferentes: con GTP unido, con GDP y con GDP+PC. Además para estudiar el efecto del Ca^{2+} en la estabilización de los filamentos se realizan simulaciones adicionales con GDP y GDP+PC incluyendo al ión de la misma forma que aparece en las estructuras cristalográficas (Matsui et al., 2012).

Las estructuras de los filamentos se sumergen en cajas triclinicas con moléculas de agua TIP3P (Jorgensen et al., 1983). La distancia mínima entre los átomos de la proteína y la superficie de la caja es de 1.5 Å. Se utilizan las PBC, donde la caja de simulación es considerada la celda primitiva de una red infinita y periódica de celdas idénticas. Para neutralizar el sistema se añaden iones de Na^+ . Una vez neutralizado se continúa añadiendo iones de Na^+ y Cl^- hasta obtener una concentración de 50 mM. Además se adicionan iones de Mg^{2+} y Cl^- hasta obtener una concentración de 10 mM. Estas concentraciones se corresponden con las condiciones experimentales de ensamblaje de FtsZ. Como control se realizan simulaciones en las que se sustituye el Na^+ por el K^+ . En estas simulaciones no se observaron diferencias respecto a las anteriores.

3.1.1.2. Equilibración y producción de DM de los filamentos

El sistema inmerso en agua es minimizado, inicialmente usando el método *steepest descent*, seguido por el método de gradientes conjugados en doble precisión. Para cada sistema se realizan dos simulaciones independientes con diferentes velocidades iniciales, asignadas aleatoriamente a partir de la distribución de Maxwell a 50 K.

Para equilibrar las moléculas de agua y los iones alrededor de los filamentos, se va aumentando gradualmente la temperatura de cada sistema durante 6 ns desde 50 hasta 298 K. Para esta primera equilibración se restringen las posiciones de todos los átomos de la proteína y los ligandos. Posteriormente se fijan solo las posiciones de los átomos del esqueleto peptídico y se continúa equilibrando durante otros 6 ns. Durante la equilibración usamos un tiempo de integración de 2 fs y la lista de átomos vecinos se actualiza cada 10 pasos de integración. Finalmente las estructuras equilibradas son el punto de partida para realizar simulaciones de DM de 300 y 500 ns.

En todas las simulaciones se usa un tiempo de integración de 2 fs y los datos de las trayectorias son guardados cada 40 ps para su análisis. Las simulaciones se realizan usando el colectivo NPT (número de átomos, presión y temperatura constante). La presión de la caja de simulación se mantiene constante a 1 atm con el algoritmo de Berendsen (Berendsen et al., 1984) usando una constante de tiempo de 0.5 ps y una compresibilidad de $4.5 \times 10^{-5} \text{ bar}^{-1}$. El solvente y el complejo (filamento-ligando) se acoplan separadamente a una temperatura de 298 K mediante el método *velocity-rescaling* (Bussi et al., 2007) con una constante de tiempo de 0.1 ps. El algoritmo LINC (Hess et al., 1997) se utiliza para mantener fija la longitud de equilibrio de los enlaces mientras la geometría de las moléculas de agua es fijada con el algoritmo SETTLE (Miyamoto and Kollman, 1992). Las interacciones electrostáticas y de Van der Waals (Lennard-Jones) se calculan dentro de un radio de corte de 1.4 y 1.0 nm respectivamente. Las interacciones electrostáticas de largo alcance son tratadas mediante el método Particle Mesh Ewald (PME) (Essmann et al., 1995) y las interacciones de largo alcance de Lennard-Jones son corregidas para el cálculo de la presión y la energía.

3.1.1.3. Análisis de las simulaciones de filamentos de SaFtsZ

Cálculo de los ángulos de curvatura y torsión entre monómeros

El ángulo de curvatura entre pares de monómeros dentro del filamento es monitorizado de forma similar a como se describe en (Hsin et al., 2012, Grafmuller and Voth, 2011). En la

Figura 6 se representa esquemáticamente el método de cálculo. Inicialmente se define un sistema de referencia fijo donde: el eje Z_0 es alineado a los largo de los centros de masa de los monómeros que forman la estructura inicial del filamento recto, el eje X_0 es fijado en la dirección de máxima curvatura del filamento de GTP y el eje Y_0 es definido ortogonalmente. Para las medidas de los ángulos se alinean los dímeros formados entre monómeros consecutivos en el filamento, a la estructura de referencia recta, superponiendo el monómero inferior. Los ángulos son calculados a partir de la rotación y alineamiento del monómero superior a la estructura de referencia con ejes (X_0, Y_0, Z_0) . Los ángulos de curvatura θ_1 y θ_2 son definidos por rotaciones alrededor del eje Y_0 (azul) y eje X_0 (verde) respectivamente, y el ángulo de torsión (Φ) es definido por la rotación alrededor del eje Z_0 (rojo). De esta forma los ángulos θ_1 , θ_2 y Φ son determinados durante la simulación. La estructura de referencia en la Figura 6 se representa en una vista equivalente a la tubulina observada desde el interior del microtúbulo.

Cálculo de longitud de persistencia

La longitud de persistencia se determinó de acuerdo con el método de (Chu and Voth, 2005). Cada monómero del filamento se representa por un punto que corresponde al centro de masas. De esta forma el filamento se proyecta en un polímero lineal unidimensional que contiene 7 puntos discretos. Según la teoría mesoscópica de polímeros lineales (Marko and Siggia, 1995, Panyukov and Rabin, 2000) la longitud de persistencia de los filamentos puede ser determinada usando la siguiente ecuación:

$$\langle \cos(\theta_{(s)}) \rangle = \exp\left(-\frac{s}{L_p}\right)$$

donde s es la longitud del contorno, θ es el ángulo entre el vector tangente a s y el vector tangente al punto de referencia en el polímero y L_p es la longitud de persistencia. En los polímeros discretos para cada grupo de tres puntos (monómeros) se estima el vector tangente por la diferencia entre centros, $\tau_i = \frac{(r_{i+1}-r_{i-1})}{|r_{i+1}-r_{i-1}|}$, donde τ_i es el vector tangente unitario para el monómero i . La longitud del contorno, δs_i , es estimada por $\delta s_i = 1/2(|r_{i+1} - r_i| + |r_i - r_{i-1}|)$. El ángulo $\theta_{(s)}$ es entonces el ángulo entre la tangente del monómero i y el monómero de referencia y s es la longitud del contorno desde el monómero i al monómero de referencia, y puede ser evaluado por: $i \cdot \langle \bar{\delta}_s \rangle$; $\bar{\delta}_s$ es la longitud promedio de los fragmentos de contorno sobre los monómeros.

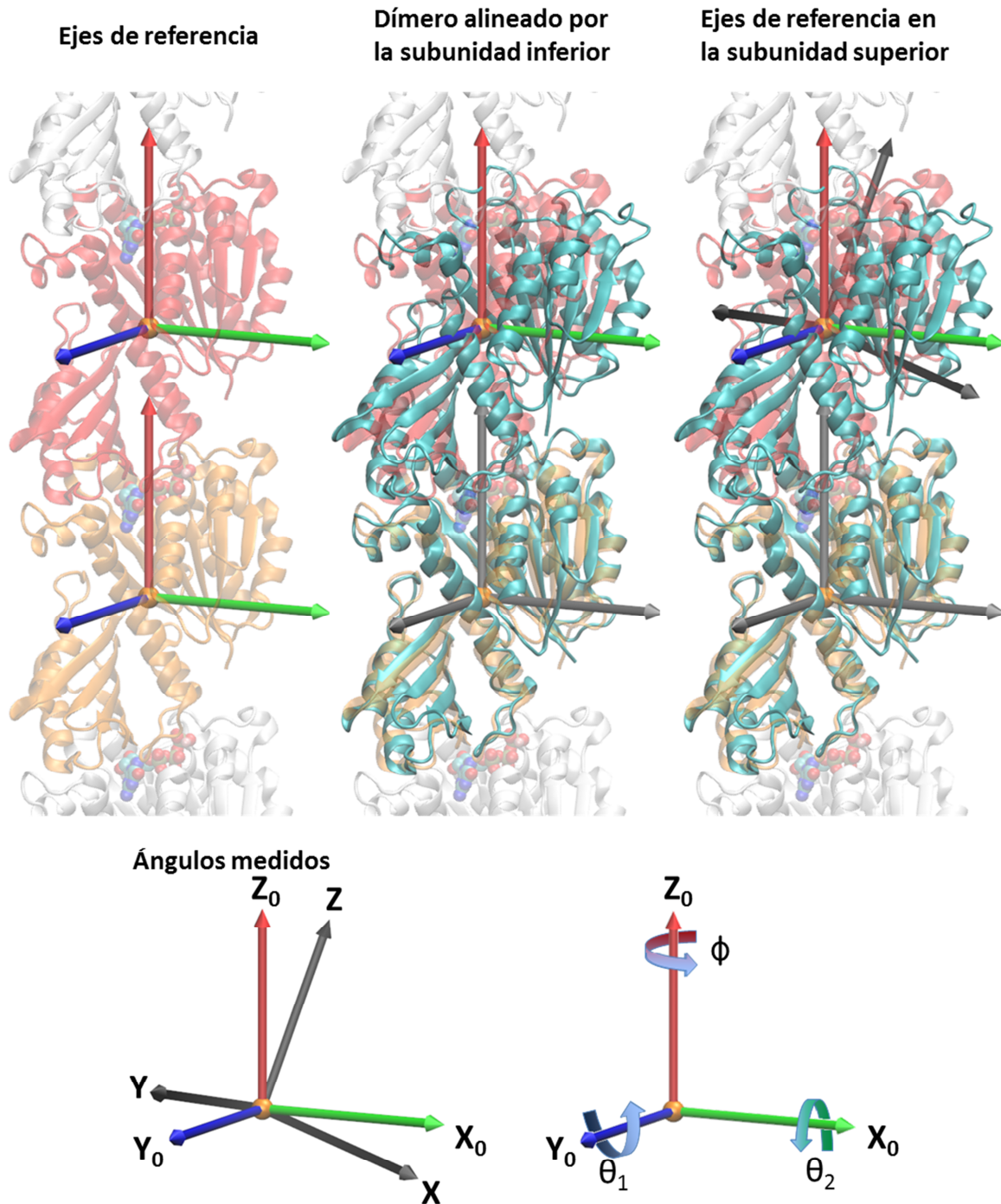


Figura 6. Definición de los ángulos de curvatura y torsión. La orientación relativa de cada par de monómeros es monitorizada durante la simulación siguiendo la metodología descrita en (Hsin et al., 2012, Grafmuller and Voth, 2011). Los ejes de referencia se definen de la siguiente manera: el eje Z_0 se alinea a lo largo de los centros de masa de dos monómeros consecutivos en el filamento recto inicial, el eje X_0 se fija en la dirección de máxima curvatura del filamento de GTP y el eje Y_0 ortogonalmente a los otros dos ejes. Para las medidas de los ángulos se alinean los dímeros de monómeros consecutivos en el filamento a la estructura de referencia superponiendo solo el monómero inferior. Los ángulos son calculados a partir de la rotación y alineamiento al monómero superior. Los ángulos de curvatura θ_1 y θ_2 son definidos por rotaciones alrededor del eje Y_0 (azul) y eje X_0 (verde) respectivamente, y el ángulo de torsión (Φ) es definido por la rotación alrededor del eje Z_0 (rojo). La estructura del filamento se representa en una vista equivalente a la tubulina observada desde el interior del microtúbulo.

Primero el vector tangente τ_{i0} promedio para cada punto a lo largo del filamento es calculado. Una matriz de rotación, R_{i0} , que alinea τ_{i0} a la dirección Z (0, 0, 1) es determinada. R_{i0} es aplicada al vector tangente instantáneo τ_{iS} en r_i y el vector tangente alineado es usado para calcular la longitud de persistencia L_p . Como nuestros filamentos son de 7 monómeros, la mayor distancia entre dos monómeros para la cual la función correlación coseno es definida es entre los monómeros i y $i + 3$.

3.1.2. Simulaciones de DM del monómero de SaFtsZ

Para estudiar en más detalle el interruptor molecular localizado entre los dominios N y C-terminal de SaFtsZ se realizan dos simulaciones de DM de 500 ns del monómero aislado de SaFtsZ unido a GTP y GDP. La preparación de los sistemas y la simulación sigue el mismo procedimiento descrito para la DM de los filamentos pero utilizando un solo monómero.

3.2. Búsqueda de nuevos inhibidores de FtsZ

Para la búsqueda de nuevos compuestos con afinidad por el sitio de unión de nucleótido y el sitio de PC que puedan afectar la división celular bacteriana se siguió el protocolo que se detalla a continuación. En primer lugar se buscaron nuevos candidatos con estructuras diferentes mediante el cribado virtual basado en la estructura del sitio de unión a explorar. El efecto de los compuestos elegidos del cribado virtual se determina experimentalmente. Los compuestos que resultan activos en los ensayos experimentales son considerados para su optimización. En este sentido se utilizan dos métodos: 1) el diseño racional basado en la síntesis de nuevos candidatos elegidos con ayuda de “docking” y cribados virtuales de pequeñas librerías accesibles sintéticamente y 2) la búsqueda de nuevos compuestos con estructuras similares a los ligandos activos, utilizando librerías de compuestos accesibles comercialmente. El modo de unión de los compuestos con mayor actividad son detalladamente estudiados por “docking” y extensas simulaciones de DM.

3.2.1. Cribado virtual basado en receptor

El cribado virtual basado en la estructura del sitio de unión nos permite explorar bases de datos de estructuras químicas y seleccionar posibles candidatos con afinidad por el sitio de unión (detalles en la Introducción). El cribado virtual se realiza con el programa ICM (Totrov and Abagyan, 1997) en dos sitios de unión de FtsZ, el sitio de unión de nucleótido y el sitio

de unión de PC. Para el cribado basado en la estructura del receptor el programa ICM utiliza la metodología de “docking” para cada uno de los ligandos de la base de datos.

La estructura de la proteína se toma de la base de datos PDB (<http://www.rcsb.org>) y se prepara utilizando el protocolo de preparación de proteínas implementado en ICM. Este es un procedimiento automático que asigna a los átomos de la proteína tipos de átomos del campo de fuerzas MMFF (Halgren, 1996). Durante este proceso se adicionan los hidrógenos, se asignan las cargas parciales y los estados de protonación de los aminoácidos His, Gln y Asn son optimizados.

Para todos los ligandos, las coordenadas atómicas 3D, las formas tautoméricas, la estereoquímica, los átomos de hidrógeno y los estados de protonación son asignados siguiendo el protocolo estándar de ICM. Distintas conformaciones del ligando se generan mediante una búsqueda rotacional y una minimización cartesiana usando el campo de fuerza MMFF (Halgren, 1996) en ausencia del receptor. Estas moléculas libres son optimizadas con una energía global en el espacio de coordenadas internas y las conformaciones de menor energía son usadas en el “docking”. Además se tienen en cuenta los distintos rotámeros del ligando.

Inicialmente el Dr. Pablo Chacón (2010) realizó dos cribados en el sitio de unión de nucleótido: i) utilizando una pequeña librería de compuestos sintéticos del laboratorio de Química Médica (Departamento de Química Orgánica I de la Universidad Complutense de Madrid, UCM) y ii) utilizando la librería de ligandos comerciales Zinc (Irwin and Shoichet, 2005) formada por 4 millones de compuestos no redundantes. En ambos casos el cribado virtual se realiza usando los procedimientos y parámetros por defecto del programa ICM (versión 3.6-1e) y se utiliza la estructura de BsFtsZ en la forma apo (PDB: 2vxy).

Posteriormente realizamos el cribado de la librería de ligandos comerciales Zinc en el sitio de unión de PC, usando el programa ICM (versión 3.7-2c) (Totrov and Abagyan, 1997). La flexibilidad del sitio de unión en este caso es considerada utilizando la aproximación de múltiples receptores acoplados (Totrov and Abagyan, 2008), en particular el protocolo 4D (Bottegoni et al., 2009). Para el cribado en el sitio de unión de PC, el interruptor molecular localizado entre los dominios N y C-terminal debe estar en la conformación abierta, por lo que se utiliza la estructura 3vo8 de SaFtsZ (Matsui et al., 2012). La variabilidad conformacional del sitio se representa mediante 7 estructuras extraídas de una de las simulaciones de DM de los filamentos de SaFtsZ con GDP. Las dimensiones de la caja para

el cribado se eligen de forma que cubra toda la hendidura formada entre la hélice H7 y el dominio C-terminal.

Para la elección de los compuestos a probar experimentalmente se tiene en cuenta además de la puntuación obtenida para cada compuesto en el cribado virtual, otros factores como la variabilidad conformacional, la predicción de la solubilidad de los compuestos y predicción de la “drugabilidad”. Estas últimas características son estimadas por el programa ICM. En primer lugar los compuestos con alto valor de puntuación se filtran teniendo en cuenta la predicción de la “drugabilidad” y los valores de MolLogS y MolLogP que están relacionados con la solubilidad. El filtrado se realiza en base a:

$$\text{“drugabilidad”} > 0 \quad \text{MolLogS} > -5 \quad \text{MolLogP} < 4$$

En segundo lugar los compuestos son agrupados según su estructura química (se conoce como *clustering*), permitiendo seleccionar compuestos con diferentes estructuras. Finalmente los compuestos seleccionados son comprados a través de casas comerciales (Enamine, MolPort, Mcule y Asinex)

3.2.2. Búsqueda de compuestos con estructuras similares a la de ligandos activos

En algunos casos la optimización de compuestos activos se realiza mediante una búsqueda basada en la estructura del ligando. Se utiliza la base de datos MolPort (<https://www.molport.com>) en la búsqueda de estructuras químicamente similares basado en la métrica de Tanimoto (Bajusz et al., 2015). MolPort mantiene una base de datos y la sincroniza con bases de datos de diferentes casas comerciales, por lo que los compuestos cribados están disponibles y pueden ser adquiridos en cortos plazos de tiempo.

3.2.3. Ajuste Molecular “Docking”

El docking de los diferentes compuestos en los sitios de unión de FtsZ se realiza con el programa ICM, versión 3.6-1e (Totrov and Abagyan, 1997). La preparación de la proteína y los ligandos se realiza de la misma forma que para el cribado virtual. En todos los casos la metodología del programa ICM utiliza coordenadas internas para optimizar el ligando flexible en el sitio de unión elegido. Las energías son calculadas usando las cargas parciales asignadas con MMFF y el campo de fuerzas ECEPP/3 (Nemethy et al., 1992). El “docking” de los ligandos se complementa con una minimización local usando el método de Monte Carlo (Abagyan and Totrov, 1994).

Para el “docking” de los compuestos en el sitio de nucleótido se utiliza la estructura de BsFtsZ en la forma apo (PDB: 2vxy). Al igual que en el cribado virtual del sitio de PC se considera la flexibilidad del sitio de unión. Para ello se utilizan 7 estructuras extraídas de una simulación de DM del monómero de BsFtsZ (PDB: 2vxy) en su forma libre y se normalizan usando el protocolo estándar 4D de ICM. Las dimensiones de la caja para realizar el “docking” se obtienen a partir de la estructura del GDP en su forma cristalizada (PDB: 2rhl).

Inicialmente, para validar el método se realiza el “docking” del GDP en el sitio de nucleótido de la estructura de BsFtsZ en la forma apo y la simulación de DM del complejo con mayor puntuación. Los resultados fueron comparados con la estructura resuelta por difracción de rayos X del complejo BsFtsZ-GDP (PDB: 2rhl).

Los “docking” de los ligandos fluorescentes en el sitio de PC se realizan utilizando la estructura de SaFtsZ (4dxd) con los parámetros por defecto del programa.

3.2.4. Simulaciones de DM de los ligandos en los sitios de unión de FtsZ

Para estudiar la estabilidad de diferentes compuestos en los sitios de unión de FtsZ se realizan simulaciones de DM de los complejos proteína-ligando obtenidos con mayor puntuación en experimentos de “docking”.

3.2.4.1. Preparación y equilibración de los sistemas proteína-ligando

Las estructuras de los complejos obtenidas en el “docking” son inmersas en cajas dodecaédricas con moléculas de agua TIP3P (Jorgensen et al., 1983) y se le añaden iones de Na^+ para neutralizar los sistemas. La distancia mínima entre los átomos de la proteína y la superficie de la caja es de 1.5 Å. La energía de cada sistema proteína-ligando es minimizada por el método de gradientes conjugados en doble precisión. Las velocidades iniciales son asignadas aleatoriamente a partir de la distribución de Maxwell a 50 K y los sistemas son calentados hasta 298 K incrementando la temperatura gradualmente mientras todos los átomos de la proteína y el ligando se mantienen restringidos. Posteriormente se realiza otra equilibración NPT de 5 ns con los átomos de las cadenas laterales libres. La presión de la caja de simulación se mantiene constante a 1 atm con el algoritmo de Berendsen (Berendsen et al., 1984) usando una constante de tiempo de 0.5 ps y una compresibilidad de $4.5 \times 10^{-5} \text{ bar}^{-1}$. El solvente y el complejo (proteína-ligando) se acoplan separadamente a una temperatura de 298 K mediante el método velocity-rescaling (Bussi et al., 2007) con una constante de tiempo de 0.1 ps. El algoritmo LINC (Hess et al., 1997) se utiliza para mantener fija la longitud de

equilibrio de los enlaces mientras la geometría de las moléculas de agua se fija con el algoritmo SETTLE (Miyamoto and Kollman, 1992). Las interacciones electrostáticas y de Van der Waals (Lennard-Jones) son calculadas dentro de un radio de corte de 1.4 y 1.0 nm respectivamente. Las interacciones electrostáticas de largo alcance son tratadas mediante el método Particle Mesh Ewald (PME) (Essmann et al., 1995) y las interacciones de largo alcance de Lennard-Jones son corregidas para el cálculo de la presión y la energía. En todos los casos se usan las PBC.

3.2.4.2. Simulaciones de DM de los complejos proteína-ligando

Las estructuras equilibradas fueron los puntos de partida de simulaciones de DM usando el colectivo NPT sin ninguna restricción. La presión de la caja de simulación en este caso se mantiene constante a 1 atm con el algoritmo de Parrinello-Rahman (Parrinello and Rahman, 1981, Nose and Klein, 1983) usando una constante de tiempo de 0.5 ps y una compresibilidad de $4.5 \times 10^{-5} \text{ bar}^{-1}$. El resto de los parámetros de la simulación son los mismos que los usados durante la fase de equilibración. Los datos de las trayectorias se almacenan cada 40 ps para su análisis.

3.2.5. Modelado molecular usando Maestro de Schrödinger

En algunos casos muy específicos (con el compuesto **28** y VS33), debido a que en el momento del cálculo no se tenía acceso a un superordenador y no se disponía de tiempo suficiente de simulación, se realizaron simulaciones más cortas (40 - 50 ns) de los ligandos en el sitio de unión de nucleótido de BsFtsZ. En estos casos tanto el “docking”, como las simulaciones de DM se realizan con el paquete de programas Maestro de Schrödinger, versión 9.9.013. Para el “docking” se utiliza el programa Glide (versión 6.3, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2014) (Friesner et al., 2006), mientras que las simulaciones de DM para evaluar la estabilidad del complejo y estudiar sus interacciones se realizan con el programa Desmond (versión 3.8, D. E. Shaw Research, New York, NY, 2014). En ambos casos el campo de fuerzas usado es OPLS-2005 (Jorgensen et al., 1996, Kaminski et al., 2001).

3.2.5.1. Preparación de la proteína y los ligandos

La estructura inicial para la proteína se toma de la estructura cristalográfica de BsFtsZ en la forma apo (PDB: 2vxy) y preparada usando la herramienta “Protein Preparation Wizard” de Maestro (versión 9.9.013, Schrödinger LLC, New York, NY, 2014). Los átomos de

hidrógenos son adicionados y la orientación de los grupos hidroxilos, y las cadenas laterales de Asn y Gln son optimizadas para maximizar los puentes de hidrógenos. Finalmente una minimización rápida se realiza para eliminar choques estéricos. Para los ligandos se generan diferentes conformeros con Maestro. El módulo Ligprep (versión 3) se utiliza para la optimización de las coordenadas, la asignación de los estados de protonación a pH neutro y la minimización de las estructuras de los ligandos.

3.2.5.2. “Docking” con Maestro

El “docking” de los ligandos se realiza con Glide (versión 6.3, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2014) (Friesner et al., 2006). Las dimensiones de la caja para el sitio de nucleótido se determinan de las coordenadas de la estructura del complejo con GDP (PDB: 2rhl). El algoritmo de puntuación de mayor precisión (XP) es usado para identificar las conformaciones con mayor puntuación. En el “docking”, los ligandos son tratados como flexibles. Las estructuras del docking son minimizadas usando Macromodel (versión 10.4) con varios pasos del método de gradiente conjugado de Polak-Ribière (PRCG) hasta que el gradiente de energía es inferior a $0.005 \text{ kJ.Å}^{-1} \text{ mol}^{-1}$.

3.2.5.3. Simulaciones de DM con Maestro

La conformación mejor evaluada durante el “docking” es posteriormente estudiada con simulaciones de DM con el programa Desmond (versión 3.8, D. E. Shaw Research, New York, NY, 2014). El sistema se introduce en una caja ortorrómbica con moléculas de agua SPC y se neutraliza con iones de sodio. La distancia de los átomos de hidrógeno unidos a átomos pesados y la geometría de las moléculas de agua se fijan con el algoritmo SHAKE (Ryckaert et al., 1977). Se usan las PBC y las interacciones electrostáticas son tratadas con el método PME (Essmann et al., 1995) y un radio de corte de 0.9 nm.

Antes de la producción de DM, el protocolo de minimización y equilibración (relax model system before simulation) es usado con las opciones por defecto del programa. Esto consiste en repetidas minimizaciones y pequeñas simulaciones de equilibración para relajar el sistema. Inicialmente, la minimización se realiza con restricciones de movimiento para los átomos del soluto y seguidamente se repite sin restricciones. Posteriormente cuatro simulaciones cortas se realizan para equilibrar el sistema: 1) 12 ps de simulación NVT a una temperatura de 10 K con restricciones de las posiciones de los átomos del soluto, 2) se repite el procedimiento pero con el conjunto NPT, 3) nuevamente con NPT pero subiendo la

temperatura hasta 300 K y 4) por último 24 ps de simulación NPT sin restricción de los átomos. La restricción de las posiciones de los átomos se realiza con una fuerza constante de $50 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$, mientras la temperatura y presión se mantuvo estable con el termostato y barostato de Berendsen respectivamente (Berendsen et al., 1984).

Después de la equilibración, simulaciones de DM son realizadas con el conjunto NPT a 300 K de temperatura y 1 atm de presión usando el termostato de Nosé-Hoover y el baróstato de Martyna-Tobias-Klein (Martyna et al., 1994, Martyna et al., 1992). Para la dinámica, el algoritmo de integración RESPA es usado con tiempos de integración variable de 2, 2 y 6 fs para átomos enlazados, interacciones de corto alcance de los átomos no enlazados e interacciones de largo alcance de los átomos no enlazados, respectivamente. Las energías y las coordenadas de la trayectoria se almacenan cada 1.2 y 4.8 ps, respectivamente. El análisis y visualización de las trayectorias se realiza con VMD (Humphrey et al., 1996) y las herramientas de análisis de Desmond.

3.3. Validación experimental de los compuestos procedentes del cribado virtual

3.3.1. Reactivos utilizados, medios de cultivos y tampones empleados

Reactivos utilizados

Los reactivos utilizados en la preparación de tampones y medios de cultivos como NaCl, KCl, Tris, KOH, HCl y glicerol provienen de Merck; el extracto de levadura y la bactotripton de Becton Dickinson & Co, el EDTA, pipes, Mes y Hepes provienen de Sigma-Aldrich; el PMSF y la leupeptina de Calbiochemy y Sigma respectivamente.

En la preparación y tinción de los geles PAGE-SDS se usaron acrilamida, bisacrilamida, TEMED, APS y 2-mercaptoetanol que provienen de bioRad, ácido acético de Merck, SDS y azul de Coomassie de Sigma-Aldrich, el metanol de Panreac y el marcador de bajo peso molecular (LMWM) de BioRad.

Para la expresión y purificación de BsFtsZ se utilizó IPTG de Merck y ampicilina de Roche. Las columnas HiTrapQ HP (5 mL), Phenyl HP (5 mL), Desalting (5 mL) y la resina Superdex-75 proceden de la casa comercial GE Healthcare. Los filtros Centriprep y Centricore (15 K) de Milipore. Para la determinación de la concentración de proteína purificada se usó ácido perclórico de Merck y cloruro de guanidinio de Calbiochem.

Los nucleótidos usados en los experimentos (GTP, GDP, GMPCPP) provienen de Sigma. Distintos experimentos requirieron de DMSO o DMSO-D6 que proviene de Merck.

Medios de cultivos

Medio 2xYT (16 g/L triptona, 5 g/L NaCl, 10 g/L extracto de levadura, pH 7.0)

Medio SOC (SOB + 20 mM glucosa + 20 mM MgCl₂)

Tampones usados

Tampón Hepes (50 mM Hepes-KOH, 50 mM KCl, 1 mM EDTA, pH 6.8)

Tampón TKM (50 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, pH 8.0)

Tampón Tris50 (50mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1 mM EDTA, pH 7.4)

Tampón A (50 mM Mes-KOH, 5 mM MgCl₂, 10% glicerol, pH 6.5)

Tampón B (50 mM Mes-KOH, 5 mM MgCl₂, 10% glicerol, 1 M KCl, pH 6.5)

Tampón A3 (50 mM KH₂PO₄ / K₂HPO₄ - KOH, 1 mM EDTA, 0.8 M (NH₄)₂SO₄, pH 7.5)

Tampón B3 (50 mM KH₂PO₄ / K₂HPO₄ - KOH, 1 mM EDTA, pH 7.5)

Tampón C (50 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1 mM EDTA, 10% Glicerol pH 7.5)

Tampón GdmHCl (50 mM Mes-KOH, 2.5 M GdmHCl, pH 6.5)

Todos los tampones son filtrados y desgasificados con filtros Milipore de 0.2 µm de diámetro del poro.

3.3.2. Purificación de FtsZ

La expresión y purificación de la proteína BsFtsZ se detalla a continuación. Todos estos experimentos fueron realizados por mí para posteriormente realizar los ensayos funcionales con los compuestos del cribado virtual en el sitio de PC.

En el caso de la proteína truncada BsFtsZ-ΔCt que carece de la cola desestructurada C-terminal (67 residuos), la expresión y purificación fue realizada por la Dra. Sonia Huecas del Centro de investigaciones Biológicas empleando un procedimiento similar al empleado para

la proteína BsFtsZ en su forma nativa.

3.3.2.1. Expresión de BsFtsZ

En todos nuestros experimentos se emplea la proteína BsFtsZ. Para la expresión de la proteína se transforman células competentes de *E. coli* de la cepa CD41 (DE3) con el vector pHis17- A TCC23857D (Oliva et al., 2007, Lowe and Amos, 1998) que contiene la versión completa del gen *FtsZ*, bajo el control del promotor T7. Este plásmido incluye el gen de la β -lactamasa que confiere resistencia a ampicilina.

La transformación de las células competentes se lleva a cabo por electroporación. Para ello, inicialmente las células se descongelan en hielo y se les añade 1 μ L del DNA plasmídico. Se transfieren a las celdas de electroporación y se mantienen durante 10 minutos en hielo. Posteriormente, se someten a un pulso eléctrico con el programa Ec2 ($V = 2.5$ kV) del electroporador (MicroPulser) de BioRad. A continuación se añaden 250 μ L de medio SOC en las mismas celdas de electroporación y se mantienen una hora a temperatura ambiente para que las células se recuperen. Seguidamente, se siembran en placas de Luria-Bertani-agar (LB-agar) con el antibiótico (ampicilina) y se incuban durante la noche a 37°C.

Al día siguiente se seleccionan las colonias que han crecido y se prepara el preinóculo. Para ello se toman algunas células con un palillo estéril y se pasan al medio 2xYT que mejora la expresión de la proteína (20 ml de 2xYT con 100 μ g/mL Ampicilina). El preinóculo se deja creciendo durante la noche a 37°C con una agitación de 200 rpm (baño Innova 3000).

Para favorecer las condiciones óptimas de inducción se realiza una dilución 1:100 del preinóculo en 1 L de medio con 100 μ g/mL Ampicilina y se deja crecer (37°C, 200 rpm) hasta la fase exponencial (0.4 - 0.6 unidades de densidad óptica medidas a una longitud de onda de 600 nm). Entonces se lleva a cabo la inducción con 1 mM de IPTG durante 3 horas en agitación a 37°C.

Después de 3 horas, el cultivo se centrifuga a 8000 x g, 10 minutos a 4°C (rotor SLA-3000, centrífuga Sorvall RC-5C plus), con el objetivo de sedimentar las bacterias. Tras descartar el sobrenadante, las células fueron resuspendidas en el tampón TKM y guardadas a -80°C hasta el momento de purificar la proteína.

Para comprobar la expresión de la proteína en cada uno de las etapas anteriores (preinóculo, inóculo y cultivo inducido) se toman muestras de 500 μ L y se cargan en un gel

de electroforesis PAGE-SDS. Todas las electroforesis realizadas para visualizar y cuantificar la proteína son realizadas en geles con una concentración de 12% de poliacrilamida en presencia de SDS (PAGE-SDS) aplicando un voltaje de 100 V.

3.3.2.2. Purificación de BsFtsZ

La purificación de la proteína BsFtsZ expresada en células de *E. coli* se realiza siguiendo el protocolo descrito en (Schaffner-Barbero et al., 2010) con algunas modificaciones incorporadas en el laboratorio del Prof. J.M. Andreu para mejorar el rendimiento y la velocidad del método (Ruiz-Avila et al., 2013). El proceso se divide en cuatro pasos: i) precipitación con sulfato amónico mediante el cual precipita un rango de proteínas, entre ellas la FtsZ, ii) cromatografía de intercambio aniónico, iii) cromatografía de interacción hidrofóbica y por último iv) el cambio de tampón. Todas las cromatografías se realizan usando el AKTA purifier P900 (Ge Healthcare). Para concentrar la proteína se realizan ciclos de centrifugación de 15 minutos a 3200 rpm (centrífuga Rotina 380 R Hettich) usando los filtros Centriprep 10K (Amikon).

Precipitación con sulfato amónico

Se descongelan las células resultantes de la expresión almacenadas a -80°C y se les añaden 200 $\mu\text{g/mL}$ de PMSF y 2 $\mu\text{g/mL}$ de leupeptina (inhibidores de proteasas) para evitar la degradación proteolítica. A continuación se realiza la disrupción celular por ultrasonidos (sonicador *Brandelin Sonoplus HD200*) introduciendo una sonda de un centímetro de diámetro en la muestra y efectuando 5-6 pulsos de 20 segundos (con un minuto entre pulso y pulso) al 20% de potencia. El lisado obtenido se centrifuga a $100.000 \times g$ durante 1 hora a 4°C (rotor 70.1 Ti) en el rotor 70.1 Ti de una ultracentrífuga Beckman. El sobrenadante se pasa a un vaso de cristal y en agitación se añade gradualmente sulfato amónico ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) hasta alcanzar una saturación del 40% (242 mg/mL). Posteriormente se mantiene en agitación 30 minutos. Pasado este tiempo, se centrifuga a 18.000 rpm durante 30 min a 4°C (rotor SS-34) en la centrífuga RC-5C Plus (Sorvall). Se descarta el sobrenadante y el sedimento que contiene nuestra proteína de interés se resuspende en 10 mL del tampón A.

Cromatografía de intercambio aniónico

Para clarificar la mezcla proteica (eliminar posibles contaminantes), se vuelve a centrifugar la muestra a 5000 rpm durante 10 min a 4°C . Se recupera el sobrenadante, se diluye con tampón A hasta alcanzar un volumen de 20 mL y con una bomba peristáltica

(Gilson *Minipuls 3*) se carga la muestra en la columna de intercambio aniónico HiTrap Q-HP de 5 mL (GE Healthcare), previamente equilibrada con el mismo tampón A. La columna es entonces conectada al sistema AKTA Prime y se eluye la proteína con un gradiente lineal de 0-100% de tampón B a un flujo de 1 mL/min. La elución se monitoriza y se recogen aquellas fracciones en las que se detecta absorción a 280 nm. Para localizar las fracciones que contienen la proteína de interés muestras de cada fracción (10 µL) se cargan en un gel PAGE-SDS.

Cromatografía de interacción hidrofóbica

Las fracciones seleccionadas se concentran hasta 2 mL. Este volumen se diluye 5 veces con tampón A3 y se carga en la columna de interacción hidrofóbica fenil-agarosa HiTrap Phenyl HP (GE Healthcare) de 5 mL, previamente equilibrada en tampón A3. Nuevamente se eluye la proteína en un gradiente 0-100% con tampón B3 a un flujo de 1 mL/min. Como en el paso anterior, se seleccionan las fracciones en que aparecen picos de absorción a 280 nm, y se cargan en un gel SDS-PAGE para localizar la proteína (Figura 7) y ver la pureza de la proteína. Para eliminar la alta concentración de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ residual las fracciones que contienen la proteína se concentran hasta un volumen de 500 µL.



Figura 7. PAGE-SDS de purificación de BsFtsZ. Se cargan las muestras de las fracciones recogidas después de la cromatografía de interacción hidrofóbica.

Cambio de tampón

Por último, es conveniente el cambio de tampón con el objetivo de eliminar sales presentes en el tampón anterior y situar a la proteína en un medio más favorable para su

conservación. Para ello se carga la proteína concentrada en una columna HP Desalting (GE Healthcare) de 5 mL equilibrada previamente con tampón C. La proteína se eluye a un flujo de 1 mL/min de ese mismo tampón y se colecta (fracciones de 500 μ L) al igual que en los casos anteriores. Las fracciones con proteína son concentradas hasta un volumen final de 500 μ L. La concentración de BsFtsZ obtenida se determina, y a continuación se divide en alícuotas de 25 μ L y se guardan a -80°C hasta su uso.

3.3.3. Determinación de la concentración de BsFtsZ obtenida en la purificación

Para determinar la concentración de la proteína obtenida en la purificación se usan dos procedimientos distintos: el método de doble longitud de onda, que considera la absorción de la proteína y del nucleótido en GdmHCl (6M) y el método de extracción del nucleótido en el cual se determina la concentración del nucleótido unido a BsFtsZ extraído con ácido perclórico. La concentración final es la media del valor obtenido por ambos procedimientos cuyos valores resultan ser muy similares. Para la medida de la absorción se usa en ambos métodos el espectrofotómetro UV-vis Evolution 300 de doble haz, utilizando cubetas de cuarzo con paso óptico de 1 cm.

3.3.3.1. Método de doble longitud de onda

En este método se prepara una dilución 1:20 de la proteína purificada en 6M de GdmHCl y se mide la absorción a dos longitudes de onda: 254 nm (corresponde a la longitud de onda de máxima absorción del nucleótido) y 280 nm (corresponde a la longitud de onda de máxima absorción de la proteína). Entonces según la ley de Lambert-Beer [$A = \varepsilon * C * l$] podemos plantear las siguientes ecuaciones:

$$A_{254} = (\varepsilon_{proteína(254)} * C_{proteína}) + (\varepsilon_{nucleótido(254)} * C_{nucleótido})$$

$$A_{280} = (\varepsilon_{proteína(280)} * C_{proteína}) + (\varepsilon_{nucleótido(280)} * C_{nucleótido})$$

donde ε es el coeficiente de extinción molar, C es la concentración de la proteína y l es el paso óptico (en este caso 1 cm).

Los coeficientes de extinción molar para el nucleótido en GdmHCl son $\varepsilon_{254} = 13620 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y $\varepsilon_{280} = 8100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Correia et al., 1987). Los coeficientes de extinción molar de la proteína se determinan a partir del número de fenilalaninas, tirosinas y triptófanos que contiene conociendo que a 280 nm $\varepsilon_{phe} = 0 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $\varepsilon_{tyr} = 1280 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y $\varepsilon_{trp} = 5690 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

$^1\text{cm}^{-1}$ y a 254 nm $\epsilon_{phe} = 140 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{tyr} = 2795 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ y $\epsilon_{trp} = 309 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Fasman, 1992). Resolviendo el sistema de ecuaciones se puede determinar la concentración de proteína ($C_{proteína}$).

3.3.3.2. Método de extracción del nucleótido

En este segundo método se prepara una dilución 1:20 de la proteína en 0.5 N HClO₄ (que induce la precipitación de la proteína y la liberación del nucleótido) y se incuba a 4°C durante 10 minutos. A continuación se centrifuga la muestra a 12000 rpm durante 10 minutos a 4°C (centrífuga Rotina 380 R Hettich) y se separa el sobrenadante. Se registra la absorción del sobrenadante donde ahora se encuentra el nucleótido libre y teniendo en cuenta que el coeficiente de extinción molar del nucleótido en medio ácido es $\epsilon_{254} = 12400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Diaz and Andreu, 1993), se calcula la concentración de nucleótido con la siguiente ecuación:

$$C_{prot} = \left(\frac{A_{280} - (\epsilon_{nucl(280)} \times C_{nucl})}{\epsilon_{prot(280)}} \right)$$

Para BsFtsZ, la relación que existe entre el número de nucleótido unido por proteína total, es de 0.02.

3.3.4. Polimerización de BsFtsZ por dispersión de luz

La técnica de dispersión de luz se utiliza para comprobar la funcionalidad de BsFtsZ obtenida en la purificación y para estudiar el efecto de diferentes compuestos sobre la polimerización de la proteína. Para los ensayos de polímeros de BsFtsZ se prepararan muestras de la proteína (10 μM) en tampón Hepes (500 μL) y se incuban durante 5 minutos en cubetas de cuarzo en el espectrofluorímetro FluoroMax-4 (Horiba Jobin Yvon). Seguidamente se añaden 10 mM de MgCl₂, y 200 μM de GTP para iniciar la polimerización. La longitud de onda de emisión y excitación de luz para FtsZ es de 350 nm con un ancho de banda de 0.5 nm y un tiempo de integración de 0.5 segundos. La dispersión de la luz se registra durante 1 hora aproximadamente.

3.3.5. Compuestos sintetizados y análogos del compuesto obtenido por cribado virtual del sitio de nucleótido VS18

La preparación, control y ensayos de los compuestos UCM (compuestos sintéticos) y de los compuestos provenientes del cribado virtual en el sitio de unión de nucleótido se

realizaron en el grupo del Prof. José Manuel Andreu del Centro de Investigaciones Biológicas.

Los compuestos UCMs (incluye todos los compuestos derivados de UCM05 y los compuestos fluorescentes derivados de PC) se sintetizaron en el laboratorio de Química Médica, Dpto. Química Orgánica I de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid, como se describe en los trabajos (Ruiz-Avila et al., 2013, Artola et al., 2014).

Los compuestos resultantes del cribado virtual en el sitio de nucleótido (VS) y sus derivados se adquieren a través de distintas casas comerciales (principalmente MolPort y Mcule).

3.3.6. Preparación y control de los compuestos del cribado virtual en el sitio de PC

3.3.6.1. Preparación de los compuestos

Los 45 compuestos elegidos del cribado virtual realizado en el sitio de unión de nucleótido se adquirieron a través de distintas casas comerciales (Enamine, Life Chemicals y Asinex). Una vez recibidos fueron etiquetados con un código que los identifica en todos los ensayos posteriores. Una pequeña fracción de cada compuesto ($2 - 4 \pm 0.2$ mg) se pesa en una balanza AG135 (Mettler Toledo) y se disuelve en DMSO-D6 hasta una concentración de 50 mM. El dimetilsulfóxido (DMSO) es un disolvente orgánico aprótico y altamente polar, que permite solubilizar los compuestos orgánicos fácilmente. Todas las preparaciones se someten a una centrifugación de 5 minutos a 13000 rpm en una centrífuga Mikroliter (Hettich). Si en algún caso se observa precipitación debido a que el compuesto no está soluble se diluye sucesivamente en DMSO hasta la concentración en la que no se observe precipitado. Para la utilización de los compuestos en los diferentes ensayos, por la necesidad de no superar el máximo de 2% de DMSO en la preparación final, se preparan diluciones que permiten un manejo más preciso de los volúmenes del compuesto. Todas las diluciones originales de los compuestos y aquellas que no estuvieron en uso fueron debidamente almacenados a -80°C , mientras las diluciones de uso diario en los ensayos fueron almacenadas a -20°C . Todas son tapadas con *parafilm* y depositadas en cajas que contienen gel de sílice desecante.

3.3.6.2. Determinación de la solubilidad de cada compuesto

La solubilidad de los compuestos se determina en tampón Hepes pH 6.8 en presencia de 2% DMSO. Estas condiciones son las mismas que serán utilizadas en los ensayos con BsFtsZ. Inicialmente se determina el espectro de absorción de distintas diluciones de los compuestos entre 10 y 150 μM en tampón Hepes pH 6.8 (volumen final 300 μL). Con el espectrofotómetro de doble haz Evolution 300 UV-VIS (cubetas con paso óptico de 1cm) se barren longitudes de onda que van desde 200 hasta 600 nm para cubrir el posible rango de absorción del compuesto. El máximo (o máximos) de absorción de cada compuesto se registra y se compara su evolución entre concentraciones.

Posteriormente estas muestras se centrifugan a 100.000 rpm durante 20 minutos a 25°C en tubos de policarbonato usando el rotor TLA-100 de la ultracentrífuga Beckman. Se repite con estas muestras el barrido espectrofotométrico y se compara la evolución de los espectros con los medidos antes de centrifugar. La mayor concentración donde no varía el valor máximo de absorbancia antes y después de centrifugar la muestra es designada como la máxima concentración soluble del compuesto en el tampón experimental. Se ha determinado que para algunos compuestos el límite de solubilidad puede incrementar en presencia de la proteína o cuando son disueltos en distintos medios de cultivo, debido a la presencia de otras moléculas que favorecen que haya unas mejores condiciones de solubilidad en el ambiente.

3.3.7. Ensayos de competición de los ligandos con la sonda fluorescente DFMBNBD en el sitio de unión de PC

La unión del ligando fluorescente DFMBNBD a la proteína produce un aumento en la anisotropía de fluorescencia debido a la reducción de su libertad rotacional (Lakowicz, 1999). El desplazamiento de DFMBNBD por otros ligandos que compitan por el sitio se ve reflejado en la disminución de la anisotropía.

En los ensayos de competición se miden los cambios de la anisotropía de fluorescencia resultantes del desplazamiento de la sonda fluorescente por los ligandos probados. Inicialmente se prepara una mezcla de BsFtsZ (10 μM) con la sonda DFMBNBD (3 μM) en tampón Hepes, 10 mM de MgCl_2 y 0.1 μM de GMPCPP hasta un volumen final de 500 μL . En estas condiciones la proteína polimeriza y el ligando fluorescente se une al interruptor molecular localizado entre los dominios N y C-terminal. Una vez que la proteína ensambla se mide el valor de anisotropía (r) a 25°C. Posteriormente se añaden concentraciones de los

compuestos y se registran los datos de anisotropías. La fracción de DFMBA-NBD unida (V_b) se determina por la ecuación:

$$V_b = \frac{(r - r_{free})}{(r_{max} - r_{free})}$$

donde r_{max} y r_{free} son la anisotropía de la sonda unida y la anisotropía de la sonda libre respectivamente. Mediante el ajuste de los datos de V_b en función de la concentración del compuesto añadido, con el programa Equigra versión 5.0 (Diaz and Buey, 2007) se obtiene la constante de unión aparente (K_b).

Las medidas de anisotropías se realizan en un espectrofluorímetro FluoroMax-4 (Horiba Jobin Yvon), cuya disposición emisor/detector está configurada en forma de L, y se emplean cubetas de cuarzo de 2 x 10 mm. El fluoróforo se excita con una longitud de onda de 474 nm, con un ancho de banda de 5 nm (tamaño de apertura del paso de luz) y su emisión se recoge a 543 nm, con un ancho de banda de 10 nm. En cada medida se obtienen datos de intensidad de emisión de fluorescencia de luz polarizada vertical y horizontalmente, y se registra también la excitación en ambos planos, así como las medidas de anisotropías.

3.3.8. Experimentos *in vivo* con células bacterianas

3.3.8.1. Determinación de la actividad antibacteriana

La concentración mínima inhibitoria (MIC) de cada compuesto frente a la cepa bacteriana se determina siguiendo las directrices que dicta el “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI), organismo que promueve el desarrollo e implementación de pruebas estándar de sensibilidad a antimicrobianos para laboratorios clínicos (CLSI, 2006; CLSI, 1999). La MIC se define como la concentración más baja de compuesto a la que se inhibe el crecimiento bacteriano, medida por absorbancia a 600 nm tras 16-18 h de incubación.

La MIC frente a las cepas de *B. subtilis* 168 se determina mediante macrodiluciones en medio líquido Mueller-Hinton II broth (CAMHB) (Becton Dickinson) en agitación y a 37°C. Inicialmente se preparan cultivos inoculando la cepa en 10mL de medio líquido CAMHB II y se deja crecer durante la noche. Al día siguiente se prepara un cultivo fresco a partir del inicial y se deja crecer hasta alcanzar una OD600= 0.1 - 0.2. Entonces, el cultivo se diluye 150 veces con medio fresco y se preparan volúmenes de 500 μ L con las concentraciones

deseadas de los compuestos. Los compuestos se añaden sin sobrepasar el umbral del 2% total de DMSO en el cultivo ya que concentraciones altas de DMSO pueden inhibir el crecimiento bacteriano. En cualquier caso como control de los experimentos se preparan muestras en presencia solo de un 2% de DMSO. Después de 16-18 h en agitación a 37°C se realizan las medidas de absorbancia a 600 nm. En todos los procesos de manipulación de cultivos y células se trabaja en condiciones de esterilidad, bajo la llama azul de un mechero Bunsen.

3.3.8.2. Efecto de los compuestos en el perfil fenotípico de división bacteriana

Para estudiar el efecto de los compuestos en la división celular bacteriana se visualizan células de *B. subtilis* incubadas con los compuestos en un microscopio óptico de contraste de fases. Si alguno de los compuestos afecta la división celular se observa un alargamiento de las células al no poder finalizar el proceso de división (Erickson and Osawa, 2010). Para ello, células de *B. subtilis* 168 que han crecido hasta 0.1-0.2 unidades de absorción óptica a 600 nm son separadas en viales de 500 µL e incubadas con concentraciones deseadas de los compuestos a 37°C. Después de 3 h de incubación se visualizan en un microscopio óptico de contraste de fases, con el objetivo 40 x (Plan-Neofluar).

3.3.8.3. Estudio del efecto de los compuestos en la localización del anillo Z

Para observar FtsZ en células vivas se utilizó la cepa de *B. subtilis* SU570 (168 rpcC2 ftsZ::FtsZ-gfp-Spec (Levin et al., 1999, Strauss et al., 2012)), cuya FtsZ nativa ha sido reemplazada por una FtsZ fusionada a GFP. Esta cepa (facilitada por la Dra. Elisabeth J. Harry del Instituto de Biociencias Médicas y Moleculares de Australia) se crece en el medio Penassay Antibiotic Broth (PAB, Becton Dickinson) con 50 µg/mL de espectinomicina, a 30°C hasta un valor de absorbancia de 0.2 (a 600 nm).

En ese punto se toman alícuotas de 500 µL que se incuban con los compuestos a las concentraciones escogidas durante 2 h. Pasado este tiempo se toman 10 µL de cada muestra y se observan en el microscopio de fluorescencia (Zeiss Axioplan), equipado con un objetivo Plan Apochromatic (100X) y una cámara digital Orca-Flash 4.0 CMOS (Hamamatsu C11440).

3.4. Determinación de la morfología de los polímeros de BsFtsZ por dispersión de rayos-X a ángulos bajo y crio-EM

3.4.1. Experimentos de dispersión de rayos-X a ángulos bajos (SAXS)

En un experimento de dispersión de rayos-X a ángulos bajo (SAXS) una muestra en solución es expuesta a un haz incidente de rayos-X de una longitud de onda específica, monocromática y colimada (Boldon et al., 2015). La radiación dispersada como resultado de la interacción con la muestra produce máximos de interferencia que pueden ser detectados (Pauw, 2013). La detección se realiza a valores pequeños del ángulo formado entre el haz incidente y el dispersado, definido como 2θ . En lugar de utilizar el ángulo de dispersión como variable de medida, es conveniente definir una magnitud denominada vector de dispersión que se define como $\vec{S} = \vec{S}_d/\lambda - \vec{S}_o/\lambda$, donde λ es la longitud de onda y \vec{S}_o y \vec{S}_d son los vectores unidad del haz incidente y del haz dispersado respectivamente.

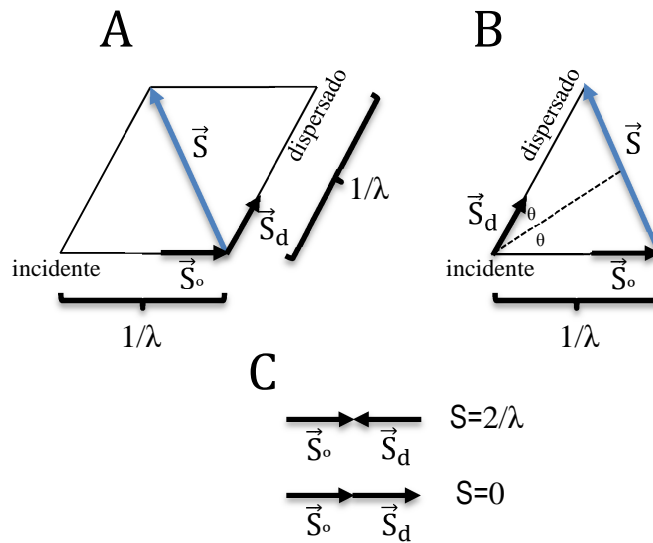


Figura 8. Vector de dispersión. A) Representación del vector de dispersión. B) Si se traslada el vector unidad de dispersión \vec{S}_d a una distancia $1/\lambda$, se puede ver cómo la longitud de \vec{S} está relacionada con el ángulo de dispersión θ . C) Valores máximos y mínimos de $|\vec{S}|$ (Cantor y Schimmel, 1980).

En la Figura 8 se muestra el significado físico de \vec{S} . La dirección del vector de dispersión es la bisectriz del ángulo que forman el haz incidente y el haz dispersado (panel A). De acuerdo con el panel B:

$$\vec{S} \cdot \vec{S} = (\vec{S}_d^2 + \vec{S}_o^2 - 2\vec{S}_d\vec{S}_o) / \lambda^2$$

$$= 2(1 - \cos 2\theta)/\lambda^2 = (4\sin^2\theta)/\lambda^2$$

$$|\vec{S}| = 2|\sin\theta|/\lambda \quad 0 \leq |\vec{S}| \leq 2/\lambda$$

cómo \vec{S} está limitado entre 0 y $2/\lambda$ (Panel C), los posibles valores del vector de dispersión quedan restringidos en el espacio a una esfera de radio $1/\lambda$. Esta esfera se denomina esfera de reflexión, y el espacio definido por los valores de \vec{S} , espacio recíproco.

El vector de dispersión también es definido en la literatura como: $|\vec{q}| = 2\pi|\vec{S}|$, por lo que obtenemos:

$$|\vec{q}| = 4\pi|\sin\theta|/\lambda$$

A partir de la ley de Bragg, $\lambda = 2d\sin\theta$, donde d es la distancia entre planos de la red cristalina, podemos obtener la siguiente relación para el vector de dispersión \vec{S} :

$$d = 1/|\vec{S}|$$

lo que indica que a medida que disminuye \vec{S} (vectores de dispersión más próximos al centro del detector) la distancia entre planos medidos aumenta. Estos vectores describen los primeros armónicos de la estructura y son los de mejor definición.

3.4.1.1. SAXS de polímeros de BsFtsZ y BsFtsZ- Δ Ct

Los patrones de dispersión de SAXS se recogen tanto en condiciones que promueven la polimerización como en condiciones que la dificultan. Las medidas de SAXS para BsFtsZ y la forma truncada BsFtsZ- Δ Ct se realizan en la estación de difracción no cristalina BL11-NCD del Laboratorio de luz del sincrotrón ALBA. Las medidas de SAXS de BsFtsZ fueron tomadas por mí y las de BsFtsZ- Δ Ct fueron tomadas por Albert Vergoños. En estos experimentos se emplea un haz de luz con una energía de 10keV ($\lambda = 1.24 \text{ \AA}$). El detector, situado a 2 m de la muestra, es un CCD ADSC Quantum 210r, con un área activa de $210 \times 210 \text{ mm}^2$ (4096 x 4096 píxeles). El detector es calibrado con behenato de plata, que presenta un espaciado de 58.38 \AA en su primer máximo en el perfil de dispersión (Wolf et al., 2001).

El ensamblaje de la proteína se realiza en tampón Tris50 a 25°C y a una concentración de 2 g/l. La polimerización se inicia añadiendo 10 mM de MgCl_2 y 0.1 mM de GMPCPP o 1 mM de GTP. La cubeta que contiene las muestras se conecta a un baño de agua programado a

la temperatura adecuada. La región de incidencia del haz en la cubeta es de aproximadamente 600 μm (horizontal) x 138 μm (vertical). La solución de FtsZ es escaneada en 63 puntos diferentes igualmente distribuidos y separados en 3 mm horizontalmente y 7 mm en el eje vertical. Cada punto es irradiando durante 0.5 s y entre un punto y otro hay un tiempo de espera de 15 s para evitar los daños por radiación. El tiempo muerto entre el cargado de la muestra y la medición es de aproximadamente 2 min.

La integración de los datos de dispersión se realiza usando el programa informático FIT2D (<http://www.esrf.eu/computing/scientific/FIT2D>) y se procesan y analizan con los programas informáticos PRIMUS (Konarev et al., 2003) y GNOM (Svergun, 1992) respectivamente. Para restar la contribución del solvente se tomaron datos de dispersión del tampón.

3.4.2. Modelos para la dispersión de rayos-X de polímeros de FtsZ

Para tratar de reproducir los perfiles de dispersión de los polímeros de FtsZ obtenidos en los experimentos, se construyen modelos de polímeros y se calcula el perfil teórico de dispersión. Los modelos de polímeros se construyen usando el programa informático FilaSitus (Wriggers, 2012) a partir de la estructura cristalográfica de SaFtsZ (PDB: 3vo8). Con el programa CRY SOL (Svergun et al., 1995) se generan los perfiles de dispersión teóricos para cada uno de los modelos. Los parámetros usados son los que tiene el programa por defecto con las siguientes excepciones: orden máximo de armónicos 30, orden de la grid de Fibonacci 18, máximo valor de s 0.30 y número de puntos 256 excepto por los modelos de anillos que fue de 1024.

3.4.3. Crio-EM de polímeros de BsFtsZ y BsFtsZ- ΔCt

La forma de los polímeros de BsFtsZ y BsFtsZ- ΔCt también se ha estudiado por crio-EM por la Dra. Sonia Huecas (lab. del Prof. J. M. Andreu) en el servicio de microscopía del CIB (Rafael Núñez-Ramírez). Para ello, las muestras se toman durante la polimerización de la proteína, monitorizándola por ensayos de dispersión de luz y se incuban sobre una rejilla cubierta con una película de carbón con agujeros (*Quantifoil*), previamente tratada por radiación iónica con un equipo *Glow-discharge*. Las muestras son vitrificadas en etano líquido a alta velocidad con un sistema de preparación de crio-muestras de GATAN (*Cryoplunge*).

Las micrografías se toman a una magnificación de 40000x usando un microscopio

electrónico de transmisión JEOL JEM-1230, operado a 100 kV y equipado con un crio-brazo y un sistema de anticontaminación de GATAN. Las imágenes se registran bajo condiciones de mínima dosis de electrones con una cámara CCD GATAN Bioscan 702. Para determinar la distancia entre filamentos, las imágenes se guardan en ficheros .PNG y se miden con el programa Image-J. Las imágenes de crio-EM se procesan con EMAN, usando un filtro de baja frecuencia para eliminar el ruido presente a frecuencias altas.

4. Resultados y Discusión

4. Resultados y Discusión

4.1. Dinámica de los filamentos de SaFtsZ

El ensamblaje de la proteína de división celular FtsZ depende de la unión del nucleótido y de su hidrólisis; mientras el GTP favorece el ensamblaje, el GDP favorece el desensamblaje (véase Introducción). Para estudiar el efecto del nucleótido en la flexibilidad y curvatura de los filamentos de FtsZ utilizamos simulaciones de DM con las estructuras de *S. aureus* (Matsui et al., 2012) que son las únicas que corresponden a un filamento funcional. En estas estructuras el empaquetamiento del cristal muestra un filamento recto donde la interfaz formada entre monómeros es mucho más compacta que en estructuras de otras especies (Oliva et al., 2004) y la hendidura entre los dominios N y C-terminal, está en la conformación abierta. A partir de estas estructuras funcionales se construyeron filamentos rectos en tres condiciones diferentes de nucleótido (SaFtsZ-GTP, SaFtsZ-GDP, SaFtsZ-GDP+PC) usando la simetría del cristal. El tamaño de los filamentos (7 monómeros) y el tiempo de simulación (300 o 500 ns) nos permite observar conformaciones representativas de los filamentos en presencia de los diferentes ligandos (detalles en Materiales y Métodos).

4.1.1. Flexibilidad y curvatura dependiente del nucleótido

El estado inicial de los filamentos en todas las trayectorias de DM corresponde a los filamentos rectos del cristal. El primer resultado que se obtiene de todas las simulaciones realizadas es que para los diferentes ligandos y condiciones los filamentos se curvan rápidamente poniendo de manifiesto su flexibilidad intrínseca. Los filamentos con GDP exhiben una mayor variabilidad conformacional, mientras los que tienen GTP y PC adoptan conformaciones curvadas más rígidas. Estas diferencias dinámicas se ilustran en la Figura 9A, donde el estado final de cada filamento (amarillo) se superpone a la conformación alcanzada a los 100 ns de DM. Lógicamente, las diferencias en la dinámica y curvatura de los filamentos están relacionadas con las interacciones entre monómeros. El filamento de GDP exhibe varios patrones curvados, adoptando incluso una conformación en forma de S (Figura 9A). En estos filamentos las interfaces formadas entre monómeros adyacentes se encuentran en dos conformaciones distintas, encerrando al nucleótido (cerrada) o en una conformación abierta donde el nucleótido queda más expuesto al solvente como se observa en la Figura 9B. En esta figura se representan interfaces de dímeros representativos con los diferentes ligandos obtenidas del promedio de las estructuras de los últimos 100 ns de simulación. En el

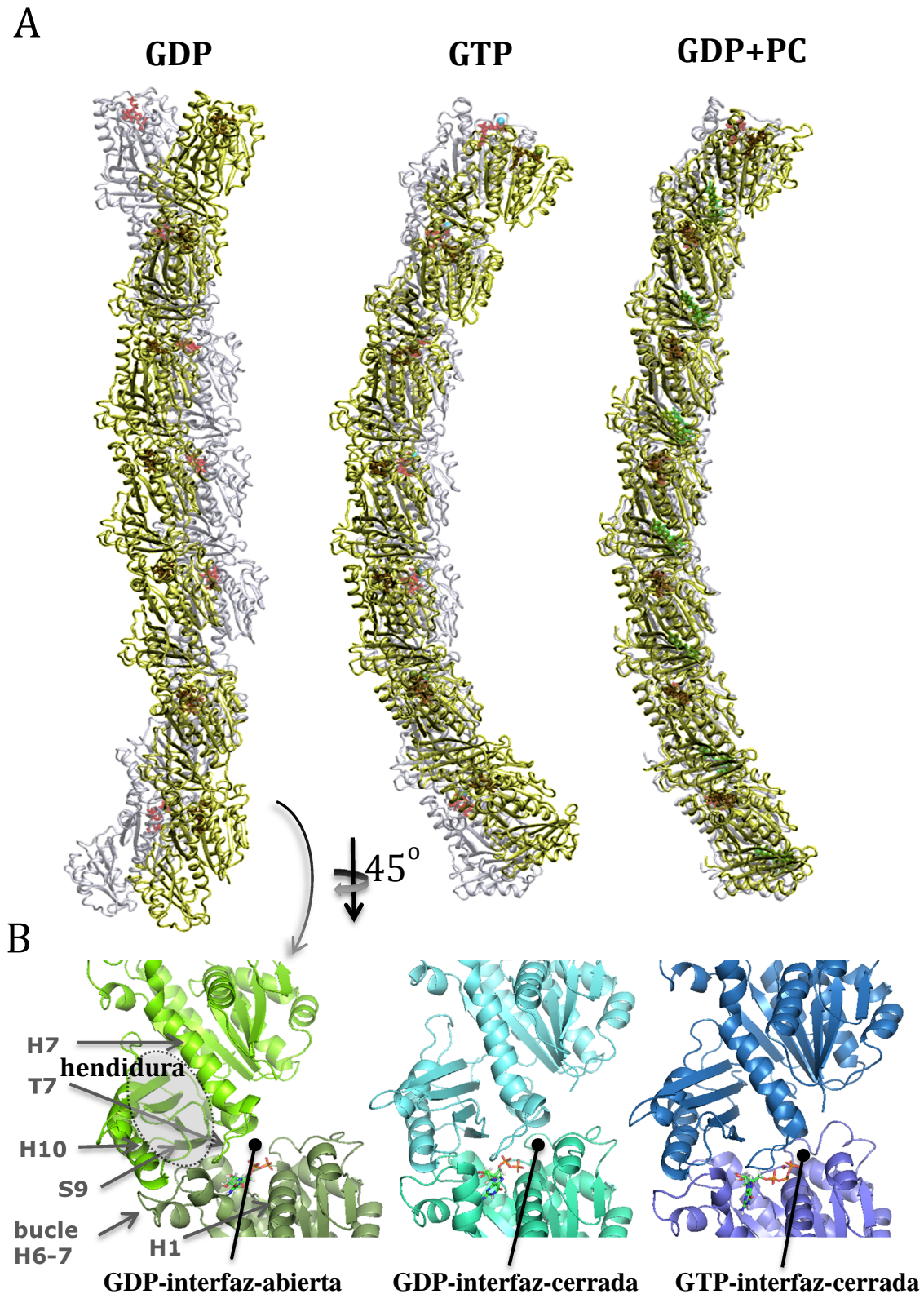


Figura 9. A) Estructuras correspondientes a las trayectorias de DM de los filamentos de GDP, GTP y GDP+PC, tomadas desde una vista perpendicular a la máxima curvatura obtenida con los filamentos de GTP y GDP. En cada caso, la estructura final después de 300 ns (amarillo) se superpone a la alcanzada a los 100 ns de simulación (gris). B) Imágenes ilustrativas correspondientes a interfaces de GDP abierta (verde), GDP cerrada (cian) y GTP (azul). En este panel la orientación corresponde a los filamentos del panel A rotados 45° alrededor del eje del filamento. Se indican los elementos de estructura secundaria mencionados en el texto.

filamento con GTP, el fosfato γ y el ión Mg^{2+} coordinado inducen una curvatura en una orientación preferencial (Figura 9A), en la cual las interfaces definidas por la asociación entre monómeros a lo largo del filamento están cerradas (Figura 9B). En la Figura 9B se muestra la

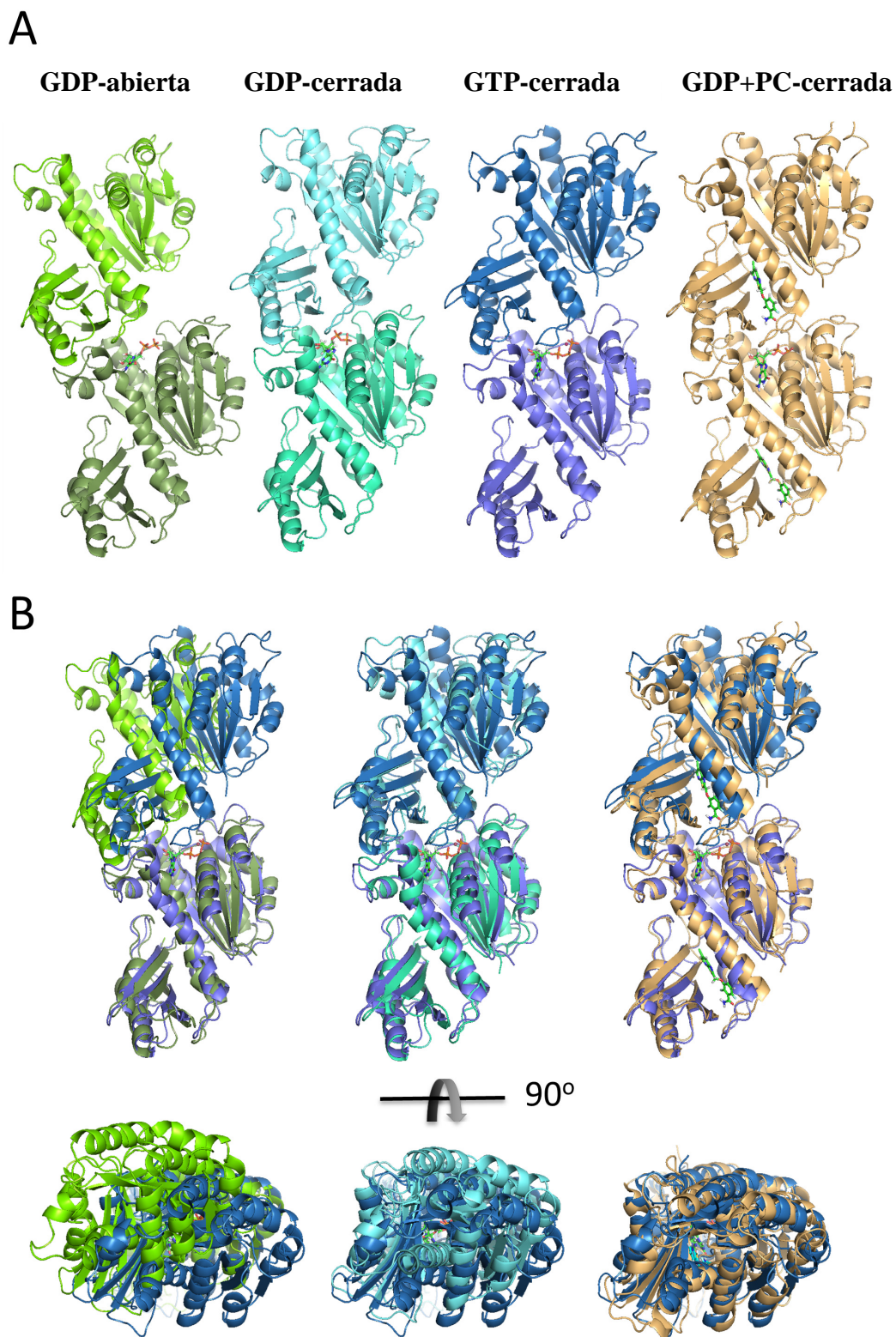


Figura 10. A) Estructuras de dímeros representativos obtenidos de la media de los últimos 100 ns, correspondientes a interfaces de GDP-abiertas (verde), GDP-cerradas (cian), GTP (azul) y PC (marrón). B) Alineamiento de los dímeros de GDP y PC con el dímerno de GTP.

interfaz abierta en presencia de GDP (verde), en la cual el nucleótido queda más expuesto al solvente que en las interfaces cerradas de GTP y GDP donde el monómero superior cubre totalmente el sitio del nucleótido. La existencia de una interacción más fuerte en la conformación cerrada se refleja en el aumento del área no accesible que pasa de 1017 \AA^2 en la interfaz abierta de GDP a 1107 y 1168 \AA^2 en las interfaces cerradas de GDP y GTP respectivamente. La interfaz abierta de GDP podría facilitar la disociación del nucleótido en el polímero de FtsZ (Huecas et al., 2007) y el intercambio por GTP. En la Figura 10 se muestra las diferencias de las distintas conformaciones alineando los dímeros representativos. Se observa que la interfaz cerrada de GDP (en verde) está curvada y con menos torsión respecto a la de GTP de referencia (en azul). El filamento con PC unido, que es más rígido, se curva obstruyendo el nucleótido, sugiriendo un efecto alostérico de este agente estabilizante en la interfaz de asociación entre monómeros.

Para caracterizar la curvatura intrínseca de los filamentos simulados se monitorizó la orientación relativa entre cada par de monómeros durante los últimos 100 ns de cada simulación, como se describió previamente (Hsin et al., 2012, Grafmuller and Voth, 2011) (detalles en Materiales y Métodos). Se analizaron ocho interfaces por caso teniendo en cuenta las dos simulaciones realizadas y excluyendo los monómeros de los extremos para evitar efectos de borde. Nótese que para facilitar la comparación entre las diferentes interfaces, hemos calculado los ángulos de curvatura usando una estructura de referencia fija alineada en la dirección de máxima curvatura del filamento con GTP (Figura 11A). Sin embargo, la dirección de curvatura máxima para los otros casos muestra diferentes orientaciones. En cualquier caso la distribución angular de las interfaces (Figura 11B) es ancha para los 3 estados, indicando que son sistemas muy flexibles. La curvatura para la interfaz GDP-abierta apunta aproximadamente hacia el C-terminal, mientras que las interfaces cerradas de GDP apuntan en la dirección opuesta (Figura 11A). Los filamentos con PC se curvan con un ángulo entre monómeros de $-4.6^\circ \pm 4.5^\circ$ (Figura 11B, en azul) en la misma dirección que las interfaces cerradas de GDP, y los filamentos con GTP, que exhiben el mayor cierre de las interfaces con un ángulo de $-9.0^\circ \pm 4.3^\circ$ (Figura 11B, en rojo) se curvan en una dirección que difiere con la de GDP-cerrado en un ángulo de $\sim 35^\circ$ (Figura 11A, en azul). Mientras que con GTP y PC unido aparece solo un pico a valores negativos que se corresponde con interfaces cerradas, en el caso de los filamentos con GDP unido (Figura 11B, verde), además del pico a valores negativos ($-6.6^\circ \pm 4.0^\circ$), aparece una población adicional a $6.6^\circ \pm 4.4^\circ$, que corresponde a las interfaces abiertas entre monómeros.

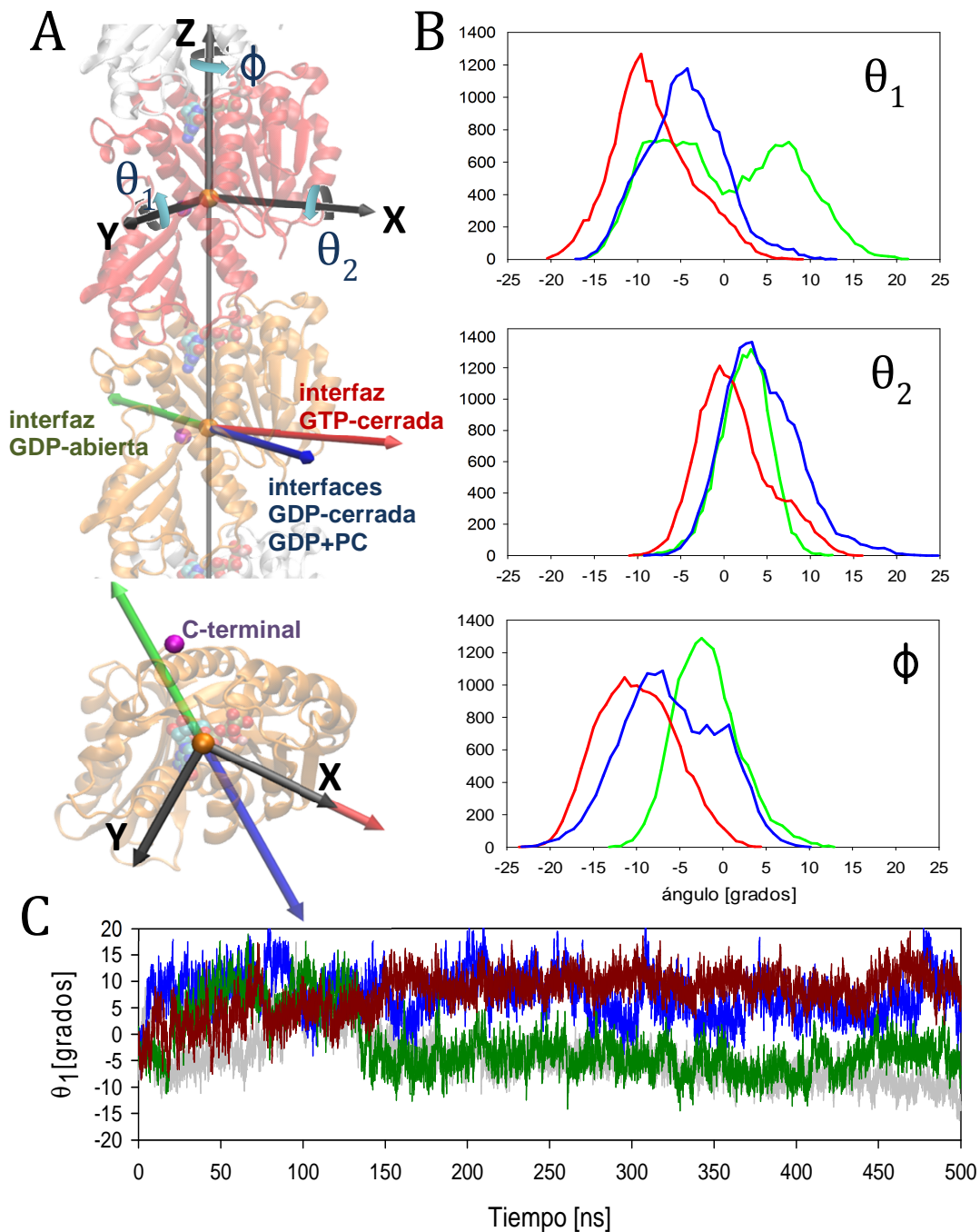


Figura 11. Caracterización de las distintas conformaciones de las interfaces. A) Estructura de referencia usada para calcular la rotación relativa entre monómeros consecutivos dentro del filamento. La rotación alrededor del eje Z, el cual se extiende a lo largo del filamento, describe el ángulo de torsión entre monómeros consecutivos (Φ), el ángulo de curvatura principal θ_1 fue elegido en la dirección de máxima curvatura del GTP y el ángulo de curvatura secundario θ_2 fue definido alrededor del eje X (véase Figura 6 Materiales y Métodos para detalles). Las direcciones de máxima curvatura se representan en la estructura de referencia: interfaces GDP-abierto (verde), GDP-cerrado (azul), GTP-cerrado (rojo). El ángulo de máxima curvatura para las interfaces abiertas de GDP apunta aproximadamente al C-terminal, mientras la interfaz cerrada de GDP apunta en la dirección opuesta. Las direcciones entre el GTP y el GDP-cerrado difieren en 35° . La vista de la estructura representada es equivalente a la tubulina observada desde el interior del microtúbulo. B) Los gráficos representan la distribución angular para las interfaces con GDP (verde), GTP (rojo) y PC (azul) para los últimos 100 ns de simulación. C) Evolución temporal del ángulo principal de curvatura θ_1 para las cuatro interfaces centrales de un filamento de GDP. El filamento converge heterogéneamente en interfaces abiertas ($\sim 6^\circ$) y cerradas ($\sim -6^\circ$). Sin embargo la asociación entre monómeros permanece cerrada durante toda la simulación para los filamentos de GTP y GDP+PC (Figura 12).

En estudios anteriores de DM con dímeros de *Archaeal* (MjFtsZ), también se observaron diferentes configuraciones de interfaces, con una transición de la interfaz abierta de GDP a cerrada (Hsin et al., 2012). Nuestras simulaciones corroboran esta transición pero además muestran que diferentes conformaciones de interfaces abiertas y cerradas pueden coexistir a lo largo del tiempo, lo cual es indicativo de un equilibrio dinámico. La Figura 11C muestra los cambios dinámicos del ángulo de curvatura θ_1 observados durante el tiempo de simulación, para cuatro interfaces en un filamento de GDP. Durante la primera parte de la simulación, se observan fluctuaciones entre configuraciones de interfaces abiertas y cerradas, pero al final el filamento queda compuesto por interfaces heterogéneas que fluctúan alrededor de una configuración dada. Por ejemplo la forma de S en el filamento de GDP de la Figura 9A corresponde a interfaces con configuraciones alternas abiertas y cerradas. Al contrario, en los filamentos con GTP y GDP+PC las interfaces entre monómeros permanecen cerradas durante toda la simulación (Figura 12).

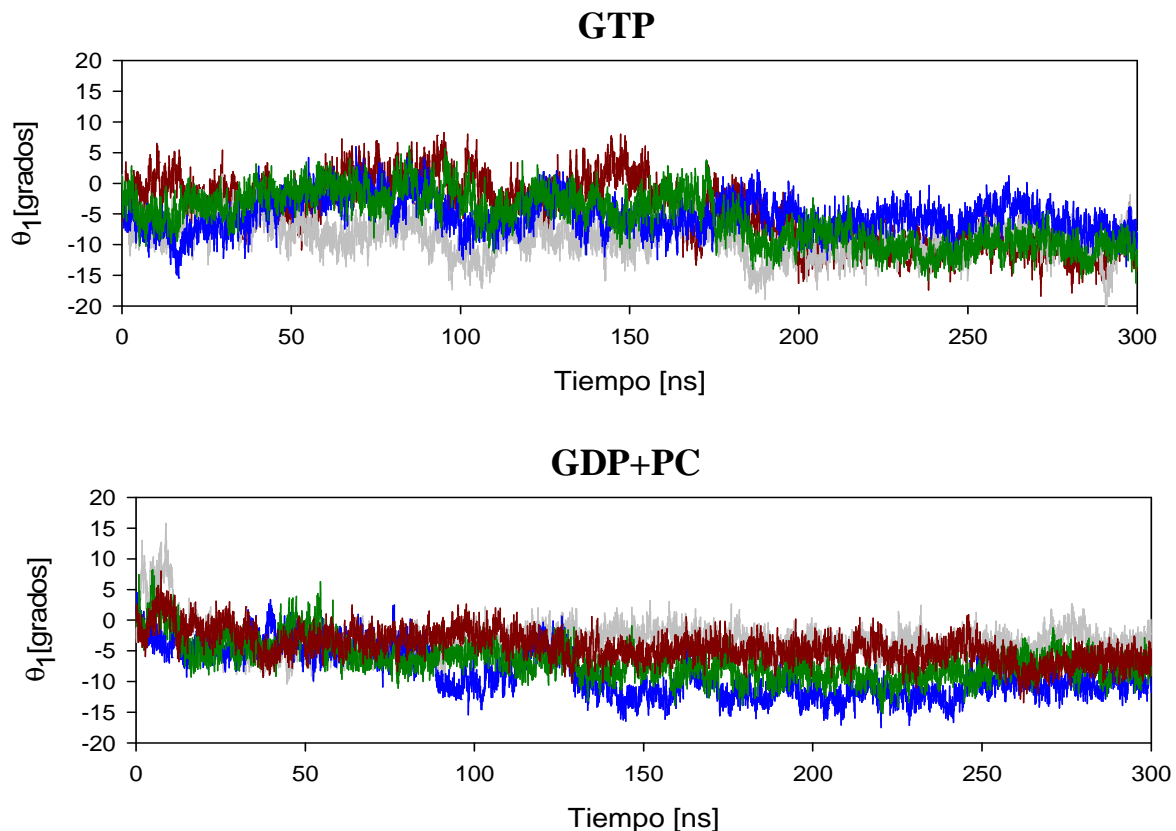


Figura 12. Evolución temporal del ángulo principal de curvatura θ_1 para las cuatro interfaces centrales de un filamento de GTP y de GDP+PC.

Las variaciones del ángulo de curvatura θ_2 son pequeñas con valores de $2.6^\circ \pm 2.8^\circ$ y $3.8^\circ \pm 4.2^\circ$ para filamentos con GDP y GDP+PC respectivamente, mientras que los filamentos con GTP oscilan alrededor de la posición inicial ($-0.3^\circ \pm 3.7^\circ$). Mayores diferencias se encuentran en el ángulo de torsión Φ entre monómeros consecutivos, con valores de $-10.2^\circ \pm 4.8^\circ$ en los filamentos con GTP, $-2.2^\circ \pm 3.5^\circ$ para los filamentos con GDP y $-6.2^\circ \pm 6.1^\circ$ en presencia del PC (Figura 11B).

Las curvaturas obtenidas son mucho más reducidas que las reportadas con el dímero de MtFtsZ (Li et al., 2013) y MjFtsZ (Hsin et al., 2012), que presentan ángulos de curvatura de 49.5° y 26° respectivamente. Con el objetivo de comparar con la tubulina, homólogo estructural de la FtsZ, en la Figura 11A se han representado las direcciones de curvatura de los diferentes estados en una vista desde el interior y desde arriba del microtúbulo. Como se observa en la figura, la dirección de curvatura de la interfaz abierta de GDP apunta hacia el exterior del microtúbulo, y es similar a la dirección en que se curvan los protofilamentos del microtúbulo en el momento del desensamblaje (Alushin et al., 2014).

Nuestras simulaciones no muestran grandes cambios conformacionales entre las subunidades con GTP y GDP. La desviación cuadrática media (RMSD) de los monómeros alineados independientemente dentro del filamento de GTP y GDP son similares (Figura 13). En ambos casos las mayores fluctuaciones aparecen en los bucles T3, T7, H6-H7 y en el dominio C-terminal, que fluctúa manteniendo la hendidura con la hélice H7 similar a la conformación del cristal. El extremo de la hélice H7 se curva más en presencia de GTP, que en los filamentos con GDP (Figura 13B). En el caso de los filamentos con PC, la rigidez se refleja en menores valores de RMSD del monómero, aunque las fluctuaciones del bucle H6-H7 y del C-terminal aún son evidentes. Aunque se observa flexibilidad en el bucle T3, las diferencias relativas en nuestras simulaciones en presencia de GTP o GDP no proporcionan ninguna evidencia de un cambio conformacional que provoque la apertura o cierre de las interfaces como se ha propuesto en Hsin y col. (Hsin et al., 2012). Sorprendentemente, los cambios conformacionales de los monómeros dentro de los filamentos de GDP y GTP son muy similares cuando los comparamos entre sí (Figura 13B), lo que indica que las diferencias dinámicas observadas se deben fundamentalmente a un movimiento de bisagra de cuerpos rígidos entre monómeros.

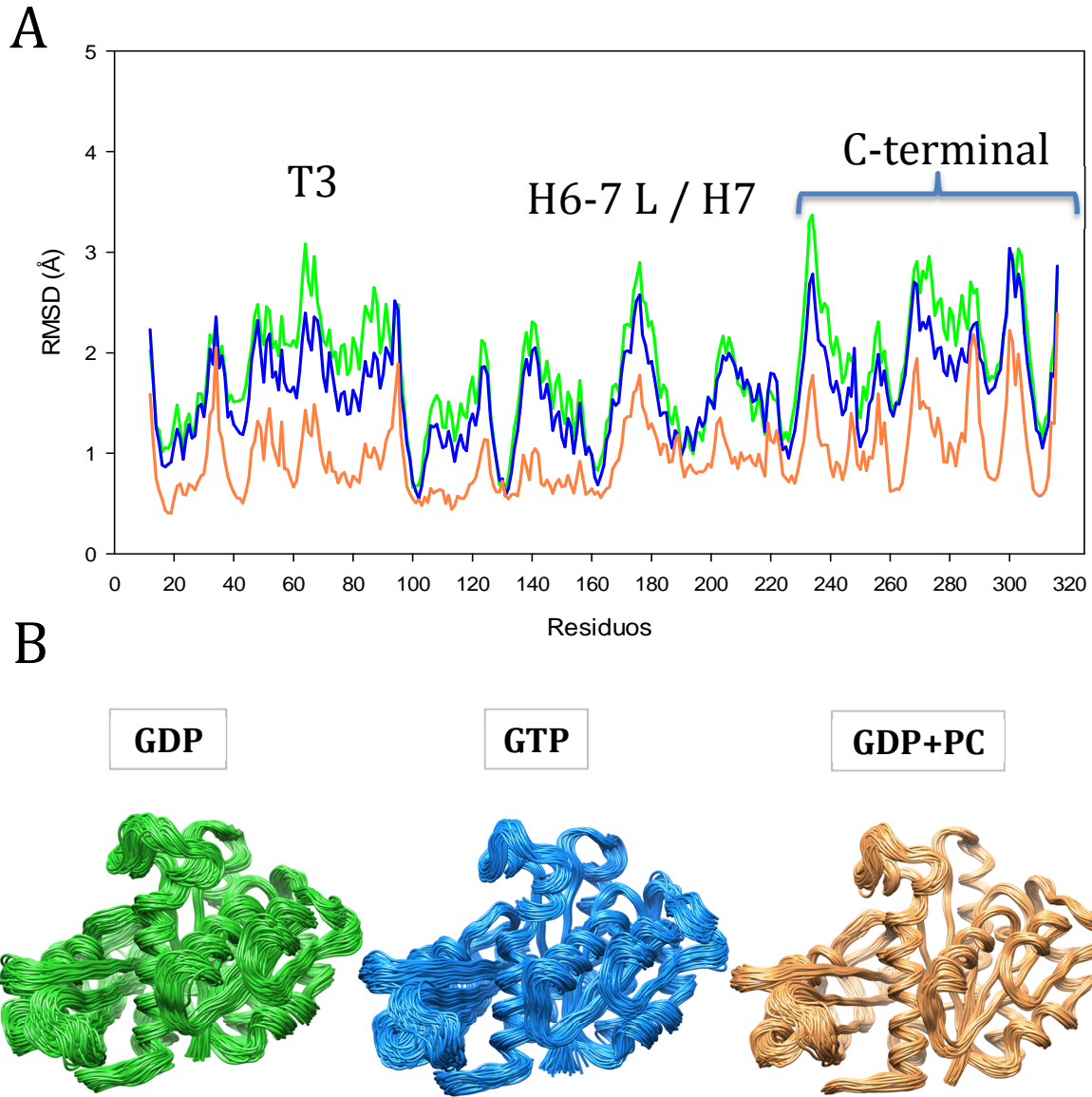


Figura 13. Conformaciones de monómeros representativos dentro de los filamentos con GDP (verde), GTP (azul) y PC (naranja), durante los últimos 100 ns de simulación, alienados usando THESEUS (Theobald and Wuttke, 2008). A) RMSD por residuo (promedio) obtenido de la superposición. B) Conjunto de conformaciones de monómeros superpuestos.

Basado en las distribuciones angulares se estimaron parámetros macroscópicos como la fuerza producida por la transición entre estados y el radio de curvatura. La fuerza radial producida por monómero en un filamento es proporcional a $\Delta\theta k_B T / (2l\sigma^2)$ (Hsin et al., 2012), donde $\Delta\theta$ es el ángulo medio de curvatura entre dos estados conformacionales, σ es la varianza de θ en la conformación final, l es la longitud de un monómero de FtsZ (~4.0 nm), T es la temperatura (298 K) y k_B es la constante de Boltzmann. Partiendo de la distribución angular de θ_1 , la transición de la interfaz con GTP a la interfaz abierta con GDP debido a la hidrólisis produce una fuerza radial de 23 pN en cada interfaz y la transición hacia el estado

cerrado con GDP produce una fuerza menor de 4 pN. La transición entre el estado cerrado y abierto de GDP produce una fuerza significativa de 19 pN. Según estas estimaciones, la transición entre las distintas conformaciones de las interfaces junto con los elementos que anclan la membrana podrían proporcionar la fuerza de constricción para dividir la bacteria sin la necesidad de alguna otra proteína (Erickson, 2009, Erickson et al., 2010). Anteriores trabajos de simulaciones de DM de MjFtsZ reportaron fuerzas algo mayores de 30 pN para la transición de GTP a GDP-abierto y 20 pN por monómero para la transición GTP-GDP-cerrado (Hsin et al., 2012). Sin embargo, todos estos cálculos son aproximaciones y previsiblemente están sobrestimados. Por ejemplo la fuerza de constricción medida experimentalmente es de 5 pN para un protofilamento de microtúbulo, estructuralmente relacionado con los filamentos de FtsZ (Grishchuk et al., 2005). De cualquier modo, filamentos homogéneos con interfaces GDP-abiertas o GDP-cerradas son una abstracción y como ocurre en nuestras simulaciones una variedad de conformaciones pueden coexistir a lo largo del filamento que permitirán distintas curvaturas y fuerzas de constricción más pequeñas. El marco real es bastante más complejo, ya que los filamentos de FtsZ contienen una mezcla de subunidades con GDP y GTP que pueden alcanzar una proporción 50:50 (Osawa and Erickson, 2011), y que además pueden intercambiar el nucleótido (Chen and Erickson, 2009).

El radio de curvatura medio para filamentos homogéneos, estimado como l/θ_1 , fue de 50 nm, 26 nm y 35 nm, para PC, GTP y GDP-cerrado respectivamente, mientras la interfaz de GDP-abierto tiene una curvatura opuesta de 35 nm de radio. La curvatura para los filamentos con PC es compatible con los toroides de ~100 nm de diámetro observados por microscopía electrónica de polímeros de SaFtsZ ensamblados con PC (véase Figura 8C en (Andreu et al., 2010)).

En nuestras simulaciones los filamentos de SaFtsZ son aparentemente bastante flexibles. La longitud de persistencia de acuerdo con el método de Grafmuller y Voth (Grafmuller and Voth, 2011) (véase Materiales y Métodos) fue de 88 nm para los filamentos de GTP y 113 nm para los de GDP+PC, mucho más pequeña que la obtenida para protofilamentos del microtúbulo (Grafmuller and Voth, 2011). La heterogeneidad dinámica en los filamentos con GDP nos dificulta el cálculo fiable de la longitud de persistencia. La comparación con datos experimentales es compleja porque los valores de longitud de persistencia están calculados con filamentos mucho más grandes que los heptámeros simulados. Además, existe una gran disparidad en los valores de persistencia encontrados en la literatura. Por ejemplo, mediante

crio-EM Turner y colaboradores (Turner et al., 2012) visualizaron filamentos de EcFtsZ relativamente rectos con una longitud de persistencia de 1.4 μm . Por el contrario, también usando crio-EM se han obtenido longitudes de persistencias en el rango de 100 nm con filamentos de EcFtsZ (Huecas et al., 2008). Por otro lado, estas medidas se basan solamente en el ángulo de curvatura, obviando la contribución del ángulo de torsión. En nuestras simulaciones de filamentos con GTP el componente torsional es significativo. La importancia de la torsión también ha sido resaltada recientemente en estudios de filamentos de FtsZ fijados en mica usando microscopía de fuerza atómica (Gonzalez de Prado Salas et al., 2014).

4.1.2. Interacciones en las interfaces entre monómeros reguladas por nucleótido

Las diferencias en la dinámica y curvatura de los filamentos están lógicamente relacionadas con las interacciones entre monómeros. Por ello, se calcularon los contactos entre todos los pares de residuos de monómeros consecutivos dentro del filamento durante los últimos 100 ns de simulación. En la Figura 14 el promedio de los contactos entre monómeros es proyectado en la superficie de la interfaz correspondiente siguiendo un gradiente de colores rojo-blanco-azul; donde las regiones azules son aquellas que están en contacto durante todo el tiempo de simulación, las regiones blancas un 50% del tiempo y en color rojo están aquellas regiones donde no hay contactos. En los diferentes estados hay zonas que comparten contactos comunes, pero claramente existen diferencias dependiendo del nucleótido unido. En las interfaces cerradas de GDP y GTP los patrones de contactos son bastante similares. Aun así, en los filamentos con GTP hay más contactos estables alrededor del nucleótido y las interfaces cerradas de GDP tienen menos contactos estables entre las regiones H1/H2/T3 y H8/T7 de los monómeros inferiores y superiores respectivamente. Finalmente, las interfaces abiertas de GDP lógicamente contienen menos regiones de interacción, con pocos contactos entre las hélices H1 y H2 y el bucle T7 sugiriendo una asociación monómero–monómero más débil.

Mediante el análisis de contactos se identificaron dos regiones principales (Figura 15). La primera región incluye las interacciones comunes del dominio N-terminal de la subunidad de abajo con el dominio C-terminal (aminoácidos 260-300) de la subunidad superior. Las interacciones en esta región son similares en las interfaces con GTP y GDP y se corresponde con la zona azul cercana al centro de cada panel en la Figura 14. Esta región incluye los contactos de la hélice H10 del monómero superior con los bucles T5 y H6-H7 del monómero inferior. Un puente de hidrógeno estable entre los residuos Arg-141 y Asp-289 une la hélice

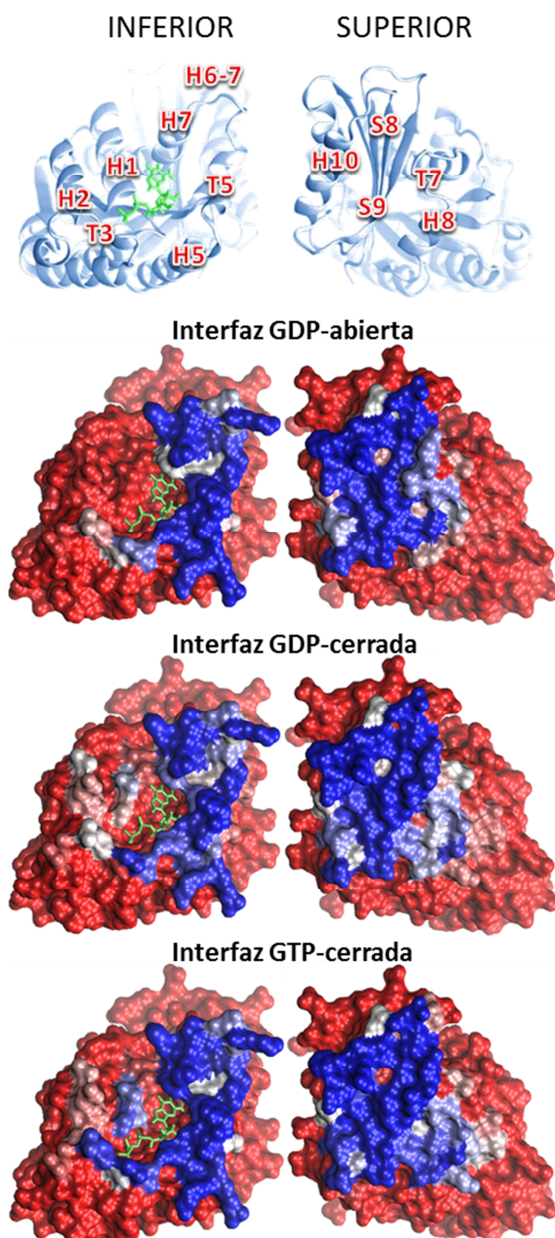


Figura 14: Superficies de contacto de las interfaces. Se representan los contactos promedios entre dos monómeros consecutivos en el filamento. Dos residuos se consideraron en contacto si al menos un par de átomos está a una distancia inferior a 4 Å. Las imágenes corresponden a la superficie superior del monómero de abajo (izquierda) y a la superficie inferior del monómero de arriba (derecha). La presencia de contactos durante la simulación se proyecta en la interfaz correspondiente mediante un gradiente de colores rojo-blanco-azul. Las regiones en azul corresponden con contactos estables durante toda la simulación, regiones en blanco corresponden a contactos presentes durante el 50% de la simulación y en rojo a regiones que no presentan contactos. Los contactos se han calculado solo para las cuatro interfaces centrales de los filamentos durante los últimos 100 ns de simulación para evitar efectos de borde.

H5 y el bucle H10-S9 respectivamente. Además se establecen otros puentes de hidrógenos entre Met-179 (bucle H6-H7) y Leu-270 (H10), y entre Lys-142 (H5) y Asp-213 (H8). Como en esta región se obtiene casi el mismo patrón de contactos en todas las simulaciones nosotros creemos que constituye el principal anclaje entre monómeros. Esta región debe actuar como una bisagra en la apertura o cierre de las interfaces. La flexibilidad del bucle H6-H7 y del extremo superior de la hélice H7 facilita la complementariedad entre las subunidades lo que se ve reflejado en las regiones de contactos. Esta complementariedad puede ser importante en la transmisión de los cambios conformacionales a través de la hélice H7 a lo largo del filamento.

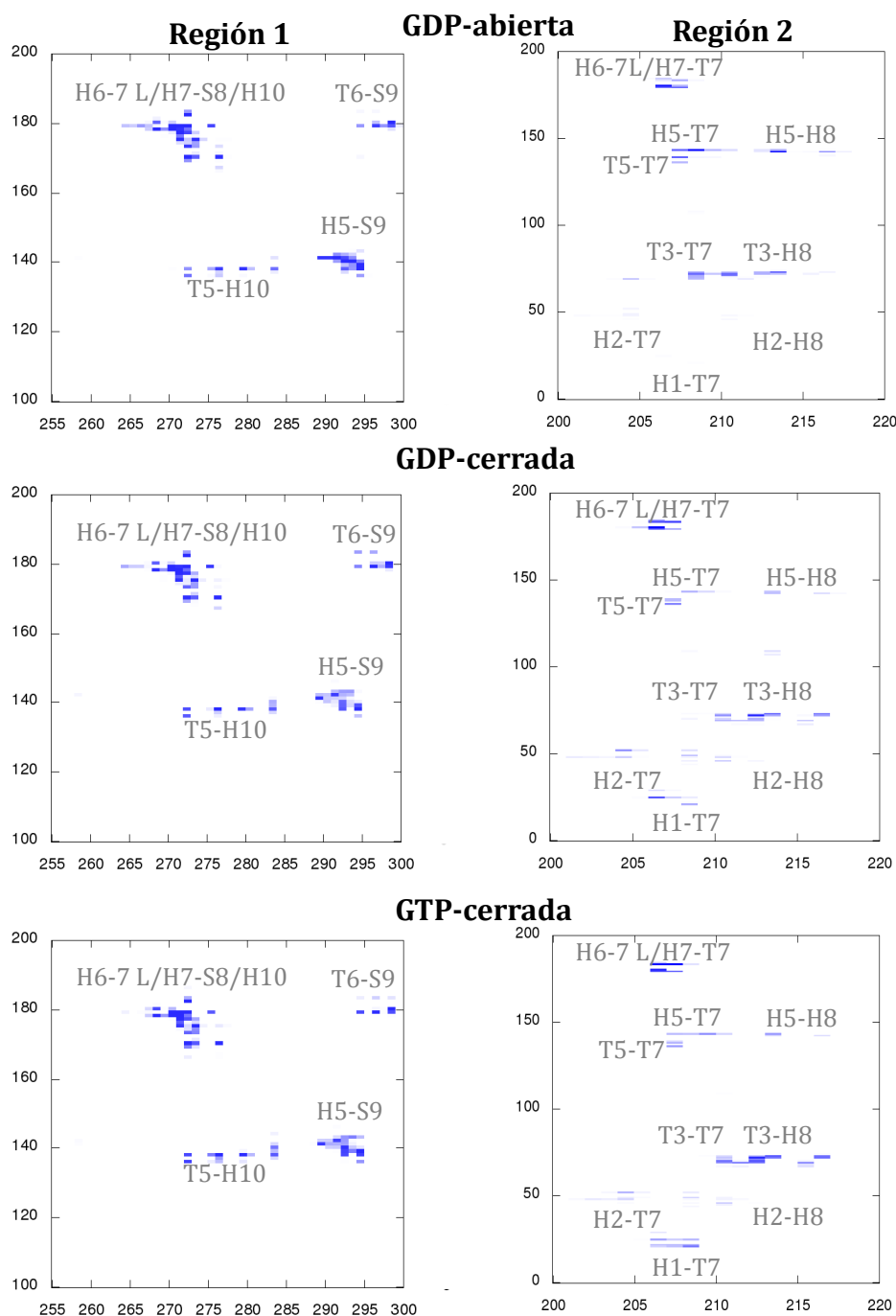


Figura 15. Representación de los contactos atómicos en las interfaces monómero-monómero. Los ejes representan el número de residuos de cada interfaz. Ver Figura 14 para detalles de cómo se han calculado los contactos.

La segunda región muestra las diferencias entre los filamentos y contiene principalmente todos los contactos del bucle T7 y la hélice H8 del monómero superior (residuos 203-219) con los elementos del dominio N-terminal del monómero inferior. Estos contactos están representados por áreas azules y blancas y están ausentes en la configuración abierta con GDP (Figura 14). En las interfaces cerradas con GDP y GTP, el bucle T7 (Glu-206 y Asn-208) mantiene contactos con las hélices H1 y H2 (Asn-25, Arg-49 y Asp-46) del monómero

de abajo, que desaparecen en la interfaz abierta con GDP. La hélice H8 se une al bucle T3 del monómero inferior en los filamentos con GTP, mientras que las interfaces con GDP muestran una pérdida de estos contactos (Figura 15). En los filamentos con GTP, el primer residuo de H8 (Asp-210) interactúa con los residuos Gly-70, Ala-71 y Gly-72. Sin embargo, este residuo solo interactúa con las glicinas en las interfaces cerradas con GDP y únicamente con alanina en las interfaces abiertas. Las interfaces abiertas además carecen del puente de hidrógeno formado entre Phe-138 (T5) y Gln-283 (H10) y de la interacción electrostática entre Glu-206 (T7) y Lys-184 (H8), que están presentes en las interfaces cerradas.

En resumen, las simulaciones de filamentos representativos de FtsZ demuestran diferencias en los contactos entre monómeros dependientes del nucleótido que modulan la curvatura de los filamentos y su estabilidad.

4.1.3. El Mg^{2+} como elemento esencial en la estabilidad

El ión Mg^{2+} presente en todas las estructuras cristalográficas de FtsZ con GTP unido es un elemento esencial para mantener las interfaces cerradas durante las simulaciones de DM. El Mg^{2+} estabiliza al GTP y crea las condiciones adecuadas para que se produzca la hidrólisis. El GTP inicialmente está unido al monómero de abajo, pero en el filamento el ión Mg^{2+} conecta los fosfatos β y γ con el lazo T7 de la subunidad superior (Figura 16). Esta conexión adicional entre monómeros se mantiene por interacciones estables del catión con la Asn-208 del bucle T7 e interacciones algo más débiles con las Asp-207 (T7) y Asp-213 (H8). La caja de coordinación del Mg^{2+} formada por los fosfatos β y γ y la Asn-208 se completa con dos moléculas de agua. Una de estas dos moléculas de agua puede ser polarizada por cualquiera de los residuos Asp-210 o Asp-213. Durante nuestras simulaciones estos residuos indistintamente y de forma alterna pueden localizarse a la distancia y ángulo compatible con la formación de puente de hidrógeno necesario para la hidrólisis del GTP. Además, los puentes de hidrógeno entre la Asn-208 y los fosfatos β y γ también estabilizan los contactos entre monómeros.

Curiosamente, la mutación Asp208Ala provoca la pérdida de polimerización, incluso en presencia de Ca^{2+} (ver Figura 8 en Matsui y col. (Matsui et al., 2012)). Nótese que el Ca^{2+} se localiza en el interior del bucle T7 en la interfaz de polimerización (ver Figura 1 en Matsui y col. (Matsui et al., 2012)). Los autores justifican la pérdida de polimerización por la ausencia de la interacción del Asp-208 con el Ca^{2+} . Por el contrario, nuestras simulaciones demuestran la importancia de este residuo en el anclaje del monómero superior a través del Mg^{2+} .

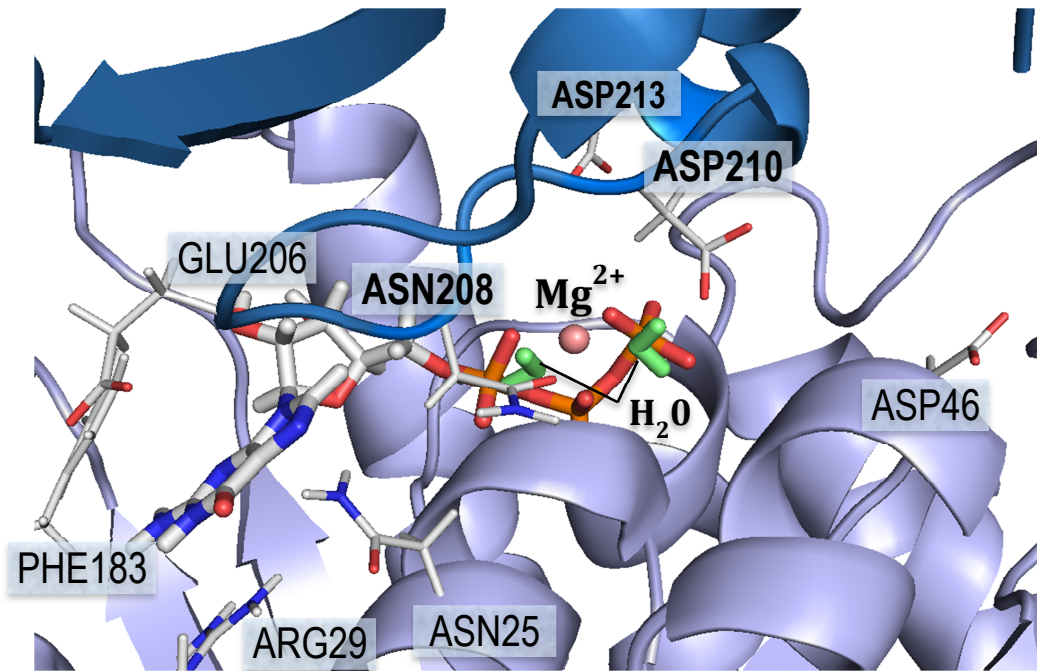


Figura 16. Vista detallada de la interfaz en un filamento con GTP. El Mg^{2+} establece una fuerte interacción con Asn-208 y con los fosfatos β y γ (en color naranja) del GTP, lo cual ayuda al cierre de la interfaz y a crear las condiciones adecuadas para la hidrólisis. En este caso el grupo carbonilo de Asp-210 está localizado a la distancia correcta para establecer puente de hidrógeno y polarizar a la molécula de agua (verde) coordinada con el magnesio (rosa).

4.1.4. Efecto estabilizante de los iones de Ca^{2+}

En nuestras simulaciones inicialmente se omitió el Ca^{2+} localizado en el interior del bucle T7 en las estructuras cristalográficas de filamentos de SaFtsZ, pero que no está presente en ninguna otra estructura de FtsZ. Además la polimerización y actividad GTPasa de FtsZ solo se ve afectada a concentraciones de Ca^{2+} muy altas ($\sim 1-10$ mM) (Matsui et al., 2012), lo que apunta a una relativa baja afinidad. A pesar de ello, realizamos simulaciones idénticas con GDP y PC en presencia del Ca^{2+} para examinar su efecto. A diferencia de las simulaciones sin Ca^{2+} , todas las interfaces GDP- Ca^{2+} se cierran, resultando en filamentos curvos más estables. Al igual que en las estructuras del cristal, el Ca^{2+} se coordina con dos moléculas de agua dentro del bucle T7, incrementando aparentemente los contactos intermonómeros cerca de la H2 (Figura 17). En los filamentos con PC, debido a su estabilidad, no detectamos ninguna diferencia causada por la presencia de Ca^{2+} . Curiosamente, los monómeros aislados de SaFtsZ pierden el Ca^{2+} durante las simulaciones de DM, así como el monómero del extremo (-) del filamento. Todos estos resultados sugieren que los iones de Ca^{2+} juegan un papel secundario en la estabilidad del bucle T7 en los filamentos de FtsZ.

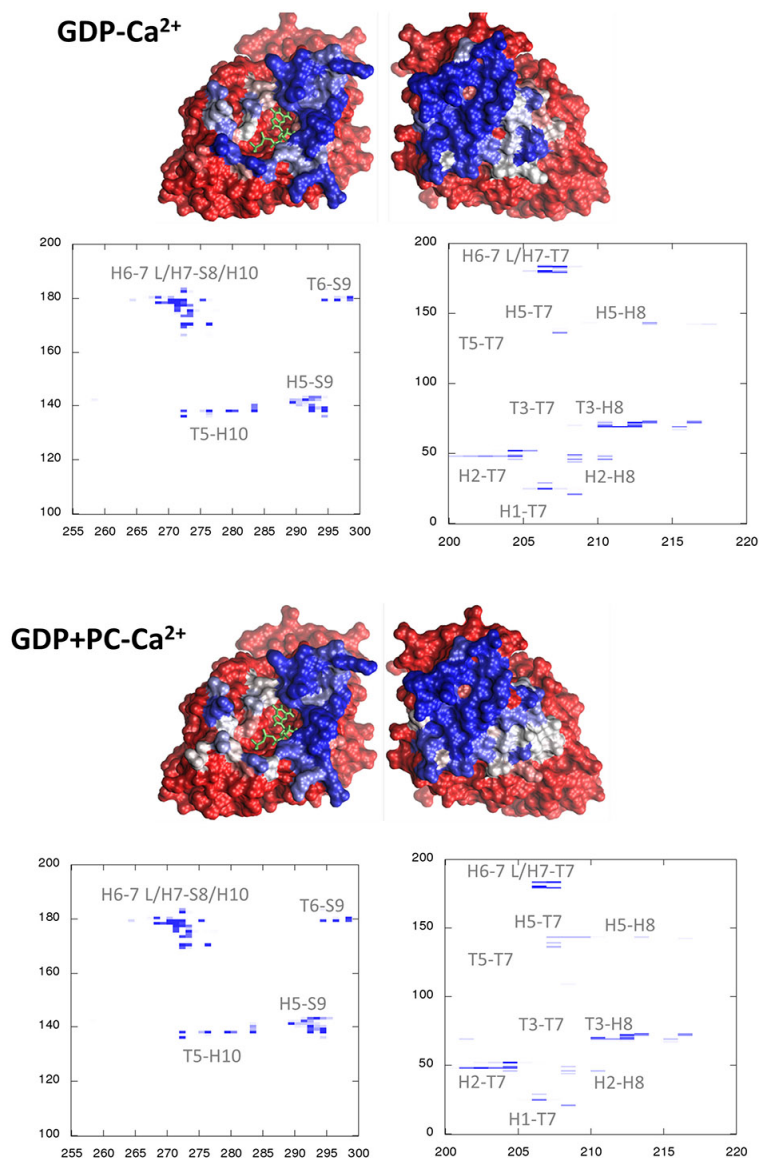


Figura 17. Superficies de contactos y representación de los contactos entre pares de átomos en las interfaces monómero-monómero de los filamentos simulados con Ca^{2+} . En comparación con las simulaciones sin Ca^{2+} (Figura 15), hay un aparente incremento de los contactos cerca de la hélice H2. En nuestras simulaciones los grupos carbonilo de los residuos Leu-200, Val-203, Ser-204, Asn-208 y Asp-210 están muy cercanos al ión, pero las interacciones más fuertes son con los dos últimos. Otras interacciones importantes en la interfaz comprenden los residuos Asp-46 y Gln-48 de la hélice H2 de la subunidad inferior.

4.2. El interruptor molecular entre los dominios N y C-terminal

Para explicar el comportamiento cooperativo en el ensamblaje de los protofilamentos de FtsZ, se propuso un modelo mediante el cual cambios conformacionales entre subunidades “inactivas” y asociaciones entre subunidades “activas” son capaces de transmitir variaciones de un monómero a otro a lo largo del filamento (véase Introducción) (Huecas et al., 2008, Dajkovic et al., 2008, Miraldi et al., 2008). En el trabajo de Martín-Galiano y col. (Martín-Galiano et al., 2010) se propone que el ensamblaje de FtsZ puede estar relacionado con un

movimiento entre dominios, que permite la apertura o cierre de la hendidura entre el dominio C-terminal y la hélice H7, modificando la asociación axial entre monómeros de FtsZ. Este cambio molecular ha sido además validado por cambios observados mediante la desactivación de la fluorescencia inducida por triptófano en mutantes de EcFtsZ, después del ensamblaje (Chen and Erickson, 2011). A pesar de estas evidencias, todas las estructuras cristalográficas de FtsZ de diferentes organismos muestran una conformación cerrada de la hendidura (Oliva et al., 2007), con excepción de la estructura de SaFtsZ, en la cual el empaquetamiento del cristal exhibe filamentos rectos con la hendidura del monómero en la conformación abierta (Matsui et al., 2012, Elsen et al., 2012, Tan et al., 2012). La comparación estructural de SaFtsZ con FtsZs de otras especies indican la apertura de la hendidura para el ensamblaje de la proteína, sin embargo, es necesario alguna validación del cambio conformacional en una misma especie.

En las estructuras cristalinas de SaFtsZ, donde se han identificado al monómero con la hendidura en la conformación abierta, se forman filamentos rectos en los cuales la hélice H7 baja y el lazo T7 se inserta en la cavidad de la subunidad inferior, creando una asociación axial entre monómeros más compacta que en otras especies. En nuestras simulaciones de DM de los filamentos en presencia de GTP y GDP la conformación abierta de la hendidura se mantiene en todas las subunidades, excepto en el monómero del extremo (-) del filamento, donde la hendidura se cierra. Para monitorizar esta transición en las simulaciones hemos medido la distancia entre los centros de masas de los residuos 196-202 de la hélice H7 y 295-300 de la lámina β S9 del dominio C-terminal. Como se observa en la Figura 18A, durante la simulación la distancia fluctúa alrededor de la distancia inicial de 13 Å en todos los monómeros excepto en el último (en azul), que se reduce aproximadamente a 9 Å. Este comportamiento se observa en casi todas las simulaciones de GTP y GDP, sugiriendo la tendencia de FtsZ a cerrar la hendidura cuando se encuentra libre de interacción por su extremo (-). Alentados por este resultado se realizaron dos simulaciones de DM de la proteína aislada unida a GTP y GDP con la hendidura abierta. Como ocurrió para las subunidades del extremos (-) de los filamentos, en los monómeros aislados la distancia H7-S9 rápidamente decrece y ocurre una transición espontánea hacia una conformación cerrada de la hendidura (Figura 18A, gris). El hecho de que rápidamente y durante todo el resto de la trayectoria, tanto la proteína aislada y los monómeros del extremo (-) permanezcan en la conformación cerrada es un buen indicador de estabilidad. Nuestras simulaciones apuntan a que la hendidura entre dominios está cerrada en los monómeros de FtsZ y se abre durante el ensamblaje actuando como un interruptor molecular.

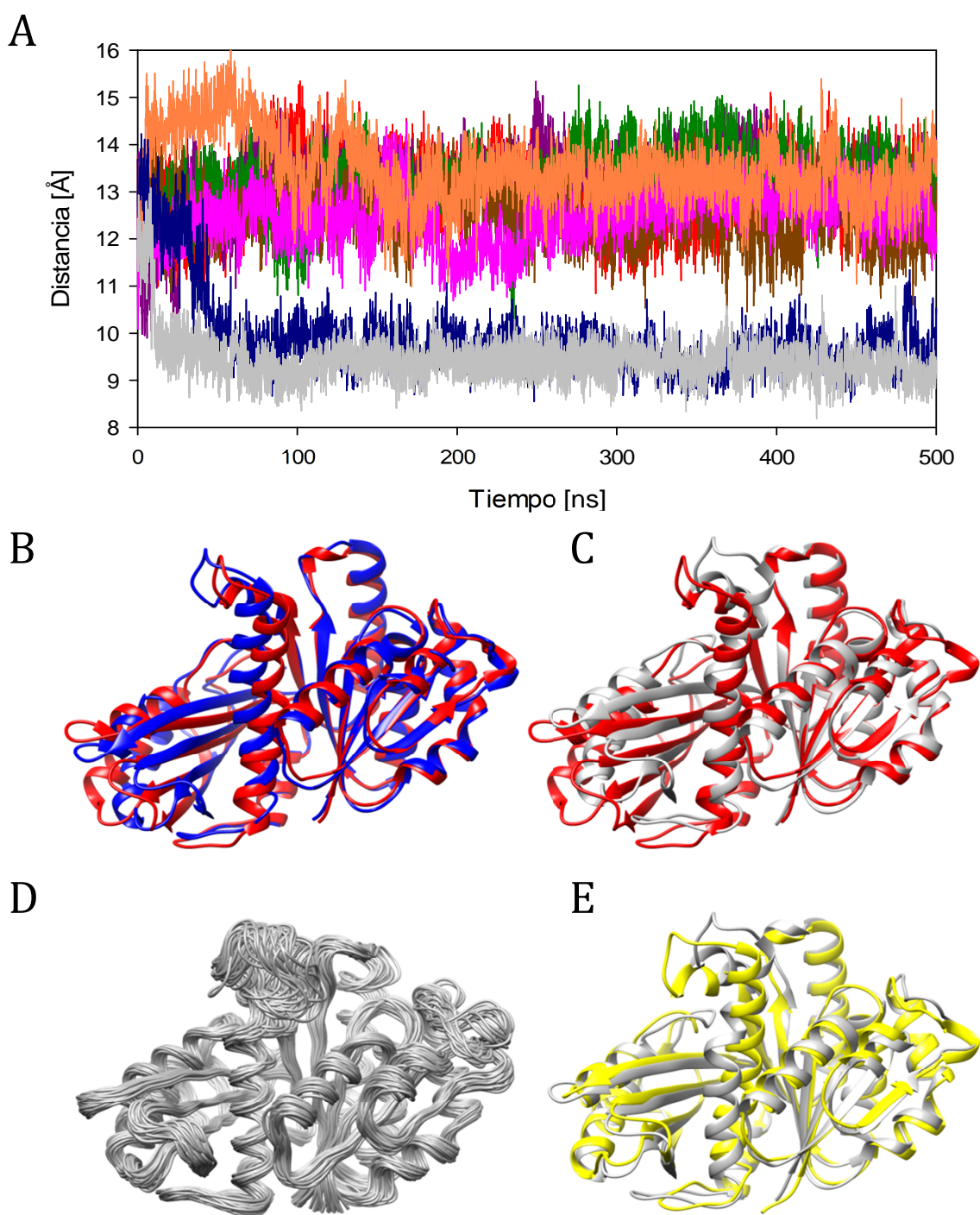


Figura 18. Relajación del interruptor de ensamblaje de FtsZ y estudio del cierre de la hendidura entre dominios. A) La distancia entre los centros de masa de los residuos 196-202 de la hélice H7 y los residuos 295-300 de la lámina S9 es monitorizada durante la trayectoria de DM (500 ns) para todos los monómeros de un filamento con GDP. La distancia fluctúa en torno a la distancia inicial de 13 Å excepto para el monómero del extremo (-) donde disminuye en 4 Å (línea azul). Resultados similares han sido observados en las simulaciones de otros filamentos de GDP y GTP en los que la hendidura del monómero del extremo (-) también se cierra. En línea gris se representa el cierre de la hendidura durante la simulación de un monómero aislado. B) Superposición de la estructura inicial del monómero dentro del filamento con la hendidura abierta (rojo) y la estructura final del monómero del extremo (-) de nuestra simulación del filamento (azul), C) superpuesto con el monómero aislado (gris). D) Conjunto de conformaciones del monómero para los últimos 100 ns, superpuestos usando THESEUS (Theobald and Wuttke, 2008). E) Estructura final del monómero aislado con la hendidura cerrada (gris) superpuesta a la estructura del cristal de BsFtsZ (amarillo, PDB: 2vxy).

El cierre de la hendidura se puede visualizar superponiendo la estructura inicial abierta (roja) con la estructura final de la simulación del monómero aislado (Figura 18C, gris) o del monómero del extremo (-) (Figura 18B, azul); o comparando conjuntos de conformaciones del monómero aislado (Figura 18D) con las conformaciones abiertas en el filamento (Figura 13B). Colectivamente estos resultados revelan la tendencia natural del monómero de SaFtsZ a adoptar una conformación cerrada de la hendidura. Debido a la alta homología estructural entre las diferentes FtsZs, es posible que FtsZs de otras especies compartan esta tendencia. De hecho, la estructura final de DM de SaFtsZ en la conformación cerrada de la hendidura es muy similar a estructuras monoméricas de FtsZ resueltas en otros organismos, como se ilustra para BsFtsZ en la Figura 18E. Aunque hay una gran semejanza entre las estructuras, estas no superponen bien la parte superior de la hélice H7 y el bucle H6-H7 que son regiones de gran movilidad en nuestras simulaciones. Además del movimiento rotacional del subdominio C-terminal, también observado previamente en dos mutantes de SaFtsZ que inhiben su actividad GTPasa (Buey et al., 2006), nosotros observamos una deformación en la parte superior de la hélice y alrededor del bucle.

Curiosamente, estructuras de SaFtsZ con sustituciones en el bucle T7 ($\Delta T7_{GAG}$ y $\Delta T7_{GAN}$) en presencia de GDP tienen la hendidura cerrada similar a las estructuras en estado monomérico de BsFtsZ, mientras que la sustitución $\Delta T7_{GAN}$ con GTP mantiene la hendidura abierta como la proteína nativa (Matsui et al., 2014). Nosotros sugerimos que este cambio no es consecuencia del nucleótido unido, sino que refleja la transición entre asociaciones activas y monómeros inactivos. Aunque estas proteínas quiméricas no presentan actividad GTPasa (probablemente debido a defectos en la polimerización) estos resultados además sugieren que los contactos del bucle T7, particularmente los que están relacionados con el fosfato γ o el ión Mg^{2+} , juegan un papel principal en el control del interruptor de activación. Los resultados de nuestras simulaciones apoyan la importancia de la estructura cristalográfica elegida y confirman la existencia del interruptor de ensamblaje. Por primera vez se ha monitorizado la transición abierto-cerrado del interruptor que había sido deducido anteriormente solo a través de comparaciones de FtsZ de diferentes especies.

4.3. Moléculas que bloquean el interruptor molecular

4.3.1. Mecanismo de estabilización de los filamentos por PC

El antibiótico PC se une al interruptor de activación localizado entre el dominio C-

terminal y la hélice H7 de FtsZ (Elsen et al., 2012, Matsui et al., 2012). Este compuesto induce el ensamblaje de BsFtsZ disminuyendo su concentración crítica de ensamblaje ($Cr = 0.65 \pm 0.13 \mu\text{M}$) respecto a un control en ausencia de compuesto ($Cr = 4.95 \pm 0.43 \mu\text{M}$), formando filamentos y manojos estables (Andreu et al., 2010).

En nuestras simulaciones de DM los filamentos de GDP+PC se curvan de forma parecida a los filamentos con GTP, sin embargo, el mecanismo mediante el cual los filamentos se mantienen más rígidos es diferente. Mientras el fosfato γ del GTP y el Mg^{2+} son las claves de la unión entre monómeros adyacentes en los filamentos de GTP, el PC induce alostéricamente el cierre de la interfaz entre subunidades al bloquear la hendidura entre los dominios N y C-terminal y mantener al monómero en una conformación activa. El grupo benzamida del PC establece puentes de hidrógenos estables con los residuos Val-207, Asn-263, Gly-205 y Leu-209. La presencia del antibiótico estabiliza los contactos entre el bucle T7 del monómero superior y las hélices H1 y H2 del monómero inferior, e impide los contactos observados en los filamentos con GTP y GDP con la hélice H5 (comparar Figuras 15 y 19). La estabilización del bucle T7 promueve el cierre de la interfaz entre monómeros, haciendo posible que el filamento se curve de manera similar al GTP, pero en una dirección ligeramente diferente (Figuras 9 y 11). Las interfaces de los filamentos de GDP+PC se curvan en la misma dirección que las interfaces cerradas de los filamentos de GDP (Figura 11A), mientras los filamentos de GTP se curvan en una dirección que difiere 35° haciendo más hermético el sitio de nucleótido. A diferencia de los filamentos de GDP, los filamentos con PC unido tienen torsión como los de GTP. Este comportamiento incrementa el empaquetamiento en la interfaz en los filamentos con PC reduciendo la flexibilidad intrínseca del monómero, como se observa en la Figura 13B.

Los resultados de nuestras simulaciones son consistentes con las observaciones experimentales del efecto estabilizante del PC en la proteína homóloga de BsFtsZ (Andreu et al., 2010). La unión del PC en la hendidura entre dominios, desplaza el equilibrio hacia una conformación de alta afinidad requerida por la FtsZ para la elongación de los polímeros. El mecanismo estabilizante del PC está parcialmente relacionado con el de los agentes estabilizantes de microtúbulos, aunque no hay una equivalencia exacta para el sitio del PC en tubulina.

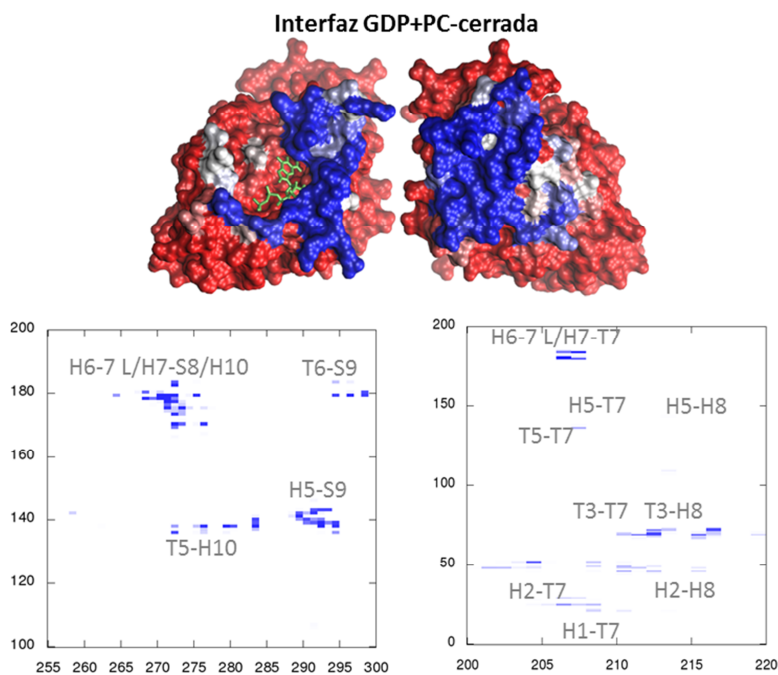


Figura 19. Superficies de contactos y representación de los contactos entre pares de átomos en las interfaces monómero-monómero de los filamentos de GDP+PC. Los ejes de los mapas de contactos representan el número de los residuos. Las interfaces con el antibiótico PC son cerradas. El PC estabiliza los contactos del bucle T7 con las hélices H1 y H2, además en comparación con las simulaciones de GDP y GTP (Figura 15), hay una pérdida de contactos con H5.

4.3.2. Sonda fluorescente DFMBA-NBD

Con los conocimientos adquiridos sobre el efecto del PC en la dinámica de los filamentos de FtsZ y del interruptor molecular asociado al ensamblaje colaboramos en el diseño de una sonda fluorescente que se une en la hendidura entre dominios. En el grupo de Química Médica de la Profa. María L. López Rodríguez (Departamento de Química Orgánica I de la Universidad Complutense de Madrid, UCM) se sintetizaron una serie de compuestos fluorescentes derivados del PC, algunos de ellos se muestran en la Figura 20. Nuestra colaboración estuvo centrada en la selección de los candidatos a ser sintetizados, mediante estudios de “docking” y cribado virtual de diferentes propuestas de diseño. Los compuestos con mayores valores de puntuación fueron evaluados experimentalmente en el laboratorio del Prof. J.M. Andreu (Centro de Investigaciones Biológicas) (Artola et al., 2016).

Estudios de fluorescencia revelan que algunos de los compuestos (2-5) son inactivos en intensidad de fluorescencia y anisotropía de fluorescencia en presencia de polímeros de FtsZ. Otros compuestos (7-10, 12 y 13) no mostraron un incremento significativo (+ 1.5 veces) de la anisotropía en presencia de los polímeros de BsFtsZ, o el incremento fue no específico, o tienen valores muy altos de anisotropía en ausencia de la proteína lo que indica que están agregando. El compuesto 11 muestra un incremento de la anisotropía en presencia de los polímeros en 1.7 veces, sin embargo el valor absoluto de anisotropía es muy bajo.

Tabla 1. Valores de anisotropía de fluorescencia de los compuestos 6, 14, 15 y 16.

COMPUESTO	Anisotropía de fluorescencia (r)			
	6	14	15	16
Compuesto	0.026	0.038	0.032	0.030
+ BsFtsZ	0.034	0.042	0.035	0.042
+ GMPCPP	0.035	0.040	0.039	0.042
+ MgCl ₂	0.086	0.078	0.078	0.127
+ PC190723	0.036	0.057	0.046	0.067
Compuesto + GMPCPP	0.026	0.038	0.028	0.030
+ MgCl ₂	0.027	0.033	0.027	0.027
+ PC190723	0.026	0.035	0.028	0.029

Los valores de la primera fila corresponden al compuesto (10 μ M) en tampón hepes pH 6.8 a 25°C. BsFtsZ (10 μ M, no ensamblada) y GMPCMM (0.1 μ M) fueron añadidos consecutivamente. Posteriormente la polimerización de BsFtsZ fue inducida por la adición de MgCl₂ (10 mM). Después de cada adición se midió la anisotropía de fluorescencia. El PC fue añadido para desplazar al compuesto fluorescente. Las tres últimas filas corresponden a controles hechos sin proteína para excluir interacciones de los compuestos con GMPCPP, MgCl₂ o PC. Los valores de r son los promedios para 2 muestras y la desviación estándar es de 0.002. La longitud de onda máxima de excitación de los compuestos es 474 nm y la longitud de onda máxima de emisión es de 543 nm. Resultados tomados de Artola et al., 2016.

DFMBA-NBD (compuesto 6) induce polimerización de BsFtsZ en presencia de GMPCPP y magnesio. Los compuestos 14 y 15 también inducen el ensamblaje de la proteína de forma similar al compuesto 6. Sin embargo, el compuesto 16 en el cual la longitud de la cadena se incrementa en 6 carbonos da un cambio de anisotropía mayor en comparación con los otros compuestos y no muestra un incremento en la polimerización de BsFtsZ lo que indica un modo diferente de unión.

Con el fin de obtener una visión estructural en el modo de unión de la sonda fluorescente DFMBA-NBD y sus análogos 15 y 16 hemos realizado experimentos de “docking” para obtener una primera aproximación de la unión del complejo en el sitio localizado en la hendidura entre los dominios N y C-terminal (detalles en Materiales y Métodos). Además, se llevó a cabo la simulación de DM de los mejores complejos de “docking” para estudiar su estabilidad y sus interacciones en el equilibrio. Las simulaciones de DM (500 ns) de los diferentes compuestos muestran que después de un período de relajación, la unión de los ligandos es estable (Figura 21). En la primera parte de la simulación (hasta 130 ns) el grupo NBD se acomoda en la hendidura adoptando la posición de equilibrio.

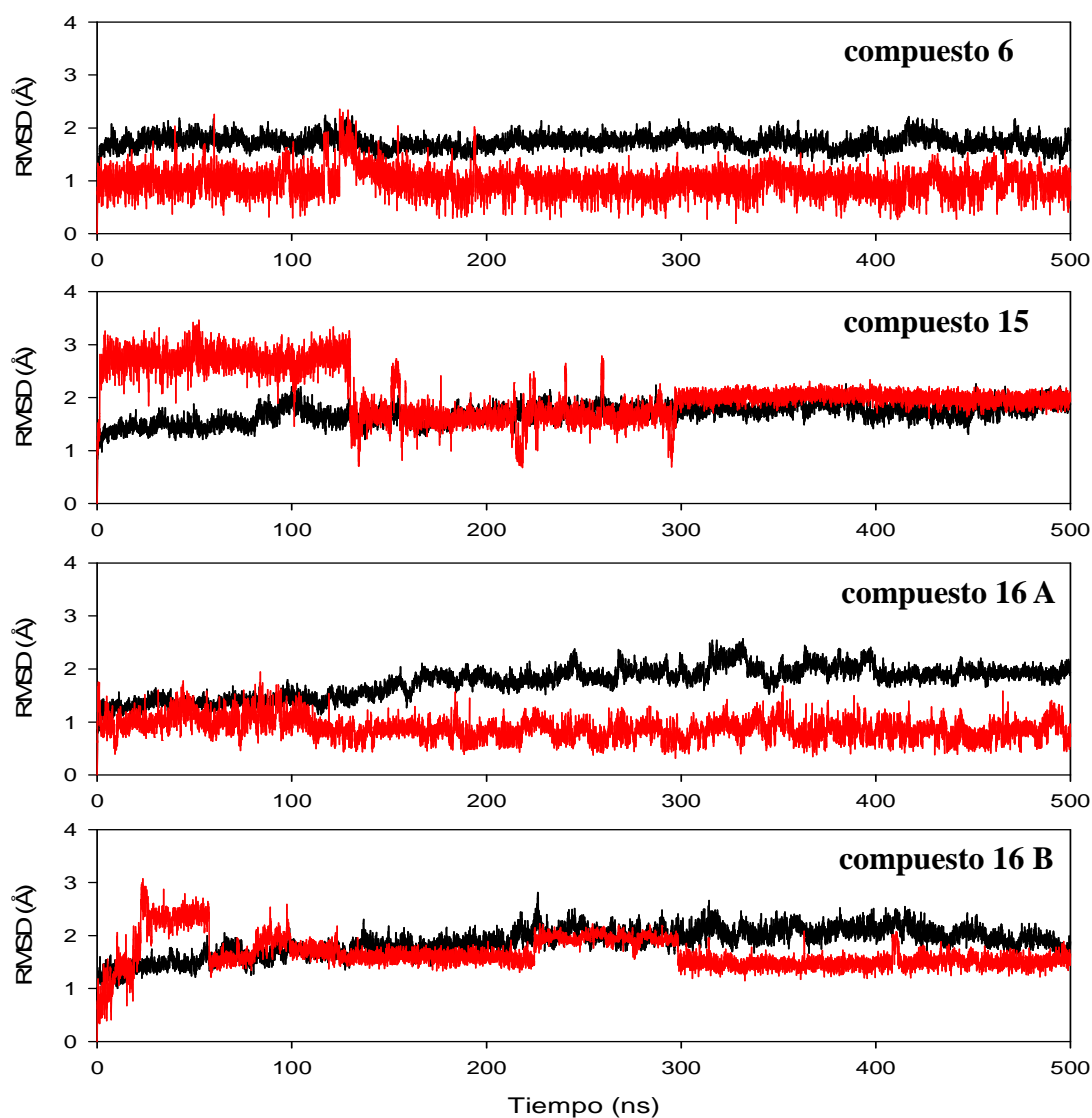


Figura 21. Trayectorias de DM de los complejos SaFtsZ-sonda. Se muestra el RMSD de SaFtsZ (línea negra) con el correspondiente compuesto unido (línea roja) durante el tiempo de simulación. Se observa que las simulaciones alcanzan el estado de equilibrio sugiriendo la estabilidad de los modos de unión. Sin embargo, hay un período de relajación (~130 ns) donde el grupo NBD se acomoda hasta que adopta una posición estable.

Las estructuras finales de los complejos con los compuestos 6, 15 y 16 después de 500 ns se muestra en la Figura 22. El grupo benzamida de los compuestos 6 y 15 comparten interacciones con residuos del bucle T7 y las láminas beta S8 y S9 como las observadas en nuestras simulaciones de filamentos con PC. En particular se forman puentes de hidrógenos estables del grupo amino con los residuos Val-207 y Asn-263 y el grupo carbonilo con Gly-205 y Leu-209. La interacción hidrofóbica con el aminoácido Val-297 también contribuye a la estabilización de la benzamida. Estos contactos son críticos en el interruptor de ensamblaje/desensamblaje manteniendo la hendidura entre dominios en la conformación abierta e induciendo alostéricamente el cierre de las interfaces en los filamentos de FtsZ como se observa en nuestras simulaciones de filamentos con PC. Sin embargo nosotros

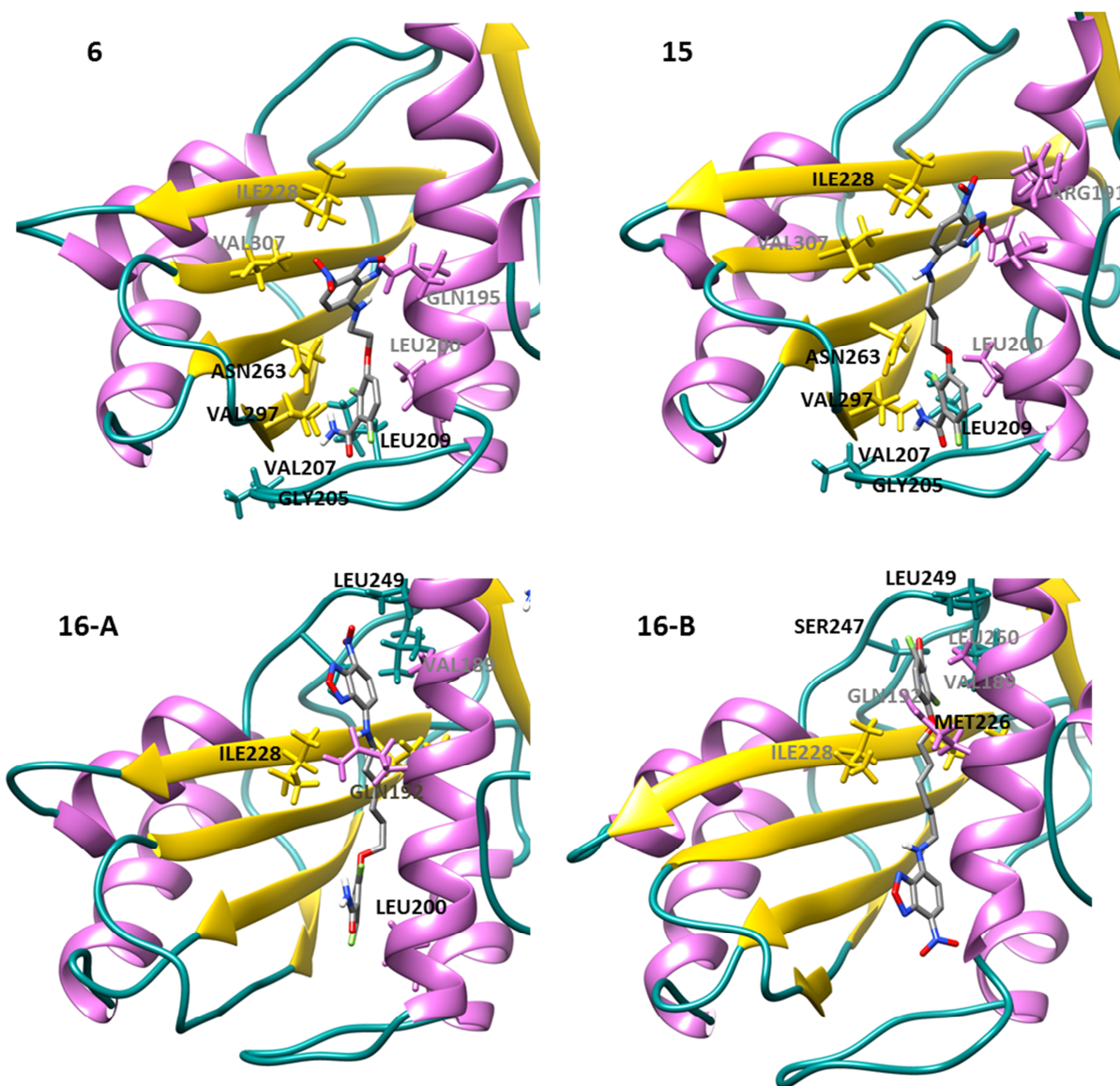


Figura 22. Modos de unión de las sondas fluorescentes en la hendidura entre dominios. Se muestran las estructuras finales de los complejos SaFtsZ con los compuestos 6, 15 y 16 obtenidas después de 500 ns de simulación de DM. Los residuos marcados en negro corresponden a contactos estables y en gris aquellos relativamente menos estables observados en los últimos 100 ns de simulación. Para los compuestos 6 y 15 se observan puentes de hidrógenos estables entre el grupo amino y los residuos Val-207 (bucle T7) y Asn-263 (lámina beta S8), y entre el grupo carbonilo y los residuos Gly-205 y Leu-209 (bucle T7). Además interacciones hidrofóbicas con Val297 (lámina beta S9) contribuyen a la unión de la benzamida. Interacciones con Ile-228, Val-307 y Arg-191 también ayudan a mantener al fluoróforo fluctuando en la hendidura. En el caso del compuesto 16 se encuentran dos posibles modos de unión. Las interacciones que contribuyen a la unión son Ile-228 y Leu-249 para el NBD (modo A) y Met-226, Ser-247 y Leu-249 para la benzamida (modo B).

observamos que el grupo fluorescente NBD de la sonda queda parcialmente expuesto al solvente (más en el compuesto 6 que en el 15), no reemplazando el heterociclo del antibiótico PC. Sorprendentemente, para el compuesto 16 que tiene el espaciador más largo, encontramos dos modos de unión alternativos y ambos modos difieren del modo de unión del PC. En este caso el ligando se une en la parte superior de la hendidura y no se establece

interacción de la benzamida con T7 y S8-S9. Los dos modos de unión intercambian las posiciones de la benzamida y el NBD en el sitio de unión. Estos modelos revelan un posible modo de unión diferente al de los otros compuestos lo que puede explicar las diferencias encontradas en la interacción de 16 con FtsZ en los experimentos. Por lo tanto, los resultados experimentales y nuestros modelos sugieren una extensión del sitio de unión de PC que puede estar disponible para la unión de inhibidores a la hendidura entre dominios de FtsZ.

4.3.3. Validación experimental del interruptor de FtsZ con la sonda fluorescente DFMBBA-NBD

En el grupo del Prof. Andreu se realizaron medidas de anisotropía frente al tiempo y ensayos de dispersión de luz de BsFtsZ en presencia de DFMBBA-NBD (10 μ M) (Figura 23 A y B) para monitorizar el ensamblaje de la proteína con la sonda fluorescente. Se realizaron tres experimentos diferentes: 1) se polimeriza BsFtsZ y se añade el PC después de la despolimerización, tras la hidrólisis completa del nucleótido (Figura 23 A y B línea roja); 2) se añade PC cuando FtsZ está polimerizada (Figura 23 A y B línea azul) y 3) no se adiciona el nucleótido (Figura 23A) línea negra). Para los tres experimentos se parte del compuesto en tampón hepes y se atempera la muestra a 25°C durante 5 minutos en el espectrofluorímetro. Posteriormente se añaden 10 μ M de FtsZ y después de 15 minutos, 10 mM de MgCl₂. Para comenzar la polimerización se añaden después de 20 minutos de incubación 0.1 mM de GMPCPP.

Los experimentos muestran que existe un pequeño aumento de la anisotropía del fluoróforo al añadir la proteína debido a una unión inespecífica del ligando y dicha anisotropía aumenta significativamente después de añadir el magnesio y el nucleótido, lo que indica la unión del ligando fluorescente a los polímeros de FtsZ (Figura 23A línea roja). Una vez hidrolizado todo el nucleótido la anisotropía disminuye, indicando que el ligando vuelve a su forma libre y no se une a los monómeros de FtsZ. Los resultados demuestran que la variación de la anisotropía está ligada a la polimerización/despolimerización de la proteína (Figura 23 A y B). En el experimento 2 se observa una disminución de la anisotropía al añadir el PC (Figura 23A, línea azul) como resultado del desplazamiento del ligando fluorescente del sitio de unión del antibiótico y un incremento en el ensamblaje (Figura 23B, línea azul) debido al efecto estabilizante del compuesto (Andreu et al., 2010). El experimento 3 en el que no se añade el nucleótido (Figura 23A, línea negra) y no se observa un cambio significativo de la anisotropía de fluorescencia sirve como control de que la sonda

fluorescente se une solo a la proteína ensamblada. Resultados totalmente comparables también se han obtenido con SaFtsZ en las mismas condiciones.

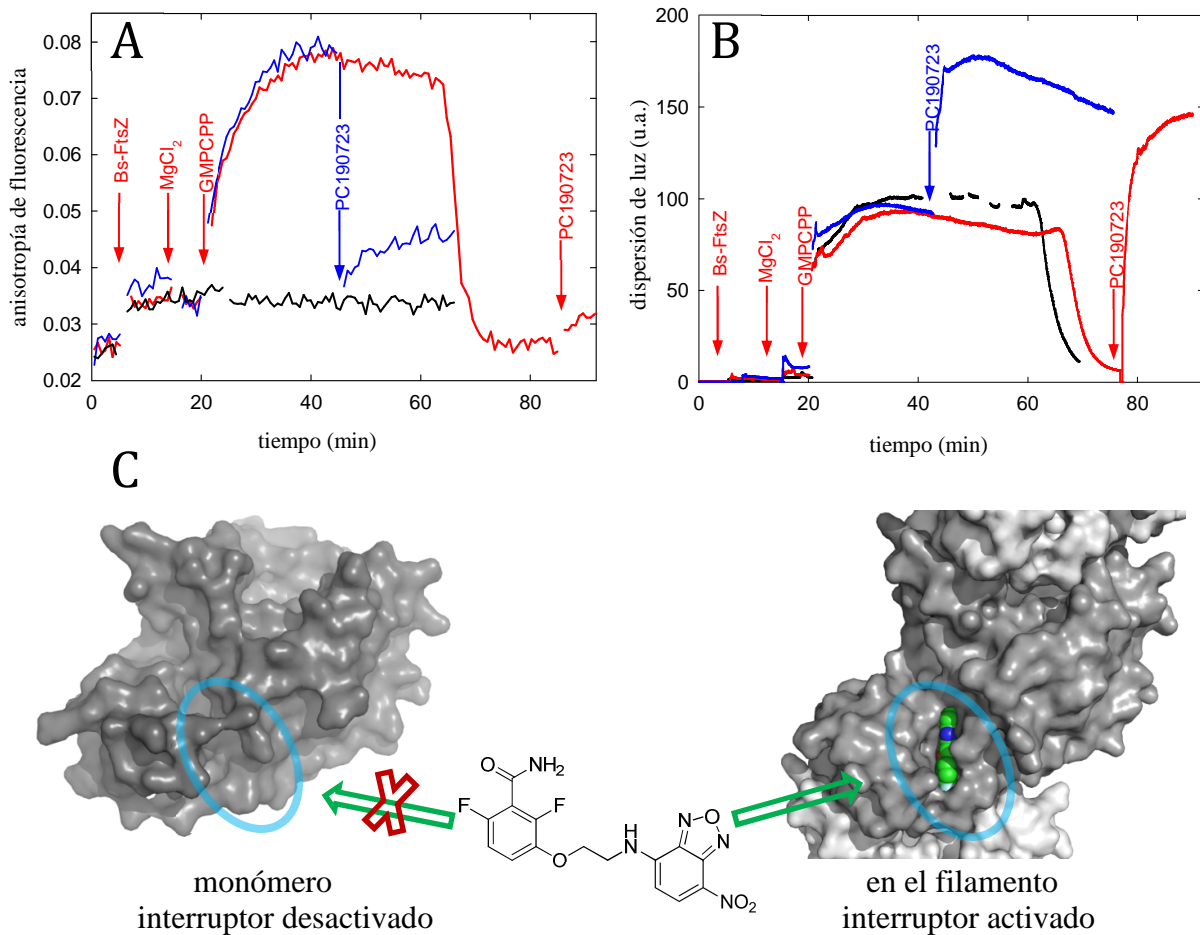


Figura 23. Ensamblaje de FtsZ monitorizado con la sonda fluorescente DFMBBA-NBD. A) Variación de anisotropía frente al tiempo durante el ensamblaje de BsFtsZ en presencia de DFMBBA-NBD. BsFtsZ (10 μ M), MgCl₂ (10 mM), GMPCPP (0.1mM) y PC (10 μ M) son añadidos sucesivamente a la sonda fluorescente (10 μ M) como indican las flechas. En rojo se muestra el ensamblaje y desensamblaje de la proteína por el consumo de nucleótido. El PC es añadido durante la polimerización de la proteína (en azul) y en negro se muestra el ensayo en ausencia de GMPCPP. B) Ensamblaje monitorizado por dispersión de la luz provocada por los polímeros de BsFtsZ en las mismas condiciones que el panel, excepto el experimento 3 mostrado en línea negra que corresponde a un control sin la sonda fluorescente A). C) Esquema de interpretación de los resultados. La sonda fluorescente se une a la hendidura entre dominios que se abre durante el ensamblaje de los polímeros y no al monómero de FtsZ que tiene la hendidura cerrada. El monómero con la hendidura cerrada (señalada en azul) se representa a la izquierda del panel por la estructura de BsFtsZ (PDB: 2vxy), en la cual no entra el PC. A la derecha del panel se representa el filamento del cristal de SaFtsZ con la hendidura abierta y el PC unido (coloreado en verde) (PDB: 2vob). Imagen tomada de Artola et al., 2016.

La unión y la disociación de la sonda fluorescente durante el ensamblaje/desensamblaje de FtsZ nos permiten monitorizar la apertura de la hendidura durante la polimerización de la proteína. El análisis de los cambios de anisotropía nos indica que la hendidura entre los dominios N y C-terminal está en la conformación cerrada en los monómeros, impidiendo la

unión del ligando fluorescente; y pasa a la conformación abierta cuando ensambla, permitiendo la interacción del ligando (Figura 23C). Estos estudios en solución apoyan firmemente el mecanismo estructural del interruptor de ensamblaje ya observado en nuestras simulaciones de DM de los filamentos de FtsZ.

La sonda fluorescente es además una herramienta para detectar ligandos que se unan específicamente al sitio de PC de FtsZ. La variación de la anisotropía por el desplazamiento de la sonda constituye un nuevo ensayo en la búsqueda de fármacos antibacterianos con afinidad específica por este sitio. Un método de competición similar ya había sido desarrollado con el nucleótido fluorescente mant-GTP por el grupo del Prof. J.M. Andreu que permite la evaluación de la afinidad de compuestos que se unen al sitio de nucleótido de FtsZ (Schaffner-Barbero et al., 2010, Schaffner-Barbero et al., 2012, Keffer et al., 2013).

4.4. Ciclo de ensamblaje/desensamblaje de FtsZ

Los resultados de nuestras simulaciones de DM proporcionan nuevos conocimientos acerca de las bases estructurales del proceso de ensamblaje/desensamblaje de FtsZ. Durante este proceso dinámico se asocian dos movimientos de bisagra que modulan la dinámica y estabilidad de los filamentos, uno localizado en la interfaz entre monómeros y otro en la hendidura entre dominios. El movimiento en la interfaz es dependiente del nucleótido unido; mientras los filamentos con GTP se curvan encerrando el sitio de nucleótido, los filamentos con GDP son más inestables y las interfaces formadas entre monómeros adyacentes oscilan entre conformaciones cerradas y abiertas que pueden ser la causa del desensamblaje de los polímeros. El segundo movimiento de bisagra está asociado con el interruptor molecular. En nuestras simulaciones se observa que la hendidura entre los dominios N y C-terminal se mantiene abierta en los monómeros dentro de los filamentos, pero se cierra en los monómeros aislados. Experimentos realizados con la sonda fluorescente DFMBA-NBD que se une en esta hendidura demuestra su comportamiento de interruptor molecular asociado al ensamblaje de la proteína.

La dinámica de los filamentos de FtsZ dependiente del nucleótido y la dinámica del interruptor de ensamblaje pueden ser integrados en un ciclo de ensamblaje/desensamblaje, como se ilustra esquemáticamente en la Figura 24. Inicialmente, el filamento de FtsZ con GTP se encuentra curvado con las interfaces entre monómeros cerradas, creando las condiciones para que pueda ocurrir la hidrólisis del nucleótido. Los monómeros dentro del filamento tienen la hendidura entre los dominios N y C-terminal abierta. Durante la hidrólisis

del GTP, el fosfato γ se libera junto con el Mg^{2+} , provocando una mayor flexibilidad en los filamentos que puede promover la despolimerización. Las interfaces entre los monómeros del filamento de GDP fluctúan entre estados abiertos y cerrados, mientras la hendidura de cada monómero permanece abierta. La transición de filamentos con interfaces cerradas en presencia de GTP a filamentos con conformaciones abiertas y cerradas de las interfaces con GDP puede contribuir a la constricción de los anillos en las células bacterianas (Erickson et al., 2010, Erickson, 2009, Allard and Cytrynbaum, 2009). El filamento de GDP despolimeriza en monómeros en los cuales la hendidura entre sus dominios rápidamente se cierra (de forma alternativa algunas interfaces pueden sustituir nuevamente el GDP por GTP dentro del filamento). Posteriormente, el GDP espontáneamente se intercambia por el GTP (que está presente en exceso en el medio), obteniéndose monómeros con GTP, con la hendidura entre dominios cerrada. Para la polimerización de la proteína, como indican nuestras simulaciones y los ensayos con la sonda fluorescente DFMBA-NBD, debe activarse el interruptor de ensamblaje pasando de una conformación cerrada en el monómero a una conformación abierta en el filamento. El ensamblaje de monómeros con GTP en los nuevos filamentos de FtsZ, asociado con la apertura de la hendidura, está fuera del alcance de nuestras simulaciones de DM. Sin embargo, de acuerdo con las propiedades del sistema, una posibilidad es que los monómeros con GTP cuya hendidura está cerrada se asocien débilmente en forma de dímeros o trímeros con interfaces abiertas. Estos oligómeros inactivos pueden isomerizar en oligómeros activos con interfaces cerradas y hendiduras abiertas y constituir los núcleos de polimerización (Huecas et al., 2008), que crecen hasta formar los filamentos.

Integrar los cambios conformacionales observados para explicar el ensamblaje cooperativo aún resulta complejo, ya que tanto la interfaz superior e inferior del monómero deben cambiar simultáneamente a la forma de alta afinidad (Miraldi et al., 2008). Nuestras simulaciones identifican claramente el movimiento en la hendidura como un cambio conformacional necesario en la interfaz inferior. Por otra parte, dada la flexibilidad de la parte superior de la hélice H7 y del bucle H6-H7, especulamos que podría favorecer el cambio conformacional en la interfaz superior.

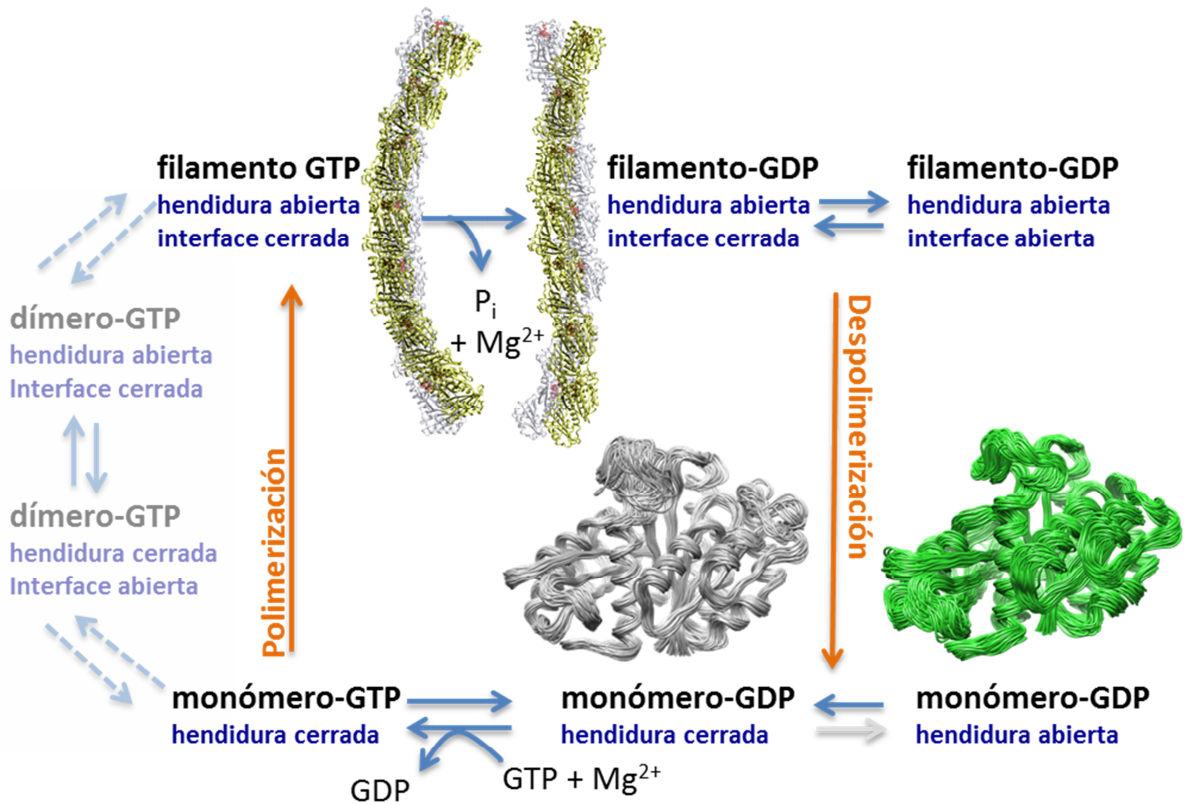


Figura 24. Esquema del ciclo de ensamblaje/desensamblaje que integra la dinámica de los filamentos dependiente del nucleótido y del interruptor de ensamblaje.

4.5. Auto-organización de los polímeros de FtsZ analizados por SAXS y crio-EM

4.5.1. Polímeros de BsFtsZ medidos por SAXS

Los monómeros de FtsZ en presencia de GTP y magnesio ensamblan en filamentos que se pueden asociar formando polímeros más complejos en dependencia de las condiciones de polimerización (ver Introducción). Con el objetivo de determinar las características estructurales de los polímeros de BsFtsZ, se realizaron experimentos de SAXS (detalles en Materiales y Métodos) que nos permiten obtener información estructural a baja resolución de estas macromoléculas en solución (distancias, radios de giro (R_g), forma, etc.). Nuestros ensayos se han centrado en tres condiciones diferentes: condiciones de no polimerización, polimerización en presencia de GTP y polimerización con GMPCPP que es un análogo de GTP lentamente hidrolizable.

En la Figura 25A se representa el perfil de dispersión para BsFtsZ en condiciones de no

polimerización. BsFtsZ se comporta como una proteína monomérica no isométrica con radio de giro $R_G = 32.1 \pm 1.0 \text{ \AA}$ y dimensión máxima $D_{\max} = 120 \text{ \AA}$. El análisis de velocidad de sedimentación por ultracentrifugación analítica realizado en las mismas condiciones que el SAXS confirmó que la muestra está formada por partículas hidrodinámicamente monodispersas con valor de $S_{20,w} = 3.2 \text{ S}$ correspondiente a monómeros de FtsZ (Rivas et al., 2000) (Figura 25B).

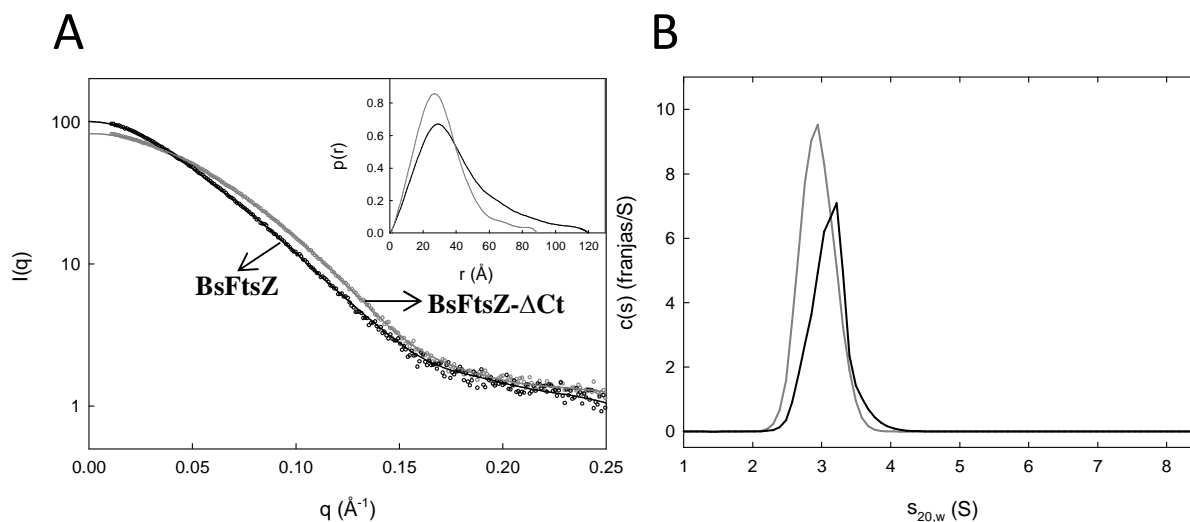


Figura 25. Perfiles de SAXS para monómeros de FtsZ en la forma nativa y la forma truncada en condiciones de no polimerización. A) Perfil de SAXS para BsFtsZ (en negro) y BsFtsZ- Δ Ct que carece de la cola desordenada C-terminal (en gris) determinados a una concentración de 2 g/L de la proteína en tampón tris50 con 1 mM de GDP a 25 °C. Las líneas corresponden a los respectivos ajustes con GNOM (Svergun, 1992). La figura insertada muestra la función de distribución de pares de BsFtsZ (línea negra) y BsFtsZ- Δ Ct (línea gris). B) Distribución de los coeficientes de sedimentación de BsFtsZ (línea negra) y BsFtsZ- Δ Ct (línea gris) determinados por ultracentrifugación analítica en las mismas condiciones empleadas en los experimentos de SAXS. Mediante el procesamiento con SEDFIT obtenemos BsFtsZ: $S_{20,w} = 3.2 \text{ S}$, $f/f_{\min} = 1.4$, $M_r \approx 44.600$. BsFtsZ: $S_{20,w} = 3.1 \text{ S}$, $f/f_{\min} = 1.3$, $M_r \approx 37.700$. Los experimentos de BsFtsZ- Δ Ct han sido realizados por Albert Vergoños (medidas de SAXS y dispersión de luz) y por Sonia Huecas y Patricia Castellen (purificación de BsFtsZ- Δ Ct y ultracentrifugación analítica).

En el perfil de dispersión para la proteína ensamblada con GTP (Figura 26A) se observa una intensidad de dispersión a ángulo bajo ($q = 0.01$ a 0.02 \AA^{-1}) característica de grandes polímeros. El perfil muestra además un máximo a $q = 0.09 \text{ \AA}^{-1}$ que corresponde en el espacio real a una distancia $d = 70 \text{ \AA}$ ($d = 2\pi/q$) que podría estar relacionada con la distancia lateral (espaciado) entre protofilamentos vecinos. El perfil de dispersión es plano para valores superiores a 0.10 \AA^{-1} y no se observa un máximo esperado a $d \approx 0.14 \text{ \AA}^{-1}$ correspondiente a la distancia de 44 \AA entre los monómeros que forman el filamento (Andreu et al., 2010, Elsen et

al., 2012, Lowe and Amos, 1999).

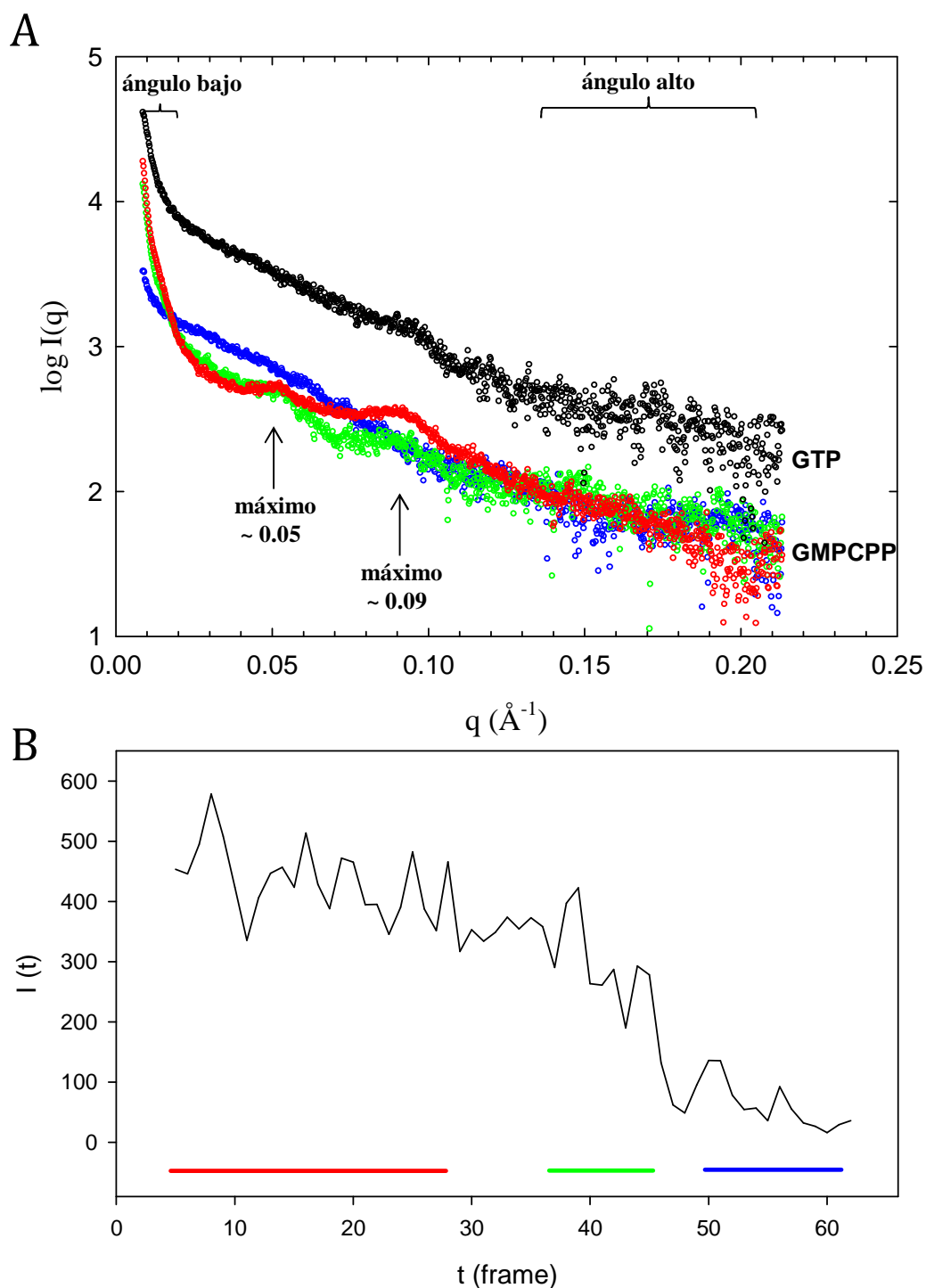


Figura 26. Perfiles de SAXS de la proteína BsFtsZ en condiciones de polimerización. A) Perfil de SAXS para polímeros ensamblados de BsFtsZ (2 g/L, 50 μ M) en tampón tris50 con 10 mM de $MgCl_2$ y 1 mM de GTP (perfil negro) o 0.1 mM de GMPCPP (perfiles en colores) a 25 $^{\circ}C$. El perfil rojo es un promedio de las mediciones realizadas mientras la proteína está polimerizada (véase panel B). El perfil verde corresponde a las mediciones tomadas durante la despolimerización debido a la hidrólisis de GMPCPP y el perfil azul después de la despolimerización de la proteína. Los perfiles con GTP y GMPCPP son desplazados verticalmente para facilitar la comparación. B) Monitorización de la polimerización de BsFtsZ. El grado de polimerización es medido por la dispersión a ángulo bajo durante el experimento.

También se realizaron experimentos con polímeros de BsFtsZ ensamblados con GMPCPP, un análogo de GTP lentamente hidrolizable (Figura 26A). En este caso específico se monitorizó el desensamblaje de los polímeros por la disminución de la intensidad de dispersión a bajo ángulo (Figura 26B). Para ello se escaneó la solución y se recogieron datos cada 15 segundos como se describe en Materiales y Métodos. Los perfiles de dispersión promediados para cada estado de polimerización se representan en la Figura 26A. El perfil de dispersión para la proteína ensamblada (en rojo) muestra en este caso un máximo más notable a 0.09 \AA^{-1} que con GTP y un máximo adicional a ángulos más bajos $q = 0.05 \text{ \AA}^{-1}$ que se corresponde con una distancia de 126 \AA (Figura 26A, puntos rojos). La intensidad de dispersión a ángulo bajo ($q = 0.01$ a 0.02 \AA^{-1}) es mayor, indicando la formación de polímeros más grandes. El desensamblaje de BsFtsZ va acompañado por la desaparición progresiva de los máximos a 0.05 y 0.09 \AA^{-1} . No se encontró ningún otro cambio en la dispersión que indique la formación de especies intermedias durante el desensamblaje en cantidades suficientes para ser detectadas.

4.5.2. Diferencias en la dispersión de rayos-X de los polímeros de BsFtsZ (1-315) que carecen de la cola C-terminal

De forma similar a la proteína nativa BsFtsZ, se ha estudiado por SAXS los polímeros formados por la proteína truncada BsFtsZ (1-315) (BsFtsZ- Δ Ct), la cual carece de la cola C-terminal. Los experimentos con BsFtsZ- Δ Ct han sido realizados por Albert Vergoños, Sonia Huecas y Patricia Castellen (lab. Prof. J.M. Andreu). Experimentos de dispersión de luz muestran que aunque esta construcción es capaz de ensamblar tarda más tiempo en despolimerizar que la proteína nativa (Figura 27). BsFtsZ- Δ Ct presenta menor valor de concentración crítica (Cr) para el ensamblaje y actividad GTPasa reducida respecto a BsFtsZ. Las velocidades de hidrólisis de GTP (2 mM) para BsFtsZ y BsFtsZ- Δ Ct son $1.12 \pm 0.09 \text{ min}^{-1}$ y $0.62 \pm 0.08 \text{ min}^{-1}$ respectivamente y con GMPCPP (0.1 mM) $0.11 \pm 0.01 \text{ min}^{-1}$ y $0.032 \pm 0.003 \text{ min}^{-1}$. La construcción BsFtsZ- Δ Ct contiene una extensión de 6 residuos (GSHMAS) en el N-terminal añadida en el proceso de purificación. Para comprobar que estos residuos no afectan a la polimerización se realizaron experimentos de dispersión de luz y de microscopía electrónica de la proteína nativa con la misma extensión (GSHMAS-BsFtsZ) y se encontró que tanto la proteína nativa y la construcción ensamblan de forma similar y tienen la misma Cr.

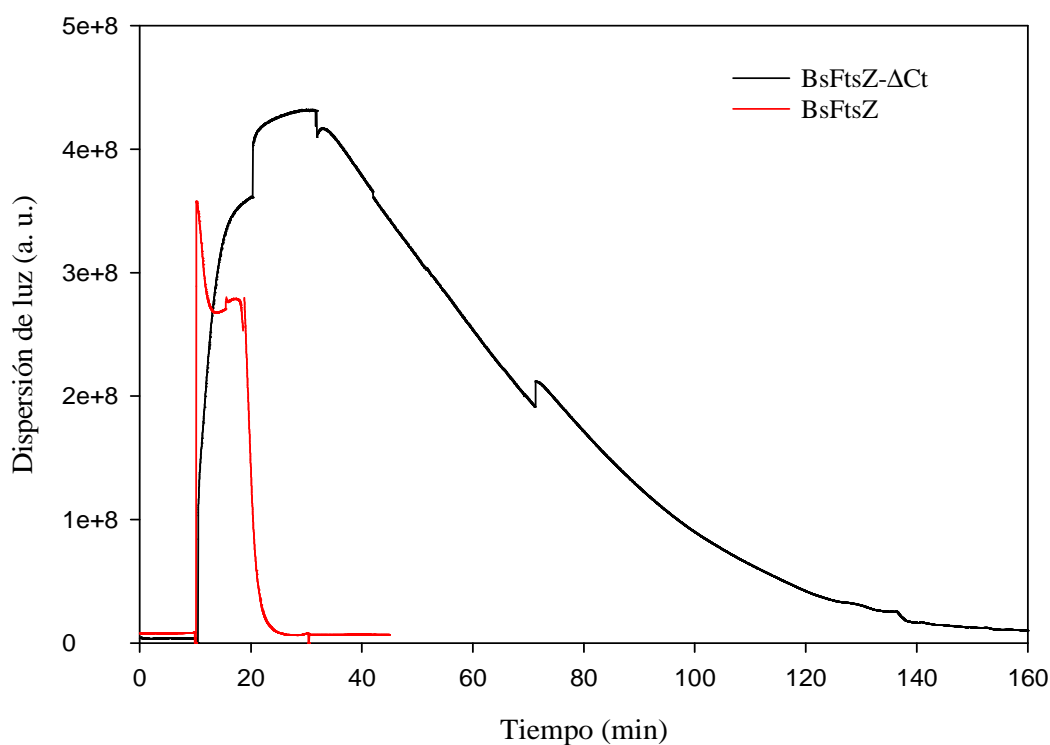


Figura 27. Experimentos de dispersión de luz para la proteína BsFtsZ (línea roja) y la forma truncada BsFtsZ- Δ Ct (línea negra) con GMPCPP. Los experimentos son realizados en las mismas condiciones empleadas en los experimentos de SAXS.

El perfil de SAXS para BsFtsZ- Δ Ct en condiciones de no polimerización se representa en la Figura 25A. El radio de giro $R_G = 24.9 \pm 1.3 \text{ \AA}$ y la dimensión máxima $D_{\max} = 85 \text{ \AA}$ para el monómero de BsFtsZ- Δ Ct se reducen considerablemente respecto al monómero nativo ($R_G = 32.1 \pm 1.0 \text{ \AA}$ y $D_{\max} = 120 \text{ \AA}$ respectivamente) debido a la ausencia de la cola C-terminal. Por otra parte, el ensamblaje de BsFtsZ- Δ Ct (Figura 28) muestra notables diferencias respecto a BsFtsZ en las mismas condiciones (Figura 26). En presencia de GMPCPP se observa un máximo a 0.143 \AA^{-1} correspondiente al espaciamiento de 44 \AA entre subunidades de FtsZ dentro de los protofilamentos (Lowe and Amos, 1999, Elsen et al., 2012, Andreu et al., 2010). A diferencia de los perfiles de dispersión de BsFtsZ, no aparecen los máximos a 0.05 y 0.09 \AA^{-1} atribuidos a distancias de 70 y 126 \AA entre protofilamentos adyacentes. Estas características indican un modo notablemente diferente de interacción lateral de los filamentos de BsFtsZ en ausencia de la cola C-terminal, lo cual será analizado más adelante a través de perfiles de dispersión de polímeros modelos (sección 4.5.4).

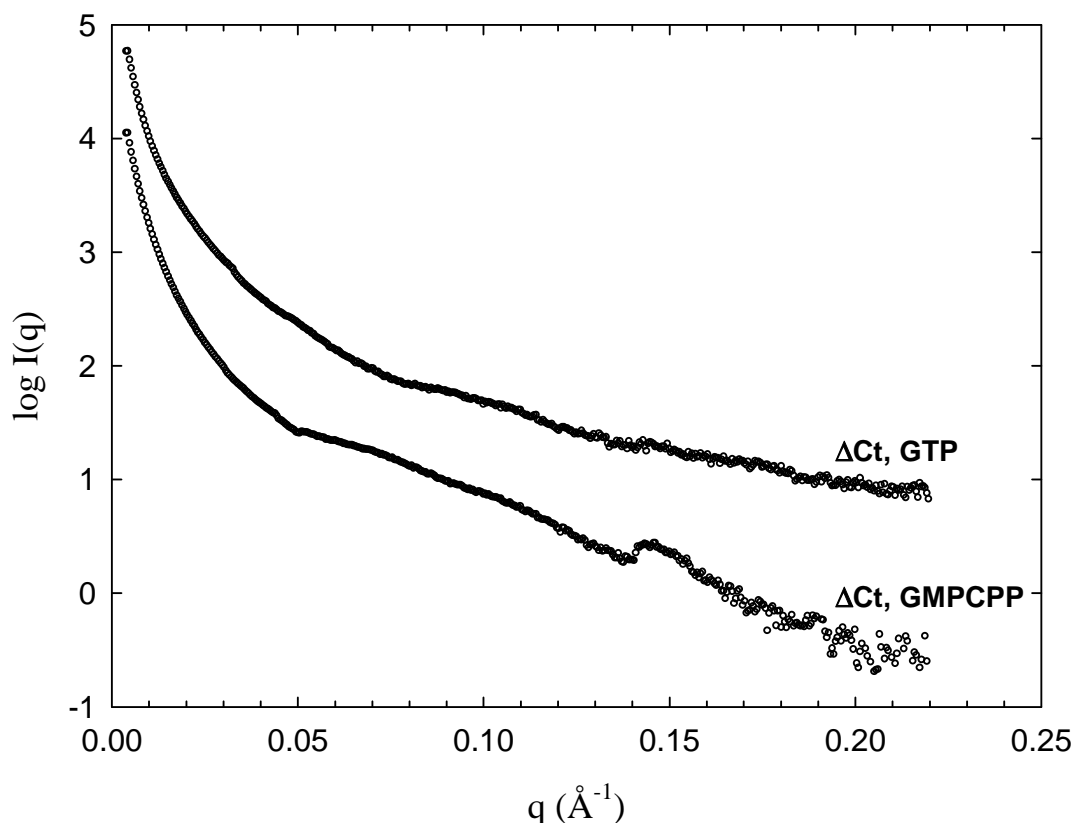


Figura 28. Perfiles de SAXS de la proteína truncada BsFtsZ- Δ Ct. A) Se representan los perfiles de SAXS para polímeros ensamblados de la proteína truncada BsFtsZ- Δ Ct (2 g/L, 50 μ M) en tampón tris50 con 10 mM de $MgCl_2$ y 1 mM de GTP o 0.1 mM de GMPCPP a 25 °C. Los perfiles con GTP y GMPCPP son desplazados verticalmente para facilitar la comparación.

4.5.3. Detección por SAXS del efecto estabilizante o inhibitorio de moléculas pequeñas en el ensamblaje de BsFtsZ

Hemos estudiado por SAXS el efecto de dos moléculas: 1) el antibiótico PC que es un agente estabilizante que induce la polimerización de FtsZ (Andreu et al., 2010) y 2) el compuesto UCM53 que es un inhibidor de ensamblaje que se une en el sitio de nucleótido (véase sección 4.6.1.3.1). Para estudiar el efecto de estas dos moléculas pequeñas en la polimerización de BsFtsZ se realizaron experimentos de SAXS añadiendo los ligandos a las soluciones de la proteína con GTP y GMPCPP. Los perfiles en presencia de los ligandos fueron superpuestos a los perfiles de las soluciones libres de compuesto (Figura 29).

El PC aumenta y desplaza ligeramente a 0.05 y 0.10 \AA^{-1} los máximos presentes en el perfil de BsFtsZ-GMPCPP. En el perfil de los polímeros de BsFtsZ-GTP con el antibiótico también se observa un aumento del máximo a 0.09 \AA^{-1} . Además en presencia del ligando aumenta la intensidad de dispersión a bajo ángulo. Estas observaciones son compatibles con

la formación de manojos inducidos por el PC en presencia de ambos nucleótidos (Andreu et al., 2010). Como era de esperar PC inhibe la despolimerización en ambos casos al bloquear el interruptor de ensamblaje. Cuando se añade el antibiótico a la solución de BsFtsZ-GMPCPP en ausencia de Mg^{2+} (Figura 29), aumenta la intensidad de dispersión a ángulo bajo, lo cual es compatible con la formación de protofilamentos individuales inducidos por PC (Andreu et al., 2010).

Por otra parte, con la adición de UCM53 a los polímeros de BsFtsZ-GTP (Figura 29) desaparece el máximo a 0.09 \AA^{-1} y decrece la intensidad de dispersión en la zona de ángulo bajo, indicando una reducción en el grado de polimerización. Estos resultados están en correspondencia con el efecto inhibitorio de la polimerización del UCM53 (Ruiz-Avila et al., 2013).

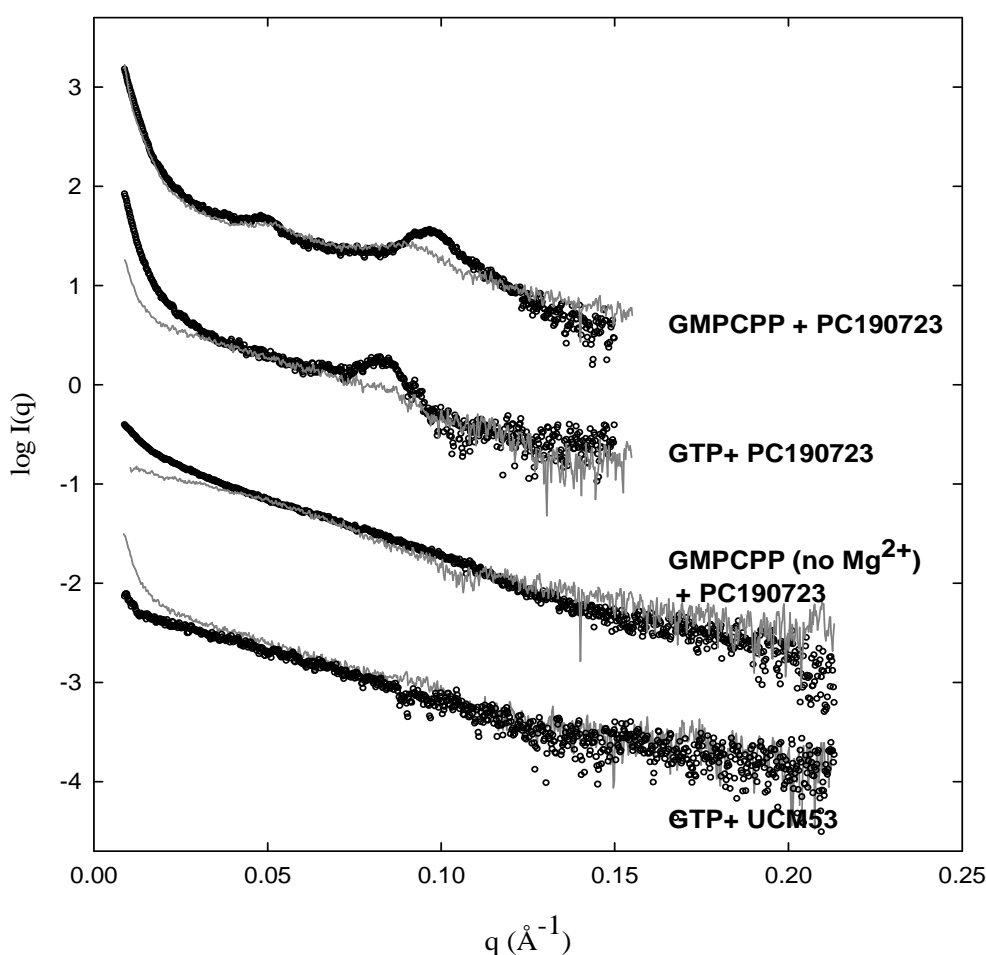


Figura 29. Efecto modulador de moléculas pequeñas sobre polímeros de BsFtsZ. Los perfiles de dispersión de BsFtsZ ensamblada con GTP o GMPCPP, cuando se le añade el agente estabilizador PC190723 ($60 \mu\text{M}$) o el inhibidor UCM53 ($60 \mu\text{M}$) son representados en negro. En línea gris se representa los perfiles en ausencia del ligando modificador.

4.5.4. Modelos de filamentos de FtsZ para estudiar la dispersión de rayos-X

Para obtener una mayor comprensión de la morfología de los polímeros de FtsZ en solución se modelaron distintas formas poliméricas para tratar de reproducir las características de los perfiles experimentales de SAXS. En concreto, intentamos modelar los máximos a 0.05 y 0.09 \AA^{-1} y la zona plana de los perfiles de BsFtsZ (Figura 26A), y el máximo a 0.14 \AA^{-1} observado para la proteína truncada (Figura 28). La construcción de los modelos se realizó con el programa FilaSitus (Wriggers, 2012) y los perfiles teóricos de dispersión se obtuvieron con el programa Crysol (Svergun et al., 1995) (detalles en Materiales y Métodos) utilizando la estructura cristalina de SaFtsZ (PDB: 3vo8). Aunque los experimentos se realizaron con BsFtsZ, en nuestros modelos usamos la estructura de SaFtsZ con la hendidura entre dominios abierta porque es la única estructura resuelta que corresponde a filamentos funcionales. Además ambas proteínas son homólogas y como se ha visto en nuestras simulaciones de DM, los monómeros no ensamblados de estas especies son muy similares (véase sección 4.2). El segmento desordenado C-terminal (contiene 75 aminoácidos en SaFtsZ) y los primeros 11 residuos del N-terminal no fueron incluidos en los modelos porque no están presente en la estructura del cristal. En la modelización estudiamos el efecto de diferentes parámetros en las características de los perfiles de dispersión de los filamentos: ángulo, longitud y número de filamentos.

Modelos de filamentos con ángulo variable

En un primer paso se construyeron filamentos individuales compuestos por 140 monómeros con ángulo de curvatura entre subunidades consecutivas de 0 (recto, 616 nm de longitud), 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 y 2.57° (anillo cerrado de 196 nm de diámetro) (Figura 30 modelos **a-f**). La dirección de curvatura empleada es similar a la que adoptaron los filamentos de SaFtsZ-GTP en nuestras simulaciones de DM y el ángulo de curvatura está dentro del rango observado (véase sección 4.1.1). El modelo recto **a** muestra un pico a $q = 0.143 \text{\AA}^{-1}$, que corresponde a los 44 \AA de espaciamiento entre las subunidades del protofilamento. Como se puede ver en las Figuras 26 y 28, este pico apenas puede ser apreciado en los perfiles experimentales de SAXS, excepto para BsFtsZ- Δ Ct donde aparece más suave (Figura 28). El pico desaparece en los perfiles de dispersión de los modelos de filamentos curvos (modelos **b-e**), donde aparecen ondulaciones a ángulos altos que no han sido detectadas en los experimentos. Las ondulaciones están desfasadas entre perfiles de filamentos con diferentes curvaturas por lo que tienden a suavizarse cuando se combinan,

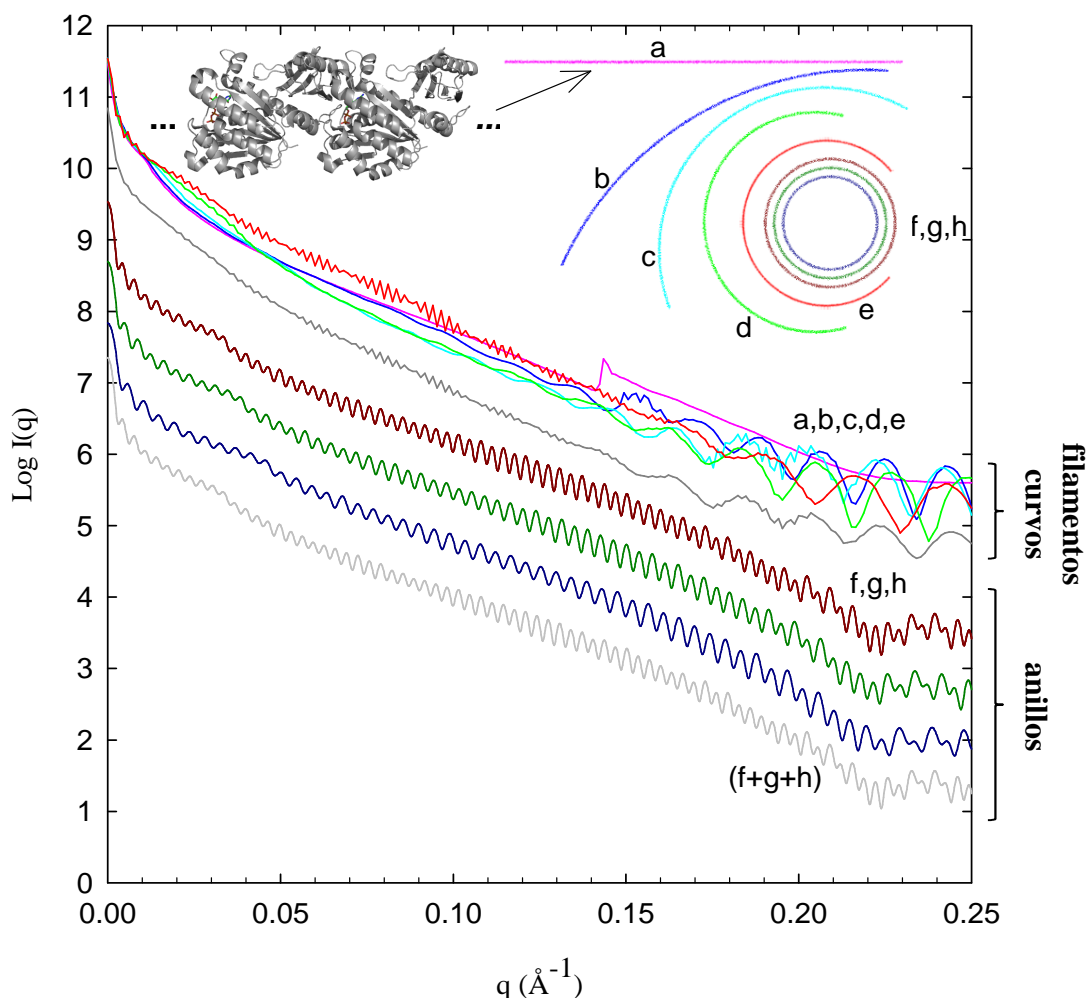


Figura 30. Perfiles de dispersión para modelos de filamentos individuales de FtsZ con curvatura variable. Los modelos son construidos mediante la asociación de monómeros individuales de SaFtsZ (representados en forma de cinta. Véase Materiales y Métodos). El modelo **a** corresponde a un protofilamento recto formado por 140 monómeros y con un ángulo de 0° entre monómeros, el modelo **b** con ángulo de 0.5° , modelo **c** con 1° , modelo **d** con 1.5° y modelo **e** con 2° . El perfil gris oscuro corresponde a una combinación lineal de los modelos **b** (30%), **c** (40%) y **d** (30%). Los modelos **f**, **g** y **h** corresponden a anillos de 140, 120 y 100 monómeros respectivamente. El perfil gris claro corresponde a la combinación lineal de los perfiles de dispersión de los modelos **f** (30%), **g** (40%) y **h** (30%)

simulando de esta forma la flexibilidad de los filamentos (Figura 30, línea gris oscura). Cuando los filamentos curvos sobrepasan el semicírculo y se aproximan a anillos cerrados (modelos **e**, **f**, **g** y **h**), una serie de pequeñas ondas periódicas uniformemente espaciadas cada 0.003 \AA^{-1} aparecen a lo largo de los perfiles de dispersión de los modelos. Estas ondas corresponden a los máximos de una función de Bessel J_0 derivados de anillos con diámetro medio de aproximadamente 2000 \AA ; donde la separación de las ondas es inversamente proporcional al diámetro del anillo (Diaz et al., 1994). Para tratar de suavizar las ondas observadas se construyeron varios anillos de dimensiones cercanas (100, 120 y 140

monómeros) (Figura 30 modelos **f-h**) y se combinaron los correspondientes perfiles teóricos de dispersión (Figura 30, línea gris clara). Sin embargo, la combinación de anillos apenas suaviza las ondas de los modelos que no aparecen en los datos experimentales (Figuras 26 y 28).

Modelos de filamentos de longitud variable

También se examinó el efecto de la longitud de los filamentos incrementando el número de monómeros con dos ángulos de curvaturas diferentes (Figura 31). Se construyeron filamentos de 20, 40, 60, 80, 100, 120 y 140 monómeros con ángulo de 1.0° entre subunidades (Figura 31 modelos **a-g**) y filamentos de 20, 40, 60, 80 y 100 monómeros con ángulo de 3.5° (Figura 31 modelos **h-l**). Como se puede ver, el pico a 0.14 \AA^{-1} es más notable en aquellos modelos que cubren arcos de hasta 80° y desaparece en modelos más grandes donde se visualizan las ondulaciones. Sin embargo, estas ondulaciones también se suavizan mediante la combinación de filamentos de dimensiones cercanas (100, 120 y 140 monómeros con un ángulo de curvatura de 1° entre monómeros consecutivos, o filamentos de 40, 60 y 80 monómeros con ángulo de curvatura de 3.5° ; Figura 31, línea gris). Por lo tanto, combinaciones de modelos de filamentos individuales de longitud y curvatura variable (Figuras 30 y 31) son cualitativamente compatibles con la zona plana observada a ángulo alto en los experimentos de SAXS de polímeros de BsFtsZ. Los modelos de anillos de tamaños cercanos parecen menos compatibles con esta zona.

Las soluciones de polímeros de FtsZ siempre contienen una concentración de proteína no ensamblada debido a la concentración crítica (C_r) requerida para el ensamblaje que depende de la especie de FtsZ y de las condiciones de la solución (Andreu et al., 2010, Huecas et al., 2008). Para tenerlo en cuenta calculamos la combinación lineal de las curvas de dispersión de los filamentos modelos con una pequeña proporción (5%, C_r experimental = 0.088 g/L) de monómeros de FtsZ no ensamblada. Este procedimiento suaviza los máximos a ángulos altos; tanto el pico a 0.14 \AA^{-1} de los filamentos rectos como las ondulaciones de los modelos curvados. Sin embargo, en el caso de la mezcla de los modelos de anillos las ondas continuaron presente y son claramente mayores al ruido experimental, indicando que los modelos de anillos no son capaces de reproducir los perfiles experimentales.

Estos análisis nos permiten concluir que modelos de filamentos individuales de curvatura y longitud variable reproducen la zona plana a ángulo alto de los datos experimentales para los polímeros de BsFtsZ. Modelos de filamentos rectos, presentan un pico a 0.14 \AA^{-1} que no

aparecen en los perfiles de BsFtsZ, pero si en el de BsFtsZ- Δ Ct.

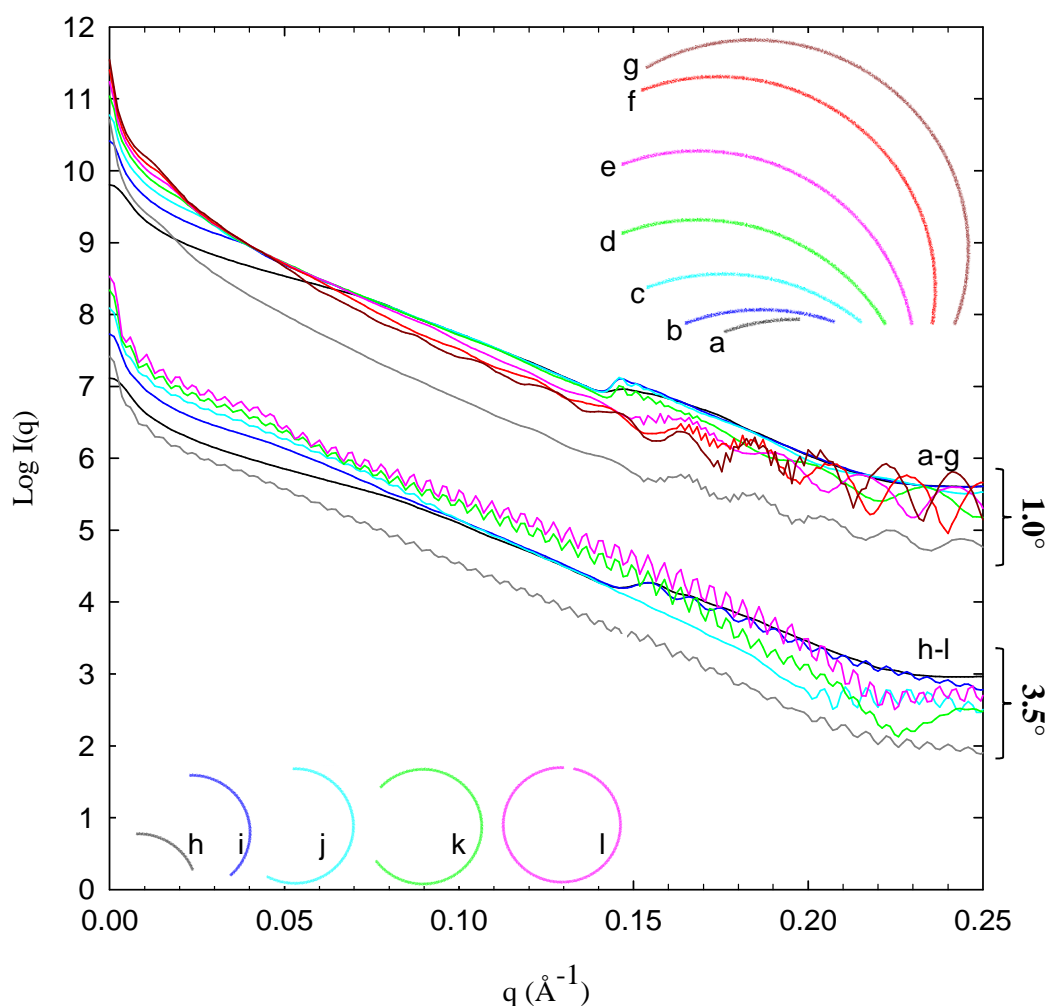


Figura 31. Perfiles de dispersión para modelos de filamentos curvos de FtsZ con longitud variable. Los modelos curvos fueron construidos con ángulos de 1° y 3.5° entre monómeros consecutivos. Los modelos **a**, **b**, **c**, **d**, **e**, **f** y **g** (ángulo de 1°) están formados respectivamente por 20, 40, 60, 80, 100, 120 y 140 monómeros. Los modelos **h**, **i**, **j**, **k** y **l** (ángulo de 3.5°) están formados respectivamente por 20, 40, 60, 80 y 100 monómeros. Cada perfil de dispersión calculado es representado en el mismo color que su modelo. Los perfiles para modelos de 1° se representan en la parte superior y para modelos de 3.5° en la parte inferior de la figura. La línea gris superior es la combinación de los perfiles de dispersión de los modelos **e** (30%), **f** (40%) y **g** (30%). La línea gris inferior es la combinación de los perfiles de dispersión de los modelos **i** (30%), **j** (40%) y **k** (30%).

Modelos de varios filamentos rectos

Los modelos individuales analizados hasta ahora no reproducen los máximos a 0.05 y 0.09 \AA^{-1} observados en los perfiles de BsFtsZ (Figura 26A). Para aproximarnos a los datos experimentales es necesario considerar filamentos múltiples. Centrándonos inicialmente en modelos de filamentos rectos se construyeron: i) 2, 3 y 4 filamentos de 140 monómeros

separados una distancia de 48 Å entre los centros (Figura 32, modelos **e-g**) y ii) 2, 3 y 4 filamentos de 140 monómeros separados 70 Å entre los centros de forma que no hay contactos entre ellos (Figura 32, modelos **h-k**). En todos los modelos de varios filamentos, estos están desplazados axialmente una distancia de medio monómero entre ellos, con excepción del modelo **i**. El máximo a 0.09 \AA^{-1} se reproduce mediante dos filamentos paralelos separados una distancia de 70 Å entre sus centros de masas (Figura 32, modelos **h** e **i**), y se hace más notable en modelos de tres y cuatro filamentos (Figura 32, modelos **j** y **k**).

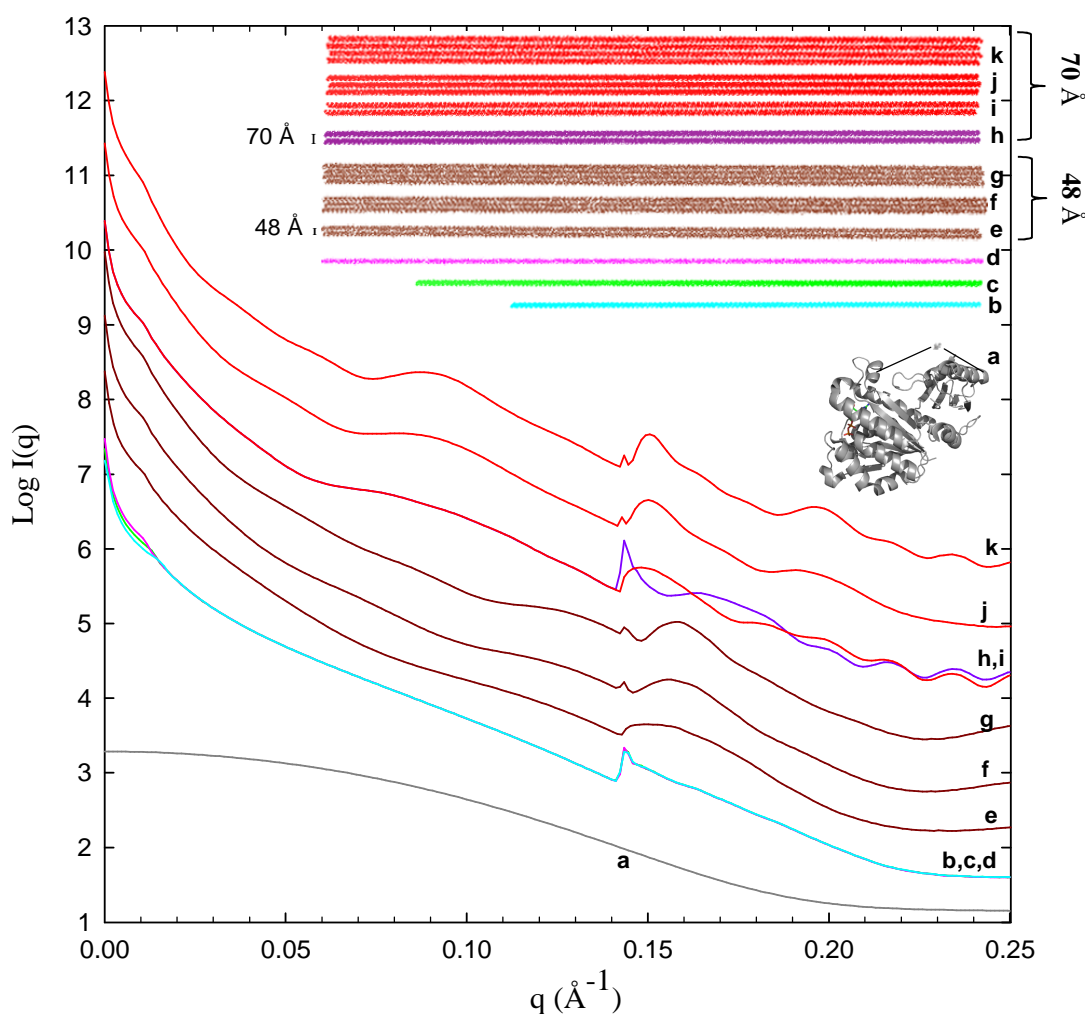


Figura 32. Perfiles de dispersión para modelos de múltiples filamentos rectos de FtsZ.

El modelo **a** es un monómero de SaFtsZ. Los modelos **b**, **c** y **d** son protofilamentos rectos de 100, 120 y 140 monómeros respectivamente. El modelo **e** es formado por dos filamentos rectos separados una distancia de 48 Å entre los centros de masa. En este modelo los filamentos establecen contacto entre ellos. Los modelos **f** y **g** corresponden a modelos de tres y cuatro filamentos respectivamente separados 48 Å. En el modelo **h** dos filamentos a una distancia entre centros de masa de 70 Å son representados. En este modelo los filamentos no establecen contactos entre ellos. El modelo **i** es similar al modelo **h** pero uno de los filamentos está desplazado en una distancia de medio monómero $\sim 22 \text{ \AA}$. Los modelos **j** y **k** son de tres y cuatro filamentos respectivamente separados 70 Å.

Resulta curioso que en estos modelos los filamentos no se tocan entre ellos y en los modelos donde los filamentos se tocan (distancia 48 Å) no aparece este máximo (Figura 32, modelos **e-g**). Un pico agudo se observa a 0.14 \AA^{-1} debido a la repetición de monómeros en los modelos rectos **b, c, d, h**, que es modulado en los modelos múltiples por el desplazamiento de uno de los filamentos en una distancia de medio monómero ($\sim 22 \text{ \AA}$) (compare modelos **h** y **i**). Es de destacar que la forma de este máximo a 0.14 \AA^{-1} en los modelos múltiples es muy parecida a la de los datos experimentales para la proteína truncada BsFtsZ- Δ Ct (Figura 28). De forma general los perfiles de modelos de filamentos rectos separados 48 Å tienen una forma similar a los perfiles de SAXS generados por la proteína truncada. Sin embargo, estos modelos rectos apenas reproducen el máximo a 0.05 \AA^{-1} correspondiente a la distancia de 126 Å observado para BsFtsZ, que como veremos a continuación se puede aproximar mejor con modelos de filamentos curvos.

Modelos de varios filamentos curvos

Para tratar de reproducir el máximo a 0.05 \AA^{-1} observado para BsFtsZ se analizaron diferentes modelos de filamentos curvos. Estos modelos consisten en triples filamentos de 65, 60 y 55 monómeros radialmente espaciados 70 Å, con ángulos de curvatura de 3.138° , 3.437° y 3.800° (Figura 33 representado por los filamentos en verde). En el perfil calculado para el modelo de tres filamentos curvos separados en el plano radial (Figura 33, modelo **a**) se puede apreciar tanto un máximo a 0.09 \AA^{-1} como a 0.05 \AA^{-1} . Este modelo además nos da un mínimo notable a 0.15 \AA^{-1} y un pico a 0.18 \AA^{-1} que no aparecen en nuestros datos experimentales. Estas dos características pueden ser eliminadas desplazando uno de los filamentos (modelos **b** y **c**) o dos (modelo **d**) de los tres filamentos en la dirección perpendicular al plano de curvatura. Para ellos basta con desplazar los filamentos 36 Å y reajustar a 70 Å la distancia entre filamentos vecinos. El modelo **d** o una combinación de modelos refleja mejor los máximos a 0.05 \AA^{-1} y 0.09 \AA^{-1} y reproduce la forma plana de los perfiles experimentales de BsFtsZ en la región de ángulo alto. Es de esperar que asociaciones de más de tres filamentos curvos espaciados 70 Å entre ellos también puedan reproducir las características de los perfiles de dispersión de SAXS. Sin embargo, los modelos equivalentes de tres filamentos circularmente cerrados (Figura 33, modelos **e-g**) o una combinación de ellos tienen ondas periódicas típicas moduladas por la interferencia entre anillos.

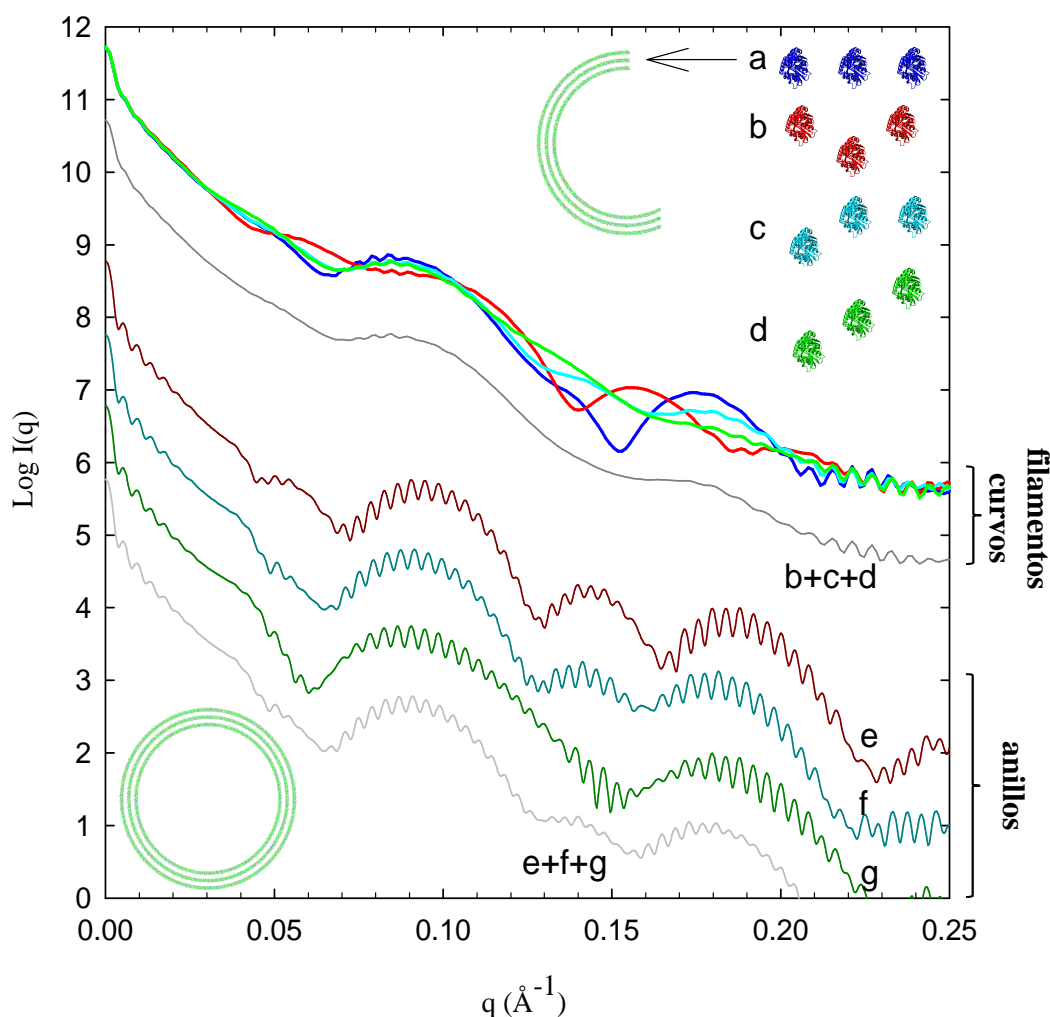


Figura 33. Perfiles de dispersión para modelos de múltiples filamentos curvos de FtsZ. El modelo **a** muestra una vista ortogonal de tres arcos concéntricos hechos de 65-60-55 monómeros cada uno, espaciados radialmente 70 Å y con una curvatura de 3.138°, 3.444° y 3.800°. En los modelos **b** y **c** uno de los filamentos (**b** central, **c** lateral) es desplazado 36 Å en la dirección perpendicular al plano definido por los otros dos anillos. En el modelo **d** el filamento central es desplazado 36 Å y el lateral 72 Å del plano. Los perfiles de dispersión calculados se representan con los mismos colores que los modelos. En la zona de abajo se representan los perfiles para modelos de triples anillos desplazados de igual forma que los triples filamentos curvos. En gris se representa la combinación lineal de los modelos **b** (30%), **c** (40%) y **d** (30%) arriba y abajo la curva resultante de la combinación lineal equivalente para los modelos de anillos.

De igual forma que para los filamentos individuales, combinamos los perfiles de los filamentos curvos con un 5% del de los monómeros desensamblados (BsFtsZ Cr=0.076 g/L) y encontramos que esta combinación se suaviza reproduciendo mejor los perfiles experimentales de BsFtsZ-GMPCPP. Estos modelos se ilustran en la Figura 34A con tres filamentos curvos desplazados del plano radial. Para el caso de los polímeros de BsFtsZ-GTP, dos de los tres filamentos curvos son suficientes para reproducir las características experimentales de los perfiles de dispersión. En la Figura 34A además se representa el perfil

para tres anillos combinado con el 5% del de los monómeros desensamblados y se observan las ondas típicas.

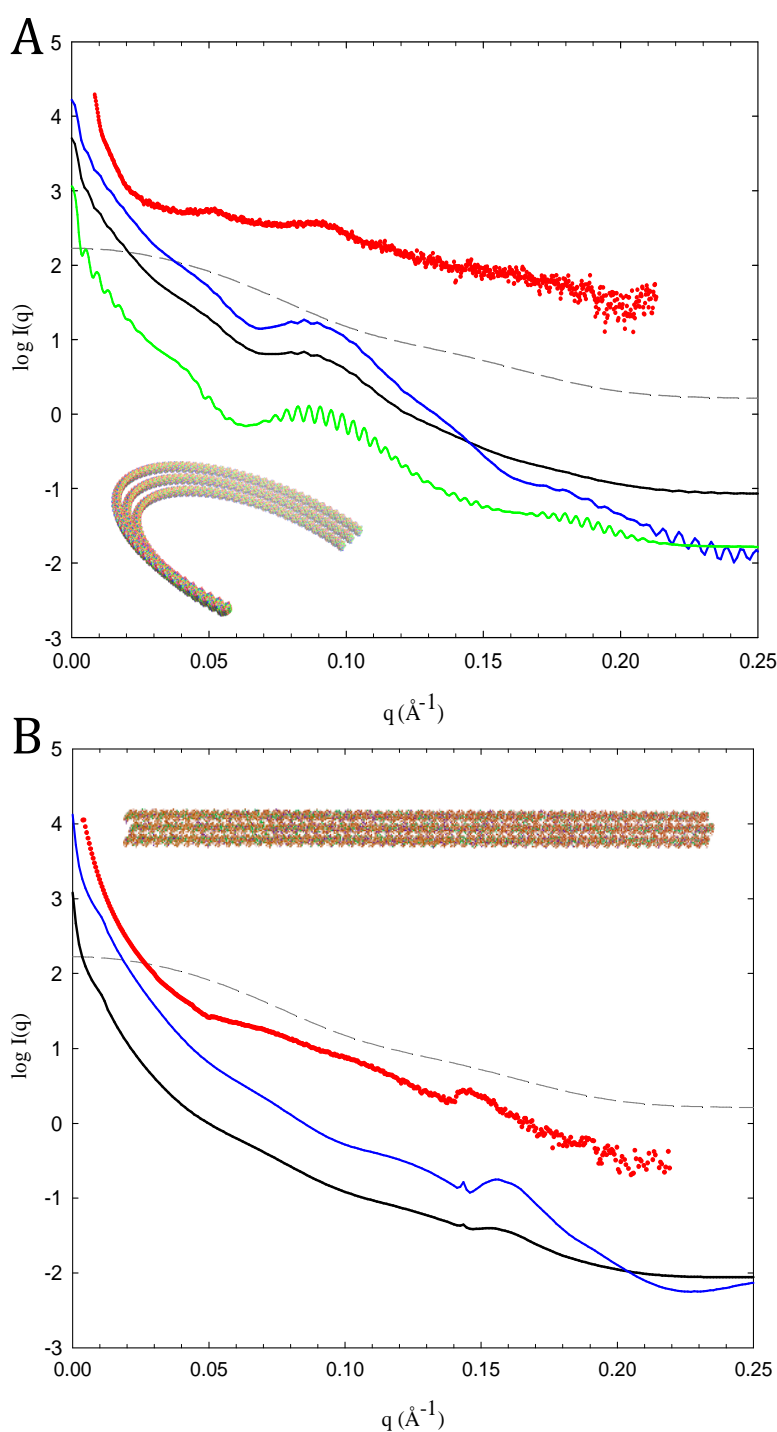


Figura 34. Perfiles de SAXS de los modelos de polímeros de FtsZ que mejor reproducen los perfiles experimentales. A) Se representa el modelo de tres filamentos curvos separados 70 Å y desplazados del plano radial que corresponde al modelo **d** de la Figura 33. En azul se representa el perfil de dispersión calculado para el modelo y en negro la combinación lineal de este perfil con un 5% del perfil de dispersión del monómero de BsFtsZ. El perfil de dispersión del monómero es representado en línea discontinua gris regularizado con GNOM. A modo de comparación se representa en rojo el perfil de dispersión de BsFtsZ-GMPCPP. En verde se representa el perfil para el modelo de tres anillos. B) Se hace la misma representación que en A) para la proteína truncada. En este caso el modelo elegido es formado por tres filamentos rectos espaciados 48 Å.

En resumen, los modelos de filamentos curvos simulan mejor los datos experimentales para BsFtsZ que los modelos de filamentos rectos y los modelos de anillos. Sin embargo, la zona de bajo ángulo de dispersión ($q = 0.01$ a 0.02 \AA^{-1}) en los perfiles obtenidos mediante nuestros modelos no es tan pronunciada como la de los datos experimentales para BsFtsZ-GMPCPP lo que indica la formación de polímeros bastante más grandes. A partir de estos resultados se propone que en solución BsFtsZ forma aglomerados o manojos de filamentos curvos de forma similar a los modelos descritos. Los polímeros de BsFtsZ-GMPCPP observados mediante SAXS pueden ser explicados por manojos de 3 o más protofilamentos curvados de longitud variable, espaciados lateralmente 70 \AA , más sus agregados (Figura 34A). La formación de manojos de filamentos rectos parece ser menos probable y los grupos de anillos son incompatibles con los datos experimentales de BsFtsZ. Por el contrario la dispersión de los polímeros truncados BsFtsZ- Δ Ct puede ser explicado mediante asociaciones de 2 o más filamentos rectos con interacciones laterales entre ellos, como se ejemplifica mediante el modelo de tres filamentos rectos en la Figura 34B. Todas estas evidencias apuntan a que el espaciado de $\sim 70 \text{ \AA}$ entre filamentos curvos de BsFtsZ es proporcionado por la cola C-terminal. Mientras que los filamentos de BsFtsZ- Δ Ct se unen generando manojos rectos, la asociación lateral flexible a través del C-terminal explica la curvatura de los filamentos de BsFtsZ.

Cómo se abordó en la Introducción, el extremo cargado de la cola C-terminal de FtsZ es esencial en las interacciones laterales entre filamentos de BsFtZ, y en la interacción con proteínas reguladoras y de anclaje a la membrana (Buske and Levin, 2012). Estos residuos cargados están conectados al núcleo de FtsZ por un segmento desestructurado de longitud variable que es necesario para la formación del anillo citoquinético (Buske and Levin, 2013, Gardner et al., 2013) y que además juega un rol crítico en la unión de los filamentos a las proteínas de unión a membrana ZipA y FtsA (Buske et al., 2015). El segmento desestructurado también está implicado en la regulación de la pared celular durante la división celular (Sundararajan et al., 2015). La extensión C-terminal puede abarcar distancias comparables al tamaño del núcleo estructurado de FtsZ. En Gardner et al., 2013 reportan una distancia de 52 \AA para la cola C-terminal usando FRET. Este valor sumado al espesor de los filamentos (48 \AA) da un espaciado entre los centros de los filamentos de 10 \AA . Se puede esperar que esta distancia se reduzca por las interacciones electrostáticas del extremo C-terminal con el filamento vecino (Buske and Levin, 2012).

4.5.5. Crio-EM de polímeros de BsFtsZ y BsFtsZ- Δ Ct

La Dra. Sonia Huecas (lab. Prof. J.M. Andreu) analizó por crio-EM, en hielo vítreo sin ningún soporte o tinción, polímeros de BsFtsZ y BsFtsZ- Δ Ct ensamblados en las mismas condiciones (2 g/L FtsZ) que los estudios de SAXS. Las imágenes obtenidas muestran que BsFtsZ forma protofilamentos curvos que se unen en espirales (Figura 35A) o toroides, que a su vez forman grandes agregados (Figura 35B). Filamentos y toroides de BsFtsZ similares ya habían sido observados por tinción negativa (Andreu et al., 2010), pero los resultados en crio-EM confirman que los toroides se forman en solución y no son consecuencia de la superficie de carbono. El hecho de que no se hayan encontrado ondas periódicas en los perfiles de SAXS sugiere que los toroides son relativamente desordenados, formados por la asociación de protofilamentos. A diferencia de la proteína nativa, la proteína truncada BsFtsZ- Δ Ct forma manojos de filamentos rectos y protofilamentos curvos que con frecuencia salen de los extremos de los manojos rectos (Figura 35C).

Las distancias entre pares de protofilamentos se midieron en las zonas aparentemente planas de los toroides (Figura 35D) y en los manojos de BsFtsZ- Δ Ct (Figura 35E), obteniéndose dos distribuciones claramente diferentes (Figura 35F). La distancia entre los filamentos en los toroides de BsFtsZ es de 65 ± 5 Å, mientras que la distancia de los filamentos de la proteína truncada es de 43 ± 5 Å. Estos valores obtenidos en crio-EM son similares a los estimados mediante SAXS de 70 Å y 48 Å respectivamente.

En resumen, los resultados de crio-EM apoyan los análisis de los modelos de SAXS de los distintos tipos de polímeros formados por BsFtsZ y BsFtsZ- Δ Ct (Figuras 26 y 28) y permiten la observación de toroides y manojos con dimensiones bastante mayores que el espaciado máximo detectable con nuestros ajustes de SAXS (~60 nm). Además estos resultados corroboran de nuevo nuestra propuesta de una asociación lateral a través del segmento C-terminal para protofilamentos de BsFtsZ y contactos laterales directos entre filamentos vecinos de la proteína truncada. Esto puede explicar la formación de manojos de filamentos curvos de la proteína nativa, mientras los filamentos de la proteína truncada se mantienen rectos debido a los contactos laterales.

La propiedad de los filamentos de FtsZ de asociarse a través de la cola C-terminal en manojos sueltos tiene importantes implicaciones biológicas. La división celular bacteriana se inicia mediante el ensamblaje de FtsZ en el septum pero la disposición dinámica de los filamentos en el anillo Z y los mecanismos de constricción ahora es que están comenzando a

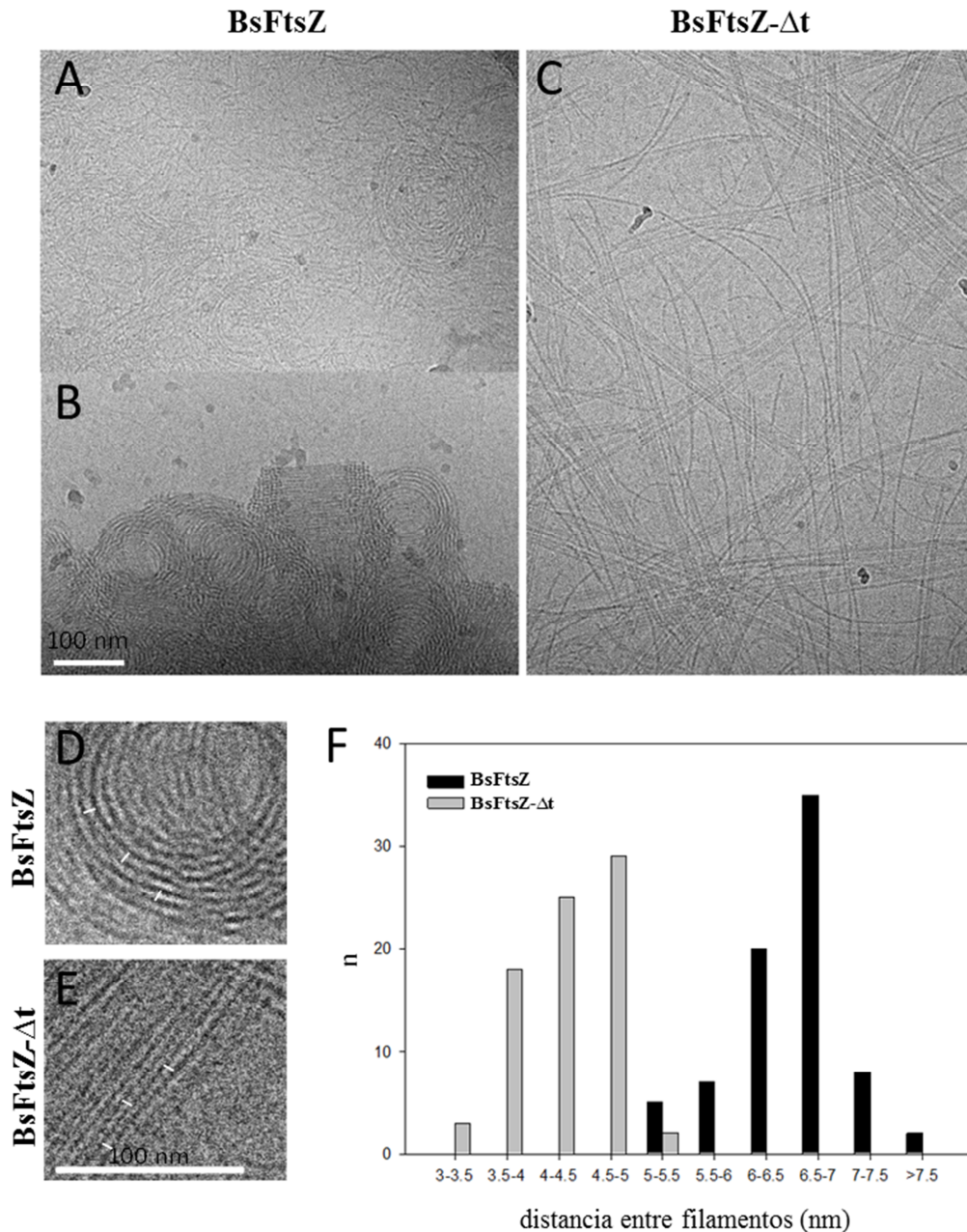


Figura 35. Crio-EM de polímeros de BsFtsZ y BsFtsZ-ΔCt. Imágenes de polímeros ensamblados de A) y B) BsFtsZ y C) BsFtsZ-ΔCt en las mismas condiciones de los ensayos de SAXS; 2 g/l de la proteína en 50 mM de tampón Tris-HCl, 10 mM MgCl₂ y 0.1 mM de GMPCPP. En D y E se muestran dos imágenes representativas para BsFtsZ y BsFtsZ-ΔCt extraídas de B) y C) respectivamente. F) Medidas de la distancia entre filamentos determinadas a partir de D) y E), las líneas sobre los filamentos indican la forma empleada para medir la distancia usando el programa ImageJ.

entenderse (Erickson et al., 2010, Meier and Goley, 2014, Hajduk et al., 2016, Haeusser and Margolin, 2016). Estudios de microscopía de fluorescencia de súper-resolución han descrito un anillo Z discontinuo formado por agrupaciones relativamente cortas de protofilamentos de FtsZ (Strauss et al., 2012, Buss et al., 2013, Holden et al., 2014, Rowlett and Margolin, 2014,

Coltharp et al., 2016). Nosotros proponemos que la auto-organización de los filamentos de FtsZ en manojos sueltos es la razón de la formación de agrupaciones desordenadas en el anillo Z. Análisis de las imágenes de súper-resolución indican que los polímeros de FtsZ se localizan ~ 130 Å por debajo de la cara interna de la membrana y están estabilizados por la red de proteínas del divisoma extendidas en el cromosoma de *E. coli* (Buss et al., 2015). A diferencia de los estudios que proponen un anillo discontinuo, resultados de crio-EM han indicado una capa continua de filamentos de FtsZ a una distancia de 150 ± 20 Å por debajo de la membrana en *E. coli* y esta distancia puede variar por diferentes transformaciones de la extensión C-terminal. Curiosamente los filamentos de FtsZ aparecen separados 78 Å entre ellos (centro a centro) en células de *C. crescentus* y 68 Å en células de *E. coli* que sobre-expresan FtsZ (Szwedziak et al., 2014). Nosotros especulamos que la distancia de ~ 70 Å encontrada entre los filamentos de las células estudiadas por crio-EM es debido a la cola C-terminal, al igual que la observada en los manojos sueltos formados por FtsZ en solución. Aceptando que la condensación de los filamentos de FtsZ, la rotación y el deslizamiento pueden participar en la constricción del anillo Z, sugerimos que múltiples interacciones electrostáticas transitorias de las colas flexibles C-terminal tienen la función de agrupar los protofilamentos de FtsZ en manojos sueltos. Esto resolvería el problema del deslizamiento, permitiendo al protofilamento vecino deslizarse respecto al otro sin llegar a ser liberado durante la constricción de anillo Z.

4.6. Búsqueda de nuevos inhibidores específicos de FtsZ

De forma paralela a las simulaciones de DM de los filamentos de FtsZ nos propusimos el descubrimiento de nuevos inhibidores de la división celular bacteriana, utilizando la técnica de cribado virtual en dos sitios diferentes de FtsZ: i) el sitio de unión de nucleótido y ii) la hendidura entre los dominios N y C-terminal (Figura 5 Introducción).

Como se ha abordado en la Introducción, FtsZ es una proteína que une nucleótidos de guanina en su dominio N-terminal (Mukherjee et al., 1993, RayChaudhuri and Park, 1992) y presenta un ensamblaje dinámico asociado a la hidrólisis de GTP (Mukherjee and Lutkenhaus, 1999). Este sitio de unión de nucleótido está conservado en las distintas especies de bacterias y constituye una diana clara para la búsqueda de moléculas capaces de desplazar al GTP e inhibir la división celular bacteriana. La homología estructural de FtsZ con la tubulina eucariota sugiere el inconveniente de que los compuestos también puedan afectar a los microtúbulos. Sin embargo, análogos de GTP con sustituciones en el C8 demostraron la

posibilidad de inhibir de forma específica la polimerización de FtsZ sin afectar el ensamblaje de la tubulina eucariota (Lappchen et al., 2008) validando este sitio de unión. Nuestras simulaciones de DM refuerzan la importancia de este sitio de unión ya que la dinámica del filamento funcional depende del nucleótido unido.

El segundo sitio de inhibición de FtsZ es el interruptor molecular localizado entre los dominios N y C-terminal caracterizado dinámicamente en nuestras simulaciones de DM. El PC se une a esta hendidura (Matsui et al., 2012, Elsen et al., 2012, Tan et al., 2012) bloqueándola y estabilizando los polímeros (Andreu et al., 2010). Ensayos de anisotropía de fluorescencia con el derivado fluorescente del PC (DFMBA-NBD), muestran que este ligando no se une al monómero de FtsZ y si a los polímeros, lo que demuestra que el interruptor molecular se activa durante el ensamblaje. El PC es activo frente a dosis letales de cepas de *S. aureus* resistentes a metilina en modelos de animales, lo que permitió validar a FtsZ como una diana antibacteriana (Haydon et al., 2008).

4.6.1. Sitio de unión de nucleótido

Para la búsqueda de nuevos inhibidores de la división celular bacteriana con afinidad por el sitio de nucleótido de FtsZ, primero estudiamos la flexibilidad intrínseca del sitio. Con este fin se realizaron simulaciones de DM con la estructura de la proteína BsFtsZ en la forma apo (PDB: 2vxy). En segundo lugar se realizó una validación del protocolo de docking que es usado en los programas de cribado virtual y que aplicaremos en el estudio de los posibles modos de unión de los compuestos seleccionados. Para ello aplicamos el procedimiento de “docking” con el GDP en el sitio de nucleótido de la estructura apo. También se estudiaron las principales interacciones del complejo BsFtsZ-GDP obtenido con mayor puntuación con simulaciones de DM. Como el complejo BsFtsZ-GDP ya ha sido determinado por cristalografía de rayos-X (PDB: 2rhl), este procedimiento nos proporciona un estado de referencia y nos permite validar la metodología que será aplicada en la búsqueda y modelización de nuevos compuestos. Por último se realizó el cribado virtual de librerías de ligandos sintéticos y comerciales y se estudió por simulaciones de DM el modo de unión de aquellos compuestos que resultaron activos experimentalmente.

4.6.1.1. Flexibilidad del sitio de unión

El estudio de la flexibilidad intrínseca del sitio de unión de nucleótido se realizó con la estructura del cristal de BsFtsZ en la forma apo (PDB: 2vxy) que es la que tiene mayor

resolución hasta la fecha (1.7 Å). Se realizó la simulación de DM de BsFtsZ durante 100 ns con el paquete de programas GROMACS (Hess et al., 2008a, Van Der Spoel et al., 2005a) siguiendo el protocolo detallado en Materiales y Métodos. El cálculo del RMSD durante la simulación (Figura 36A) muestra que la proteína fluctúa alcanzando su conformación de equilibrio aproximadamente después de 60 ns. Las mayores fluctuaciones corresponden a los bucles T3, T4 y T5, el extremo de la hélice H7, el bucle H6/H7 y la región del C-terminal (Figura 36B). Precisamente los bucles T3, T4 y T5 y la hélice H7 son elementos que componen el sitio de unión a nucleótido, lo que indica que es un sitio muy dinámico.

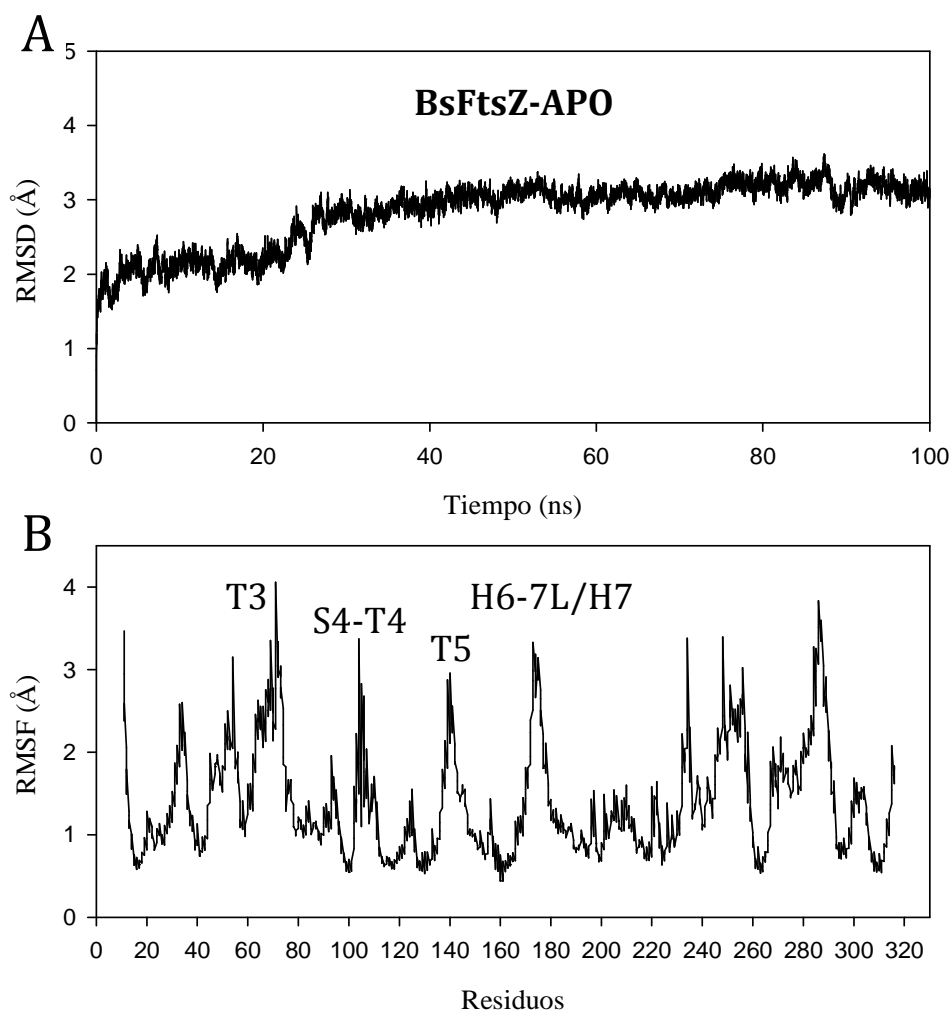


Figura 36. Dinámica de la proteína BsFtsZ en la forma apo (PDB: 2vxy). A) RMSD de la proteína respecto a la estructura inicial, durante los 100 ns de simulación de DM. B) Fluctuación cuadrática media por residuo (RMSF) obtenida usando el programa Theseus.

4.6.1.2. Unión con GDP. Validación del protocolo de “docking”

Para la validación del protocolo usado en el “docking” y cribado virtual de los diferentes

compuestos, inicialmente se realizó el “docking” del GDP en el sitio de nucleótido de BsFtsZ en la forma apo (PDB: 2vxy), con el programa ICM (protocolo 4D) (Totrov and Abagyan, 1997) (detalles en Materiales y Métodos). Es importante mencionar que la conformación de GDP con mayor puntuación que se obtuvo a través del “docking” es prácticamente idéntica a la conformación del GDP en la estructura cristalina de la misma especie (PDB: 2rhl).

Para estudiar las interacciones dinámicas del nucleótido con la proteína realizamos la simulación de DM del complejo BsFtsZ-GDP. Los resultados de la simulación de DM están en correspondencia con la estructura del complejo BsFtsZ-GDP (2rhl) y con estudios computacionales previos (Schaffner-Barbero et al., 2010). Se observa una relativa flexibilidad del sitio de unión y una fluctuación promedio de 1 Å del GDP dentro del sitio (Figura 37). Las interacciones del GDP estabilizan varios elementos del sitio de unión respecto a la proteína apo (comparar Figura 36B y 37B), pero los bucles T3 y H6/H7 mantienen su alta flexibilidad.

A pesar de la flexibilidad observada, la mayoría de las interacciones cristalográficas observadas en la estructura del GDP con FtsZ son estables a lo largo de los 100 ns de la simulación de DM (Tabla 2). El anillo de guanina de GDP se posiciona entre las hélices H7 y H1 formando puentes de hidrógenos estables con el Asp-187, mientras la ribosa establece interacciones con el bucle T5. Tanto la ribosa como la guanina comparten una fuerte interacción electrostática con el anillo aromático de la Phe-183. Los fosfatos por su parte, interactúan con los bucles T1 y T4 de la proteína, ricos en glicinas. A diferencia de la estructura del cristal, en la simulación el GDP establece puentes de hidrógenos estables con la Arg-143 (bucle T5) y el nitrógeno (N2) de la guanina interacciona con Thr-133 en lugar de la interacción del oxígeno (O6) con Asn-25. Estas diferencias podrían deberse a la relajación de la estructura en nuestras simulaciones respecto al cristal (Tabla 2).

También se han realizado simulaciones de DM con GTP unido en lugar de GDP (resultados no mostrados). Recordar que hasta la fecha no se ha determinado por difracción de rayos-X ninguna estructura de BsFtsZ con GTP, sí con GTP-gamma-S. En nuestras simulaciones el GTP se coloca prácticamente idéntico al GDP. La mayoría de las interacciones de los fosfatos con las glicinas de los bucles T1 y T4 se mantienen, lógicamente aparecen nuevas interacciones del fosfato γ con el bucle T3. Por simplicidad y como no hay ninguna estructura cristalográfica con GTP, en las comparaciones que se realizan posteriormente con nuevos ligandos utilizaremos la estructura y la simulación con GDP.

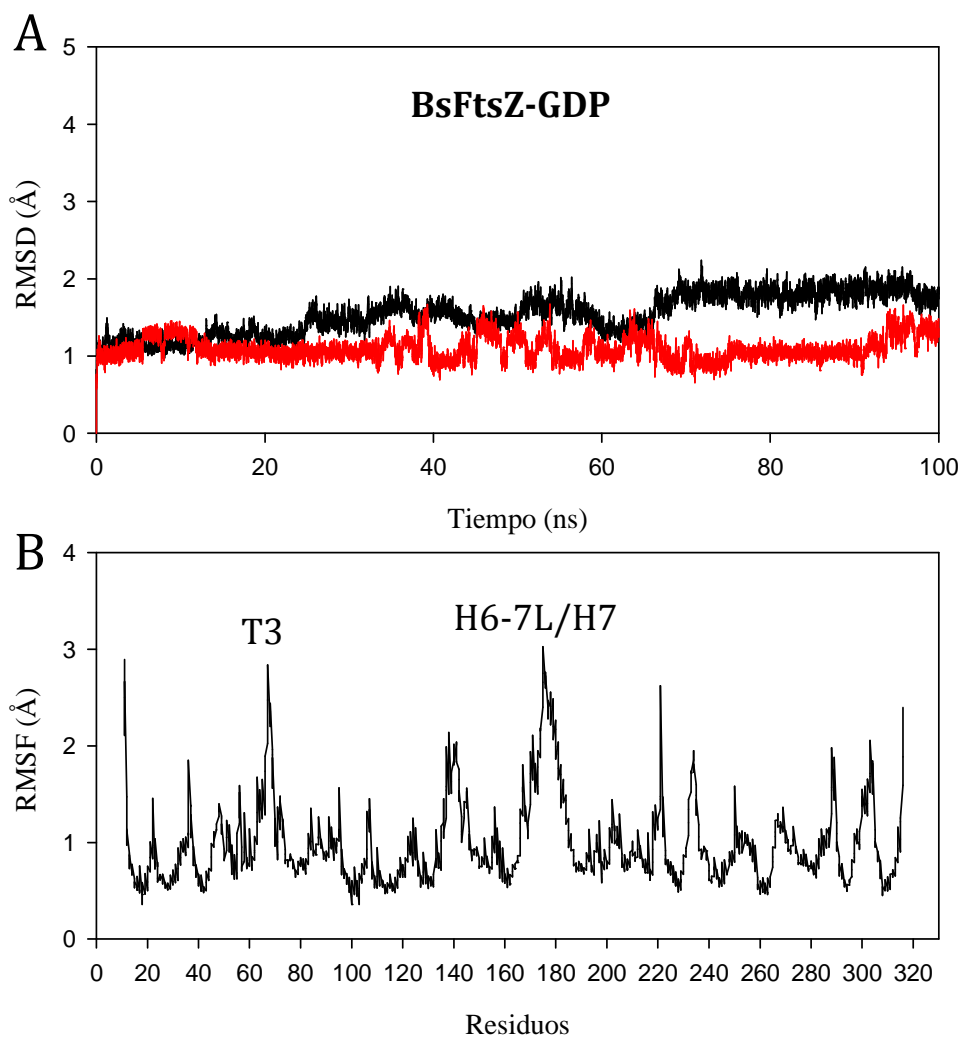


Figura 37. Dinámica de BsFtsZ con GDP unido. A) RMSD de la proteína (negro) y GDP (rojo) respecto a la estructura inicial durante los 100 ns de simulación de DM. B) RMSF de la proteína obtenido usando el programa Theseus.

	2VXY	GDP 2rhl	GDP MD
GUANINA	Asn-25	O6	-
	Thr-133	-	N2 (39)
	Asp-187	N1 N2	N1 (92) N2 (81)
RIBOSA	Glu-139	O3'	O3' (51) O2' (60)
	Arg-143	-	O3' (75) O3A (71) O1B (98) O2B (20)
FOSFATOS	Gly-22	O1A-O2A	O1A (78)
	Gly-21	O3B	O1A (11)
	Gly-108	O1B	O2B (96.35)
	Thr-109	O1B	-
	Gly-110	O2B	-

Tabla 2. Comparación de los Puentes de Hidrógenos del complejo BsFtsZ-GDP.

Se comparan los puentes de hidrógenos observados durante la simulación de DM de BsFtsZ-GDP con los puentes de hidrógenos formados en la estructura del cristal del complejo (PDB: 2rhl). En ambos casos la guanina forma puentes de hidrógenos con la hélice H7 (Asp-187). La ribosa interactúa con el bucle T5 y forma puentes de hidrógenos estables con Glu-139 y Arg-143, mientras los fosfatos se insertan entre los bucles T1 y T4 estableciendo puentes de hidrógenos con las glicinas.

4.6.1.3. Ligandos sintéticos validados experimentalmente: Compuestos polifenólicos (UCM05)

En un primer paso en la búsqueda de ligandos capaces de desplazar al GTP y afectar la polimerización de FtsZ el Dr. Pablo Chacón (año 2010) realizó el cribado virtual de una pequeña biblioteca sintética del laboratorio de Química Médica (Departamento de Química Orgánica I de la Universidad Complutense de Madrid, UCM). El cribado virtual se realizó en el bolsillo de unión de nucleótido en la estructura 2vxy con el programa ICM, versión 3.6-1e (Totrov and Abagyan, 1997).

Del cribado virtual se eligieron los 18 compuestos con mejor puntuación. La principal característica es que varios son polifenoles con un núcleo central constituido por una molécula de naftaleno. La validación experimental se realizó por Laura Ruiz (lab. Prof. J.M. Andreu) (Ruiz-Avila et al., 2013). La afinidad de unión por el sitio de nucleótido de FtsZ se determinó por ensayos de desplazamiento con la sonda mant-GTP unida (Schaffner-Barbero et al., 2010), que permite la medida indirecta (K aparente) de la unión de compuestos que se unen al sitio de GTP de FtsZ aunque estos tengan estructura diferente a los nucleótidos. De los 18 compuestos, cuatro resultaron activos. De ellos el UCM05 es el que mayor afinidad aparente presenta ($K_{b_{UCM05}} = (4.30 \pm 0.04) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$), aunque lejos de la del ligando natural GTP ($K_{b_{GTP}} = (3.1 \pm 0.5) \times 10^7 \text{ M}^{-1}$) (Figura 38A) (Ruiz-Avila et al., 2013). Ensayos en células mostraron que UCM05 además inhibe el crecimiento bacteriano con una concentración mínima inhibitoria (MIC) de 100 μM . El efecto de UCM05 en la división celular se determinó por experimentos de microscopía de contraste de fases de la cepa *B. subtilis* 168 incubada con el compuesto. El fenotipo típico de afectación específico a FtsZ en células bacilares consiste en la elongación de las células al no poder finalizar el proceso de división (Erickson and Osawa, 2010). La Figura 38B muestra la filamentación de las células de *B. subtilis* 168 en presencia de UCM05 respecto a un control sin compuesto.

4.6.1.3.1. Optimización de los compuestos basada en diseño racional

Una vez comprobado que el UCM05 se une al sitio de nucleótido de FtsZ y afecta la división bacteriana se realizaron una serie de modificaciones iniciales con el fin de mejorar la afinidad al sitio de nucleótido y la actividad antibacteriana. La síntesis de los nuevos compuestos se realizó en el laboratorio de Química Médica de la UCM. En este proceso nosotros colaboramos con experimentos de cribado virtual y “docking” para seleccionar los

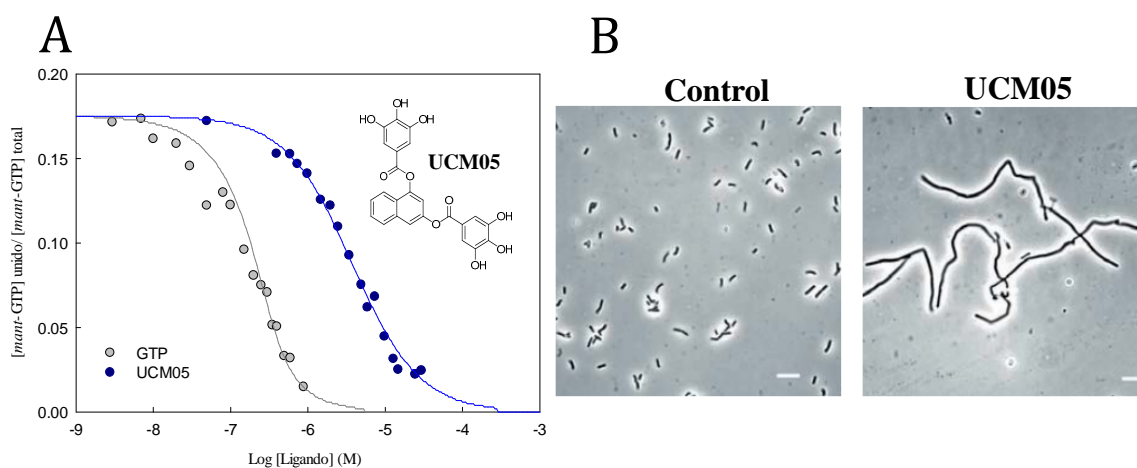


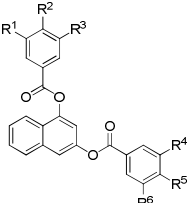
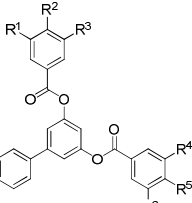
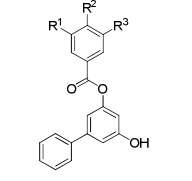
Figura 38. Validación experimental de UCM05. A) Curvas de desplazamiento de mant-GTP por el compuesto UCM05 (en azul). Como control se representa la curva de desplazamiento del GTP (en gris). Insertado en la figura se representa la estructura de UCM05. B) Células de la cepa *B. subtilis* 168 después de incubarlas durante 2 h a 37 °C con UCM05 (50μM) observadas por microscopía de contraste de fases. El control mostrado equivale al mismo experimento en ausencia de compuesto. La barra de escala equivale a 10 μm. Imagen tomada de Ruiz-Avila et al., 2013.

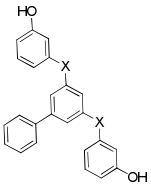
diseños de los compuestos desde el punto de vista computacional. De esta optimización inicial resultaron dos compuestos que desplazan al mant-GTP y mejoran la afinidad por el sitio, UCM44 (donde se redujo el número de hidroxilos de la molécula) y UCM53 (donde se sustituyeron dos hidroxilos del anterior por cloro) (Figura 39A). Ambos ligandos presentan una afinidad que se ve incrementada hasta 3.5 veces respecto al UCM05 ($K_{b_{UCM44}} = (1.5 \pm 0.3) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ y $K_{b_{UCM53}} = (1.3 \pm 0.2) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$). Además la actividad antibacteriana se incrementa respecto al compuesto parental con valores de MIC de 25 μM y 13 μM para UCM44 y UCM53 respectivamente. Mediante microscopía de contraste de fases se observó que estos compuestos afectan la división de las células de *B. subtilis* 168 induciendo filamentos incluso a concentraciones inferiores a sus MIC (Figura 39B). Experimentos de dispersión de luz de la proteína BsFtsZ ensamblada con GTP y un sistema de regeneración de GTP mostraron que tanto UCM05 como los dos derivados (UCM44 y UCM53) afectan la polimerización de la proteína (Ruiz-Avila et al., 2013). Al añadir los ligandos disminuye considerablemente la dispersión de luz respecto al control en ausencia de los compuestos lo que sugiere que actúan como inhibidores del ensamblaje de BsFtsZ.

La unión de estos compuestos con BsFtsZ fue estudiada en detalle tanto desde el punto de vista experimental como computacional y los conocimientos adquiridos fueron empleados en una optimización sistemática de los compuestos. Las nuevas modificaciones sintéticas se realizaron en el laboratorio UCM: cambiando el núcleo naftaleno, cambiando los

espaciadores entre el naftaleno y los anillos fenólicos y variando el número de hidroxilos de los anillos (Tabla 3). También se realizaron estudios de modelado molecular para predecir los posibles modos de unión de las distintas propuestas de síntesis, los más representativos serán mostrados en el siguiente apartado.

Tabla 3. Afinidad y actividad antibacteriana de la serie de compuestos sintetizados.

	Comps	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶	Kd ^a FtsZ (μM)	MIC ^d (μM)	
									<i>B. Subtilis</i>	MRSA
	1:05^b	OH	OH	OH	OH	OH	OH	2.3 ± 0.1	114	50
	2:44^c	OH	H	OH	OH	OH	H	0.7 ± 0.2	25	50
	3	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	≥ 286	>200	>100
	4	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OH	OH	OH	1.5 ± 0.2	100	100
	5	OH	OH	OH	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	1.6 ± 0.3	100	100
	6	OH	OH	OH	OH	OH	H	1.4 ± 0.03	50	100
	7	OH	OH	OH	OH	H	OH	1.3 ± 0.1	50	100
	8	OH	OH	H	OH	OH	OH	1.2 ± 0.1	25	100
	9	OH	H	OH	OH	OH	OH	1.4 ± 0.2	100	100
	10	OH	OH	OH	OH	H	H	2.0 ± 0.1	50	100
	11	OH	OH	OH	H	OH	H	1.5 ± 0.1	50	100
	12	OH	H	H	OH	OH	OH	1.3 ± 0.1	50	100
	13	H	OH	H	OH	OH	OH	2.0 ± 0.1	>50	100
	14	OH	OH	H	OH	OH	H	2.0 ± 0.04	50	>100
	15	OH	OH	H	OH	H	OH	0.9 ± 0.1	>50	50
	16	OH	H	OH	OH	H	OH	1.6 ± 0.1	25	10
	17	OH	H	OH	OH	H	H	1.5 ± 0.1	20	10
	18	OH	H	OH	H	OH	H	2.2 ± 0.1	>50	8
	19	OH	H	H	OH	OH	H	0.7 ± 0.2	20	10
	20	OH	H	H	OH	H	H	1.5 ± 0.1	10	10
	21	OH	H	H	H	OH	H	0.8 ± 0.2	5	5
	22	H	OH	H	OH	H	H	1.5 ± 0.1	10	5
	23	H	OH	H	H	OH	H	1.7 ± 0.02	5	5
	24	OH	OH	OH	OH	OH	OH	0.8 ± 0.1	40	50
	25	OH	OH	H	OH	H	OH	0.4 ± 0.1	15	10-50
	26	OH	OH	H	OH	H	H	0.4 ± 0.1	15	10-50
	27	OH	H	OH	OH	H	H	0.5 ± 0.1	5	5
	28	OH	H	H	OH	H	H	0.5 ± 0.1	5	7
	29	OH	H	H	H	OH	H	0.6 ± 0.2	10	5
	30	H	OH	H	H	OH	H	0.4 ± 0.1	2.5	5
	31	OH	OH	H	-	-	-	5.3 ± 1.0	75	10-50
	32	OH	H	OH	-	-	-	5.3 ± 1.0	50	10-50
	33	OH	H	H	-	-	-	3.8 ± 0.8	50	10-50
	34	H	OH	H	-	-	-	3.3 ± 0.6	50	10-50

		Comps	X	K _d ^a (μM) FtsZ	MIC (mg/L)	
					<i>B. Subtilis</i>	MRSA
		35	-	0.5 ± 0.1	5	3
		36	NHCO	4.3 ± 1.0	25	10-50
		37	NHSO ₂	4.8 ± 0.5	50	10-50
		38	CONH	8.3 ± 1.4	50	10-50

^a Nótese que se representa la constante de disociación K_d (K_d=K_b⁻¹). ^b Datos para el compuesto UCM05. ^c Datos para el compuesto UCM44. ^d Mínima concentración a la que se inhibe completamente el crecimiento bacteriano. Datos tomados de Artola et al., 2014.

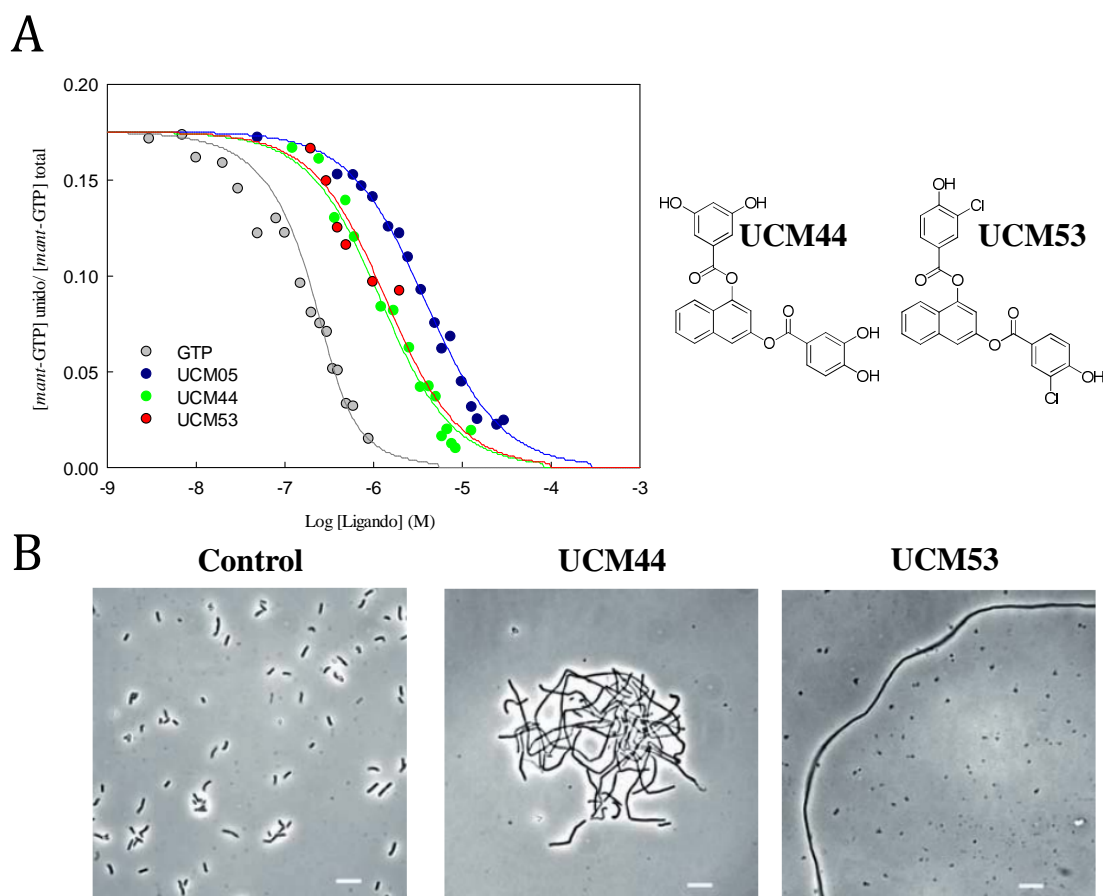


Figura 39. Validación experimental de UCM44 y UCM53. A) Curvas de desplazamiento de mant-GTP por los compuestos UCM44 y UCM53. Como control se representa la curva de desplazamiento del GTP (gris) y del compuesto UCM05 (azul). Además se representan las estructuras de UCM44 y UCM53. B) Células de la cepa *B. subtilis* 168 después de incubadas durante 2 h a 37°C con los compuestos UCM44 (12μM) y UCM53 (12μM) observadas por microscopía de contraste de fases. El control mostrado equivale al mismo experimento en ausencia de compuesto. La barra de escala equivale a 10 μm. Imagen tomada de Ruiz-Avila et al., 2013.

Los resultados de constante de disociación y efecto en bacterias de los nuevos compuestos determinados experimentalmente, se representan en la Tabla 3. Todas las modificaciones químicas mostradas tienen afinidad por el sitio de nucleótido de BsFtsZ y se ha conseguido mejorar en varios compuestos el efecto antibacteriano. El cambio del naftaleno por el grupo bifenilo aportó los mejores resultados de afinidad por FtsZ (con valores de constante de disociación (Kd) entre 0.4 y 0.8 μM) y en 6 casos, marcados en negrita en la Tabla 3, (variando el número de hidroxilos y el espaciador) se alcanzaron valores de MIC en BsFtsZ inferiores a 5 μM . Además 12 compuestos (señalados en rojo en la Tabla 3) presentan MIC inferior a 10 μM frente a la cepa de *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA). Los experimentos de microscopía de contraste de fases mostraron que de todos, el compuesto **28** es el que produce mayor filamentación de las células de la cepa *B. subtilis* 168, las cuales alcanzan longitudes hasta 10 veces mayor que el control sin compuesto (Figura 40).

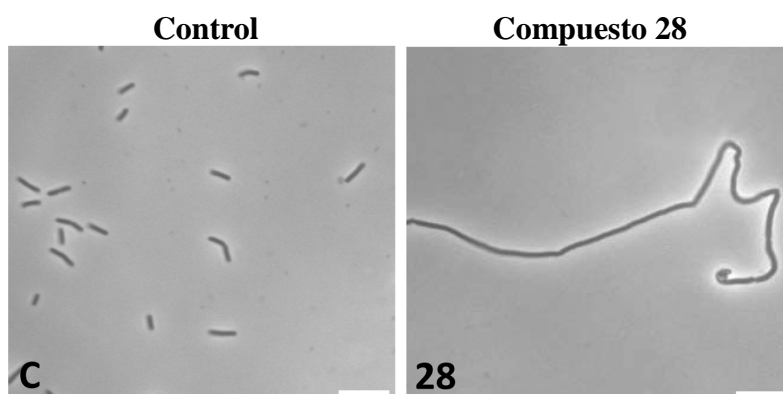


Figura 40. Validación experimental del compuesto 28. Células de la cepa *B. subtilis* 168 después de incubarlas durante 3 h a 37 °C con el compuesto **28** (4 μM) observadas por microscopía de contraste de fases. El control mostrado equivale al mismo experimento en ausencia de compuesto. La barra de escala equivale a 10 μm . Imagen tomada de Artola et al., 2014.

En resumen, a partir del cribado virtual de compuestos sintéticos se identificó al inhibidor de FtsZ, UCM05, sintetizado a partir de (-)-epigallocatequina-3-galato (EGCG) que es la principal catequina polifenólica presente en el té verde (Puig et al., 2008, Turrado et al., 2012). Durante los últimos años los compuestos polifenólicos han sido objeto de estudios por sus propiedades antimicrobianas sobre algunas especies del género *Achillea* (Benedec et al., 2013, Kotan et al., 2010, Kundakovic et al., 2005) y bacterias Gram-positivas como *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus* y *Listeria monocytogenes* (Jobim et al., 2014). Varios fenoles y polifenoles además han sido descritos como inhibidores de FtsZ, como el totarol,

curcumina, la viriditoxina, zantrinas 1 y 4, ácido caféico y ácido clorogénico (Schaffner-Barbero et al., 2012), aunque ensayos realizados por el grupo del Prof. J.M. Andreu no muestran afinidad específica de estos compuestos por el sitio de nucleótido de BsFtsZ (Ruiz-Avila, 2013).

Por último, del diseño racional de UCM05 resultaron varios compuestos con mayor afinidad por el sitio de unión y un aumento considerable de la actividad antibacteriana. El más prometedor es el compuesto **28**, que presenta el mayor efecto en la filamentación de células de *B. subtilis* como consecuencia directa de su interacción con FtsZ. Además se realizaron estudios de modelado molecular para predecir los posibles modos de unión de las distintas propuestas de síntesis, los más representativos son mostrados en el siguiente apartado.

4.6.1.3.2. Modelos estructurales de los complejos BsFtsZ-UCM44 y BsFtsZ-28

BsFtsZ-UCM44

Para estudiar el modo de unión del ligando UCM44 (con núcleo naftaleno) se realizó el “docking” del compuesto en el sitio de unión de nucleótido de BsFtsZ con el programa ICM (versión 3.6-1e), siguiendo el mismo protocolo empleado anteriormente para el GDP. Con las soluciones de mejor puntuación se realizaron simulaciones de DM de 200 ns con el programa GROMACS 4 (Van Der Spoel et al., 2005a, Hess et al., 2008a) para confirmar la estabilidad del ligando en el sitio (detalles en Materiales y Métodos).

La dinámica de los complejos mostró que al igual que el GDP, el ligando fluctúa en el sitio de nucleótido y se identificaron dos posibles modos de unión de los ligandos (Figura 41A). En el modo 1 (Figura 41 B y C), el anillo de naftaleno se une al bolsillo hidrofóbico entre las hélices H7, H5 y el bucle T5 y establece una interacción de tipo π - π con el anillo aromático de Phe-183. El brazo 1-poli-hidroxibenzoil interacciona con H7 formando un puente de hidrógeno estable con el Asp-187, mientras el otro brazo (3-poli-hidroxibenzoil) se inserta entre los bucles T4 y T1 estableciendo un puente de hidrógeno con Gly-110. Las dos zonas de unión de los extremos de UCM44 corresponden a la unión de la base del GDP y el sitio de unión de los fosfatos respectivamente (Figura 41C). La estructura del complejo superpuesta a la estructura del cristal de la proteína con GDP muestra que ambos ligandos comparten un importante número de interacciones con la proteína. En el modo 2 de unión Figura 41B, el ligando se coloca en el sentido inverso. Ahora el naftaleno se introduce más en

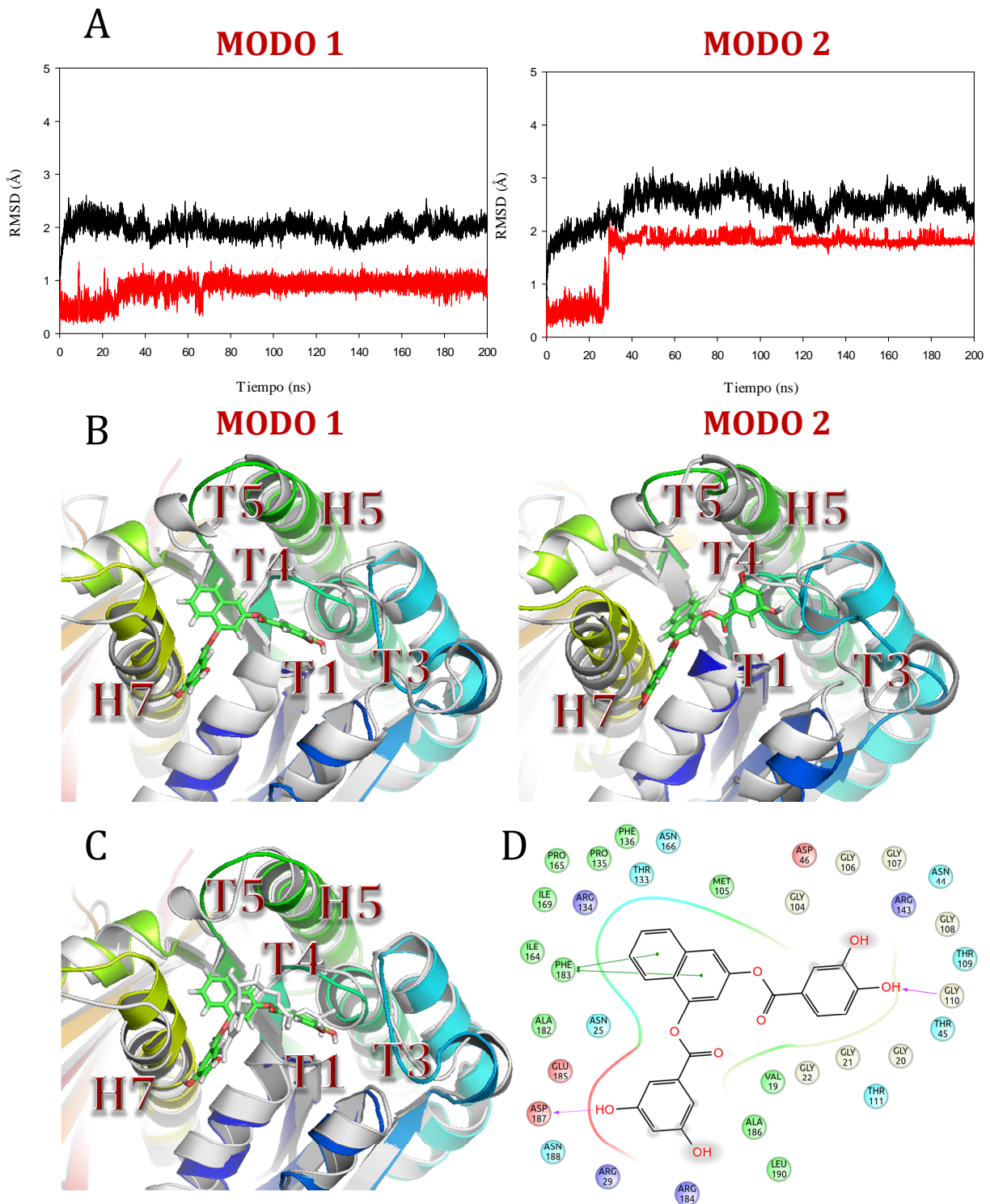


Figura 41: Modos de unión de UCM44 identificados por DM. A) RMSD durante los 200 ns de simulación de DM respecto a la estructura inicial. B) Estructuras representativas de los modos de unión extraídas de la simulación de DM de BsFtsZ-UCM44 superpuestas a la estructura del cristal de BsFtsZ (en gris). C) Estructura representativa del primer modo de unión superpuesta a la estructura del cristal de BsFtsZ con GDP unido (gris). D) Diagrama de interacción del ligando en el que se muestran los residuos del sitio de unión (residuos a distancias < 5 Å del ligando). Los aminoácidos están diferenciados en diferentes colores; hidrofóbicos (verde), glicinas (gris), polares (azul), cargados positivos (fucsia), cargados negativos (rojos). Las flechas representan puentes de hidrógenos y las líneas verdes corresponden a una interacción de tipo π - π .

el bolsillo formado entre H7, H5 y el bucle T5, manteniendo la interacción con Phe-183, el 3-poli-hidroxibenzoil establece un puente de hidrógeno con Asp-187 y el 1-poli-hidroxibenzoil queda más expuesto estableciendo interacciones con los bucles T1, T4 y T3. Los hidroxilos del brazo 1-poli-hidroxibenzoil forman puentes de hidrógenos menos estables con Arg-143 y Gly-72, mientras el oxígeno del grupo éster, establece un puente de hidrógeno estable con la Gly-22.

BsFtsZ-**28**

La consecuente optimización de la primera serie de compuestos UCMs (05, 44 y 53) condujo a ligandos con mayor afinidad por el sitio y actividad antibacteriana. Para continuar profundizando en la unión de estos nuevos compuestos con un núcleo bifénilo se seleccionó el **28** para realizar estudios de DM en el sitio de nucleótido. En este caso, a diferencia de UCM44, los experimentos de “docking” y DM se realizaron con el paquete de programas Maestro de Schrödinger, versión 9.9.013. Esta alternativa fue utilizada ya que en este momento del trabajo no contábamos con superordenadores para realizar los cálculos.

El “docking” del compuesto **28** con BsFtsZ (PDB: 2vxy) se realizó con el programa Glide (versión 6.3, Schrödinger, LLC, New York, 2014) (Friesner et al., 2006). La solución con mayor puntuación se empleó para simulaciones de DM de 40 ns usando Desmond (versión 3.8, D. E. Shaw Research, New York, NY, 2014) y el campo de fuerzas OPLS-2005 (Jorgensen et al., 1996, Kaminski et al., 2001) para confirmar la estabilidad del ligando.

El compuesto **28** se mantiene estable en el sitio de unión durante el tiempo de simulación (Figura 42A). En nuestro modelo el bifénilo se acomoda en el bolsillo hidrofóbico localizado entre las hélices H5 y H7 de forma similar al grupo naftaleno de UCM44. Uno de los anillos hidroxibenzoil interactúa con los bucles T1 y T3 ricos en glicinas y el otro anillo se posiciona entre las hélices H1 y H7 (Figura 42B). Las diferentes regiones de interacción coinciden con la localización del azúcar, fosfatos y el anillo de guanina del GDP respectivamente (Figura 42C), observadas tanto en la estructura del cristal como en nuestras simulaciones con GDP.

El modo de unión obtenido para el compuesto **28** en general está en correspondencia con los posibles modos de unión de UCM44, aunque la simulación de DM en este caso es de solo 40 ns (por 200 ns las de UCM44). En cualquier caso, el compuesto **28** está más expuesto al solvente, debido al mayor volumen estérico del grupo bifénilo en lugar del naftaleno. Al igual

que el naftaleno de UCM44, el bifenilo del compuesto **28** establece una interacción π - π con el anillo aromático de Phe-183 y el grupo hidroxilo de uno de los brazos forma un puente de hidrógeno estable con Asp-187 (Figura 42D). Ambas interacciones son cruciales para la unión del nucleótido. El otro brazo que interacciona con los bucles T1 y T3 está más expuesto al solvente. Recordar que en nuestras simulaciones con la proteína en la forma apo y con GDP hemos observado que el bucle T3 por sí mismo es muy flexible, esto podría afectar la interacción estable con el ligando.

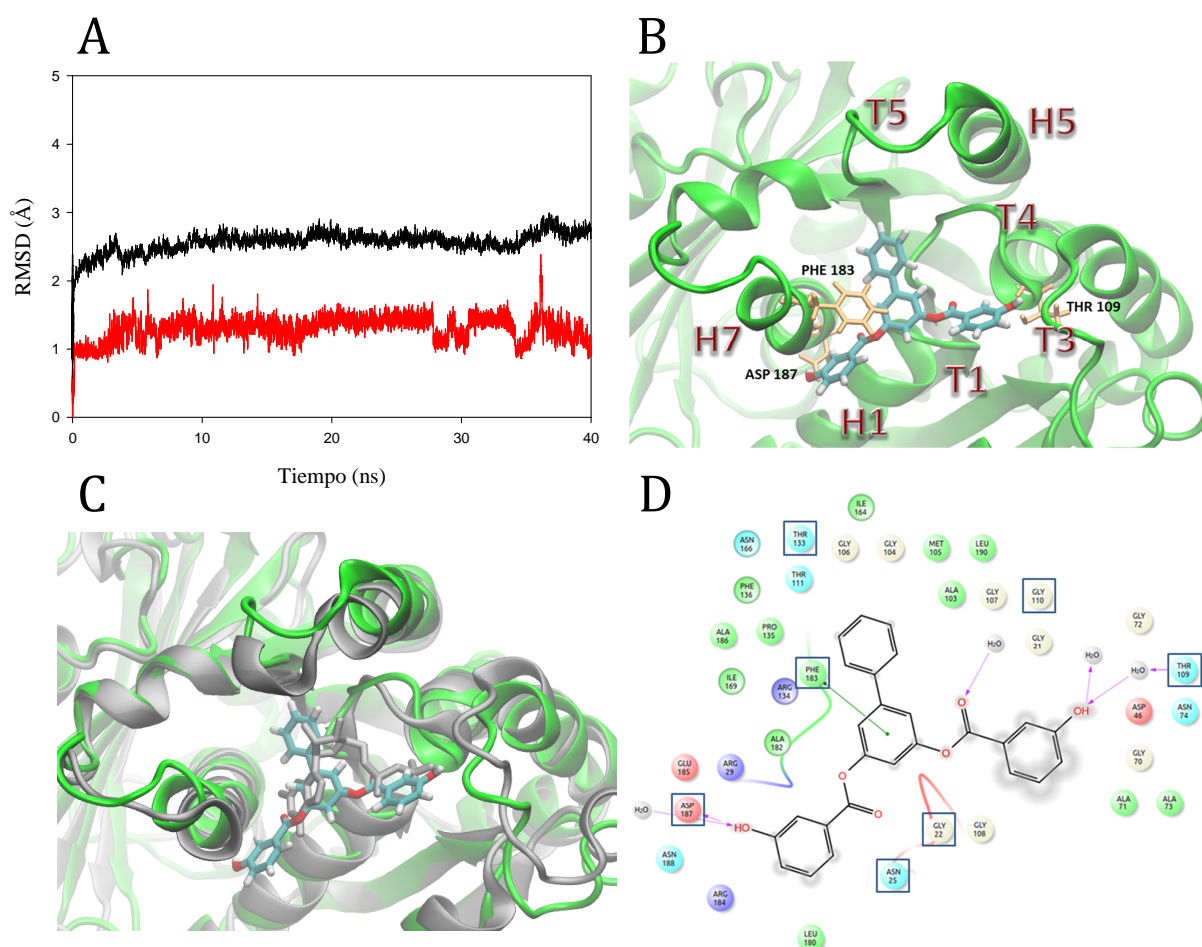


Figura 42. Modelo molecular del reconocimiento del compuesto **28 por el sitio de unión de nucleótido.** A) RMSD durante los 40 ns de simulación de DM para FtsZ (línea negra) y **28** (línea roja) respecto a la estructura inicial. B) Estructura representativa del modo de unión del compuesto **28** extraída de la simulación de DM del complejo mejor evaluado durante el “docking”. C) La estructura representativa del complejo superpuesta a la estructura del cristal de BsFtsZ con GDP unido (gris). D) Diagrama de interacción del ligando en el que se muestran los residuos del sitio de unión (véase pie de la Figura 41 para más información).

Es importante resaltar que aunque se han utilizado técnicas de simulación diferentes (Glide vs ICM, Desmond vs GROMACS) los resultados son bastante compatibles entre

UCM44 y el compuesto **28**. Las diferencias observadas se deben principalmente al mayor volumen del grupo bifenilo. En cualquier caso, ambos compuestos comparten interacciones con el GDP que nos proporcionan una explicación sencilla del mecanismo de inhibición de los UCMs por competición. Además nos brinda información sobre las principales interacciones y características del bolsillo de gran valor para la búsqueda de nuevos inhibidores de la división bacteriana en el sitio de nucleótido de FtsZ.

4.6.1.4. Ligandos procedentes del cribado virtual: VS18

Al igual que en el caso de los UCMs, se partió de un cribado virtual anterior en el sitio de nucleótido de 4 millones de compuestos procedentes de la librería de ligandos comerciales Zinc (Irwin and Shoichet, 2005) (Dr. P. Chacón 2010). El protocolo usado con el programa ICM versión 3.6-1e (Totrov and Abagyan, 1997) fue el mismo que para el cribado de la librería de compuestos sintéticos. Teniendo en cuenta la puntuación del cribado, las mejores predicciones de “drugabilidad” y solubilidad y la variabilidad de la estructura, se eligieron 42 compuestos que fueron probados experimentalmente en varias rondas en el grupo del Prof. J.M. Andreu realizadas por Claudia Schaffner Barbero (2010), Laura Ruiz y Albert Vergoños (2013). De todas estas rondas uno de los compuestos resultó positivo (Ruiz-Avila, 2013). Los ensayos de desplazamientos de la sonda fluorescente mant-GTP unida a BsFtsZ demuestran que el compuesto VS18 tiene afinidad por el sitio de unión ($K_d = 90.9 \mu\text{M}$) (Figura 43). Aunque el compuesto es capaz de unirse *in vitro* a BsFtsZ, los experimentos en células de *B. subtilis* 168 indican que carece de actividad antibacteriana (Ruiz-Avila et al., 2013).

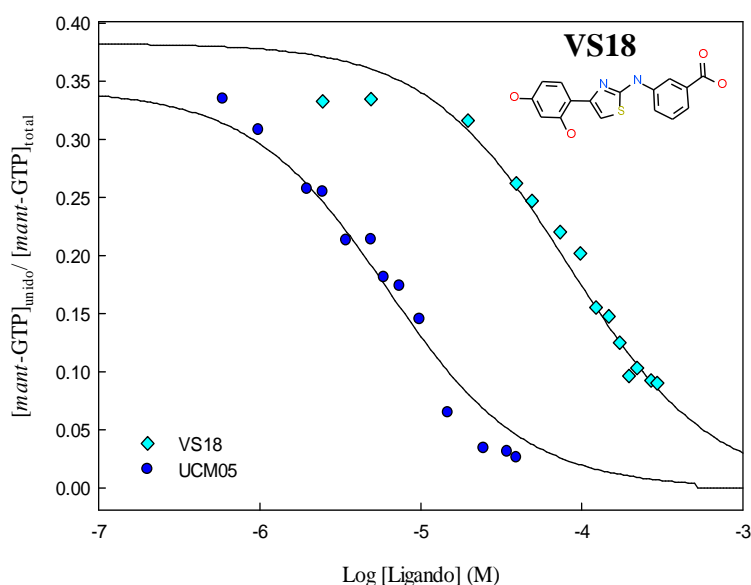


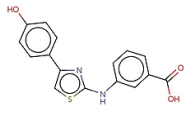
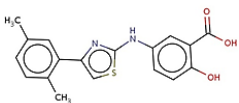
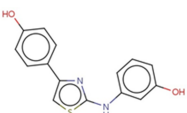
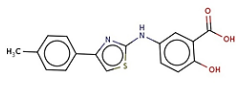
Figura 43. Curva de desplazamiento del mant-GTP por el compuesto VS18. Como control se representa la curva de desplazamiento del compuesto UCM05. Insertado en la figura se representa la estructura de VS18. Datos tomados de la tesis de Laura Ruiz, comunicación personal.

4.6.1.4.1. Búsqueda de nuevos ligandos basada en la estructura de VS18

A pesar de la baja afinidad de unión de VS18 por FtsZ y la carencia de actividad antibacteriana, el compuesto constituye un buen punto de partida para la búsqueda de candidatos con mayor afinidad y actividad antibacteriana. En este sentido se realizó una búsqueda basada en la estructura del ligando VS18 con compuestos comerciales accesibles en MolPort (<https://www.molport.com>) y Mcule (<https://mcule.com>). Los compuestos resultantes de la búsqueda además fueron cribados virtualmente en el sitio del receptor y los 10 con mayor puntuación fueron comprados (Tabla 4). Los ensayos de afinidad de unión y efecto en células bacterianas de estos ligandos han sido realizados por Albert Vergoños (Tesis doctoral, comunicación personal) en el lab. del Prof. J.M. Andreu. En estos estudios se ha encontrado que varios compuestos mejoran los valores de afinidad por el sitio de GTP respecto a VS18, en particular VS25 (sombreado en azul) presenta $K_d \approx 12.5 \mu\text{M}$. Experimentos de dispersión de luz de la proteína BsFtsZ ensamblada con GTP y un sistema de regeneración de GTP indican que el ligando VS25 afecta la polimerización de la proteína. Además en experimentos en células se observa que VS25 induce filamentación de la cepa *B. subtilis* 168 e inhibe el crecimiento bacteriano a concentraciones significativamente bajas ($\sim 100 \mu\text{M}$). La principal diferencia entre el compuesto primario VS18 y VS25 es la sustitución en uno de los anillos de benceno externo del grupo carbonilo por un hidroxilo, además pierde uno de los dos hidroxilos en el otro.

Tabla 4. Nuevos compuestos derivados de VS18.

Compuesto	Estructura	Compuesto	Estructura
VS21		VS26	
VS22		VS27	
VS23		VS28	

VS24		VS29	
VS25		VS30	

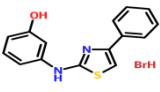
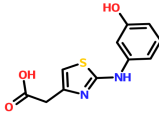
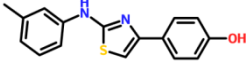
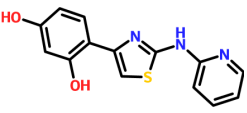
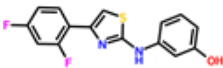
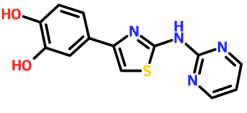
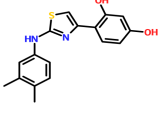
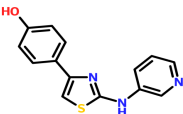
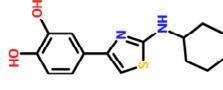
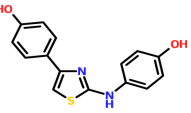
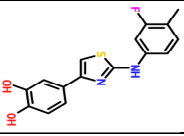
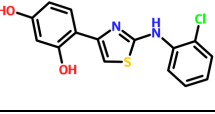
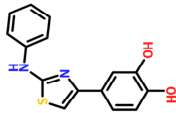
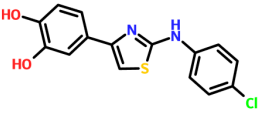
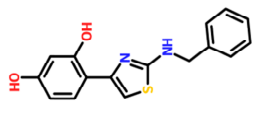
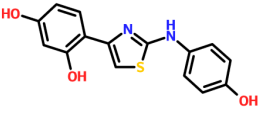
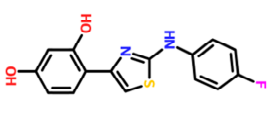
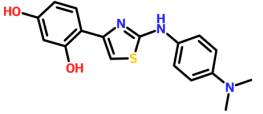
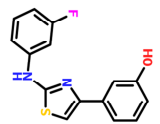
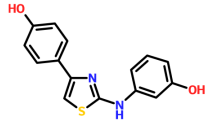
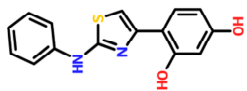
4.6.1.4.2. Búsqueda de derivados basada en la estructura de VS25

Dada la mejora de la afinidad y la actividad antibacteriana presentada por VS25, se consideró este compuesto para una nueva ronda de cribado basada en su estructura. Inicialmente identificamos en la base de datos de la compañía comercial MolPort, 90 compuestos con un valor mayor de 0.6 (máximo 1.0) de similitud con VS25. Con estos compuestos se realizó el cribado virtual y “docking” en el sitio de nucleótido y se eligieron los 21 compuestos con mayor puntuación (Tabla 5). Estos ligandos presentan variaciones respecto a VS25 pero mantienen la estructura central. Las pruebas experimentales realizadas por Albert Vergoños mostraron que excepto el VS44, todos los compuestos se unen al sitio de nucleótido de FtsZ, incluso algunos de ellos mejoran significativamente la afinidad de unión de VS18 y VS25. Además varios de estos nuevos compuestos mejoran la actividad antibacterianas frente a la cepa *B. subtilis* 168 respecto a VS25, como es el caso de VS32, VS33, VS34, VS35, VS36, VS39, VS40, VS47 y VS48, con valores de MIC entre 20-50 μM (sombreados en gris en la Tabla 5). Curiosamente algunos compuestos presentan un efecto significativo frente a la cepa multirresistente de *S. aureus* para concentraciones de 20 μM como son: VS33, VS36, VS48 y VS51. Para ver si los ligandos de la serie afectan la división celular se realizaron experimentos de microscopía de contraste de fases de la cepa *B. subtilis* 168 incubada con los compuestos. De todos ellos, VS33 con valores de $K_d = 6.7 \mu\text{M}$ y MIC [50 μM en *B. subtilis* y 20 μM en MRSA] (sombreado en azul en la Tabla 5) fue el que mostró un efecto más significativo en la filamentación de *B. subtilis* 168, produciendo una elongación de las bacterias cuatro veces mayor que la observada en el control.

En resumen, los resultados experimentales de los ligandos seleccionados del cribado virtual de la librería Zinc (Irwin and Shoichet, 2005) permitió identificar un compuesto (VS18) que se une al sitio de nucleótido de BsFtsZ pero que carece de actividad antibacteriana. La estructura de VS18 nos sirvió como punto de partida para la búsqueda de derivados en librerías comerciales, de los cuales 29 mejoran su afinidad por el sitio de unión,

validando el protocolo seguido. De ellos el compuesto más prometedor es el VS33, que reemplaza al nucleótido afectando la división celular bacteriana.

Tabla 5. Nuevos compuestos derivados de VS25.

Compuesto	Estructura	Compuesto	Estructura
VS31		VS42	
VS32		VS43	
VS33		VS44	
VS34		VS45	
VS35		VS46	
VS36		VS47	
VS37		VS48	
VS38		VS49	
VS39		VS50	
VS40		VS51	
VS41			

4.6.1.4.3 Simulaciones de DM de VS33

El modo de unión del compuesto VS33 se estudió por modelado molecular. Experimentos de “docking” y DM de VS33 en el sitio de nucleótido de BsFtsZ (PDB: 2vxy) se realizaron con el paquete de programas Maestro de Schrödinger, versión 9.9.013. El “docking” se ejecutó con el programa Glide (versión 6.3, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2014) (Friesner et al., 2006) y la solución con mayor puntuación fue empleada para simulaciones de DM de 50 ns usando Desmond (versión 3.8, D. E. Shaw Research, New York, NY, 2014) y el campo de fuerzas OPLS-2005 (Jorgensen et al., 1996, Kaminski et al., 2001), para confirmar la estabilidad del ligando (detalles en Materiales y Métodos).

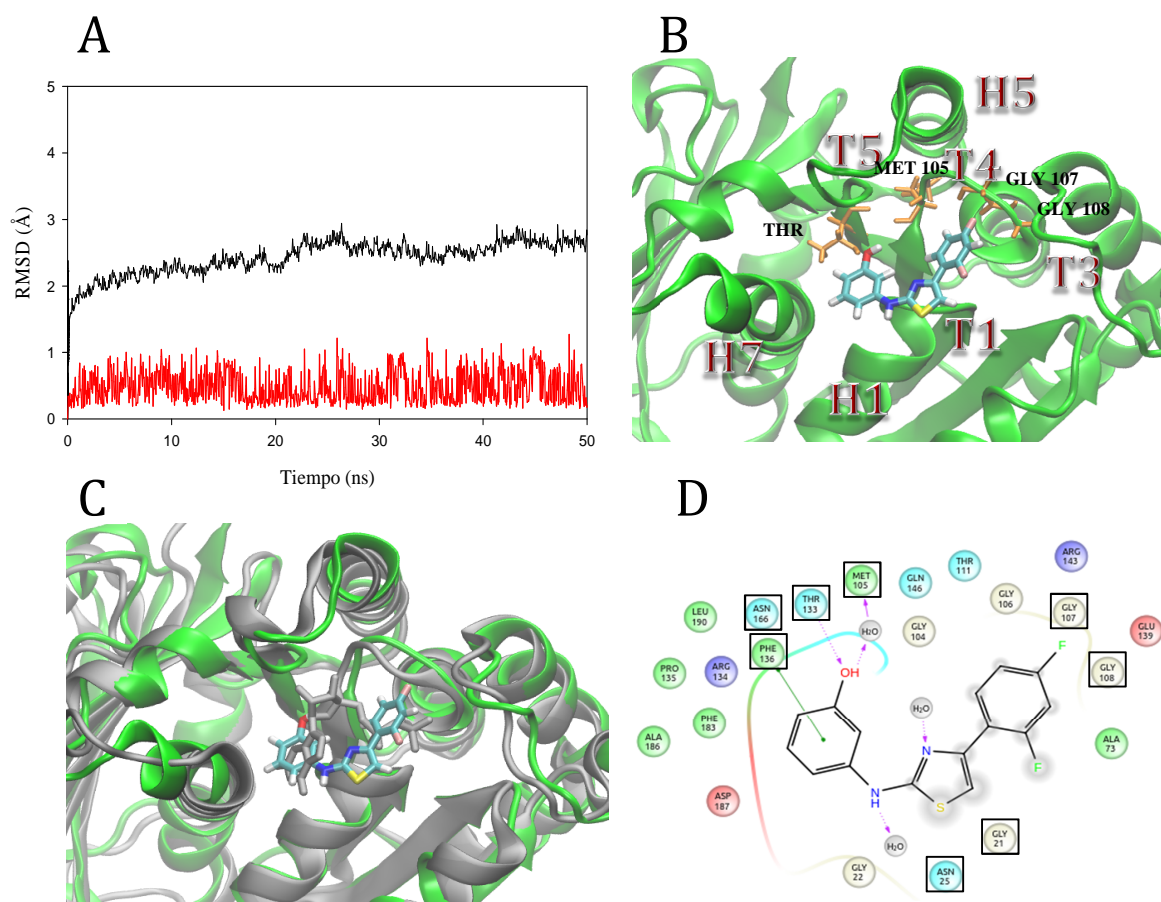


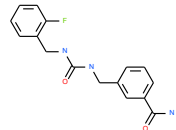
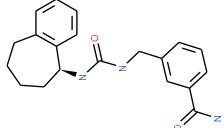
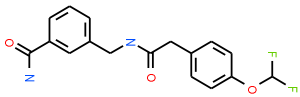
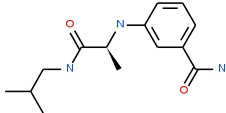
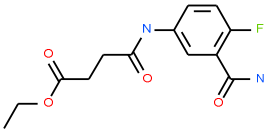
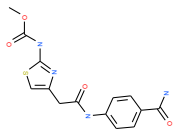
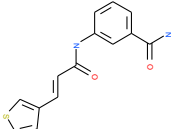
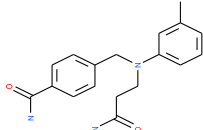
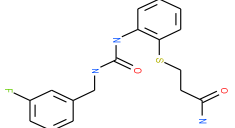
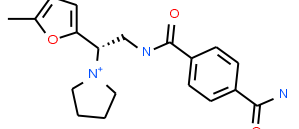
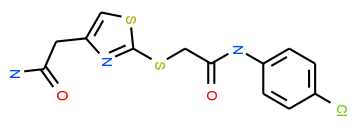
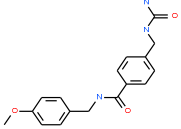
Figura 44: Modelo molecular del reconocimiento del compuesto VS33 por el sitio de unión de nucleótido. A) RMSD durante los 50 ns de simulación de DM para FtsZ (línea negra) y VS33 (línea roja) respecto a la estructura inicial. B) Estructura representativa del modo de unión de VS33 extraída de la simulación de DM del complejo mejor evaluado durante el “docking”. C) La estructura representativa del complejo superpuesta a la estructura del cristal de BsFtsZ con GDP unido (gris). D) Diagrama de interacción del ligando en el que se muestran los residuos del sitio de unión (véase pie de la Figura 41 para más información).

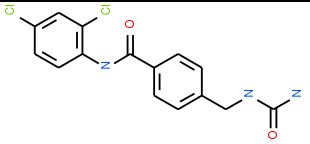
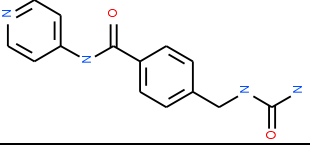
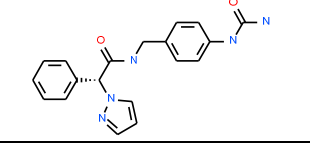
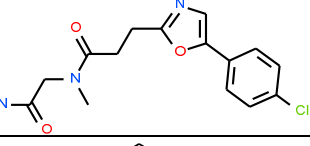
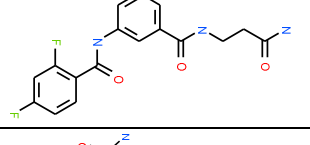
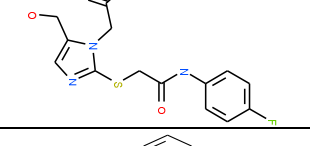
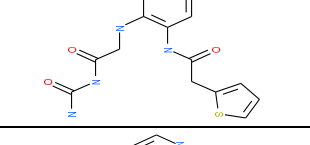
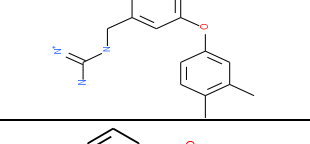
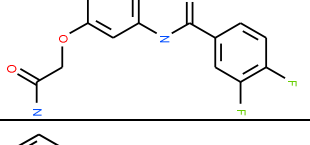
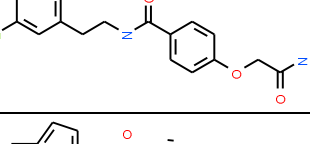
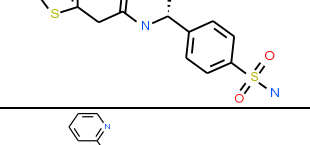
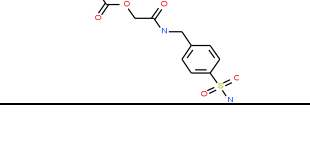
La DM del complejo con mayor puntuación muestra que el ligando se mantiene unido al sitio de nucleótido durante los 50 ns de simulación y presenta una fluctuación promedio menor de 1 Å (Figura 44A). En el modo de unión identificado el anillo fenólico de VS33 se inserta entre la hélice H7 y el bucle T5, y el difluorobenceno establece interacciones con el bucle T4 (Figura 44B). El aminotiazol queda más expuesto al solvente y no se han detectado interacciones estables con la proteína. El VS33 comparte regiones de interacción con el nucleótido, observadas por la superposición del complejo simulado con la estructura del cristal de BsFtsZ-GDP (PDB: 2rhl). El anillo fenólico se coloca en la posición de la base de guanina del GDP, mientras que el difluorobenceno superpone con los fosfatos (Figura 44C). Las principales interacciones que le confieren estabilidad al complejo son los puentes de hidrógenos formados entre el hidroxilo y los aminoácidos Thr-133 y Met-105 (Figura 44D). Una fuerte interacción π - π con el anillo aromático de Phe-136 también estabiliza el anillo fenólico, mientras que en el difluorobenceno, uno de los flúor interacciona con las Gly-107 y Gly-108 del bucle T4.

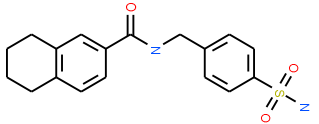
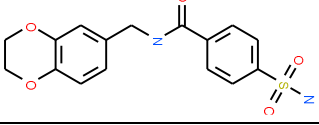
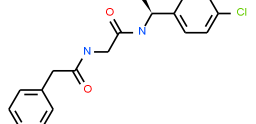
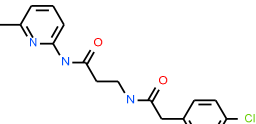
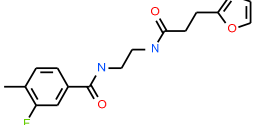
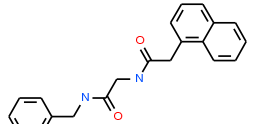
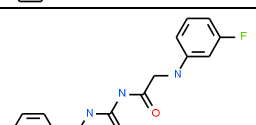
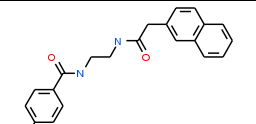
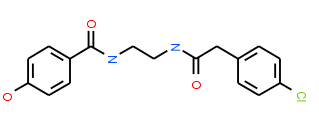
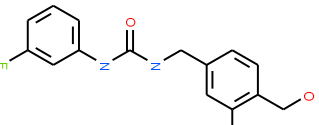
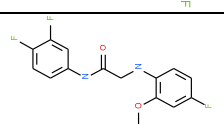
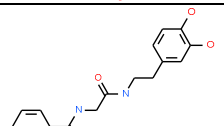
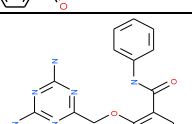
4.6.2. Cribado virtual en el sitio de PC

La búsqueda de nuevos inhibidores no solo fue dirigida al sitio de unión de nucleótido, sino que se expandió a la hendidura entre el dominio C-terminal y la hélice H7. En este caso se realizó un nuevo cribado virtual de los compuestos procedentes de la librería Zinc (Irwin and Shoichet, 2005) en el sitio de PC. Al igual que para el sitio de nucleótido se utilizó el programa ICM, versión 3.7-2c (Totrov and Abagyan, 1997). Dado que para realizar el cribado el interruptor molecular asociado a la polimerización debe estar en la conformación abierta, se utilizó la estructura 3vo8 de SaFtsZ (Matsui et al., 2012). Se empleó el protocolo 4D para simular la flexibilidad del sitio de unión, acoplando 7 conformaciones del monómero extraídas de una de las simulaciones de los filamentos de SaFtsZ con GDP, donde la hendidura fluctúa en la conformación abierta (véase Materiales y Métodos). Posterior al cribado de 4 millones de compuestos se realizó un filtrado teniendo en cuenta la predicción de diferentes características químicas (drugabilidad y solubilidad) y un agrupamiento por la similitud estructural de los compuestos (*clustering*). Aunque todos los ligandos con mayor puntuación del cribado tenían estructuras parecidas al PC (base benzamida) nos centramos en la selección de estructuras distintas al inhibidor con menor puntuación. De esta forma se eligieron 45 compuestos (solo 7 contienen el grupo benzamida) (Tabla 6) para determinar experimentalmente si alguno presenta afinidad por el sitio de unión.

Tabla 6. Compuestos procedentes del cribado virtual del sitio de PC.

Comps.	Estructura	Punt. ^a	Drug. ^b	molLogP ^c	molLogS ^c	Sol. ^d (μM)
VSE1		-45.33	0.33	2.07	-4.23	≥ 150
VSE2		-39.52	1.47	3.33	-4.49	15
VSE3		-46.14	0.47	2.31	-3.90	≥ 150
VSE4		-40.60	0.30	1.44	-3.33	60
VSE5		-38.72	0.12	0.89	-3.15	≥ 150
VSE6		-39.23	1.06	1.00	-3.53	≥ 150
VSE7		-44.15	0.09	2.21	-4.52	≥ 150
VSE8		-32.57	0.02	1.98	-4.86	≥ 150
VSE9		-41.15	0.27	2.73	-4.59	≥ 150
VSE10		-35.78	1.50	1.06	-4.89	≥ 150
VSE11		-37.04	1.57	2.04	-4.69	≥ 150
VSE12		-40.89	0.01	2.01	-3.90	≥ 150

VSE13		-44.22	0.78	3.26	-5.39	≥ 150
VSE14		-38.05	1.44	0.91	-3.25	≥ 150
VSE15		-39.40	0.95	1.54	-4.25	140
VSE16		-35.99	1.17	1.47	-3.55	140
VSE17		-31.51	0.65	1.58	-4.27	≥ 150
VSE18		-34.88	1.48	0.06	-2.26	≥ 150
VSE19		-39.90	0.36	0.64	-3.65	≥ 150
VSE20		-33.10	0.65	2.14	-4.41	-
VSE21		-40.75	0.60	2.06	-4.32	40
VSE22		-32.63	0.70	2.16	-3.66	≥ 150
VSE23		-41.35	0.34	1.95	-3.48	100
VSE24		-44.16	0.48	0.51	-2.93	≥ 120

VSE25		-23.98	0.89	2.93	-5.47	100
VSE26		-33.14	0.20	1.52	-4.36	≥ 150
VSE27		-35.05	1.01	3.61	-4.94	20
VSE28		-33.90	0.67	2.62	-3.39	140
VSE29		-32.57	0.04	2.18	-3.30	140
VSE30		-32.83	-0.23	3.31	-5.04	140
VSE31		-32.12	-0.79	2.39	-4.60	20
VSE32		-33.24	0.79	3.22	-4.11	≥ 150
VSE33		-32.59	1.07	2.49	-3.11	≥ 150
VSE34		-31.80	-0.20	2.86	-3.91	≥ 150
VSE35		-30.89	-0.24	2.53	-4.49	140
VSE36		-35.54	1.11	1.55	-3.19	≥ 150
VSE37		-38.73	1.13	2.10	-4.18	70

VSE38		-32.87	0.51	1.44	-2.99	≥ 150
VSE39		-33.28	0.49	2.73	-3.63	≥ 150
VSE40		-34.15	0.47	3.36	-4.36	140
VSE41		-32.92	0.29	1.73	-3.57	≥ 150
VSE42		-39.71	0.91	1.87	-4.81	20
VSE43		-33.07	0.02	1.20	-4.37	40
VSE44		-32.62	0.36	2.39	-3.99	100
VSE45		-34.43	-0.31	2.76	-5.19	60

^a Valores de puntuación obtenidos con ICM (detalles en Materiales y Métodos). ^b Predicción de la “drugabilidad” con ICM. ^c Valores de predicción de molLogP y molLogS relacionados con la solubilidad. ^d Solubilidad experimental en tampón hepes.

Previamente a los ensayos de afinidad medimos la solubilidad en el tampón hepes de cada compuesto, cuyos valores son representados en la Tabla 6 (detalles en Materiales y Métodos). En este caso todos los ensayos funcionales fueron realizados por mí. Los ensayos de unión, a través de los cambios de anisotropía generados por el desplazamiento de la sonda fluorescente DFMBBA-NBD (ensayo puesto a punto en el lab. del Prof. J.M. Andreu) nos indica que los compuestos VSE1, VSE3, VSE15, VSE22 y VSE40 presentan una afinidad de unión muy baja por la hendidura ($K_b \sim 10^3 \text{ M}^{-1}$) (Figura 45). Sorprendentemente los compuestos VSE2, VSE4, VSE5, VSE6 y VSE7, que también presentan el grupo benzamida no desplazaron al compuesto fluorescente.

Para comprobar si alguno de los 5 compuestos de muy baja afinidad afecta la división celular de las bacterias a través de su unión a FtsZ se incubaron diferentes concentraciones durante 3 horas en células de *B. subtilis* 168 y se observaron por microscopía de contraste de fases. Únicamente el derivado de 3-metoxibenzamida VSE3 parece tener un pequeño efecto en la división de las bacterias a concentraciones superiores a 1.5 mM, produciendo el alargamiento de las células respecto al control sin compuesto (Figura 46A). Aunque no se observa una gran filamentación, más del 85% de las células presentan filamentos mayores que los observados en el control. Además se realizaron ensayos con la cepa *B. subtilis* Su570 (Strauss et al., 2012), que contiene como única FtsZ la quimera fluorescente FtsZ::GFP, para visualizar el anillo Z (detalles en Materiales y Métodos) y determinar cualquier efecto de los compuestos en la formación y localización del anillo. En estos experimentos se observó que concentraciones de 1.5 mM de VSE3 induce cierta deslocalización de FtsZ y una formación incompleta de los anillos respecto al control sin compuesto (Figura 46B), evitando la correcta división celular de las bacterias.

En resumen, de los 45 compuestos seleccionados del cribado virtual solamente el derivado de 3-metoxibenzamida VSE3 causa filamentación en la cepa *B. subtilis* 168 a concentraciones relativamente altas (1.5 mM). Ninguno de los compuestos con estructura totalmente diferente al PC mostró efecto en células a las concentraciones probadas que era nuestro objetivo inicial. En un futuro, podríamos centrarnos en la búsqueda de compuestos diferentes modificando el protocolo, o bien, renunciado a nuestro objetivo inicial, centrarnos en los compuestos derivados del PC que habíamos descartado en el cribado. En este contexto la utilización de técnicas de cribado virtual basadas en la estructuras de ligandos conocidos (farmacóforo) podría ser una alternativa interesante.

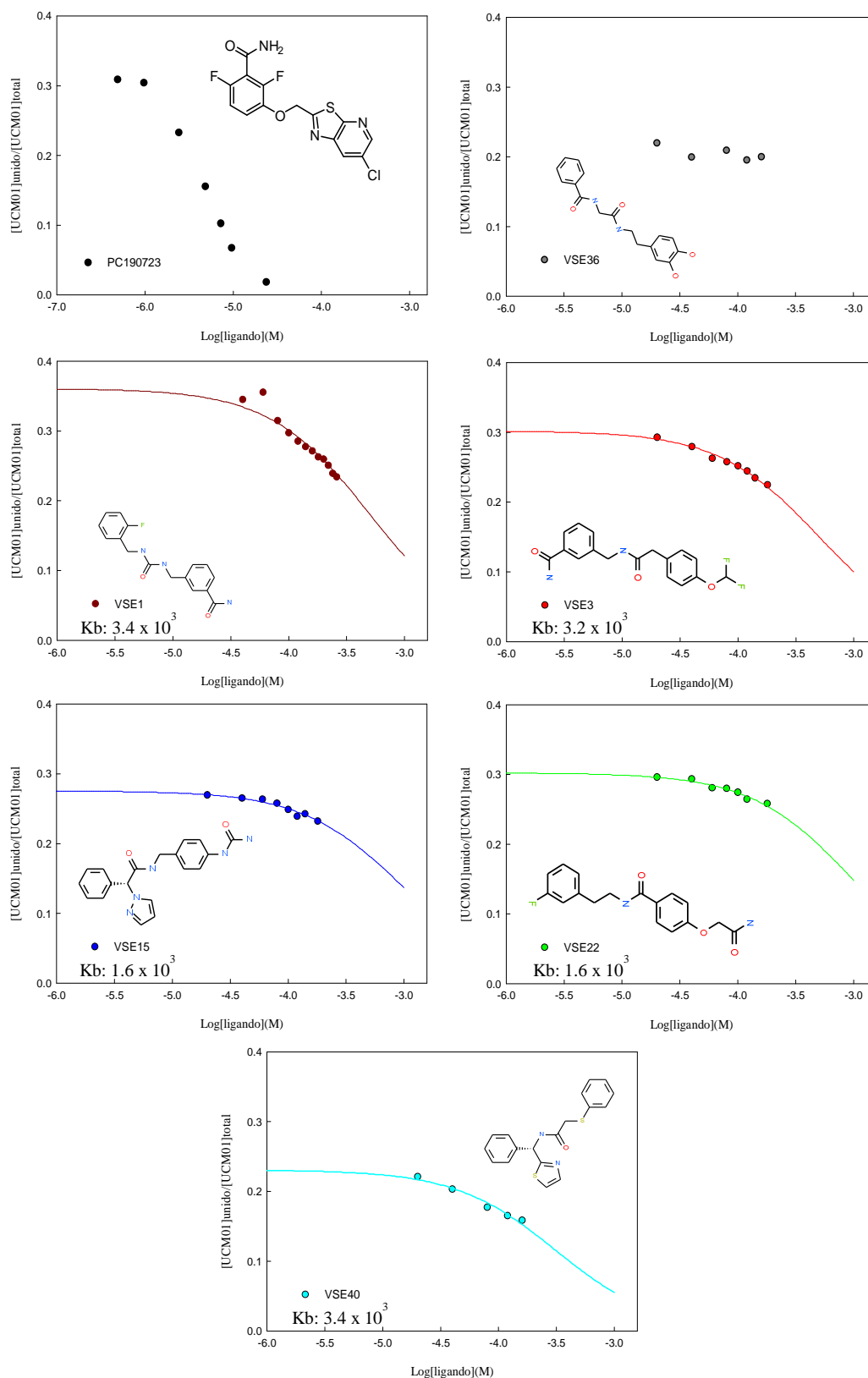


Figura 45. Curvas de desplazamientos de los compuesto VSE1, VSE3, VSE15, VSE22 y VSE40. En la parte superior del panel se representan los desplazamientos del PC y el VSE36 como controles positivos y negativos respectivamente.

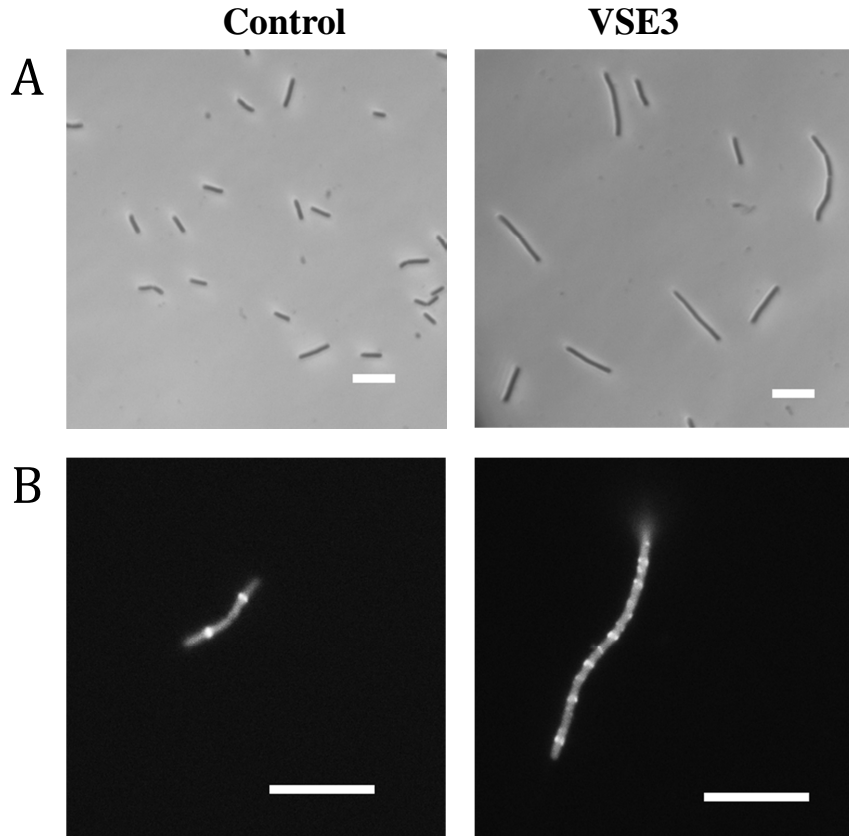


Figura 46. Efecto *in vivo* de VSE3. A) Imágenes de microscopía de contraste de fases de células *B. subtilis* 168 incubadas durante 3 horas a 37°C con VSE3 (1.5 mM). El control mostrado equivale al mismo experimento en ausencia de compuesto. B) Imágenes de microscopía de fluorescencia de células de *B. subtilis* SU570 incubadas durante 2 hora a 30°C con VSE3 (1.5 mM) donde se observa la localización de FtsZ-GFP. Las barras de escala equivalen a 10 μm .

5. Conclusiones

5. Conclusiones

Los resultados obtenidos en este trabajo nos han permitido llegar a las siguientes conclusiones:

1. Dinámica de los filamentos de SaFtsZ dependiente de nucleótido.

- 1.1. Los contactos entre monómeros son los principales responsables de la curvatura intrínseca y estabilidad de los filamentos y dependen del nucleótido.
 - 1.1.1. Los filamentos con GDP unido fluctúan entre varias conformaciones curvadas, formando una distribución heterogénea de interfaces abiertas y cerradas. La pérdida de contactos del bucle T7 con el monómero inferior en los filamentos con GDP lleva a interfaces abiertas más inestables, que en principio deben ser más propensas a la despolimerización.
 - 1.1.2. Los filamentos con GTP unido son menos flexibles y se curvan en una orientación preferencial, encerrando al nucleótido. El Mg^{2+} contribuye significativamente a la unión entre monómeros sirviendo de conexión entre el bucle T7 de la subunidad de arriba con la subunidad de abajo y estabilizando el GTP en una conformación idónea para la hidrólisis. En estos filamentos el componente torsional es significativo.
- 1.2. Los cambios conformacionales en los monómeros dentro de los filamentos de GTP y GDP son muy similares. Las diferencias dinámicas observadas entre los filamentos se deben fundamentalmente a un movimiento de bisagra de cuerpos rígidos entre monómeros.
- 1.3. Independientemente de la unión de GTP o GDP los polímeros de FtsZ tienen una zona de anclaje común que incluye los contactos de la hélice H10 del monómero superior con los bucles T5 y H6-H7 del monómero inferior. La flexibilidad intrínseca del bucle H6-H7 y del extremo superior de la hélice H7 facilita la complementariedad entre subunidades contiguas y puede ayudar a transmitir el cambio conformacional a través de H7 a lo largo del filamento.

- 1.4. El antibiótico PC induce alostéricamente el cierre de las interfaces entre monómeros de forma similar a los filamentos con GTP, pero en una dirección ligeramente diferente. La presencia del antibiótico estabiliza los contactos entre el bucle T7 del monómero superior y las hélices H1 y H2 del monómero inferior e impide los contactos observados en los filamentos de GTP y GDP con la hélice H5.
- 1.5. Los iones de Ca^{2+} presentes en la estructura del cristal de SaFtsZ juegan un papel secundario en la estabilidad. Aunque estabilizan los filamentos con GDP no son estables en las simulaciones con monómeros.

2. Estudio del interruptor molecular.

- 2.1. Nuestras simulaciones de DM corroboran la existencia del interruptor molecular monitorizándose por primera vez su transición de abierto a cerrado. La hendidura entre H7 y el dominio C-terminal, que se encuentra en una conformación abierta en la estructura cristalográfica de SaFtsZ se cierra en los monómeros aislados y en el monómero del extremo (-) del filamento,
- 2.2. Se ha colaborado en el diseño de la sonda fluorescente DFMBA-NBD cuya variación de anisotropía está ligada a la polimerización de FtsZ.
 - 2.2.1. El grupo benzamida de la sonda fluorescente comparte las mismas interacciones con el bucle T7 y la lámina β S8 observadas en la estructura atómica del complejo SaFtsZ-PC y en las simulaciones de DM. La parte fluorescente queda parcialmente expuesta, no reemplazando el heterociclo del PC.
 - 2.2.2. Esta sonda ha permitido el desarrollo de un ensayo fluorescente para detectar y caracterizar la unión de compuestos que se unen específicamente en el sitio de PC.
- 2.3. La unión de la sonda únicamente a la forma ensamblada de FtsZ (hendidura abierta) corrobora experimentalmente el mecanismo estructural propuesto para el interruptor de ensamblaje de FtsZ.
- 2.4. Se propone un modelo que integra el interruptor molecular con la dinámica de los

filamentos dependiente de nucleótido para explicar el ciclo de ensamblaje/desensamblaje de FtsZ. Durante este proceso dinámico se asocian dos movimientos de bisagra que modulan la dinámica y estabilidad de los filamentos, uno localizado en la interfaz entre monómeros y otro en la hendidura entre dominios.

3. Estudio de polímeros de FtsZ mediante SAXS y criomicroscopía electrónica.

3.1. Los polímeros de la proteína nativa BsFtsZ en solución forman agrupaciones de 3 o más protofilamentos de longitud y de curvatura variable, con un espaciado lateral de ~ 70 Å; mientras los polímeros de la proteína truncada BsFtsZ- Δ Ct forman agrupaciones de 2 o más protofilamentos rectos que están en contacto directo entre ellos. El espaciado de 7 nm es compatible con una interacción entre protofilamentos a través de la cola flexible C-terminal.

4. Búsqueda de nuevos inhibidores

4.1. Se han identificado distintas cabezas de serie para el sitio de unión del nucleótido pero ninguno de los compuestos probados en el sitio de unión del PC con estructuras diferentes a este mostraron efecto en células. En el sitio de unión del nucleótido:

4.1.1. El cribado virtual de la librería de ligandos comerciales Zinc permitió identificar un compuesto (VS18) que se une específicamente y afecta la polimerización ($K_d = 90.9 \mu\text{M}$) pero no presenta actividad antibacteriana. La búsqueda de derivados en librerías comerciales partiendo de este compuesto permitió encontrar 29 ligandos que mejoran su afinidad por el sitio de unión. El compuesto más prometedor es el VS33, con valores de $K_d = 6.7 \mu\text{M}$ y MIC [50 μM en *B. subtilis* y 20 μM en MRSA].

4.1.2. El cribado virtual y “docking” de ligandos procedentes de una pequeña librería sintética nos permitió identificar al compuesto UCM05 como cabeza de serie ($K_d = 2.3 \mu\text{M}$ y MIC = 100 μM en *B. subtilis*). A través de la optimización de este compuesto se identificaron nuevos inhibidores (UCM44, UCM53, compuesto **28**) que tienen mayor afinidad de unión por el sitio de nucleótido de FtsZ y mejor actividad antibacteriana. El compuesto **28** presenta una $K_d = 0.5$

μM y MIC [5 μM en *B. subtilis* y 7 μM en MRSA].

4.2. Mediante “docking” y DM se han caracterizado los modos de unión de estos ligandos.

4.2.1. VS33: Este compuesto es estable en el sitio de nucleótido y comparte regiones de interacción con el GDP; el anillo fenólico se inserta entre la hélice H7 y el bucle T5 coincidiendo con la base de guanina, mientras el difluorobenceno establece interacciones con el bucle T4, superponiendo con la región de los fosfatos.

4.2.2. UCMs: Los compuestos UCM44 y **28** interactúan con el sitio de GTP. El núcleo central de estos inhibidores se acomoda en el bolsillo hidrofóbico localizado entre las hélices H5 y H7, estableciendo una interacción π - π con el anillo aromático de Phe-183. Uno de los brazos forma un puente de hidrógeno estable con Asp-187 mientras el otro brazo interactúa con las glicinas de los bucles T1, T3 y T4. Estas interacciones son cruciales para la unión del nucleótido. Los resultados obtenidos nos proporcionan una explicación sencilla del mecanismo de inhibición de los UCMs por competición.

6. Bibliografía

6. Bibliografía

- ABAD, A., LOPEZ-PEREZ, J. L., DEL OLMO, E., GARCIA-FERNANDEZ, L. F., FRANCESCH, A., TRIGILI, C., BARASOAIN, I., ANDREU, J. M., DIAZ, J. F. & SAN FELICIANO, A. 2012. Synthesis and antimitotic and tubulin interaction profiles of novel pinacol derivatives of podophyllotoxins. *J Med Chem*, 55, 6724-37.
- ABAGYAN, R. & TOTROV, M. 1994. Biased probability Monte Carlo conformational searches and electrostatic calculations for peptides and proteins. *J Mol Biol*, 235, 983-1002.
- ACI-SECHE, S., ZIADA, S., BRAKA, A., ARORA, R. & BONNET, P. 2016. Advanced molecular dynamics simulation methods for kinase drug discovery. *Future Med Chem*, 8, 545-66.
- ADDINALL, S. G. & LUTKENHAUS, J. 1996. FtsA is localized to the septum in an FtsZ-dependent manner. *J Bacteriol*, 178, 7167-72.
- AGRESTI, J. J., ANTIPOV, E., ABATE, A. R., AHN, K., ROWAT, A. C., BARET, J. C., MARQUEZ, M., KLIBANOV, A. M., GRIFFITHS, A. D. & WEITZ, D. A. 2010. Ultrahigh-throughput screening in drop-based microfluidics for directed evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 4004-9.
- ALLARD, J. F. & CYTRYNBAUM, E. N. 2009. Force generation by a dynamic Z-ring in *Escherichia coli* cell division. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 145-50.
- ALUSHIN, G. M., LANDER, G. C., KELLOGG, E. H., ZHANG, R., BAKER, D. & NOGALES, E. 2014. High-resolution microtubule structures reveal the structural transitions in alpha-tubulin upon GTP hydrolysis. *Cell*, 157, 1117-29.
- ALVAREZ, J. C. 2004. High-throughput docking as a source of novel drug leads. *Curr Opin Chem Biol*, 8, 365-370.
- ANDERSEN, H. C. 1983. Rattle - a Velocity Version of the Shake Algorithm for Molecular-Dynamics Calculations. *Journal of Computational Physics*, 52, 24-34.
- ANDERSON, D. E., GUEIROS-FILHO, F. J. & ERICKSON, H. P. 2004. Assembly dynamics of FtsZ rings in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* and effects of FtsZ-regulating proteins. *J Bacteriol*, 186, 5775-81.
- ANDREU, J. M., SCHAFFNER-BARBERO, C., HUECAS, S., ALONSO, D., LOPEZ-RODRIGUEZ, M. L., RUIZ-AVILA, L. B., NUNEZ-RAMIREZ, R., LLORCA, O. & MARTIN-GALIANO, A. J. 2010. The antibacterial cell division inhibitor PC190723 is an FtsZ polymer-stabilizing agent that induces filament assembly and condensation. *J Biol Chem*, 285, 14239-46.
- ARTOLA, M., RUIZ-AVILA, L. B., RAMIREZ-APORTELA, E., MARTINEZ, R. F., ARAUJO-BAZAN, L., VAZQUEZ-VILLA, H., MARTIN-FONTECHA, M., OLIVA, M. A., MARTIN-GALIANO, A. J., CHACON, P., LOPEZ-RODRIGUEZ, M. L., ANDREU, J. M. & HUECAS, S. 2016. The structural assembly switch of cell division protein FtsZ probed with fluorescent allosteric inhibitors. *Chemical Science*.
- ARTOLA, M., RUIZ-AVILA, L. B., VERGONOS, A., HUECAS, S., ARAUJO-BAZAN, L., MARTIN-FONTECHA, M., VAZQUEZ-VILLA, H., TURRADO, C., RAMIREZ-APORTELA, E., HOEGL, A., NODWELL, M., BARASOAIN, I., CHACON, P., SIEBER, S. A., ANDREU, J. M. & LOPEZ-RODRIGUEZ, M. L. 2014. Effective GTP-Replacing FtsZ Inhibitors and Antibacterial Mechanism of Action. *ACS Chem Biol*.
- BAJORATH, J. 2002. Integration of virtual and high-throughput screening. *Nat Rev Drug Discov*, 1, 882-94.
- BAJUSZ, D., RACZ, A. & HEBERGER, K. 2015. Why is Tanimoto index an appropriate choice for fingerprint-based similarity calculations? *Journal of Cheminformatics*, 7.
- BEECH, P. L., NHEU, T., SCHULTZ, T., HERBERT, S., LITHGOW, T., GILSON, P. R. & MCFADDEN, G. I. 2000. Mitochondrial FtsZ in a chromophyte alga. *Science*, 287, 1276-9.
- BENEDEC, D., VLASE, L., ONIGA, I., MOT, A. C., DAMIAN, G., HANGANU, D., DUMA, M. & SILAGHI-DUMITRESCU, R. 2013. Polyphenolic composition, antioxidant and antibacterial activities for two Romanian subspecies of *Achillea distans* Waldst. et Kit. ex Willd. *Molecules*, 18, 8725-39.
- BERENDSEN, H. J. C., GRIGERA, J. R. & STRAATSMA, T. P. 1987. The Missing Term in Effective Pair Potentials. *Journal of Physical Chemistry*, 91, 6269-6271.
- BERENDSEN, H. J. C., POSTMA, J. P. M., VANGUNSTEREN, W. F., DINOLA, A. & HAAK, J. R. 1984. Molecular-Dynamics with Coupling to an External Bath. *Journal of Chemical Physics*, 81, 3684-3690.
- BERMUDEZ, M., MORTIER, J., RAKERS, C., SYDOW, D. & WOLBER, G. 2016. More than a look into a crystal ball: protein structure elucidation guided by molecular dynamics simulations. *Drug Discovery Today*.
- BI, E. F. & LUTKENHAUS, J. 1991. FtsZ ring structure associated with division in *Escherichia coli*. *Nature*, 354, 161-4.
- BIZZARRI, A. R. & CANNISTRARO, S. 2002. Molecular dynamics of water at the protein-solvent interface. *Journal of Physical Chemistry B*, 106, 6617-6633.

- BOLDON, L., LALIBERTE, F. & LIU, L. 2015. Review of the fundamental theories behind small angle X-ray scattering, molecular dynamics simulations, and relevant integrated application. *Nano Rev*, 6, 25661.
- BOTTEGONI, G., KUFAREVA, I., TOTROV, M. & ABAGYAN, R. 2009. Four-dimensional docking: a fast and accurate account of discrete receptor flexibility in ligand docking. *J Med Chem*, 52, 397-406.
- BOWERS, K. J., CHOW, E., XU, H., DROR, R. O., EASTWOOD, M. P., GREGERSEN, B. A., KLEPEIS, J. I., KOLOSSVARY, I., MORAES, M. A., SACERDOTI, F. A., SALMON, J. K., SHAN, Y. & SHAW, D. E. 2006. Scalable algorithms for molecular dynamics simulations on commodity cluster. *Proceeding of the ACM/IEEE Conference on Supercomputing (SC06)*. Tampa, Florida.
- BROOKS, B. R., BROOKS, C. L., MACKERELL, A. D., NILSSON, L., PETRELLA, R. J., ROUX, B., WON, Y., ARCHONTIS, G., BARTELS, C., BORESCH, S., CAFLISCH, A., CAVES, L., CUI, Q., DINNER, A. R., FEIG, M., FISCHER, S., GAO, J., HODOSCEK, M., IM, W., KUCZERA, K., LAZARIDIS, T., MA, J., OVCHINNIKOV, V., PACI, E., PASTOR, R. W., POST, C. B., PU, J. Z., SCHAEFER, M., TIDOR, B., VENABLE, R. M., WOODCOCK, H. L., WU, X., YANG, W., YORK, D. M. & KARPLUS, M. 2009. CHARMM: The Biomolecular Simulation Program. *J Comput Chem*, 30, 1545-1614.
- BROOKS, B. R., BRUCCOLERI, R. E., OLAFSON, B. D., STATES, D. J., SWAMINATHAN, S. & KARPLUS, M. 1983. Charmm - a Program for Macromolecular Energy, Minimization, and Dynamics Calculations. *J Comput Chem*, 4, 187-217.
- BUEY, R. M., DIAZ, J. F. & ANDREU, J. M. 2006. The nucleotide switch of tubulin and microtubule assembly: a polymerization-driven structural change. *Biochemistry*, 45, 5933-8.
- BURNS, J. 2014. Do health plans have a role in limiting antibiotic resistance? *Manag Care*, 23, 26-30, 32-3.
- BUSKE, P. J. & LEVIN, P. A. 2012. Extreme C terminus of bacterial cytoskeletal protein FtsZ plays fundamental role in assembly independent of modulatory proteins. *J Biol Chem*, 287, 10945-57.
- BUSKE, P. J. & LEVIN, P. A. 2013. A flexible C-terminal linker is required for proper FtsZ assembly in vitro and cytokinetic ring formation in vivo. *Mol Microbiol*, 89, 249-63.
- BUSKE, P. J., MITTAL, A., PAPPU, R. V. & LEVIN, P. A. 2015. An intrinsically disordered linker plays a critical role in bacterial cell division. *Semin Cell Dev Biol*, 37, 3-10.
- BUSS, J., COLTHARP, C., HUANG, T., POHLMAYER, C., WANG, S. C., HATEM, C. & XIAO, J. 2013. In vivo organization of the FtsZ-ring by ZapA and ZapB revealed by quantitative super-resolution microscopy. *Mol Microbiol*, 89, 1099-120.
- BUSS, J., COLTHARP, C., SHTENGEL, G., YANG, X., HESS, H. & XIAO, J. 2015. A multi-layered protein network stabilizes the Escherichia coli FtsZ-ring and modulates constriction dynamics. *PLoS Genet*, 11, e1005128.
- BUSSI, G., DONADIO, D. & PARRINELLO, M. 2007. Canonical sampling through velocity rescaling. *Journal of Chemical Physics*, 126.
- CABRERA, A. C., GIL-REDONDO, R., PERONA, A., GAGO, F. & MORREALE, A. 2011. VSDMIP 1.5: an automated structure- and ligand-based virtual screening platform with a PyMOL graphical user interface. *J Comput Aided Mol Des*, 25, 813-24.
- CASE, D. A., CHEATHAM, T. E., DARDEN, T., GOHLKE, H., LUO, R., MERZ, K. M., ONUFRIEV, A., SIMMERLING, C., WANG, B. & WOODS, R. J. 2005. The Amber biomolecular simulation programs. *J Comput Chem*, 26, 1668-1688.
- CHAN, F. Y., SUN, N., NEVES, M. A., LAM, P. C., CHUNG, W. H., WONG, L. K., CHOW, H. Y., MA, D. L., CHAN, P. H., LEUNG, Y. C., CHAN, T. H., ABAGYAN, R. & WONG, K. Y. 2013. Identification of a new class of FtsZ inhibitors by structure-based design and in vitro screening. *J Chem Inf Model*, 53, 2131-40.
- CHEN, Y. & ERICKSON, H. P. 2005. Rapid in vitro assembly dynamics and subunit turnover of FtsZ demonstrated by fluorescence resonance energy transfer. *J Biol Chem*, 280, 22549-54.
- CHEN, Y. & ERICKSON, H. P. 2009. FtsZ filament dynamics at steady state: subunit exchange with and without nucleotide hydrolysis. *Biochemistry*, 48, 6664-73.
- CHEN, Y. & ERICKSON, H. P. 2011. Conformational changes of FtsZ reported by tryptophan mutants. *Biochemistry*, 50, 4675-84.
- CHO, H., MCMANUS, H. R., DOVE, S. L. & BERNHARDT, T. G. 2011. Nucleoid occlusion factor SlmA is a DNA-activated FtsZ polymerization antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 3773-8.
- CHU, J. W. & VOTH, G. A. 2005. Allosteric of actin filaments: molecular dynamics simulations and coarse-grained analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 13111-6.
- COLTHARP, C., BUSS, J., PLUMER, T. M. & XIAO, J. 2016. Defining the rate-limiting processes of bacterial cytokinesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113, E1044-53.
- CORREIA, J. J., BATY, L. T. & WILLIAMS, R. C., JR. 1987. Mg²⁺ dependence of guanine nucleotide binding to tubulin. *J Biol Chem*, 262, 17278-84.
- CORTES CABRERA, A., KLETT, J., DOS SANTOS, H. G., PERONA, A., GIL-REDONDO, R., FRANCIS, S. M., PRIEGO, E. M., GAGO, F. & MORREALE, A. 2012. CRDOCK: an ultrafast multipurpose

- protein-ligand docking tool. *J Chem Inf Model*, 52, 2300-9.
- CRAMER, C. J. & TRUHLAR, D. G. 1999. Implicit solvation models: Equilibria, structure, spectra, and dynamics. *Chemical Reviews*, 99, 2161-2200.
- DAJKOVIC, A., MUKHERJEE, A. & LUTKENHAUS, J. 2008. Investigation of regulation of FtsZ assembly by SulA and development of a model for FtsZ polymerization. *J Bacteriol*, 190, 2513-26.
- DAVIES, J. & DAVIES, D. 2010. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev*, 74, 417-33.
- DAVIS, A. M., TEAGUE, S. J. & KLEYWEGT, G. J. 2003. Application and limitations of X-ray crystallographic data in structure-based ligand and drug design. *Angew Chem Int Ed Engl*, 42, 2718-36.
- DE BOER, P., CROSSLEY, R. & ROTHFIELD, L. 1992. The essential bacterial cell-division protein FtsZ is a GTPase. *Nature*, 359, 254-6.
- DE PEREDA, J. M., LEYNADIER, D., EVANGELIO, J. A., CHACON, P. & ANDREU, J. M. 1996. Tubulin secondary structure analysis, limited proteolysis sites, and homology to FtsZ. *Biochemistry*, 35, 14203-15.
- DIAZ, J. F. & ANDREU, J. M. 1993. Assembly of purified GDP-tubulin into microtubules induced by taxol and taxotere: reversibility, ligand stoichiometry, and competition. *Biochemistry*, 32, 2747-55.
- DIAZ, J. F. & BUEY, R. M. 2007. Characterizing ligand-microtubule binding by competition methods. *Methods Mol Med*, 137, 245-60.
- DIAZ, J. F., PANTOS, E., BORDAS, J. & ANDREU, J. M. 1994. Solution structure of GDP-tubulin double rings to 3 nm resolution and comparison with microtubules. *J Mol Biol*, 238, 214-25.
- DIN, N., QUARDOKUS, E. M., SACKETT, M. J. & BRUN, Y. V. 1998. Dominant C-terminal deletions of FtsZ that affect its ability to localize in *Caulobacter* and its interaction with FtsA. *Mol Microbiol*, 27, 1051-63.
- DURRANT, J. D. & AMARO, R. E. 2015. Machine-learning techniques applied to antibacterial drug discovery. *Chem Biol Drug Des*, 85, 14-21.
- ECDC & GROUP, D. J. W. 2009. ECDC/EMA Joint Technical Report: The bacterial challenge: time to react. European Centre for Disease Prevention and Control Stockholm.
- ELSEN, N. L., LU, J., PARTHASARATHY, G., REID, J. C., SHARMA, S., SOISSON, S. M. & LUMB, K. J. 2012. Mechanism of action of the cell-division inhibitor PC190723: modulation of FtsZ assembly cooperativity. *J Am Chem Soc*, 134, 12342-5.
- ERICKSON, H. P. 2001. The FtsZ protofilament and attachment of ZipA--structural constraints on the FtsZ power stroke. *Curr Opin Cell Biol*, 13, 55-60.
- ERICKSON, H. P. 2009. Modeling the physics of FtsZ assembly and force generation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 9238-43.
- ERICKSON, H. P., ANDERSON, D. E. & OSAWA, M. 2010. FtsZ in bacterial cytokinesis: cytoskeleton and force generator all in one. *Microbiol Mol Biol Rev*, 74, 504-28.
- ERICKSON, H. P. & OSAWA, M. 2010. Cell division without FtsZ--a variety of redundant mechanisms. *Mol Microbiol*, 78, 267-70.
- ESSMANN, U., PERERA, L., BERKOWITZ, M. L., DARDEN, T., LEE, H. & PEDERSEN, L. G. 1995. A Smooth Particle Mesh Ewald Method. *Journal of Chemical Physics*, 103, 8577-8593.
- FASMAN, G. D. 1992. Poly-Alpha-Amino Acids - a Citation-Classic Commentary on Protein Models for Conformational Studies by Fasman, G.D. *Current Contents/Life Sciences*, 10-10.
- FERREIRA, L. G., DOS SANTOS, R. N., OLIVA, G. & ANDRICOPULO, A. D. 2015. Molecular docking and structure-based drug design strategies. *Molecules*, 20, 13384-421.
- FOX, S. J., LI, J., SING TAN, Y., NGUYEN, M. N., PAL, A., OUARAY, Z., YADAHALLI, S. & KANNAN, S. 2016. The Multifaceted Roles of Molecular Dynamics Simulations in Drug Discovery. *Curr Pharm Des*, 22, 3585-600.
- FRAUNHOLZ, M. J., MOERSCHEL, E. & MAIER, U. G. 1998. The chloroplast division protein FtsZ is encoded by a nucleomorph gene in cryptomonads. *Mol Gen Genet*, 260, 207-11.
- FRIESNER, R. A., BANKS, J. L., MURPHY, R. B., HALGREN, T. A., KLICIC, J. J., MAINZ, D. T., REPASKY, M. P., KNOLL, E. H., SHELLEY, M., PERRY, J. K., SHAW, D. E., FRANCIS, P. & SHENKIN, P. S. 2004. Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy. *J Med Chem*, 47, 1739-49.
- FRIESNER, R. A., MURPHY, R. B., REPASKY, M. P., FRYE, L. L., GREENWOOD, J. R., HALGREN, T. A., SANSCHAGRIN, P. C. & MAINZ, D. T. 2006. Extra precision glide: docking and scoring incorporating a model of hydrophobic enclosure for protein-ligand complexes. *J Med Chem*, 49, 6177-96.
- FU, G., HUANG, T., BUSS, J., COLTHARP, C., HENSEL, Z. & XIAO, J. 2010. In vivo structure of the *E. coli* FtsZ-ring revealed by photoactivated localization microscopy (PALM). *PLoS One*, 5, e12682.
- GARDNER, K. A., MOORE, D. A. & ERICKSON, H. P. 2013. The C-terminal linker of *Escherichia coli* FtsZ functions as an intrinsically disordered peptide. *Mol Microbiol*, 89, 264-75.

- GHANAKOTA, P. & CARLSON, H. A. 2016. Driving Structure-Based Drug Discovery through Cosolvent Molecular Dynamics. *J Med Chem*.
- GIL-REDONDO, R., ESTRADA, J., MORREALE, A., HERRANZ, F., SANCHO, J. & ORTIZ, A. R. 2009. VSDMIP: virtual screening data management on an integrated platform. *J Comput Aided Mol Des*, 23, 171-84.
- GLASS, J. I., LEFKOWITZ, E. J., GLASS, J. S., HEINER, C. R., CHEN, E. Y. & CASSELL, G. H. 2000. The complete sequence of the mucosal pathogen *Ureaplasma urealyticum*. *Nature*, 407, 757-62.
- GLOCKNER, F. O., KUBE, M., BAUER, M., TEELING, H., LOMBARDOT, T., LUDWIG, W., GADE, D., BECK, A., BORZYM, K., HEITMANN, K., RABUS, R., SCHLESNER, H., AMANN, R. & REINHARDT, R. 2003. Complete genome sequence of the marine planctomycete *Pirellula* sp. strain 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 8298-303.
- GONZALEZ DE PRADO SALAS, P., HORGER, I., MARTIN-GARCIA, F., MENDIETA, J., ALONSO, A., ENCINAR, M., GOMEZ-PUERTAS, P., VELEZ, M. & TARAZONA, P. 2014. Torsion and curvature of FtsZ filaments. *Soft Matter*, 10, 1977-86.
- GRAFMULLER, A. & VOTH, G. A. 2011. Intrinsic bending of microtubule protofilaments. *Structure*, 19, 409-17.
- GRISHCHUK, E. L., MOLODTSOV, M. I., ATAULLAKHANOV, F. I. & MCINTOSH, J. R. 2005. Force production by disassembling microtubules. *Nature*, 438, 384-8.
- GROMIHA, M. M., AN, J., KONO, H., OOBATAKE, M., UEDAIRA, H. & SARAI, A. 1999. ProTherm: Thermodynamic Database for Proteins and Mutants. *Nucleic Acids Res*, 27, 286-8.
- GROMIHA, M. M., YABUKI, Y., SURESH, M. X., THANGAKANI, A. M., SUWA, M. & FUKUI, K. 2009. TMFunction: database for functional residues in membrane proteins. *Nucleic Acids Res*, 37, D201-4.
- GUVENCH, O. 2015. Revealing the Mechanisms of Protein Disorder and N-Glycosylation in CD44-Hyaluronan Binding Using Molecular Simulation. *Front Immunol*, 6, 305.
- HAEUSSER, D. P. & MARGOLIN, W. 2016. Splitsville: structural and functional insights into the dynamic bacterial Z ring. *Nat Rev Microbiol*, 14, 305-19.
- HAJDUK, I. V., RODRIGUES, C. D. & HARRY, E. J. 2016. Connecting the dots of the bacterial cell cycle: Coordinating chromosome replication and segregation with cell division. *Semin Cell Dev Biol*, 53, 2-9.
- HALE, C. A. & DE BOER, P. A. 1999. Recruitment of ZipA to the septal ring of *Escherichia coli* is dependent on FtsZ and independent of FtsA. *J Bacteriol*, 181, 167-76.
- HALGREN, T. A. 1996. Merck molecular force field .5. Extension of MMFF94 using experimental data, additional computational data, and empirical rules. *J Comput Chem*, 17, 616-641.
- HALGREN, T. A., MURPHY, R. B., FRIESNER, R. A., BEARD, H. S., FRYE, L. L., POLLARD, W. T. & BANKS, J. L. 2004. Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 2. Enrichment factors in database screening. *J Med Chem*, 47, 1750-9.
- HALPERIN, I., MA, B., WOLFSON, H. & NUSSINOV, R. 2002. Principles of docking: An overview of search algorithms and a guide to scoring functions. *Proteins*, 47, 409-43.
- HANEY, S. A., GLASFELD, E., HALE, C., KEENEY, D., HE, Z. & DE BOER, P. 2001. Genetic analysis of the *Escherichia coli* FtsZ.ZipA interaction in the yeast two-hybrid system. Characterization of FtsZ residues essential for the interactions with ZipA and with FtsA. *J Biol Chem*, 276, 11980-7.
- HAYDON, D. J., BENNETT, J. M., BROWN, D., COLLINS, I., GALBRAITH, G., LANCETT, P., MACDONALD, R., STOKES, N. R., CHAUHAN, P. K., SUTARIYA, J. K., NAYAL, N., SRIVASTAVA, A., BEANLAND, J., HALL, R., HENSTOCK, V., NOULA, C., ROCKLEY, C. & CZAPLEWSKI, L. 2010. Creating an antibacterial with in vivo efficacy: synthesis and characterization of potent inhibitors of the bacterial cell division protein FtsZ with improved pharmaceutical properties. *J Med Chem*, 53, 3927-36.
- HAYDON, D. J., STOKES, N. R., URE, R., GALBRAITH, G., BENNETT, J. M., BROWN, D. R., BAKER, P. J., BARYNIN, V. V., RICE, D. W., SEDELNIKOVA, S. E., HEAL, J. R., SHERIDAN, J. M., AIWALE, S. T., CHAUHAN, P. K., SRIVASTAVA, A., TANEJA, A., COLLINS, I., ERRINGTON, J. & CZAPLEWSKI, L. G. 2008. An inhibitor of FtsZ with potent and selective anti-staphylococcal activity. *Science*, 321, 1673-5.
- HESS, B., BEKKER, H., BERENDSEN, H. J. C. & FRAAIJE, J. G. E. M. 1997. LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. *J Comput Chem*, 18, 1463-1472.
- HESS, B., KUTZNER, C., VAN DER SPOEL, D. & LINDAHL, E. 2008a. GROMACS 4: Algorithms for Highly Efficient, Load-Balanced, and Scalable Molecular Simulation. *J Chem Theory Comput*, 4, 435-47.
- HESS, B., KUTZNER, C., VAN DER SPOEL, D. & LINDAHL, E. 2008b. GROMACS 4: Algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation. *J Chem Theory Comput*, 4, 435-447.
- HOCKNEY, R. W., GOEL, S. P. & EASTWOOD, J. W. 1974. Quiet High-Resolution Computer Models of a Plasma. *Journal of Computational Physics*, 14, 148-158.

- HOLDEN, S. J., PENGO, T., MEIBOM, K. L., FERNANDEZ FERNANDEZ, C., COLLIER, J. & MANLEY, S. 2014. High throughput 3D super-resolution microscopy reveals *Caulobacter crescentus* in vivo Z-ring organization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111, 4566-71.
- HORNAK, V., ABEL, R., OKUR, A., STROCKBINE, B., ROITBERG, A. & SIMMERLING, C. 2006. Comparison of multiple Amber force fields and development of improved protein backbone parameters. *Proteins*, 65, 712-25.
- HORVATH, D. 2011. Pharmacophore-based virtual screening. *Methods Mol Biol*, 672, 261-98.
- HOSPITAL, A., GONI, J. R., OROZCO, M. & GELPI, J. L. 2015. Molecular dynamics simulations: advances and applications. *Adv Appl Bioinform Chem*, 8, 37-47.
- HSIN, J., GOPINATHAN, A. & HUANG, K. C. 2012. Nucleotide-dependent conformations of FtsZ dimers and force generation observed through molecular dynamics simulations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 9432-7.
- HU, Z., MUKHERJEE, A., PICHOFF, S. & LUTKENHAUS, J. 1999. The MinC component of the division site selection system in *Escherichia coli* interacts with FtsZ to prevent polymerization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 14819-24.
- HUECAS, S. & ANDREU, J. M. 2003. Energetics of the cooperative assembly of cell division protein FtsZ and the nucleotide hydrolysis switch. *J Biol Chem*, 278, 46146-54.
- HUECAS, S. & ANDREU, J. M. 2004. Polymerization of nucleotide-free, GDP- and GTP-bound cell division protein FtsZ: GDP makes the difference. *FEBS Lett*, 569, 43-8.
- HUECAS, S., LLORCA, O., BOSKOVIC, J., MARTIN-BENITO, J., VALPUESTA, J. M. & ANDREU, J. M. 2008. Energetics and geometry of FtsZ polymers: nucleated self-assembly of single protofilaments. *Biophys J*, 94, 1796-806.
- HUECAS, S., SCHAFFNER-BARBERO, C., GARCIA, W., YEBENES, H., PALACIOS, J. M., DIAZ, J. F., MENENDEZ, M. & ANDREU, J. M. 2007. The interactions of cell division protein FtsZ with guanine nucleotides. *J Biol Chem*, 282, 37515-28.
- HUMPHREY, W., DALKE, A. & SCHULTEN, K. 1996. VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph*, 14, 33-8, 27-8.
- IRWIN, J. J. & SHOICHET, B. K. 2005. ZINC--a free database of commercially available compounds for virtual screening. *J Chem Inf Model*, 45, 177-82.
- JAMOUS, C., BASDEVANT, N. & HA-DUONG, T. 2014. Influence of GTP/GDP and magnesium ion on the solvated structure of the protein FtsZ: a molecular dynamics study. *J Biomol Struct Dyn*, 32, 916-27.
- JENSEN, S. O., THOMPSON, L. S. & HARRY, E. J. 2005. Cell division in *Bacillus subtilis*: FtsZ and FtsA association is Z-ring independent, and FtsA is required for efficient midcell Z-Ring assembly. *J Bacteriol*, 187, 6536-44.
- JOBIM, M. L., SANTOS, R. C., DOS SANTOS ALVES, C. F., OLIVEIRA, R. M., MOSTARDEIRO, C. P., SAGRILLO, M. R., DE SOUZA FILHO, O. C., GARCIA, L. F., MANICA-CATTANI, M. F., RIBEIRO, E. E. & DA CRUZ, I. B. 2014. Antimicrobial activity of Amazon *Astrocaryum aculeatum* extracts and its association to oxidative metabolism. *Microbiol Res*, 169, 314-23.
- JONES, G., WILLETT, P. & GLEN, R. C. 1995. Molecular recognition of receptor sites using a genetic algorithm with a description of desolvation. *J Mol Biol*, 245, 43-53.
- JONES, G., WILLETT, P., GLEN, R. C., LEACH, A. R. & TAYLOR, R. 1997. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *J Mol Biol*, 267, 727-48.
- JORGENSEN, W. L. 2004. The many roles of computation in drug discovery. *Science*, 303, 1813-8.
- JORGENSEN, W. L., CHANDRASEKHAR, J., MADURA, J. D., IMPEY, R. W. & KLEIN, M. L. 1983. Comparison of Simple Potential Functions for Simulating Liquid Water. *Journal of Chemical Physics*, 79, 926-935.
- JORGENSEN, W. L. & MADURA, J. D. 1985. Temperature and Size Dependence for Monte-Carlo Simulations of Tip4p Water. *Molecular Physics*, 56, 1381-1392.
- JORGENSEN, W. L., MAXWELL, D. S. & TIRADORIVES, J. 1996. Development and testing of the OPLS all-atom force field on conformational energetics and properties of organic liquids. *J Am Chem Soc*, 118, 11225-11236.
- KAMINSKI, G. A., FRIESNER, R. A., TIRADO-RIVES, J. & JORGENSEN, W. L. 2001. Evaluation and reparametrization of the OPLS-AA force field for proteins via comparison with accurate quantum chemical calculations on peptides. *Journal of Physical Chemistry B*, 105, 6474-6487.
- KARTHIKEYAN, M. & VYAS, R. 2015. Role of Open Source Tools and Resources in Virtual Screening for Drug Discovery. *Comb Chem High Throughput Screen*, 18, 528-43.
- KASIMOVA, M. R., KRISTENSEN, S. M., HOWE, P. W. A., CHRISTENSEN, T., MATTHIESEN, F., PETERSEN, J., SORENSEN, H. H. & LED, J. J. 2002. NMR studies of the backbone flexibility and structure of human growth hormone: A comparison of high and low pH conformations. *J Mol Biol*, 318, 679-695.
- KAUL, M., MARK, L., ZHANG, Y., PARHI, A. K., LAVOIE, E. J. & PILCH, D. S. 2013a. An FtsZ-targeting

- prodrug with oral antistaphylococcal efficacy in vivo. *Antimicrob Agents Chemother*, 57, 5860-9.
- KAUL, M., MARK, L., ZHANG, Y., PARHI, A. K., LAVOIE, E. J. & PILCH, D. S. 2013b. Pharmacokinetics and in vivo antistaphylococcal efficacy of TXY541, a 1-methylpiperidine-4-carboxamide prodrug of PC190723. *Biochem Pharmacol*, 86, 1699-707.
- KAUL, M., MARK, L., ZHANG, Y., PARHI, A. K., LYU, Y. L., PAWLAK, J., SARAVOLATZ, S., SARAVOLATZ, L. D., WEINSTEIN, M. P., LAVOIE, E. J. & PILCH, D. S. 2015. TXA709, an FtsZ-Targeting Benzamide Prodrug with Improved Pharmacokinetics and Enhanced In Vivo Efficacy against Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus. *Antimicrob Agents Chemother*, 59, 4845-55.
- KEFFER, J. L., HUECAS, S., HAMMILL, J. T., WIPF, P., ANDREU, J. M. & BEWLEY, C. A. 2013. Chrysosphaentins are competitive inhibitors of FtsZ and inhibit Z-ring formation in live bacteria. *Bioorg Med Chem*, 21, 5673-8.
- KIM, K. H., KIM, N. D. & SEONG, B. L. 2010. Pharmacophore-based virtual screening: a review of recent applications. *Expert Opin Drug Discov*, 5, 205-22.
- KIM, S., THIESSEN, P. A., BOLTON, E. E., CHEN, J., FU, G., GINDULYTE, A., HAN, L., HE, J., HE, S., SHOEMAKER, B. A., WANG, J., YU, B., ZHANG, J. & BRYANT, S. H. 2016. PubChem Substance and Compound databases. *Nucleic Acids Res*, 44, D1202-13.
- KLEBE, G. 2006. Virtual ligand screening: strategies, perspectives and limitations. *Drug Discovery Today*, 11, 580-594.
- KONAREV, P. V., VOLKOV, V. V., SOKOLOVA, A. V., KOCH, M. H. J. & SVERGUN, D. I. 2003. PRIMUS: a Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis. *Journal of Applied Crystallography*, 36, 1277-1282.
- KOTAN, R., CAKIR, A., DADASOGLU, F., AYDIN, T., CAKMAKCI, R., OZER, H., KORDALI, S., METE, E. & DIKBAS, N. 2010. Antibacterial activities of essential oils and extracts of Turkish Achillea, Satureja and Thymus species against plant pathogenic bacteria. *J Sci Food Agric*, 90, 145-60.
- KRAUTLER, V., VAN GUNSTEREN, W. F. & HUNENBERGER, P. H. 2001. A fast SHAKE: Algorithm to solve distance constraint equations for small molecules in molecular dynamics simulations. *J Comput Chem*, 22, 501-508.
- KUNDAKOVIC, T., STANOJKOVIC, T., JURANIC, Z. & KOVACEVIC, N. 2005. Cytotoxic and antioxidant activity of Achillea alexandri-regis. *Pharmazie*, 60, 319-20.
- KUNTZ, I. D., BLANEY, J. M., OATLEY, S. J., LANGRIDGE, R. & FERRIN, T. E. 1982. A geometric approach to macromolecule-ligand interactions. *J Mol Biol*, 161, 269-88.
- LAKOWICZ, J. R. 1999. A letter from the editor. *J Biomed Opt*, 4, 197.
- LAN, G., DANIELS, B. R., DOBROWSKY, T. M., WIRTZ, D. & SUN, S. X. 2009. Condensation of FtsZ filaments can drive bacterial cell division. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 121-6.
- LAPPCHEN, T., HARTOG, A. F., PINAS, V. A., KOOMEN, G. J. & DEN BLAAUWEN, T. 2005. GTP analogue inhibits polymerization and GTPase activity of the bacterial protein FtsZ without affecting its eukaryotic homologue tubulin. *Biochemistry*, 44, 7879-84.
- LAPPCHEN, T., PINAS, V. A., HARTOG, A. F., KOOMEN, G. J., SCHAFFNER-BARBERO, C., ANDREU, J. M., TRAMBALIOLO, D., LOWE, J., JUHEM, A., POPOV, A. V. & DEN BLAAUWEN, T. 2008. Probing FtsZ and tubulin with C8-substituted GTP analogs reveals differences in their nucleotide binding sites. *Chem Biol*, 15, 189-99.
- LEVIN, P. A., KURTSEER, I. G. & GROSSMAN, A. D. 1999. Identification and characterization of a negative regulator of FtsZ ring formation in Bacillus subtilis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 9642-7.
- LEVIN, P. A. & LOSICK, R. 1996. Transcription factor Spo0A switches the localization of the cell division protein FtsZ from a medial to a bipolar pattern in Bacillus subtilis. *Genes Dev*, 10, 478-88.
- LI, Y., HSIN, J., ZHAO, L., CHENG, Y., SHANG, W., HUANG, K. C., WANG, H. W. & YE, S. 2013. FtsZ protofilaments use a hinge-opening mechanism for constrictive force generation. *Science*, 341, 392-5.
- LI, Z., TRIMBLE, M. J., BRUN, Y. V. & JENSEN, G. J. 2007. The structure of FtsZ filaments in vivo suggests a force-generating role in cell division. *EMBO J*, 26, 4694-708.
- LOWE, J. & AMOS, L. A. 1998. Crystal structure of the bacterial cell-division protein FtsZ. *Nature*, 391, 203-6.
- LOWE, J. & AMOS, L. A. 1999. Tubulin-like protofilaments in Ca²⁺-induced FtsZ sheets. *EMBO J*, 18, 2364-71.
- LU, C., REEDY, M. & ERICKSON, H. P. 2000. Straight and curved conformations of FtsZ are regulated by GTP hydrolysis. *J Bacteriol*, 182, 164-70.
- MA, X. & MARGOLIN, W. 1999. Genetic and functional analyses of the conserved C-terminal core domain of Escherichia coli FtsZ. *J Bacteriol*, 181, 7531-44.
- MACKERELL, A. D., BASHFORD, D., BELLOTT, M., DUNBRACK, R. L., EVANSECK, J. D., FIELD, M. J., FISCHER, S., GAO, J., GUO, H., HA, S., JOSEPH-MCCARTHY, D., KUCHNIR, L., KUCZERA, K., LAU, F. T., MATTOS, C., MICHNICK, S., NGO, T., NGUYEN, D. T., PRODHOM, B., REIHER, W. E., ROUX, B., SCHLENKRICH, M., SMITH, J. C., STOTE, R., STRAUB, J., WATANABE, M.,

- WIORKIEWICZ-KUCZERA, J., YIN, D. & KARPLUS, M. 1998. All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. *Journal of Physical Chemistry B*, 102, 3586-616.
- MACKERELL, A. D., JR., FEIG, M. & BROOKS, C. L., 3RD 2004. Improved treatment of the protein backbone in empirical force fields. *J Am Chem Soc*, 126, 698-9.
- MAGGIORA, G. M. & JOHNSON, M. A. 1990. Introduction to Similarity in Chemistry. *Concepts and Applications of Molecular Similarity*, 1-13.
- MAKOV, G. & PAYNE, M. C. 1995. Periodic Boundary-Conditions in Ab-Initio Calculations. *Physical Review B*, 51, 4014-4022.
- MARGOLIN, W. 2000. Organelle division: Self-assembling GTPase caught in the middle. *Curr Biol*, 10, R328-30.
- MARGOLIN, W. 2005. FtsZ and the division of prokaryotic cells and organelles. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6, 862-71.
- MARKO, J. F. & SIGGIA, E. D. 1995. Stretching DNA. *Macromolecules*, 28, 8759-8770.
- MARTIN-GALIANO, A. J., BUEY, R. M., CABEZAS, M. & ANDREU, J. M. 2010. Mapping flexibility and the assembly switch of cell division protein FtsZ by computational and mutational approaches. *J Biol Chem*, 285, 22554-65.
- MARTIN-GARCIA, F., SALVARELLI, E., MENDIETA-MORENO, J. I., VICENTE, M., MINGORANCE, J., MENDIETA, J. & GOMEZ-PUERTAS, P. 2012. Molecular dynamics simulation of GTPase activity in polymers of the cell division protein FtsZ. *FEBS Lett*, 586, 1236-9.
- MARTYNA, G. J., KLEIN, M. L. & TUCKERMAN, M. 1992. Nose-Hoover Chains - the Canonical Ensemble Via Continuous Dynamics. *Journal of Chemical Physics*, 97, 2635-2643.
- MARTYNA, G. J., TOBIAS, D. J. & KLEIN, M. L. 1994. Constant-Pressure Molecular-Dynamics Algorithms. *Journal of Chemical Physics*, 101, 4177-4189.
- MATSUI, T., HAN, X., YU, J., YAO, M. & TANAKA, I. 2014. Structural change in FtsZ Induced by intermolecular interactions between bound GTP and the T7 loop. *J Biol Chem*, 289, 3501-9.
- MATSUI, T., YAMANE, J., MOGI, N., YAMAGUCHI, H., TAKEMOTO, H., YAO, M. & TANAKA, I. 2012. Structural reorganization of the bacterial cell-division protein FtsZ from *Staphylococcus aureus*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 68, 1175-88.
- MCCAMMON, J. A., GELIN, B. R. & KARPLUS, M. 1977. Dynamics of Folded Proteins. *Nature*, 267, 585-590.
- MCINNES, C. 2007. Virtual screening strategies in drug discovery. *Curr Opin Chem Biol*, 11, 494-502.
- MCROBB, F. M., NEGRI, A., BEUMING, T. & SHERMAN, W. 2016. Molecular dynamics techniques for modeling G protein-coupled receptors. *Curr Opin Pharmacol*, 30, 69-75.
- MEIER, E. L. & GOLEY, E. D. 2014. Form and function of the bacterial cytokinetic ring. *Curr Opin Cell Biol*, 26, 19-27.
- MENDIETA, J., RICO, A. I., LOPEZ-VINAS, E., VICENTE, M., MINGORANCE, J. & GOMEZ-PUERTAS, P. 2009. Structural and functional model for ionic (K(+)/Na(+)) and pH dependence of GTPase activity and polymerization of FtsZ, the prokaryotic ortholog of tubulin. *J Mol Biol*, 390, 17-25.
- MENG, X. Y., ZHANG, H. X., MEZEI, M. & CUI, M. 2011. Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. *Curr Comput Aided Drug Des*, 7, 146-57.
- MINGORANCE, J., TADROS, M., VICENTE, M., GONZALEZ, J. M., RIVAS, G. & VELEZ, M. 2005. Visualization of single *Escherichia coli* FtsZ filament dynamics with atomic force microscopy. *J Biol Chem*, 280, 20909-14.
- MIRALDI, E. R., THOMAS, P. J. & ROMBERG, L. 2008. Allosteric models for cooperative polymerization of linear polymers. *Biophys J*, 95, 2470-86.
- MIYAMOTO, S. & KOLLMAN, P. A. 1992. Settle - an Analytical Version of the Shake and Rattle Algorithm for Rigid Water Models. *J Comput Chem*, 13, 952-962.
- MONAHAN, L. G., ROBINSON, A. & HARRY, E. J. 2009. Lateral FtsZ association and the assembly of the cytokinetic Z ring in bacteria. *Mol Microbiol*, 74, 1004-17.
- MOSYAK, L., ZHANG, Y., GLASFELD, E., HANEY, S., STAHL, M., SEEHRA, J. & SOMERS, W. S. 2000. The bacterial cell-division protein ZipA and its interaction with an FtsZ fragment revealed by X-ray crystallography. *EMBO J*, 19, 3179-91.
- MUKHERJEE, A., DAI, K. & LUTKENHAUS, J. 1993. *Escherichia coli* cell division protein FtsZ is a guanine nucleotide binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 1053-7.
- MUKHERJEE, A. & LUTKENHAUS, J. 1994. Guanine nucleotide-dependent assembly of FtsZ into filaments. *J Bacteriol*, 176, 2754-8.
- MUKHERJEE, A. & LUTKENHAUS, J. 1999. Analysis of FtsZ assembly by light scattering and determination of the role of divalent metal cations. *J Bacteriol*, 181, 823-32.
- NATALE, D. A., SHANKAVARAM, U. T., GALPERIN, M. Y., WOLF, Y. I., ARAVIND, L. & KOONIN, E. V. 2000. Towards understanding the first genome sequence of a crenarchaeon by genome annotation

- using clusters of orthologous groups of proteins (COGs). *Genome Biol*, 1, RESEARCH0009.
- NATARAJAN, K. & SENAPATI, S. 2013. Probing the conformational flexibility of monomeric FtsZ in GTP-bound, GDP-bound, and nucleotide-free states. *Biochemistry*, 52, 3543-51.
- NEMETHY, G., GIBSON, K. D., PALMER, K. A., YOON, C. N., PATERLINI, G., ZAGARI, A., RUMSEY, S. & SCHERAGA, H. A. 1992. Energy Parameters in Polypeptides .10. Improved Geometrical Parameters and Nonbonded Interactions for Use in the Ecepp/3 Algorithm, with Application to Proline-Containing Peptides. *Journal of Physical Chemistry*, 96, 6472-6484.
- NEVES, M. A., TOTROV, M. & ABAGYAN, R. 2012. Docking and scoring with ICM: the benchmarking results and strategies for improvement. *J Comput Aided Mol Des*, 26, 675-86.
- NOGALES, E., DOWNING, K. H., AMOS, L. A. & LOWE, J. 1998a. Tubulin and FtsZ form a distinct family of GTPases. *Nat Struct Biol*, 5, 451-8.
- NOGALES, E., WOLF, S. G. & DOWNING, K. H. 1998b. Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography. *Nature*, 391, 199-203.
- NOSE, S. & KLEIN, M. L. 1983. Constant Pressure Molecular-Dynamics for Molecular-Systems. *Molecular Physics*, 50, 1055-1076.
- NOVIKOV, F. N., STROYLOV, V. S., ZEIFMAN, A. A., STROGANOV, O. V., KULKOV, V. & CHILOV, G. G. 2012. Lead Finder docking and virtual screening evaluation with Astex and DUD test sets. *J Comput Aided Mol Des*, 26, 725-35.
- OLIVA, M. A., CORDELL, S. C. & LOWE, J. 2004. Structural insights into FtsZ protofilament formation. *Nat Struct Mol Biol*, 11, 1243-50.
- OLIVA, M. A., HUECAS, S., PALACIOS, J. M., MARTIN-BENITO, J., VALPUESTA, J. M. & ANDREU, J. M. 2003. Assembly of archaeal cell division protein FtsZ and a GTPase-inactive mutant into double-stranded filaments. *J Biol Chem*, 278, 33562-70.
- OLIVA, M. A., TRAMBALIOLO, D. & LOWE, J. 2007. Structural insights into the conformational variability of FtsZ. *J Mol Biol*, 373, 1229-42.
- OOSTENBRINK, C., VILLA, A., MARK, A. E. & VAN GUNSTEREN, W. F. 2004. A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: The GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6. *J Comput Chem*, 25, 1656-1676.
- OROZCO, M. 2014. A theoretical view of protein dynamics. *Chem Soc Rev*, 43, 5051-66.
- OSAWA, M., ANDERSON, D. E. & ERICKSON, H. P. 2008. Reconstitution of contractile FtsZ rings in liposomes. *Science*, 320, 792-4.
- OSAWA, M., ANDERSON, D. E. & ERICKSON, H. P. 2009. Curved FtsZ protofilaments generate bending forces on liposome membranes. *EMBO J*, 28, 3476-84.
- OSAWA, M. & ERICKSON, H. P. 2011. Inside-out Z rings--constriction with and without GTP hydrolysis. *Mol Microbiol*, 81, 571-9.
- OSHIRO, C., BRADLEY, E. K., EKSTEROWICZ, J., EVENSEN, E., LAMB, M. L., LANCTOT, J. K., PUTTA, S., STANTON, R. & GROOTENHUIS, P. D. J. 2004. Performance of 3D-database molecular docking studies into homology models. *J Med Chem*, 47, 764-767.
- PANYUKOV, S. & RABIN, Y. 2000. Thermal fluctuations of elastic filaments with spontaneous curvature and torsion. *Phys Rev Lett*, 85, 2404-2407.
- PARRINELLO, M. & RAHMAN, A. 1981. Polymorphic Transitions in Single-Crystals - a New Molecular-Dynamics Method. *Journal of Applied Physics*, 52, 7182-7190.
- PAUW, B. R. 2013. Everything SAXS: small-angle scattering pattern collection and correction. *J Phys Condens Matter*, 25, 383201.
- PETTERSEN, E. F., GODDARD, T. D., HUANG, C. C., COUCH, G. S., GREENBLATT, D. M., MENG, E. C. & FERRIN, T. E. 2004. UCSF chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*, 25, 1605-1612.
- PHILLIPS, J. C., BRAUN, R., WANG, W., GUMBART, J., TAJKHORSHID, E., VILLA, E., CHIPOT, C., SKEEL, R. D., KALE, L. & SCHULTEN, K. 2005. Scalable molecular dynamics with NAMD. *J Comput Chem*, 26, 1781-1802.
- PICHOFF, S. & LUTKENHAUS, J. 2002. Unique and overlapping roles for ZipA and FtsA in septal ring assembly in *Escherichia coli*. *EMBO J*, 21, 685-93.
- PILHOFER, M. & JENSEN, G. J. 2013. The bacterial cytoskeleton: more than twisted filaments. *Curr Opin Cell Biol*, 25, 125-33.
- PUIG, T., RELAT, J., MARRERO, P. F., HARO, D., BRUNET, J. & COLOMER, R. 2008. Green tea catechin inhibits fatty acid synthase without stimulating carnitine palmitoyltransferase-1 or inducing weight loss in experimental animals. *Anticancer Res*, 28, 3671-6.
- RAREY, M., KRAMER, B., LENGAUER, T. & KLEBE, G. 1996. A fast flexible docking method using an incremental construction algorithm. *J Mol Biol*, 261, 470-89.
- RAYCHAUDHURI, D. & PARK, J. T. 1992. *Escherichia coli* cell-division gene *ftsZ* encodes a novel GTP-binding protein. *Nature*, 359, 251-4.

- RIVAS, G., LOPEZ, A., MINGORANCE, J., FERRANDIZ, M. J., ZORRILLA, S., MINTON, A. P., VICENTE, M. & ANDREU, J. M. 2000. Magnesium-induced linear self-association of the FtsZ bacterial cell division protein monomer. The primary steps for FtsZ assembly. *J Biol Chem*, 275, 11740-9.
- ROMBERG, L. & LEVIN, P. A. 2003. Assembly dynamics of the bacterial cell division protein FTSZ: poised at the edge of stability. *Annu Rev Microbiol*, 57, 125-54.
- ROWLETT, V. W. & MARGOLIN, W. 2014. 3D-SIM super-resolution of FtsZ and its membrane tethers in *Escherichia coli* cells. *Biophys J*, 107, L17-20.
- RUIZ-AVILA, L. B. 2013. *Inhibidores sintéticos de FtsZ con actividad antibacteriana*. Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid.
- RUIZ-AVILA, L. B., HUECAS, S., ARTOLA, M., VERGONOS, A., RAMIREZ-APORTELA, E., CERCENADO, E., BARASOAIN, I., VAZQUEZ-VILLA, H., MARTIN-FONTECHA, M., CHACON, P., LOPEZ-RODRIGUEZ, M. L. & ANDREU, J. M. 2013. Synthetic inhibitors of bacterial cell division targeting the GTP-binding site of FtsZ. *ACS Chem Biol*, 8, 2072-83.
- RUIZ-CARMONA, S., ALVAREZ-GARCIA, D., FOLOPPE, N., GARMENDIA-DOVAL, A. B., JUHOS, S., SCHMIDTKE, P., BARRIL, X., HUBBARD, R. E. & MORLEY, S. D. 2014. rDock: a fast, versatile and open source program for docking ligands to proteins and nucleic acids. *PLoS Comput Biol*, 10, e1003571.
- RYCKAERT, J. P., CICCOTTI, G. & BERENDSEN, H. J. C. 1977. Numerical-Integration of Cartesian Equations of Motion of a System with Constraints - Molecular-Dynamics of N-Alkanes. *Journal of Computational Physics*, 23, 327-341.
- SALOMON-FERRER, R., CASE, D. A. & WALKER, R. C. 2013. An overview of the Amber biomolecular simulation package. *Wiley Interdisciplinary Reviews-Computational Molecular Science*, 3, 198-210.
- SASS, P. & BROTZ-OESTERHELT, H. 2013. Bacterial cell division as a target for new antibiotics. *Curr Opin Microbiol*, 16, 522-30.
- SCHAFFNER-BARBERO, C., GIL-REDONDO, R., RUIZ-AVILA, L. B., HUECAS, S., LAPPCHEN, T., DEN BLAAUWEN, T., DIAZ, J. F., MORREALE, A. & ANDREU, J. M. 2010. Insights into nucleotide recognition by cell division protein FtsZ from a mant-GTP competition assay and molecular dynamics. *Biochemistry*, 49, 10458-72.
- SCHAFFNER-BARBERO, C., MARTIN-FONTECHA, M., CHACON, P. & ANDREU, J. M. 2012. Targeting the assembly of bacterial cell division protein FtsZ with small molecules. *ACS Chem Biol*, 7, 269-77.
- SCHEFFERS, D. J., DE WIT, J. G., DEN BLAAUWEN, T. & DRIESSEN, A. J. 2002. GTP hydrolysis of cell division protein FtsZ: evidence that the active site is formed by the association of monomers. *Biochemistry*, 41, 521-9.
- SCOTT, W. R. P., HUNENBERGER, P. H., TIRONI, I. G., MARK, A. E., BILLETER, S. R., FENNEN, J., TORDA, A. E., HUBER, T., KRUGER, P. & VAN GUNSTEREN, W. F. 1999. The GROMOS biomolecular simulation program package. *Journal of Physical Chemistry A*, 103, 3596-3607.
- SHEN, B. & LUTKENHAUS, J. 2009. The conserved C-terminal tail of FtsZ is required for the septal localization and division inhibitory activity of MinC(C)/MinD. *Mol Microbiol*, 72, 410-24.
- SINGH, J. K., MAKDE, R. D., KUMAR, V. & PANDA, D. 2007. A membrane protein, EzrA, regulates assembly dynamics of FtsZ by interacting with the C-terminal tail of FtsZ. *Biochemistry*, 46, 11013-22.
- SOUSA, S. F., FERNANDES, P. A. & RAMOS, M. J. 2006. Protein-ligand docking: current status and future challenges. *Proteins*, 65, 15-26.
- STOKES, N. R., BAKER, N., BENNETT, J. M., BERRY, J., COLLINS, I., CZAPLEWSKI, L. G., LOGAN, A., MACDONALD, R., MACLEOD, L., PEASLEY, H., MITCHELL, J. P., NAYAL, N., YADAV, A., SRIVASTAVA, A. & HAYDON, D. J. 2013. An improved small-molecule inhibitor of FtsZ with superior in vitro potency, drug-like properties, and in vivo efficacy. *Antimicrob Agents Chemother*, 57, 317-25.
- STRAUSS, M. P., LIEW, A. T., TURNBULL, L., WHITCHURCH, C. B., MONAHAN, L. G. & HARRY, E. J. 2012. 3D-SIM super resolution microscopy reveals a bead-like arrangement for FtsZ and the division machinery: implications for triggering cytokinesis. *PLoS Biol*, 10, e1001389.
- STROGANOV, O. V., NOVIKOV, F. N., STROYLOV, V. S., KULKOV, V. & CHILOV, G. G. 2008. Lead finder: an approach to improve accuracy of protein-ligand docking, binding energy estimation, and virtual screening. *J Chem Inf Model*, 48, 2371-85.
- SUN, N., CHAN, F. Y., LU, Y. J., NEVES, M. A., LUI, H. K., WANG, Y., CHOW, K. Y., CHAN, K. F., YAN, S. C., LEUNG, Y. C., ABAGYAN, R., CHAN, T. H. & WONG, K. Y. 2014. Rational design of berberine-based FtsZ inhibitors with broad-spectrum antibacterial activity. *PLoS One*, 9, e97514.
- SUNDARARAJAN, K., MIGUEL, A., DESMARAIS, S. M., MEIER, E. L., CASEY HUANG, K. & GOLEY, E. D. 2015. The bacterial tubulin FtsZ requires its intrinsically disordered linker to direct robust cell wall construction. *Nat Commun*, 6, 7281.
- SUTHERLAND, A. G., ALVAREZ, J., DING, W., FOREMAN, K. W., KENNY, C. H., LABTHAVIKUL, P.,

- MOSYAK, L., PETERSEN, P. J., RUSH, T. S., 3RD, RUZIN, A., TSAO, D. H. & WHELESS, K. L. 2003. Structure-based design of carboxybiphenylindole inhibitors of the ZipA-FtsZ interaction. *Org Biomol Chem*, 1, 4138-40.
- SVERGUN, D., BARBERATO, C. & KOCH, M. H. J. 1995. CRY SOL - A program to evaluate x-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates. *Journal of Applied Crystallography*, 28, 768-773.
- SVERGUN, D. I. 1992. Determination of the Regularization Parameter in Indirect-Transform Methods Using Perceptual Criteria. *Journal of Applied Crystallography*, 25, 495-503.
- SWOPE, W. C., ANDERSEN, H. C., BERENS, P. H. & WILSON, K. R. 1982. A Computer-Simulation Method for the Calculation of Equilibrium-Constants for the Formation of Physical Clusters of Molecules - Application to Small Water Clusters. *Journal of Chemical Physics*, 76, 637-649.
- SZWEDZIAK, P., WANG, Q., BHARAT, T. A., TSIM, M. & LOWE, J. 2014. Architecture of the ring formed by the tubulin homologue FtsZ in bacterial cell division. *Elife*, 3, e04601.
- TAKAHARA, M., TAKAHASHI, H., MATSUNAGA, S., MIYAGISHIMA, S., TAKANO, H., SAKAI, A., KAWANO, S. & KUROIWA, T. 2000. A putative mitochondrial ftsZ gene is present in the unicellular primitive red alga Cyanidioschyzon merolae. *Mol Gen Genet*, 264, 452-60.
- TAN, C. M., THERIEN, A. G., LU, J., LEE, S. H., CARON, A., GILL, C. J., LEBEAU-JACOB, C., BENTON-PERDOMO, L., MONTEIRO, J. M., PEREIRA, P. M., ELSEN, N. L., WU, J., DESCHAMPS, K., PETCU, M., WONG, S., DAIGNEAULT, E., KRAMER, S., LIANG, L., MAXWELL, E., CLAVEAU, D., VAILLANCOURT, J., SKOREY, K., TAM, J., WANG, H., MEREDITH, T. C., SILLAOTS, S., WANG-JARANTOW, L., RAMTOHUL, Y., LANGLOIS, E., LANDRY, F., REID, J. C., PARTHASARATHY, G., SHARMA, S., BARYSHNIKOVA, A., LUMB, K. J., PINHO, M. G., SOISSON, S. M. & ROEMER, T. 2012. Restoring methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* susceptibility to beta-lactam antibiotics. *Sci Transl Med*, 4, 126ra35.
- THANBICHLER, M. & SHAPIRO, L. 2006. MipZ, a spatial regulator coordinating chromosome segregation with cell division in *Caulobacter*. *Cell*, 126, 147-62.
- TOMASI, J., MENNUCCI, B. & CAMMI, R. 2005. Quantum mechanical continuum solvation models. *Chemical Reviews*, 105, 2999-3093.
- TOMASI, J. & PERSICO, M. 1994. Molecular-Interactions in Solution - an Overview of Methods Based on Continuous Distributions of the Solvent. *Chemical Reviews*, 94, 2027-2094.
- TOTROV, M. & ABAGYAN, R. 1997. Flexible protein-ligand docking by global energy optimization in internal coordinates. *Proteins*, Suppl 1, 215-20.
- TOTROV, M. & ABAGYAN, R. 2008. Flexible ligand docking to multiple receptor conformations: a practical alternative. *Curr Opin Struct Biol*, 18, 178-84.
- TROTT, O. & OLSON, A. J. 2010. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem*, 31, 455-61.
- TURNER, D. J., PORTMAN, I., DAFFORN, T. R., RODGER, A., ROPER, D. I., SMITH, C. J. & TURNER, M. S. 2012. The mechanics of FtsZ fibers. *Biophys J*, 102, 731-8.
- TURRADO, C., PUIG, T., GARCIA-CARCELES, J., ARTOLA, M., BENHAMU, B., ORTEGA-GUTIERREZ, S., RELAT, J., OLIVERAS, G., BLANCAFORT, A., HARO, D., MARRERO, P. F., COLOMER, R. & LOPEZ-RODRIGUEZ, M. L. 2012. New synthetic inhibitors of fatty acid synthase with anticancer activity. *J Med Chem*, 55, 5013-23.
- VAN DEN ENT, F. & LOWE, J. 2000. Crystal structure of the cell division protein FtsA from *Thermotoga maritima*. *EMBO J*, 19, 5300-7.
- VAN DER SPOEL, D., LINDAHL, E., HESS, B., GROENHOF, G., MARK, A. E. & BERENDSEN, H. J. 2005a. GROMACS: fast, flexible, and free. *J Comput Chem*, 26, 1701-18.
- VAN DER SPOEL, D., LINDAHL, E., HESS, B., GROENHOF, G., MARK, A. E. & BERENDSEN, H. J. C. 2005b. Gromacs: Fast, Flexible, and Free. *J Comput Chem*, 26, 1701-1718.
- VAUGHAN, S., WICKSTEAD, B., GULL, K. & ADDINALL, S. G. 2004. Molecular evolution of FtsZ protein sequences encoded within the genomes of archaea, bacteria, and eukaryota. *J Mol Evol*, 58, 19-29.
- VERLET, L. 1967. Computer Experiments on Classical Fluids .I. Thermodynamical Properties of Lennard-Jones Molecules. *Physical Review*, 159, 98-+.
- VITHA, S., MCANDREW, R. S. & OSTERYOUNG, K. W. 2001. FtsZ ring formation at the chloroplast division site in plants. *J Cell Biol*, 153, 111-20.
- WANG, J., WOLF, R. M., CALDWELL, J. W., KOLLMAN, P. A. & CASE, D. A. 2004. Development and testing of a general amber force field. *J Comput Chem*, 25, 1157-74.
- WEINER, S. J., KOLLMAN, P. A., CASE, D. A., SINGH, U. C., GHIO, C., ALAGONA, G., PROFETA, S. & WEINER, P. 1984. A New Force-Field for Molecular Mechanical Simulation of Nucleic-Acids and Proteins. *J Am Chem Soc*, 106, 765-784.
- WELLS, D. B. & AKSIMENTIEV, A. 2010. Mechanical properties of a complete microtubule revealed through molecular dynamics simulation. *Biophys J*, 99, 629-37.

- WISHART, D. S., KNOX, C., GUO, A. C., SHRIVASTAVA, S., HASSANALI, M., STOTHARD, P., CHANG, Z. & WOOLSEY, J. 2006. DrugBank: a comprehensive resource for in silico drug discovery and exploration. *Nucleic Acids Res*, 34, D668-72.
- WOLF, C., KOUMANOV, K., TENCHOV, B. & QUINN, P. J. 2001. Cholesterol favors phase separation of sphingomyelin. *Biophysical Chemistry*, 89, 163-172.
- WRIGGERS, W. 2012. Conventions and workflows for using Situs. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*, 68, 344-351.
- YU, X. C. & MARGOLIN, W. 1997. Ca²⁺-mediated GTP-dependent dynamic assembly of bacterial cell division protein FtsZ into asters and polymer networks in vitro. *EMBO J*, 16, 5455-63.

Artículos Publicados

Relacionados de forma directa con esta tesis:

- Artola, M., Ruiz-avila, L. B., **Ramírez-Aportela, E.**, Martínez, R. F., Araujo-Bazan, L., Vazqueza-Villa, H., Martin-Fontecha, M., Oliva, M. A., Martín-Galiano, A. J., Chacón, P., López-Rodríguez, M. L., Andreu, J. M. & Huecas, S. 2016. The structural assembly switch of cell division protein FtsZ probed with fluorescent allosteric inhibitors. *Chemical Science*.
- Artola, M., Ruiz-Ávila, L. B., Vergoños, A., Huecas, S., Araujo-Bazan, L., Martin-Fontecha, M., Vazqueza-Villa, H., Turrado, C., **Ramírez-Aportela, E.**, Hoegl, A., Nodwell, M., Barasoain, I., Chacón, P., Sieber, S. A., Andreu, J. M. & López-Rodríguez, M. L. 2015. Effective GTP-Replacing FtsZ Inhibitors and Antibacterial Mechanism of Action. *ACS Chem Biol*, 10, 834-43.
- **Ramírez-Aportela, E.**, López-Blanco, J. R., Andreu, J. M. & Chacón, P. 2014. Understanding nucleotide-regulated FtsZ filament dynamics and the monomer assembly switch with large-scale atomistic simulations. *Biophys J*, 107, 2164-76.
- Ruiz-Ávila, L. B., Huecas, S., Artola, M., Vergoños, A., **Ramírez-Aportela, E.**, Cercenado, E., BAarasoain, I., Vazqueza-Villa, H., Martin-Fontecha, M., Chacón, P., López-Rodríguez, M. L. & Andreu, J. M. 2013. Synthetic inhibitors of bacterial cell division targeting the GTP-binding site of FtsZ. *ACS Chem Biol*, 8, 2072-83.

Relacionados de forma menos directa con esta tesis:

- Kellogg, E. H., Howes, S., Ti, S. C., **Ramírez-Aportela, E.**, Kapoor, T. M., Chacón, P. & Nogales, E. 2016. Near-atomic cryo-EM structure of PRC1 bound to the microtubule. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113, 9430-9.
- **Ramírez-Aportela, E.**, López-Blanco, J. R. & Chacón, P. 2016. FRODOCK 2.0: fast protein-protein docking server. *Bioinformatics*, 32, 2386-8.
- Silva-Martín, N., Bartual, S. G., **Ramírez-Aportela, E.**, Chacón, P., Park, C. G. & Hermoso, J. A. 2014. Structural basis for selective recognition of endogenous and microbial polysaccharides by macrophage receptor SIGN-R1. *Structure*, 22, 1595-606.
- García, S., **Ramírez-Aportela, E.**, Garzón, J. I., Chacón, P., Montemayor, A. S. & Cabido, R. 2014. FRODRUG: a virtual screening GPU accelerated approach for drug discovery. *2014 22nd Euromicro International Conference on Parallel, Distributed, and Network-Based Processing (Pdp 2014)*, 594-600.