

VCH-FC
MAG-B
A-663
C. 1



EFFECTO DE COMPUESTOS DERIVADOS DE FENSTATINA SOBRE LA POLIMERIZACIÓN DE FTSZ

Tesis
entregada a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al grado de

Magíster en Ciencias Biológicas

Facultad de Ciencias

por

Gíssela Andrea Araya Rojas

Octubre, 2017

Director de Tesis: Dr. Octavio Monasterio
Co-Directora de Tesis: Dra. Rosalba Lagos

**FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE**

**INFORME DE APROBACION
TESIS DE MAGÍSTER**

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magíster presentada por la candidata.

Gíssela Andrea Araya Rojas

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 29 de Junio de 2017.

Director de Tesis

Dr. Octavio Monasterio.

Co-Directora de Tesis

Dra. Rosalba Lagos.



Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Ricardo Cabrera.

Dr. Juan Fernández.



Dedicada a mi hijo Simón

Agradecimientos

Quiero empezar dándole las gracias a mi familia. A Simón, a quien dedico este trabajo, motor que me impulsa, la fuente de inspiración y fuerza, a veces estimulador, a veces inhibidor. A Pablo, mi compañero de vida, gracias por tanto amor, contención y apoyo, tan necesarios para el día a día y más cuando la vida resulta difícil. Esto recién comienza, así es que paciencia. A Carmen, mi querida madre, ya que ella es el origen de todo lo que soy. Gracias por las enseñanzas, el amor y la preocupación. A mi tía Susana, por su ayuda infaltable y los tiempos compartidos, que a pesar de no ser muchos, estuvieron llenos de risas y regalones, muy útiles y revitalizantes. A mi abuelita María, por su constante preocupación y ayuda, las cuales siempre me aportaron tranquilidad en los momentos más complicados. A la familia que elegí, mis amigos, especialmente a Pauli, Kathy y Esteban.

Agradezco inmensamente al Dr. Octavio Monasterio, mi tutor. Por el tiempo dedicado a mi trabajo y mi persona. Por su labor como maestro, y, especialmente, por la confianza, el apoyo y los grandes consejos que me ha entregado a lo largo de los años que he trabajado en su laboratorio. También le agradezco a la Dra. Rosalba Lagos, por sus críticas a mi trabajo, las cuales siempre dieron en el blanco logrando con ello mejores resultados y más conocimientos.

Quisiera también expresar mi agradecimiento a mis compañeros de laboratorio, especialmente a Luis Pouchucq por su amistad y porque con él empezó, de muy buena manera, este continuo aprendizaje. A Felipe Montecinos, quien me enseñó a trabajar con la FtsZ y a ser más rigurosa y metódica en el mesón. A los que ya se fueron, pero en su momento aportaron con ayuda, ideas o risas al desarrollo de este trabajo. Debo de hacer un reconocimiento especial a Macarena Collao, la secretaria más regia, seca, eficiente y simpática de JGM. Mil gracias por su constante ayuda (de diversa índole) y por los divertidos y amenos momentos compartidos. A Nicole Molina, por ser tan amorosa y estar siempre pendiente de nuestros requerimientos para que los experimentos salgan bien. A Don Pedro, porque su trabajo es fundamental y crucial para el laboratorio, se agradece aún más su buena voluntad.

Índice

Biografía	iii
Agradecimientos	iv
Índice	v
Lista de tablas.....	viii
Lista de figuras.....	ix
Abreviaturas.....	xi
Resumen	xiii
Abstract.....	xv
Introducción	1
1. Antecedentes.....	1
2. Antibióticos inhibidores de la división bacteriana.....	3
2.1 Inhibidores de la síntesis de peptidoglicano.	3
2.2 Inhibidores de FtsZ, proteína inicial de la división celular.....	5
3. FtsZ como blanco de acción de los inhibidores NPY y B2T	7
4. Efecto in vivo de inhibidores de la división bacteriana.....	8
5. Efecto in vitro y mecanismo molecular de inhibidores de FtsZ.....	10
6. Hipótesis.....	11
7. Objetivos.....	11
7.1. Objetivo General	11
7.2. Objetivos Específicos	11

Materiales y Métodos.....	13
1. Materiales.....	13
1.1. Reactivos.....	13
1.2. Soluciones.....	14
1.3. Anticuerpos.....	15
1.4. Cepas bacterianas y plásmidos.....	15
1.5. Medios de cultivo.....	16
2. Métodos.....	17
2.1. Caracterización fisicoquímica de los compuestos.....	17
2.2. Purificación de EcFtsZ y BsFtsZ.....	18
2.3. Purificación de tubulina.....	22
2.4. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE).....	22
2.5. Inmunoblot (Western blot).....	22
2.6. Ensayos de viabilidad y morfología bacteriana.....	23
2.7. Polimerización de EcFtsZ y BsFtsZ.....	25
2.8. Morfología de los polímeros de FtsZ.....	28
2.9. Actividad GTPásica de FtsZ.....	28
2.10. Efecto de los compuestos sobre la polimerización de tubulina.....	30
Resultados.....	31
1. Características fisicoquímicas de los compuestos.....	31
2. Efecto de NPY y B2T sobre la polimerización <i>in vitro</i> del heterodímero de $\alpha\beta$ -tubulina.....	35
3. Efecto de NPY y B2T sobre la polimerización <i>in vitro</i> de FtsZ de <i>E. coli</i> y <i>B. subtilis</i>	36

3.1. Polimerización	36
3.2. Actividad GTPásica	50
3.3. Análisis del efecto de NPY luego de la despolimerización	53
3.4. Efecto de Mg ²⁺ sobre EcFtsZ y BsFtsZ en presencia de NPY	62
4. Efecto de NPY y B2T sobre el crecimiento bacteriano	63
4.1. Ensayos de sensibilidad en placa	64
4.2. Curvas de crecimiento	67
4.3. Morfología celular de las bacterias	69
Discusión	72
1. Efecto de los compuestos NPY y B2T sobre el crecimiento bacteriano	73
2. Efecto de los compuestos NPY y B2T sobre la polimerización de EcFtsZ y BsFtsZ	76
Resumen de resultados	82
Conclusiones	83
Bibliografía	84
MATERIAL SUPLEMENTARIO	88

Lista de tablas

Tabla I. Concentraciones críticas de EcFtsZ y BsFtsZ en presencia de NPY y B2T	50
Tabla II. Actividad GTPásica de EcFtsZ y BsFtsZ en ausencia y presencia de NPY y B2T	52
Tabla III. Efecto de NPY sobre la dispersión de luz de EcFtsZ y BsFtsZ en presencia de un exceso de GDP ^a	55
Tabla IV. Efecto de NPY disuelto en DMSO 30% sobre la viabilidad bacteriana ^a	66
Tabla V. Efecto de B2T disuelto en DMSO 30% sobre la viabilidad bacteriana ^a	66
Tabla VI. Características morfológicas de los polímeros de EcFtsZ y BsFtsZ en ausencia y presencia de los compuestos	79

Lista de figuras

Figura 1. Esquema de la maquinaria de división y los procesos adyacentes que se encuentran asociados a ésta	4
Figura 2. Estructuras químicas de los compuestos de la serie N (dihidroxi-naftil aril cetonas) y de la serie B (dihidroxibencil aril cetonas)	7
Figura 3. Características fisicoquímicas de NPY y B2T	32
Figura 4. Espectros de absorbanza de los compuestos NPY y B2T en medio acuoso con DMSO 1%.....	33
Figura 5. Estabilidad en el tiempo de los compuestos NPY y B2T en DMSO...	35
Figura 6. Efecto de NPY sobre la polimerización de EcFtsZ inducida por GTP.	37
Figura 7. Efecto de NPY sobre la polimerización de BsFtsZ inducida por GTP.	40
Figura 8. Efecto de NPY sobre la morfología de los polímeros de EcFtsZ y BsFtsZ inducidos por GTP	43
Figura 9. Efecto de B2T sobre la polimerización de EcFtsZ inducida por GTP	45
Figura 10. Efecto de B2T sobre la polimerización de BsFtsZ inducida por GTP	46
Figura 11. Efecto de B2T sobre la morfología de los polímeros de EcFtsZ y BsFtsZ	47
Figura 12. Efecto de NPY y B2T sobre la concentración crítica de EcFtsZ y BsFtsZ	49

Figura 13. Efecto de NPY sobre EcFtsZ.....	54
Figura 14. Efecto de NPY sobre distintas concentraciones de EcFtsZ en presencia de GDP.....	57
Figura 15. Efecto de NPY sobre BsFtsZ.....	59
Figura 16. Efecto de NPY sobre distintas concentraciones de BsFtsZ en presencia de GDP.....	61
Figura 17. Efecto in vivo de NPY y B2T sobre la viabilidad bacteriana mediante ensayos de sensibilidad en placas.....	64
Figura 18. Efecto in vivo de NPY y B2T sobre el crecimiento de <i>E. coli</i> K12 y <i>B. subtilis</i>	68
Figura 19. <i>B. subtilis</i> y resistencia a NPY.	69
Figura 20. Morfología celular de <i>E. coli</i> y <i>B. subtilis</i> en presencia y ausencia de NPY y B2T.....	71
Figura 21. Esquema del mecanismo propuesto para la formación de semianillos, anillos y cilindros inducidos por NPY.	78

Abreviaturas

AcP	Acetilfosfato
AcK	Acetato quinasa
Amp	Ampicilina
APS	Persulfato de amonio
BCIP	5-bromo-4-cloro-3- indolil-fosfato
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
DO ₆₀₀	Densidad óptica a 600 nm de longitud de onda
HEPES	Ácido N-(2-Hidroxietil) piperazina-N'-etanosulfónico
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
LDH	Láctico deshidrogenasa
MH	Medio de cultivo Mueller Hinton
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
NBT	Cloruro de nitroblue tetrazolium
PEP	Fosfoenolpiruvato
Pir	Piruvato
PK	Piruvato quinasa

Rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
Spc	Espectinomicina
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamino
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano
2PG	2-fosfoglicerato
3PG	3-fosfoglicerato



Resumen

El aumento de cepas bacterianas patógenas y/o resistentes a antibióticos hace necesario el desarrollo de antimicrobianos con mecanismos y blancos celulares nuevos. Un blanco que ha sido relativamente poco explorado y resulta prometedor es la maquinaria de la división celular o *divisoma*, el cual es indispensable para la supervivencia y propagación bacteriana. Un componente de esta maquinaria y excelente candidato como blanco es FtsZ, una GTPasa altamente conservada que se localiza en el sitio de división y ejerce como andamio para el reclutamiento de las proteínas del *divisoma*. FtsZ polimeriza en la cara interna de la membrana citoplasmática para formar el llamado anillo Z, cuya localización y formación se encuentra estrictamente regulada, dada su gran importancia en la división celular. En este trabajo se informa el efecto de dos moléculas clasificadas como diaril cetonas, NPY y B2T, que inhiben la polimerización *in vitro* de FtsZ de *E. coli* (EcFtsZ) y de *B. subtilis* (BsFtsZ). Los resultados indican que ambas moléculas se unen al polímero de FtsZ y no al monómero. NPY es mejor inhibidor que B2T, tanto de la polimerización de ambas proteínas, generando polímeros más cortos, como del crecimiento de *B. subtilis*. NPY induce la polimerización *in vitro* de EcFtsZ-GDP y BsFtsZ-GDP, para formar filamentos cortos y curvos, anillos y semianillos, que se agrupan para formar cúmulos y estructuras cilíndricas de anillos apilados en el caso

de la proteína de *B. subtilis*. *In vivo*, los compuestos afectan en distinta medida sólo a *B. subtilis*, induciendo la formación de esporas y minicélulas. Estos resultados son compatibles con una conducta de NPY de tipo bacteriostática. Probablemente la insensibilidad de *E. coli* a los compuestos se debe a la impermeabilidad de la membrana externa.

Abstract

The increment of pathogenic and/or antibiotic resistant bacterial strains, require the development of antimicrobial agents with new mechanisms and cellular targets. A target that has been relatively poorly explored is the machinery of cell division or *divisome*, which is indispensable for the survival and propagation of bacteria. One component of this machinery and an excellent candidate as a target is FtsZ, a highly conserved GTPase protein. FtsZ polymerizes in the middle of the bacterial cell on the inner face of the cytoplasmic membrane forming the Z ring that is a scaffold for the recruiting of the *divisome* proteins at the division site. The Z ring formation is strictly regulated, space and temporarily, due to its great importance for cell division. In this work, we report the inhibitory effect of two diaryl ketone molecules, NPY and B2T, over the *in vitro* polymerization of *E. coli* FtsZ (EcFtsZ) and *B. subtilis* FtsZ (BsFtsZ). The results showed that both compounds bind to the FtsZ polymer and not to the monomer. NPY is a better inhibitor of FtsZ polymerization than B2T, generating shorter polymers. NPY induced the *in vitro* polymerization of EcFtsZ-GDP and BsFtsZ-GDP to form short and curved filaments, rings and half-rings, which form clusters and cylindrical structures of stacked rings in the case of BsFtsZ. *In vivo* both inhibitors affect *B. subtilis* growth to a different extent behaving as bacteriostatic, inducing the formation of spores and minicells. Probably the

insensitivity of *E. coli* to the compounds is due to the impermeability of the outer membrane.

Introducción

1. Antecedentes.

La necesidad de nuevos antibióticos, pese a no ser nueva, se ha hecho crítica durante la última década, debido al problema de salud pública a nivel mundial que representan las infecciones bacterianas. Cada año mueren alrededor de 14,9 millones de personas por enfermedades de este tipo, y a pesar de que muchas de éstas son prevenidas mediante vacunas y existe una serie de antibióticos clínicamente probados y eficaces en uso, el desarrollo de resistencia por parte de las bacterias es prácticamente inevitable, razón que hace urgente el desarrollo de nuevos antibióticos con nuevos mecanismos de acción y blancos novedosos (Morens y cols., 2004; Walsh y Wencewicz, 2016). Así, el problema de la resistencia a antibióticos ha sido comparado con la crisis del cambio climático mundial en términos de consecuencias e impacto sobre la vida humana en la tierra.

La alta tasa de replicación del DNA y de división celular de las bacterias (ej. 20 minutos para bacterias gastrointestinales) sumada a la frecuencia de mutaciones en el DNA (un error de la DNA polimerasa por cada 10^6 pares bases en un genoma pequeño) deriva en que las bacterias mutantes son abundantes. Si a lo anterior le sumamos la transferencia genética horizontal

dado por elementos genéticos móviles (ej. plásmidos y transposones), se hace más entendible el que las bacterias sean altamente sensibles a cambios en su medio ambiente y presenten una gran capacidad adaptativa frente a presiones selectivas. A estos mecanismos genéticos se suman mecanismos moleculares que contribuyen a la resistencia, como la modificación de porinas, inducción de bombas de eflujo, modificación del blanco y presencia de enzimas desactivantes del antibiótico (Walsh y Wencewicz, 2016).

Un problema serio en el uso de antibióticos es la alta resistencia de las bacterias Gram negativas, respecto a las Gram positivas, debido a que estas presentan una doble membrana entre la cual se encuentra una delgada capa de peptidoglicano. La membrana externa parece ser la que contribuye mayormente a la impermeabilidad para el paso de los antibióticos al interior de la célula (Delcour, 2009; Zgurskaya y cols., 2015). En este punto, es importante mencionar que las enterobacterias son Gram negativas y en el último tiempo se ha observado que mutantes de estas producen patologías que han llegado a causar alarma pública, como es el caso de la bacteria *E. coli* enterohemorrágica (Nguyen y Sperandio, 2012).

Es así que la resistencia a los antibióticos ha aumentado en forma significativa durante los últimos 25 años, como lo muestra el aumento de la incidencia de *S. aureus* (MRSA) y el aumento de la resistencia a vancomicinas en *enterococci* y a fluoroquinolonas en infecciones por *pseudomonas* (Walsh y Wencewicz, 2016).

2. Antibióticos inhibidores de la división bacteriana.

Primero haremos un análisis de la acción de antibióticos sobre el crecimiento bacteriano y posteriormente nos centraremos en el análisis de los inhibidores de la división bacteriana, para finalizar nuestro análisis con la acción de inhibidores sobre la formación del anillo de FtsZ de la maquinaria de la división bacteriana.

Los principales antibióticos tienen como blanco 5 clases de mecanismos bacterianos: 1. Biosíntesis de la pared bacteriana; 2. Biosíntesis de proteínas; 3. Síntesis macromolecular (DNA, RNA) y del metabolismo; 4. Ruta biosintética del folato (DNA) y 5. Función de la membrana.

2.1 Inhibidores de la síntesis de peptidoglicano.

El primer mecanismo mencionado tiene directa relación con la división bacteriana al inhibir las últimas etapas en la síntesis de peptidoglicano llevado a cabo por el divisoma. Entre estos antibióticos cabe destacar la penicilina, la cual inhibe a las PBPs; la vancomicina, que inhibe el entrecruzamiento de los pentapéptidos del peptidoglicano en formación, debilitando la estructura de éste, y la bacitracina, que inhibe el transporte del undecaprenil fosfato hacia el citoplasma cortando el ciclo del transporte de los azúcares unidos al pentapéptido en el lípido II (undecaprenil-pirofosforil-disacárido-pentapéptido) para la síntesis de la pared de peptidoglicano (Barreteau y cols., 2008). Para ilustrar el mecanismo de acción de estos antibióticos en la división bacteriana, se muestra un esquema de ésta en la figura 1. En este esquema podemos distinguir dos etapas principales, primero la formación del protoanillo, es decir,

el anillo Z unido a la membrana interna, hacia el lado del citoplasma, a través de FtsA y ZipA, y en segundo lugar la formación de la maquinaria de síntesis de peptidoglicano en el espacio periplasmático.

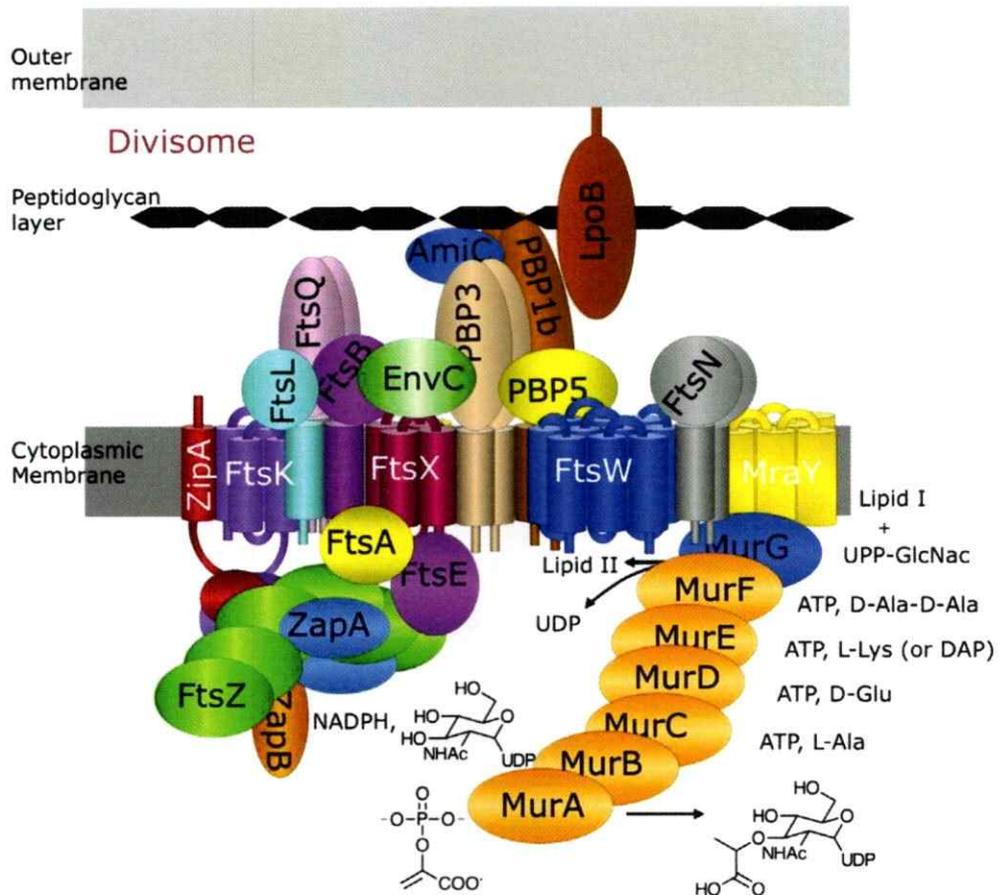


Figura 1. Esquema de la maquinaria de división y los procesos adyacentes que se encuentran asociados a ésta. En el proceso de división se distinguen 2 etapas principales: la formación del protoanillo (FtsZ, FtsA y ZipA) en la cara citoplasmática de la membrana interna, destacado en verde (anillo Z), y la formación del complejo multiproteico para la síntesis de peptidoglicano (FtsEX, FtsK, FtsQBL, FtsW, PBP3 y FtsN) en el periplasma. El complejo FtsX-EnvC-AmiC produce la ruptura de la pared de peptidoglicano en el sitio de septación. En la figura también se incluye la vía de síntesis del lípido II (proteínas Mur y sus sustratos). El lípido II se utiliza para la síntesis de peptidoglicano. Por último, se muestra la proteína encargada de la invaginación de la membrana externa (LpoB) (den Blaauwen y cols., 2014).

2.2 Inhibidores de FtsZ, proteína inicial de la división celular.

Al menos 30 compuestos han sido descritos como inhibidores de FtsZ (den Blaauwen y cols., 2014) y ellos han sido clasificados en 7 grupos de acuerdo a su estructura, de los cuales los que contienen un grupo derivado de indol parecen ser los más efectivos. Dentro de esta clasificación cabe destacar algunos heterociclos, entre los que sobresale el compuesto PC190723 por su alta afinidad a FtsZ (Anderson y cols., 2012). Es importante hacer notar la naturaleza heterocíclica de estos inhibidores, pues en este trabajo de tesis se caracterizarán los compuestos heterocíclicos (1,4-dihidroxi-naftalen-2-il) (1H-pirrol-2-il) metanona (NPY) y (2,5-dihidroxifenil) (tiofen-2-il) metanona (B2T), recientemente sintetizados (Benites y cols. 2011), que pertenecen a las denominadas series N y B (figura 2). En un trabajo reciente del laboratorio se caracterizaron los compuestos de la serie N, que corresponden a dihidroxinaftil cetonas con diferentes heterociclos, para analizar su efecto inhibitor sobre la polimerización de tubulina (Gutiérrez y cols., 2015). Además, se evaluó su potencial uso como antitumorales utilizando células normales como control y cancerosas de próstata, vejiga y mama (Benites y cols., 2016). Este trabajo es importante porque demostró que los compuestos ensayados no tenían efecto sobre las células utilizadas, excepto NTB, aunque ellos mostraron un efecto inhibitorio sobre la polimerización de microtúbulos (Gutiérrez y cols., 2015). Para evaluar la especificidad del efecto inhibitor de la naftoquinona en NPY sobre el ensamblaje del anillo Z, en este trabajo se utilizará también el compuesto B2T que corresponde a una benzoquinona de la serie B (Benites y

cols., 2011). Con estos antecedentes, parece importante caracterizar la inhibición del crecimiento bacteriano por los compuestos antes señalados, al contar con este control que habitualmente no se utiliza cuando se ensaya la actividad de nuevos potenciales antibióticos, olvidándose de su efecto sobre las células del huésped. Nos parece pertinente mencionar que en este trabajo utilizaremos *E. coli* (modelo de estudio de Gram negativas) como blanco de acción de los compuestos antes mencionados. Sin embargo, como se indicó anteriormente, no hubo una correlación directa entre el efecto inhibitor de los compuestos sobre la polimerización *in vitro* de los microtúbulos y su acción *in vivo* sobre células, mostrando que el transporte de ellos hacia el interior de la célula es importante. Por esta razón, para obviar el efecto de la membrana externa en *E. coli* se utilizará *B. subtilis* (modelo de estudio de Gram positivas).

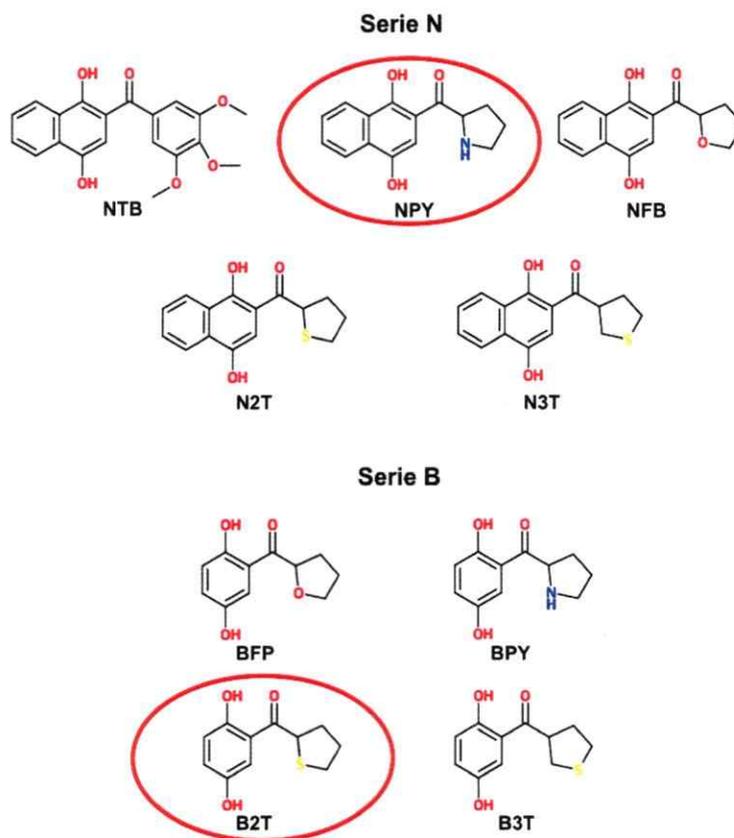


Figura 2. Estructuras químicas de los compuestos de la serie N (dihidroxi-naftil aril cetonas) y de la serie B (dihidroxi-bencil aril cetonas). Estructuras químicas de los compuestos de la serie N (dihidronaftil aril cetonas) y de la serie B (dihidroxi-bencil aril cetonas). Destacan en rojo NPY (253,26 g/mol) y B2T (220,25 g/mol).

3. FtsZ como blanco de acción de los inhibidores NPY y B2T.

En el diseño de nuevos antibióticos ha sido muy importante contar con la estructura tridimensional de las proteínas blanco, en este caso de FtsZ. Desafortunadamente, no se cuenta con la estructura cristalográfica de FtsZ de *E. coli* (EcFtsZ). Para solucionar este inconveniente se utilizó el modelo de EcFtsZ construido en el laboratorio (Poblete, 2012 y Garcés, 2007), tanto para el monómero como para el dímero utilizado como análogo del polímero de FtsZ.

Lo mismo se hizo para el dímero de FtsZ de *B. subtilis* (BsFtsZ), a partir de la estructura cristalográfica del monómero de BsFtsZ (Löwe y cols., 2007). Al utilizar los modelos de EcFtsZ y BsFtsZ y con estos hacer un *docking* molecular para los compuestos que poseen el grupo naftol (compuestos de la serie N) (Poblete, 2012; Escalona, resultados no publicados), sobresalen las interacciones de N2T (análogo de B2T) y de NPY con ambas proteínas en sus formas monoméricas y diméricas. Así, se observa que la unión de estos compuestos está en el rango μ molar (1-10 μ M) bajo para BsFtsZ y en el rango alto (10-200 μ M) para EcFtsZ. Además, se encuentra que con EcFtsZ hay un orden de magnitud de mayor afinidad para NPY respecto de N2T. No así para BsFtsZ, donde la unión de ambos compuestos es muy similar. En resumen, la presencia del grupo pirrol en NPY, respecto al grupo tiofen en N2T, muestra que el grupo NH del grupo pirrol aumenta la afinidad por alrededor de un orden de magnitud para EcFtsZ, indicando que estos compuestos son buenos candidatos para la inhibición del crecimiento bacteriano. Desgraciadamente no se hicieron los estudios bioinformáticos para los compuestos derivados de dihidroxifenilo (serie B).

4. Efecto *in vivo* de inhibidores de la división bacteriana.

Es importante señalar que para probar la susceptibilidad bacteriana a nuevos compuestos inhibidores del crecimiento bacteriano, con potencial aplicación como antibióticos, es necesario seguir protocolos estrictos que norman las

condiciones de cultivo, los medios, la preparación de las soluciones en que se disuelven los antibióticos y las diluciones necesarias para probar la efectividad de estos. De este modo, se logra reproducibilidad y la evaluación de la efectividad del nuevo inhibidor respecto a otros ya probados. En nuestros trabajos utilizamos las normas indicadas por *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved standard* (2009). Brevemente, se puede decir que estos métodos indican como pruebas esenciales construir curvas de crecimiento en los medios indicados, determinar la concentración mínima inhibitoria mediante la cuantificación de unidades formadoras de colonias (ufc), evaluar la formación de halos de inhibición, y su efecto sobre la morfología celular. Estos métodos fueron aplicados para la evaluación del compuesto PC190723 (Haydon y cols. 2008). En este trabajo es importante destacar que el efecto del compuesto produjo filamentación celular, como consecuencia directa de la inhibición de la división bacteriana, al bloquear la formación del anillo Z. La filamentación bacteriana también se ha observado al probar el efecto inhibitor de varios compuestos sobre diferentes bacterias (Li y Ma, 2015). Aunque este criterio no es concluyente para evaluar la inhibición de la formación del anillo Z, es importante para descartar otro blanco de acción. En rigor, para otorgar la categoría de antibiótico al inhibidor es necesario hacer pruebas con animales infectados con patógenos, ya sean Gram positivos o Gram negativos, y evaluar la erradicación de la infección, como se hizo con el compuesto PC190723 (Haydon y cols. 2008). Una vez establecida su acción antibiótica, para dilucidar el mecanismo de inhibición, en el caso de FtsZ, se

debe probar su efecto sobre la polimerización y la actividad GTPásica.

5. Efecto *in vitro* y mecanismo molecular de inhibidores de FtsZ.

Entre los inhibidores de FtsZ, que como ya se mencionó son alrededor de 30, existen varios mecanismos de inhibición. De acuerdo a esto, los inhibidores se clasifican en tres tipos. Tipo 1: Moléculas inhibitoras que actúan previniendo la asociación de los monómeros de FtsZ, mediante el bloqueo del sitio de unión de GTP o de otro sitio de la interfase. Ejemplos de este tipo de inhibidores son los análogos de GTP con sustitución en C8 (Läppchen y cols. 2008) y CCR-11 (Singh y cols. 2012). Tipo 2: Moléculas que estabilizan los protofilamentos o promueven la formación de manojos de protofilamentos, lo cual inhibe también la actividad GTPásica. Dentro de este grupo encontramos al DAPI (Nova y cols., 2007), al grupo de las zantrinas (Margalit y cols. 2004) y a PC190723 (Haydon y cols., 2008). Tipo 3: Moléculas que interfieren con alguna de las muchas interacciones de FtsZ con otras proteínas esenciales de la división celular. De este tipo de inhibidores podemos mencionar al grupo de los carboxibencilindoles, los cuales inhiben la interacción de FtsZ con ZipA (Sutherland y cols. 2003).

Se sabe que tubulina tiene sitios de interacción para diferentes ligandos, entre los que destacan los sitios para taxol, para vinblastina y para colchicina, más el sitio del nucleótido (Fanale y cols., 2015), el cual se encuentra ubicado en el dominio N-terminal de tubulina y también en el de FtsZ (Nogales y cols., 1998;

Löwe y Amos, 1998). Lo mismo ocurre para el compuesto PC190723, que se une a FtsZ en un sitio homólogo al del taxol en tubulina (Andreu y cols. 2010). En un estudio de nuestro laboratorio se encontró un sitio común para DAPI en tubulina y FtsZ, al igual que el sitio del nucleótido en ambas proteínas. Todos los antecedentes antes mencionados en su conjunto permiten plantear la siguiente hipótesis.

6. Hipótesis.

La similitud del efecto inhibitor de DAPI en tubulina y FtsZ, permite predecir que los compuestos derivados de fenstatina que se unen a tubulina deberían también unirse a FtsZ de *Escherichia coli* (EcFtsZ) y de *Bacillus subtilis* (BsFtsZ) e inhibirlas.

7. Objetivos.

7.1. Objetivo General.

- Encontrar inhibidores adecuados para FtsZ, a partir de compuestos derivados de fenstatina, que tengan un efecto menor sobre la polimerización de tubulina.

7.2. Objetivos Específicos.

- Determinar la solubilidad y estabilidad de los compuestos.
- Determinar y comparar *in vitro* el efecto de los compuestos sobre la polimerización de FtsZ (efectos sobre la concentración crítica, el tiempo

de permanencia de los polímeros en el estado estacionario y la morfología de los polímeros) y tubulina. Obtener el valor de I_{50} de cada compuesto, respecto a su inhibición sobre FtsZ.

- Determinar y comparar *in vitro* el efecto de los compuestos sobre la actividad GTPásica de FtsZ y tubulina al polimerizar.
- Determinar la viabilidad y morfología de las células de *E. coli* y *B. subtilis* en presencia de los compuestos.

Materiales y Métodos



1. Materiales.

1.1. Reactivos.

Ampicilina, cloruro de potasio, cloruro de sodio, cloruro de calcio, sulfato de amonio, cloruro de magnesio hexahidratado, isopropanol, fosfato monobásico de potasio, fosfato dibásico de potasio, hidróxido de potasio, ácido clorhídrico, glicerol, dimetilformamida, solución de glutaraldehído 25 % y etanol pro análisis adquiridos en Merck (Alemania). BSA (albúmina de suero bovino), piruvato quinasa de músculo de conejo, láctico deshidrogenasa de músculo de conejo, persulfato de amonio, azul de coomasie R-250, espectinomicina, glutamato sal sódica, PEP (ácido 2-[fosfonoxil] 2-propenoico sal de monociclohexilamonio), Piruvato (ácido fosfoenolpirúvico sal de sodio), GTP sal sódica, GDP sal sódica, DMSO, TEMED, EDTA, NBT, yoduro de propidio y anticuerpo anti conejo conjugado a fosfatasa alcalina hecho en cabra obtenidos de Sigma (E.E.U.U). Tween 20 y glicerol provenientes de Winkler (Chile). Ácido acético, etanol y metanol de grado técnico se obtuvieron de TCL (Chile). Medio de cultivo LB adquirido en Mo Bio Laboratories (E.E.U.U). Agar, medio de cultivo Mueller Hinton y kit de tinción obtenido de Gram de Difco laboratories (E.E.U.U). BCIP, HEPES y IPTG obtenido de US Biological (E.E.U.U). TRIS obtenido de

Umresco Inc (E.E.U.U). MES adquirido en Phyto Technology laboratories (E.E.U.U). La solución de 40 % de acrilamida/bis (37,5:1) se obtuvo de BIORAD. Las bolsas de diálisis se obtuvieron de Spectrum (E.E.U.U). En los experimentos se usó agua nano pura (resistividad >17 MΩ-cm). Las grillas de microscopia electrónica de cobre recubiertas con carbón de 400 *mesh* se obtuvieron de Ted Pella, Inc.

1.2. Soluciones.

Amortiguador A: Tris-HCl 50 mM pH 8, KCl 50 mM, EDTA 1 mM y glicerol 10%.

Amortiguador utilizado en la purificación de EcFtsZ.

Amortiguador TKM: Tris-HCl 50 mM pH 8, KCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM y glicerol 10 % (v/v). Amortiguador utilizado en la purificación de BsFtsZ.

PBS: amortiguador fosfato de sodio 50 mM pH 7,5.

Solución de carga (SDS): amortiguador Tris-HCl 75 mM pH 6,8, glicerol 10% (v/v), SDS 2,5% (p/v), 2-mercaptoetanol 10 mM, azul de bromofenol 0,01% (p/v).

Solución gel concentrador (SDS): Tris-HCl 375 mM, pH 8,8, SDS 0,1% (p/v).

Solución gel separador (SDS): Tris-HCl 138 mM pH 6,8, SDS 0,1% (p/v).

Amortiguador de corrida: Tris 25 mM, Glicina 192 mM y SDS 0,1 %.

Solución tinción Azul de Coomassie: Azul de Coomassie G250 0,3 % (p/v), metanol 50 % (v/v), ácido acético 10 % (v/v).

Solución de desteñido: metanol 50 % (v/v), ácido acético 10% (v/v).

Solución bloqueo immunoblot: Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, leche

descremada comercial al 5 % (p/v).

TBS/Tween: Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, Tween20 0,1%.

Solución de transferencia: Tris 25 mM, glicina 190 mM, metanol 20%.

Solución de revelado inmunoblot: amortiguador FAL (Tris base 100 mM pH 9,5, NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM), BCIP 5 % (p/v) en dimetilformamida al 100 % y NBT 5 % (p/v) en dimetilformamida 70 %.

Solución de verde de malaquita para tinción de esporas: verde de malaquita 0,5 % (p/v) solución acuosa.

1.3. Anticuerpos.

Se utilizó como anticuerpo primario un anticuerpo policlonal hecho en conejo anti FtsZ de *E. coli* para detectar FtsZ en los inmunoblots. Este anticuerpo se utilizó para visualizar tanto EcFtsZ como BsFtsZ, ya que reconoce a ambas proteínas, pero con menor intensidad de la reacción colorimétrica para BsFtsZ. Como anticuerpo secundario, se utilizó un anticuerpo anti conejo conjugado con fosfatasa alcalina hecho en cabra.

1.4. Cepas bacterianas y plásmidos.

1.4.1 Cepas de bacterias.

1.4.1.1. *E. coli* DH10B: utilizada comúnmente para replicar y purificar plásmidos y clonar fragmentos de DNA, debido a su deficiencia en endonucleasas y ausencia de recombinación. En esta tesis se utilizó para sobreexpresar BsFtsZ, debido a que se necesitaba una cepa *WT* (Wang y Lutkenhaus, 1993).

Genotipo: F⁻ mcrA Δ (mrrhsdRMS-mcrBC) Φ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 endA1 araD139 Δ (ara leu) 7697 galU galK rpsL nupG λ ⁻ (Casadaban y Cohen, 1980)

1.4.1.2. *E. coli* BL21 (DE3): utilizada para sobreexpresar proteínas recombinantes. En este trabajo se utilizó para la sobreexpresión de EcFtsZ. Genotipo: F⁻ ompT hsdSB (rB⁻, mB⁻) gal dcm (DE3) (Studier y Moffatt, 1986).

1.4.1.3. *E. coli* K12, *B. subtilis*, *C. violaceum*, *E. aerogenes*, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis*, *S. thyphimurium*, *Serratia* sp. y *S. aerus*. Cepas WT obtenidas a partir del Laboratorio de Docencia de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

1.4.2. Plasmidios. PMFV57. Vector utilizado para la sobreexpresión de EcFtsZ en *E. coli*. Corresponde a un derivado de PMFV56, el cual es un pET-28a que contiene el gen ftsZ de *E. coli*, con resistencia a ampicilina y es inducible por IPTG (Rivas y cols., 2000). pBS58. Vector de bajo número de copias utilizado durante la sobreexpresión de BsFtsZ en *E. coli*, que contiene los genes ftsA, ftsQ y ftsZ de *E. coli*, necesarios para la viabilidad bacteriana. Otorga resistencia a espectinomicina (spc) (Wang y Lutkenhaus 1993). pCXZ. Vector pTac que contiene el gen ftsZ de *B. subtilis*, con resistencia a ampicilina e inducible por IPTG (Wang y Lutkenhaus 1993).

1.5. Medios de cultivo.

Se utilizaron los medios de cultivo Luria-Bertani (LB) y Mueller Hinton (MH). Para preparar 1 L de LB líquido se disolvieron 25 g de LB en 1 L de agua destilada y para preparar 1 L de MH líquido, se disolvieron 21 g de MH. Una vez

preparados, los medios de cultivos se autoclavaron para esterilizarlos. Al momento de su utilización se le agregó el antibiótico (ampicilina o ampicilina/espectinomina), a una concentración final de 100 µg/mL. Para preparar medio de cultivo sólido (placas de petri), por cada 300 mL de medio de cultivo líquido se agregó 5 g de bacto agar. Para preparar el agar blando utilizado en los céspedes bacterianos, por cada 100 mL de medio de cultivo líquido se agregó 0,75 g de bacto agar.

2. Métodos.

2.1. Caracterización fisicoquímica de los compuestos.

La caracterización de los compuestos se realizó mediante espectrofotometría.

2.1.1. Espectros de absorbancia y determinación del coeficiente de extinción molar. Cada uno de los compuestos se pesó de manera exacta y se solubilizó en DMSO a una concentración conocida, esta se utilizó como solución *stock*. A partir de esta solución se hicieron diluciones en DMSO, a las cuales se les midió el espectro de absorción entre 190 y 820 nm en un espectrofotómetro con arreglo de diodos Hewlett-Packard 8452A. Una vez obtenidos los espectros de cada compuesto, estos se analizaron para determinar y graficar los valores de absorbancia de los máximos obtenidos versus las distintas concentraciones de compuesto. A partir de estos puntos se obtuvo una recta, cuya pendiente corresponde al coeficiente de extinción molar para el compuesto a la longitud de onda en que se encuentra el máximo.

2.1.2. Solubilidad y estabilidad. Se determinó la concentración máxima en la que los compuestos se mantienen solubles en medio acuoso, para así delimitar el rango de concentraciones a usar en los diferentes ensayos. Para esto se obtuvo el espectro de absorbancia de cada compuesto a distintas concentraciones en la solución amortiguadora de polimerización. A partir de los espectros obtenidos se identificó la concentración máxima de compuesto a la cual se sigue manteniendo lineal la relación entre la absorbancia y concentración del compuesto, la cual corresponde al máximo de solubilidad. La estabilidad de los compuestos se determinó midiendo los espectros de absorbancia de una misma solución de compuesto en DMSO a distintos tiempos (entre 0 y 24 horas).

2.2. Purificación de EcFtsZ y BsFtsZ..

La proteína EcFtsZ se sobreexpresó en la cepa *E. coli* BL21 (DE3), la cual se transformó con el vector PMFV57, que provee un sistema de transcripción del gen *ftsZ* inducible por IPTG y presenta resistencia a ampicilina. La proteína BsFtsZ se sobreexpresó en la cepa *E. coli* DH10B, la cual se transformó con los vectores pCXZ y pBS58. EL vector pCXZ corresponde a un plasmidio de alto número de copias que expresa el gen *bsftsZ* y la resistencia a ampicilina, inducible por IPTG. El vector pBS58 corresponde a un plasmidio de muy bajo número de copias que expresa los genes *ftsQAZ* de *E. coli*, necesarios para la viabilidad de la bacteria durante la sobreexpresión de BsFtsZ, y le otorga resistencia a espectinomicina (Wang y Luktenhaus, 1993).

2.2.1. Electrotransformación de *E. coli* BL21 (DE3) y DH10B. Se tomó un volumen de 25 μL de bacterias electrocompetentes, al cual se le agregó 5 μL del (o los) plasmidio(s), requeridos en cada caso. El protocolo de electroporación usado corresponde al de *E. coli*, para una cubeta de 2 mm, 2,5 kVolts, 25 μF y 200 Ω , y el equipo utilizado fue el GenePulser Xcell de Bio-Rad. Las bacterias se incubaron alrededor de 45 minutos en 1 mL de medio de cultivo LB después del pulso, con agitación orbital a 150 rpm a 37 °C y luego se sembraron en placas LB/amp o LB/amp/spc, dependiendo el caso, para seleccionar las células que presentaran la(s) resistencia(s) otorgada por el (los) plasmidio(s). Para todos los casos, los antibióticos se utilizaron a una concentración final de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

2.2.2. Ensayo de inducción. Se seleccionaron al menos 4 clones transformantes a los cuales se les realizó un ensayo de sobreexpresión de la proteína de interés. Para este ensayo, los clones elegidos fueron crecidos en medio de cultivo con antibiótico toda la noche (overnight). Posteriormente se tomó un volumen de 100 μL de cada cultivo overnight y se inoculó, con cada uno, 5 mL de medio fresco LB con antibiótico, el cual se creció en agitación a 37 °C hasta una $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 0,5 - 0,6. Al alcanzar la DO señalada, se agregó IPGT a una concentración final de 0,5 mM y los cultivos se continuaron creciendo a 37 °C con agitación por aproximadamente 3 horas. Después, se tomó 1 mL de cada cultivo inducido y se centrifugó por 5 minutos a 14.000 rpm en una microfuga Eppendorf para cosechar las bacterias. Se descartó el sobrenadante y el precipitado bacteriano se lavó 2 veces con 1 mL de PBS. Se lavó una última

vez con 1 mL de agua nanopura. El precipitado resultante se suspendió en 100 μ L de amortiguador de carga y se llevó a 95 °C por 5 minutos. A continuación cada muestra se analizó por SDS-PAGE (protocolo en 2.4). El gel se tiñó con Azul de Coomassie por al menos una hora y se lavó con solución de desteñido para visualizar la banda correspondiente a la proteína y de esta manera seleccionar el clon que tuviese una mejor expresión de la misma.

2.2.3. Sobreexpresión de FtsZ. Una vez seleccionado el clon que mejor sobreexpresó la proteína, éste se creció overnight con agitación a 37 °C. Se tomó 1 mL de éste cultivo y se agregó a un litro de medio de cultivo LB fresco (4 litros de LB en total), con su respectivo antibiótico, y se incubó con agitación a 37 °C hasta que el cultivo alcanzó una DO_{600} de 0,6. Luego, se agregó IPTG a una concentración final de 0,5 mM y se mantuvo 3 horas con agitación a 37 °C. Las bacterias se cosecharon por centrifugación en un rotor GSA en una centrifuga Sorval a 4 °C a 10.000 rpm por 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y el precipitado bacteriano se homogenizó en 40 mL de amortiguador A, en el caso de EcFtsZ, o en amortiguador TKM, en el caso de BsFtsZ. Las bacterias en solución se sonicaron, para lo cual se utilizó un programa correspondiente a 6 ciclos de 20 segundos a 6,0 Watts con 20 segundos de intermedio. El resultante del sonicado se ultracentrifugó durante 90 minutos a 4 °C y 100.000 x g para precipitar restos celulares membranosos y ribosomas. Se extrajo el sobrenadante y se agregó sulfato de amonio a saturación al 30%, solución que se mantuvo con agitación durante 20 minutos y se centrifugó a 10.000 x g a 4 °C durante 30 minutos. El sobrenadante

resultante se eliminó rápidamente y el sedimento se homogenizó en 5 mL de amortiguador A o TKM, dependiendo la proteína purificada. La solución obtenida se dializó contra el amortiguador respectivo con agitación a 4 °C para eliminar restos de sulfato de amonio. Luego, se centrifugó el dializado a 4 °C a 10.000 x g durante 30 minutos para eliminar posibles agregados de proteína. El sobrenadante obtenido se sometió a 3 ciclos de polimerización-despolimerización, los cuales serán explicados a continuación.

2.2.4. Purificación por ciclos de polimerización. El ciclo comienza al agregar el dializado (5 mL aproximadamente) a una solución de 15 mL para formar la mezcla de reacción de polimerización (Mes 50 mM pH 6,5, MgCl₂ 10 mM, CaCl₂ 10 mM, glutamato 1 M y GTP 2 mM) a temperatura ambiente. Esta mezcla de reacción se incubó a 37 °C durante 30 minutos, donde se formó una solución tipo gel altamente viscosa producto de la polimerización. Posteriormente se centrifugó a 10.000 x g a 25 °C durante 30 minutos. El sobrenadante se descartó, mientras que el sedimento se homogenizó en 5 mL de amortiguador A o TKM en hielo, para inducir la despolimerización por baja temperatura y dilución del GTP, y se centrifugó a 10.000 x g durante 30 minutos, para eliminar los agregados de proteína que no despolimerizan. El sobrenadante obtenido se mezcló con solución de polimerización para comenzar un nuevo ciclo. Se realizaron en total 3 ciclos. Luego, la proteína resultante se dializó y se guardó a -80 °C en alícuotas de 100 µL hasta su uso. De cada etapa se tomaron muestras, y a estos testigos se analizaron por SDS-PAGE e inmunoblot (no se muestran).

2.3. Purificación de tubulina.

El heterodímero de α/β -tubulina se purificó partir de cerebros de pollo mediante el método utilizado en el laboratorio, basado en el método de Weisenberg (Weisenberg y col., 1968) y modificado de Monasterio y Timasheff (1987).

2.4. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE).

Se utilizó acrilamida al 12 % en el gel separador y 4 % en el concentrador. Las muestras se disolvieron en solución de carga, se incubaron a 95 °C por 5 minutos y se cargaron en los pocillos del gel. La electroforesis se hizo a un amperaje constante de 60 mA durante una hora. Los geles se tiñeron con Azul de Coomasie o se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa para realizar western blots.

2.5. Inmunoblot (Western blot).

La transferencia de las proteínas desde el gel de poliacrilamida a la membrana de nitrocelulosa se realizó mediante electrotransferencia. Para esto se utilizó un voltaje fijo de 100 V y un amperaje variable máximo de 400 mA durante 90 minutos a -20 °C. Una vez transferidas las proteínas a la membrana de nitrocelulosa, esta se bloqueó durante toda la noche a 4 °C. Luego, para visualizar EcFtsZ y BsFtsZ, se incubó con el anticuerpo primario (anti-EcFtsZ) en un volumen de 5 mL de solución de bloqueo (título 1:10.000) durante 2 horas con agitación a 37 °C. Posteriormente la membrana se lavó 3 veces por 10 minutos con agitación con TBS/Tween y se incubó con el anticuerpo secundario

en solución de bloqueo por 1 hora con agitación a 37 °C. Se lavó nuevamente 3 veces con TBS/Tween. En todos los casos se reveló por un método colorimétrico mediante fosfatasa alcalina, para lo que se agregaron 33 µL de BCIP y 66 µL de NBT en 10 mL de amortiguador FAL y se agitó hasta la visualización de las bandas. La reacción se detuvo diluyendo con agua nanopura.

2.6. Ensayos de viabilidad y morfología bacteriana.

Se realizaron tres tipos de ensayos *in vivo* para determinar el efecto de los compuestos sobre las bacterias.

2.6.1. Halos de inhibición. Se analizó el efecto de los compuestos, NPY y B2T, sobre el crecimiento en placa de *E. coli* K12, *B. subtilis*, *C. violaceum*, *E. aerogenes*, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis*, *S. thyphimurium*, *Serratia* sp. y *S. aerus* mediante ensayos de sensibilidad en placas. Para esto se tomó un inóculo de 300 µL de cada cepa en medio de cultivo Mueller-Hington (MH) a una DO_{600nm} de 0,3 y se agregó a 5 mL de agar blando MH. La mezcla se agitó rápidamente y se vertió en una placa de Petri sobre 20 mL de agar sólido MH. Una vez que el agar solidificó en la placa, se agregaron 5 µL con diferentes cantidades del compuesto en DMSO, en distintas zonas de la placa. Se agregaron además los controles (DMSO como control negativo, el antibiótico minociclina como control positivo y agua). Las placas se dejaron a 37 °C por 5-6 horas y luego se analizaron los halos de inhibición. Para determinar la efectividad del compuesto se relacionó la ausencia o presencia de halo (y su diámetro, en los casos en

que fue posible y pertinente medirlo) con la cantidad de compuesto utilizado.

2.6.2. Efecto de los compuestos sobre el crecimiento y morfología bacteriana.

Para determinar el efecto de los compuestos sobre el crecimiento *B. subtilis* y *E. coli* K12, estas cepas se crecieron en medio de cultivo líquido MH en presencia y ausencia del compuesto. Para ello, se inocularon 5 mL de MH con un cultivo *overnight* de cada cepa y al alcanzar una $DO_{600nm} = 0,6$, se diluyeron hasta una $DO_{600nm} = 0,1$ y posteriormente se dividieron en varios cultivos de 5 mL, en donde se probaron diferentes concentraciones de los compuestos y dos de ellos correspondieron a los controles (en ausencia del compuesto, con y sin DMSO). Cada condición experimental se distribuyó por sextuplicado en una placa de Elisa de 96 pocillos, en volúmenes de 250 μ L y los cultivos se crecieron en agitación a 37 °C en un espectrofluorímetro de placas con módulo de absorbancia modelo TECAN Infinite M200 PRO y se midió la DO_{600nm} de manera automática cada 15 minutos durante 24 horas. A los 6 pocillos, empleados por condición se les midió la DO y 3 se utilizaron para tomar muestras de 50 μ L a distintos tiempos. Las bacterias de las muestras se fijaron con glutaraldehído al 0,75% y se montaron 5 μ L en un portaobjetos con agarosa 1% para ser observadas mediante microscopía de campo claro. Además, se realizaron 3 tinciones distintas: 1) tinción de yoduro de propidio, para visualizar el material genético de las bacterias. 2) tinción de Gram, para visualizar la morfología bacteriana tiñendo el peptidoglicano y colaborar con la identificación y diferenciación de esporas y minicélulas de otros artefactos. 3) tinción de verde de malaquita, para diferenciar esporas, ya que sólo estas se tiñen con el reactivo y adquieren gran

birrefringencia. Para teñir con yoduro de propidio, las bacterias fijadas se lavaron con 1 mL de PBS. Luego, se solubilizaron en 1 mL de PBS y se agregó 10 μ L de yoduro de propidio 10 mg/mL en PBS, se incubó en hielo por 15 minutos, para luego centrifugar y solubilizar en un volumen final de 50 μ L. Las bacterias se montaron en un portaobjetos con agarosa 1% y se observaron mediante microscopía de fluorescencia. La tinción de Gram se realizó de acuerdo a las indicaciones del fabricante del kit utilizado (Difco) y la tinción de esporas según lo indicado por la American Society for Microbiology (Hussey y Zayaitz, 2007).

2.7. Polimerización de EcFtsZ y BsFtsZ.

Para determinar el efecto de los compuestos sobre la polimerización de FtsZ se utilizó la técnica de light scattering. Para ello se midió la dispersión de luz a 350 nm de los polímeros formados en presencia de éstos (Mukherjee y Lutkenhaus, 1999). La dispersión de luz se midió en un espectrofluorímetro Perkin Elmer LS iluminando con una longitud de onda de 350 nm (excitación) y registrando a la misma longitud de onda (emisión), con un ancho de banda de excitación y emisión de 7 nm, y un filtro de 4 % de transmitancia a una temperatura constante de 30 °C. La absorbancia a 350 nm de NPY se mantuvo invariable en el tiempo que duraron los experimentos, indicando la estabilidad de este compuesto frente a la luz de excitación.

2.7.1. Efecto de los compuestos sobre la polimerización inducida por GTP. Se midió la polimerización de FtsZ inducida por GTP en ausencia y presencia de

los compuestos. Para ello, FtsZ se pre incubó a una concentración fija de 12,5 μM en el amortiguador HEPES 50 mM pH 7,2, KCl 50 mM, MgCl_2 10 mM y DMSO 1 %, con el sistema con regeneración de GTP PK/PEP¹ (sustrato PEP a 1 mM). La reacción se inició agregando el compuesto (a distintas concentraciones en los diferentes ensayos) y, luego de volver a estabilizarse la dispersión de luz, se agregó GTP 1 mM y piruvato quinasa (PK), dando inicio a la polimerización. En cada caso se registró una línea base, la cual corresponde a la dispersión de luz luego de agregar el compuesto y previo a la inducción de la polimerización por adición de GTP y PK. Luego de la adición de GTP, se continuó registrando la dispersión de luz hasta la despolimerización de la proteína. A partir de las curvas se obtuvieron los datos de intensidad de dispersión de luz y duración del estado estacionario, en función de las diferentes concentraciones de los compuestos. Con estos valores se analizó el efecto inhibitorio de estas moléculas, determinándose finalmente el I_{50} de cada compuesto.

2.7.2. Efecto de los compuestos sobre la concentración crítica (C_c) El efecto de los compuestos sobre la C_c se determinó mediante ensayos de polimerización a diferentes concentraciones de FtsZ (3, 5, 7,5, 10 y 12,5 μM) en ausencia y presencia del compuesto. La concentración utilizada de cada compuesto correspondió la concentración máxima, la cual corresponde a la solubilidad máxima en medio acuoso determinada en este trabajo. A partir de las cinéticas,

¹ Después de entregar esta tesis, se encontró un efecto del contraión del PEP (ciclohexilamonio) sobre la polimerización de FtsZ, que se está estudiando.

se determinó la diferencia de intensidad de dispersión de luz (el máximo de dispersión menos la línea base) y se graficó en función de la concentración de FtsZ. Los puntos se ajustaron a una recta y de la intersección de ésta con el eje X se obtuvo el valor de la concentración crítica de la proteína.

2.7.3. Efecto de NPY luego de la despolimerización. Se determinó la influencia de la concentración de proteína sobre la polimerización de FtsZ en estado GDP inducida por NPY. Para ello se registró la polimerización de FtsZ a distintas concentraciones en presencia de un exceso de GDP y 32 μM de NPY. Con este propósito, FtsZ se pre incubó en el amortiguador HEPES 50 mM pH 7,3, KCl 50 mM, MgCl_2 10 mM, DMSO 1 % y GDP 2 mM. La reacción se inició agregando el compuesto y se midió hasta que el valor de la dispersión de luz alcanzó un estado estable.

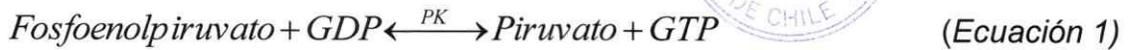
2.7.4. Efecto de Mg^{2+} sobre la polimerización de FtsZ-GDP inducida por NPY. Se determinó si la polimerización de FtsZ inducida por NPY es dependiente de la concentración de Mg^{2+} . Para ello se registró la polimerización de 12,5 y 30 μM de FtsZ con 32 μM de NPY en presencia y ausencia de Mg^{2+} . La proteína se pre incubó en el amortiguador HEPES 50 mM pH 7,3, KCl 50 mM, DMSO 1 % y GDP 2 mM, agregando MgCl_2 (10 mM) o EDTA (1 y 5 mM) de acuerdo a la condición ensayada. La reacción se inició agregando el compuesto y se midió hasta que el valor de la dispersión de luz se mantuvo constante.

2.8. Morfología de los polímeros de FtsZ.

Se determinó el efecto de los compuestos y las diferentes condiciones de polimerización sobre la morfología de los polímeros de FtsZ mediante microscopía electrónica. Para esto, se tomaron muestras de 10 μ L a distintos tiempos durante la polimerización (ej. durante estado estacionario y la despolimerización de FtsZ). La muestra se depositó sobre una grilla, previamente activada durante 30 minutos por UV cercano, se dejó por 1 minuto, se retiró el exceso de muestra con un papel filtro, luego se lavó en 10 μ L de agua nanopura y el exceso se retiró de la misma forma anterior. Se incubó en acetato de uranilo 2 % por 1 minuto, retirando el exceso con papel filtro. Para visualizar los polímeros se utilizó un microscopio electrónico de transmisión PHILIPS TECNAI 12 BIOTWIN del UMA de la PUC. El análisis dimensional de los filamentos se hizo con el software ImageJ.

2.9. Actividad GTPásica de FtsZ.

Se determinó la actividad GTPásica de EcFtsZ y BsFtsZ en presencia de los compuestos mediante el método acoplado a las enzimas piruvato quinasa (*Ec. 1*) y láctico deshidrogenasa (*Ec. 2*) (Ingeman y Nunnari, 2005). Este método, que se basa en las reacciones mostradas a continuación, resulta ser similar al sistema de regeneración utilizado en los ensayos de dispersión de luz, que utiliza la primera reacción señalada como ecuación 1. Esto es favorable, pues hace comparables los ensayos debido a la similitud de las condiciones.



Dado a que el NADH absorbe a 340 nm, se registró la cinética de su oxidación a esta longitud de onda, lo que se observa como una disminución de la absorbancia en el tiempo. Se calculó la velocidad de oxidación de NADH, la cual es equivalente a la velocidad de hidrólisis del GTP (reacción limitante), pues por cada mol de NADH que se oxida se requiere la hidrólisis de un mol de GTP.

La actividad GTPásica de EcFtsZ y BsFtsZ se midió con este método tanto en ausencia (control) y como en presencia de los compuestos. Para ello la proteína se pre incubó a una concentración de 12,5 μM , a 30 °C en amortiguador HEPES 50 mM pH 7,3, KCl 50 mM y MgCl_2 10 mM, DMSO 1%, PEP 1 mM, NADH 0,6 mM y con el compuesto a una concentración equivalente a su máxima solubilidad, en un volumen final de 500 μL . La reacción de polimerización y de oxidación del NADH se inició mediante la adición de GTP 2 mM y 10 μL de una mezcla de PK/LDH (745-906 U/mL, respectivamente). La absorbancia del NADH se midió en función del tiempo a 340 nm en un espectrofotómetro de arreglo de diodos Hewlett–Packard 8452A, y se registró desde la pre incubación de FtsZ. A las curvas obtenidas se les calculó las pendientes, las cuales equivalen a la velocidad de oxidación del NADH, y por ende, a la velocidad de hidrólisis del GTP. El número de moles de GTP hidrolizado se calculó con un valor del coeficiente de extinción del NADH a 340

nm de $6.220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.10. Efecto de los compuestos sobre la polimerización de tubulina.

Para determinar el efecto de B2T sobre la polimerización de tubulina se midió la dispersión de luz a 350 nm en el tiempo. No se ensayó el efecto de NPY, debido a que este se encuentra publicado (Gutiérrez y cols., 2015). En los ensayos, tubulina se pre incubó a una concentración fija de 1,5 mg/mL a 4 °C en amortiguador de polimerización (fosfato de sodio 10 mM pH 7,0, GTP 0,1 mM, MgCl₂ 16 mM, EGTA 1 mM, glicerol 25% v/v) y B2T en su concentración máxima de solubilidad. A la muestra se le midió la dispersión de luz a 350 nm a 4 °C por un tiempo corto para obtener la línea base y luego se subió la temperatura a 37 °C para inducir la polimerización. Luego de un tiempo se bajó nuevamente la temperatura para inducir esta vez la despolimerización. Se analizaron los máximos de las curvas para determinar el efecto provocado por el compuesto.

Resultados

1. Características fisicoquímicas de los compuestos.

En un trabajo previo del laboratorio se observó que NPY es el que mejor inhibió la polimerización *in vitro* de FtsZ de *E. coli*. Así mismo, en el laboratorio del Dr. Miguel Vicente del Centro Nacional de Biotecnología (Madrid, España), se observó que B2T era el mejor inhibidor del crecimiento en placas de *E. coli*. En cuanto a su solubilidad en medio acuoso, NPY presenta un valor de LogP teórico de $2,41 \pm 0,44$ y B2T de $2,62 \pm 0,40$, que indica una mayor solubilidad teórica en medio acuoso de NPY en una prueba octanol/agua. Debido a la baja solubilidad de estos compuestos en agua, se utilizó DMSO para aumentar su solubilidad en medio acuoso. La absorbancia en el rango espectral UV visible de ambos compuestos disueltos en DMSO 100% se muestra en la figura 3. Para NPY se observan tres máximos, a 262, 328 y 421 nm. Y para B2T se observa un máximo a 275 nm y otro no bien definido a 370 nm.

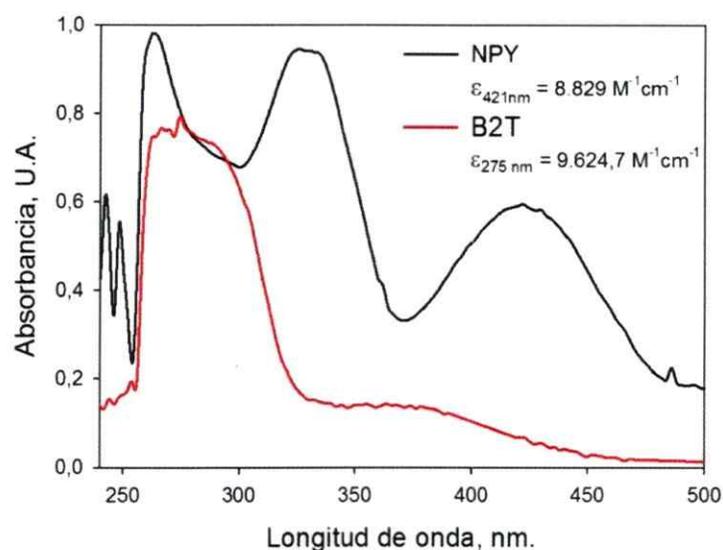


Figura 3. Características fisicoquímicas de NPY y B2T. Espectros de absorción de los compuestos en DMSO 100%. Se informa el valor del coeficiente de extinción calculado para cada compuesto.

Se determinaron experimentalmente los coeficientes de extinción molar (ver Materiales y Métodos) para NPY a 421 nm y para B2T a 275 nm, obteniéndose valores de $8.829 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ y $9.624,7 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, respectivamente.

Los resultados de la figura 4 muestran el espectro de absorción de los compuestos en medio acuoso con DMSO 1% (amortiguador de polimerización). Para NPY se observan dos máximos, a 254 y 304 nm. Para B2T se observan 2 máximos y dos hombros, a 232 y 274 nm, y a 252 y 298 nm, respectivamente. Se observa que los espectros en DMSO 100% y en amortiguador de polimerización no son iguales, siendo las principales diferencias el corrimiento de los máximos hacia longitudes de onda más bajas. Se observa además la desaparición de un máximo de NPY (421 nm) y la aparición de los dos hombros

en B2T. El fenómeno de corrimiento de los máximos hacia longitudes de ondas menores (efecto hipsocrómico) se explica por una mayor solvatación de los pares de electrones no enlazantes presentes en la molécula analizada, lo que disminuye la energía de los orbitales n . De esta manera el salto energético es mayor, lo cual se traduce en longitudes de onda más cortas. Este efecto suele ser intenso en solventes polares próticos (como el agua), en donde es posible la formación de puentes de hidrógeno entre los protones del solvente y los pares de electrones no enlazantes. Al variar la concentración de ambos compuestos se observa que hasta $32\ \mu\text{M}$ para NPY y $64\ \mu\text{M}$ para B2T, se cumple la ley de Lambert Beer.

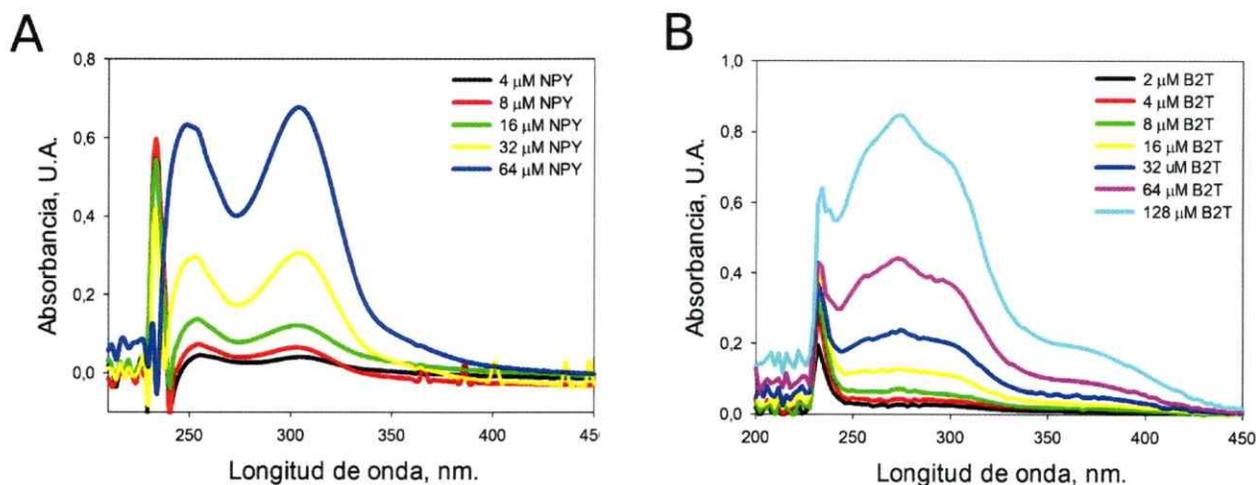


Figura 4. Espectros de absorbancia de los compuestos NPY y B2T en medio acuoso con DMSO 1%. A) Espectros de absorbancia de NPY a diferentes concentraciones en amortiguador de polimerización (HEPES 50 mM pH 7,2, KCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM y DMSO 1%). B) Espectros de absorbancia de B2T a diferentes concentraciones en amortiguador de polimerización.

La desviación de la linealidad sobre estas concentraciones se puede deber a una disminución de la solubilidad de los compuestos al sobrepasarlas, que puede ser la causa principal de esta desviación debido al rango μM de concentraciones utilizadas. Otra de las causas de desviación de la linealidad es la heterogeneidad de las muestras. Nuestros compuestos tienen grupos hidroxilos en las posiciones 4 y 7; 2 y 5 del anillo naftil y del anillo bencil, respectivamente. Estos grupos son susceptibles a la oxidación para producir los respectivos compuestos quinónicos, los cuales tienen coeficientes de extinción diferentes. Para probar la estabilidad de estos compuestos en su forma no oxidada se tomaron espectros en DMSO 100% a distintos tiempos (entre 190 y 820 nm), como se observa en la figura 5. Los principales cambios en el espectro ocurren entre 270 y 310 nm para NPY. En esta zona se hace evidente un nuevo máximo de absorción a 297 nm. También se produce un aumento de la absorbancia hacia el rojo desde 300 nm a las 8 horas, que disminuye a tiempos más largos. Para B2T no se observan cambios significativos, salvo a las 20 horas en que aparece un máximo a 264 nm.

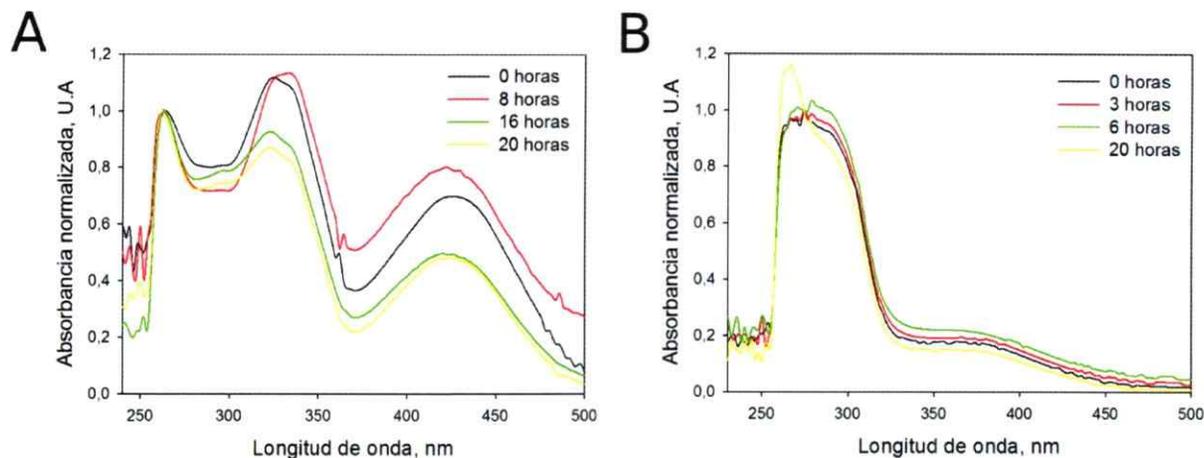


Figura 5. Estabilidad en el tiempo de los compuestos NPY y B2T en DMSO.
 A) Espectros de absorbancia de una solución de NPY en DMSO medidos a distintos tiempos. B) Espectros de absorbancia de una solución de B2T en DMSO medidos a distintos tiempos.

Los resultados en su conjunto muestran que los compuestos no son estables en el tiempo a temperatura ambiente, por lo que en todos los experimentos se utilizaron muestras almacenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ en atmósfera de nitrógeno, que conservaron sus propiedades espectrales en estas condiciones. La solubilidad de los compuestos nos permitió utilizar como concentraciones máximas 32 y 64 μM para NPY y B2T, respectivamente. Las concentraciones utilizadas se cuantificaron mediante los coeficientes de extinción antes señalados.

2. Efecto de NPY y B2T sobre la polimerización *in vitro* del heterodímero de $\alpha\beta$ -tubulina.

En la hipótesis se plantea que “la similitud del efecto inhibitor de DAPI en tubulina y FtsZ, permite predecir que los compuestos derivados de fenstatina

que se unen a tubulina deberían también unirse a FtsZ de *Escherichia coli* (EcFtsZ) y de *Bacillus subtilis* (BsFtsZ) e inhibirlas". Los resultados de un trabajo hecho en el laboratorio (Gutiérrez y cols., 2015) en forma paralela a esta tesis, demuestran que NPY inhibe la polimerización de tubulina y se une con una constante de afinidad de $1,02 \pm 0,23 \mu\text{M}$. En este trabajo se encontró que B2T no inhibe la polimerización del heterodímero de tubulina (ver Fig. MS 2). Por esta razón, para probar o rechazar la hipótesis se estudió el efecto de estos compuestos sobre la polimerización de FtsZ.

3. Efecto de NPY y B2T sobre la polimerización *in vitro* de FtsZ de *E. coli* y *B. subtilis*.

En la división bacteriana la septación se produce por la formación del anillo Z, que consiste en pequeños filamentos que se superponen en la mitad longitudinal de la célula. La formación de los filamentos lleva implícita la inducción de actividad GTPásica. Por este motivo, para caracterizar la acción de NPY y B2T se analizó su efecto sobre la polimerización y la actividad GTPásica de FtsZ de *E. coli* y *B. subtilis* purificadas (Fig. MS1).

3.1. Polimerización.

3.1.1. Polimerización en presencia de NPY. La curva del control de la polimerización de EcFtsZ de la figura 6 muestra tres fases características, una rápida polimerización inicial, un estado estacionario de los polímeros y su

despolimerización. El estado estacionario termina a los 54 minutos aproximadamente, y se inicia la despolimerización que concluye a los 64 minutos. Al aumentar la concentración de NPY desde 2 a 32 μM se observa una disminución del ΔI al inicio del estado estacionario. Durante el estado estacionario se observa un aumento lineal de la dispersión de luz, cuya pendiente positiva depende de la concentración de NPY y se observa también un leve descenso de la duración de este estado, sin afectar mayormente la velocidad de despolimerización. Luego de la despolimerización, se observa que la dispersión de luz no disminuye hasta el valor alcanzado por el control, incrementando esta diferencia a medida que se aumenta la concentración de NPY. En todos los casos NPY produce un aumento de la dispersión de luz en el tiempo después de la despolimerización.

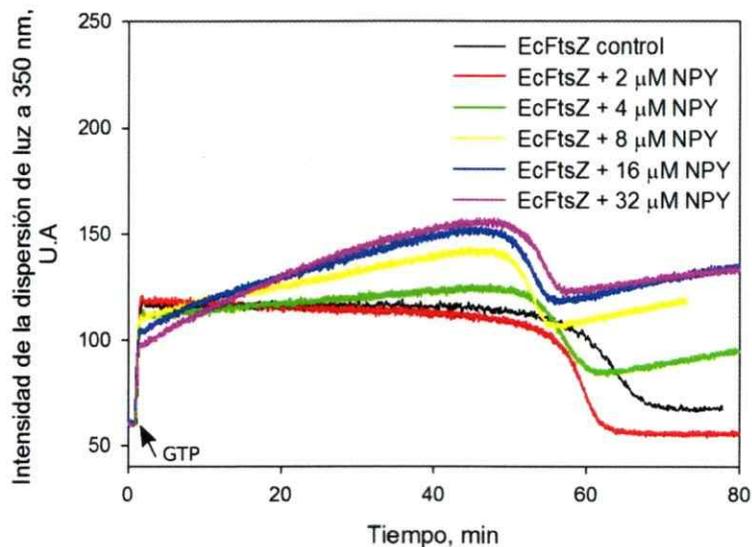


Figura 6. Efecto de NPY sobre la polimerización de EcFtsZ inducida por GTP. Cinéticas de polimerización de EcFtsZ seguidas por dispersión de luz a 350 nm en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de NPY a 30

°C. En estos ensayos se utilizó el amortiguador HEPES 50 mM pH 7,2, KCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM, DMSO 1%, GTP 1 mM, PEP 1 mM y PK. EcFtsZ se utilizó a 12,5 μM y NPY entre 2 y 32 μM.

El comportamiento antes descrito se puede interpretar como la ocurrencia de dos reacciones paralelas con constantes de velocidad diferentes, en que la de la polimerización con GTP es mayor a la constante de la otra reacción. El análisis del efecto de NPY sobre la polimerización se hará considerando la variación del valor de las pendientes durante el estado estacionario y el valor máximo alcanzado previo a la despolimerización. La disminución casi lineal del ΔI inicial del estado estacionario versus la concentración de NPY, alcanza sólo un 40% de disminución a la concentración más alta de NPY. Este comportamiento no corresponde a un fenómeno típico de inhibición, pues su conducta debiera ajustarse más bien a una isoterma de saturación. En la figura MS3A se observa la relación entre el ΔI alcanzado inmediatamente antes de la despolimerización, respecto al control, y a la concentración de NPY. Estos valores se incrementan con el aumento de la concentración de NPY y presentan una conducta sigmoidea, la cual ha sido asociada a una unión de tipo cooperativo que no en todos los casos corresponde. El ajuste de los datos experimentales a una ecuación sigmoidea, muestra un valor de $I_{0,5} = 5,74 \pm 0,21 \mu\text{M}$ y un $n_h = 2,17 \pm 0,18$. Al graficar las pendientes del estado estacionario versus la concentración de NPY (Fig. MS3B) se observa también un comportamiento sigmoideo, con un valor de $I_{0,5} = 4,64 \pm 0,08 \mu\text{M}$ y un $n_h = 2,42 \pm 0,08$. El análisis de las pendientes de la dispersión de luz post

despolimerización muestra también una conducta sigmoidea, con un valor de $I_{0,5} = 2,3 \pm 0,06 \mu\text{M}$ y un $n_h = 3,42 \pm 0,35$ (Fig. MS3C). Sin embargo, las diferencias obtenidas de éste último análisis respecto a los valores de $I_{0,5}$ y n_h , aunque cercanos a los valores anteriores, podrían estar influidos por la cercanía al equilibrio de la reacción.

Para BsFtsZ (Fig. 7) se observa en la curva control de polimerización un rápido aumento de la dispersión de luz que muestra un pequeño *overshoot* luego del cual la dispersión baja lentamente hasta que se inicia el proceso de despolimerización característico. La polimerización en presencia de NPY se caracteriza por un rápido aumento inicial de la dispersión de luz que no alcanza un estado estacionario típico, pues después del rápido aumento inicial de la dispersión de luz se produce un aumento más lento que se desacelera hasta alcanzar un máximo y que posteriormente se despolimeriza en dos etapas. Luego de la despolimerización se observa que la dispersión de luz no disminuye hasta el valor del control, aumentando el valor de la dispersión y su pendiente con la concentración de NPY. Posteriormente el valor de la dispersión de luz aumenta en el tiempo de manera lineal.

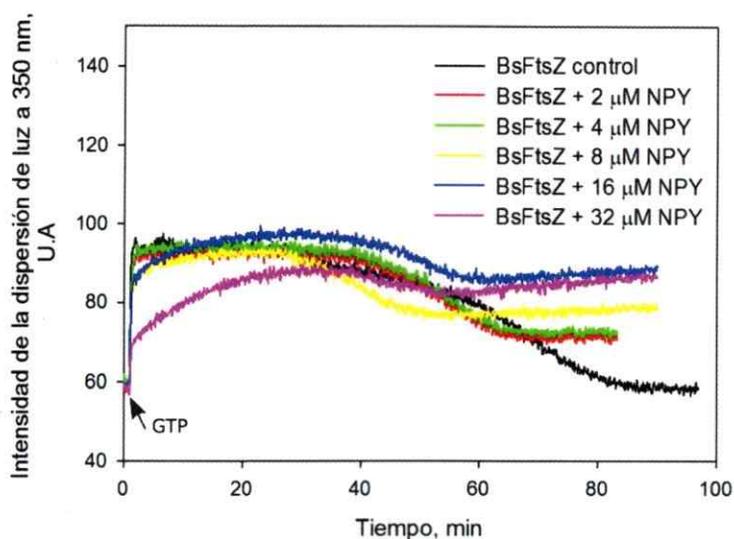


Figura 7. Efecto de NPY sobre la polimerización de BsFtsZ inducida por GTP. Cinéticas de polimerización de BsFtsZ seguidas por dispersión de luz a 350 nm en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de NPY a 30 °C. En estos ensayos se utilizó el amortiguador HEPES 50 mM pH 7,2, KCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM, DMSO 1%, GTP 1 mM, PEP1 mM y PK. FtsZ se utilizó a 12,5 μM y NPY entre 2 y 32 μM.

Al igual que para EcFtsZ se considerará que en la polimerización de BsFtsZ ocurren dos reacciones paralelas. De manera análoga a lo que ocurre con EcFtsZ, el ΔI inicial depende de manera inversa de la concentración de NPY, disminuyendo casi un 70% a la concentración más alta de NPY. En el estado estacionario de la polimerización se observa una conducta no lineal atípica, por esta razón a esta región le restamos el valor del control y lo ajustamos a una conducta lineal, donde se observa que la pendiente aumenta con la concentración de NPY. Al graficar el valor de estas pendientes versus la concentración de NPY se observa en la figura MS4A una conducta sigmoidea, con un valor de $I_{0,5} = 9,13 \pm 0,66 \mu\text{M}$ y un $n_h = 2,29 \pm 0,20$. El análisis de las

pendientes de la dispersión de luz post despolimerización muestra una conducta hiperbólica, con un valor de $I_{0,5} = 4,37 \pm 0,62 \mu\text{M}$ (Fig. MS4B).

Los resultados anteriores indican que la unión de NPY a FtsZ es sigmoidea y una explicación razonable para esta conducta es la presencia de nuevos polímeros inducidos por NPY, en equilibrio dinámico con monómeros de FtsZ. Resultados previos del laboratorio evidencian que NPY no se une al monómero de FtsZ en baja concentración, con lo que podemos suponer entonces que la unión ocurre de manera "cooperativa" con la aparición de oligómeros de FtsZ, generando los sitios de unión a los polímeros, entre ellos un polímero diferente de los filamentos habituales de FtsZ.

3.1.1.1. Morfología de los polímeros inducidos por NPY. Para confirmar que el cambio en la dispersión de luz provocado por NPY se debía a un cambio en la forma de los polímeros, éstos se visualizaron por microscopía electrónica. Los polímeros analizados corresponden al estado estacionario de la polimerización inducida por GTP en ausencia y presencia de $32 \mu\text{M}$ de NPY. En la figura 8A, se observan principalmente filamentos simples, largos (largo promedio $854 \pm 546 \text{ nm}$), curvos y de forma helicoidal de EcFtsZ, en ausencia de los compuestos (control). En presencia de NPY los filamentos se acortan aproximadamente a la mitad respecto al control y pierden la forma helicoidal, manteniendo su curvatura (Fig. 8C). Aparecen filamentos simples, dobles y triples, en una proporción 76, 19 y 5 %, respectivamente (ver Fig. MS5), y con un largo promedio $854 \pm 546 \text{ nm}$, $423 \pm 212 \text{ nm}$ y $635 \pm 215 \text{ nm}$, respectivamente. En la figura 8B, se observan filamentos simples de BsFtsZ

mucho más cortos (largo promedio 207 ± 59 nm) y menos curvos que los de EcFtsZ, en ausencia de los compuestos (control). En presencia de NPY los filamentos muestran una población heterogénea donde se percibe una disminución del largo de los filamentos (largo promedio de 218 ± 137 nm, con una mayor población entre 100 y 200 nm, ver Fig. MS5) que tienden a curvarse e incluso formar semicírculos (Fig. 8D)

Luego de la despolimerización de los filamentos persiste un aumento de la dispersión de luz que se explica por una polimerización de FtsZ-GDP. Se tomaron muestras a los 90 minutos de los procesos mostrados en las figuras 6 y 7 y se analizaron por microscopía electrónica. En la figura 8E y 8G se muestran los polímeros de EcFtsZ, entre ellos se distinguen estructuras más bien rectas de anchos variables entre 8 y 30 nm al parecer formadas por interacciones de filamentos simples. Predominan también cúmulos formados por filamentos difusos de anchos variables entre 8 y 20 nm. En la figura 8F y 8H se muestran los polímeros de BsFtsZ, y se observan al menos 3 formas de ellos. Llama la atención la presencia de polímeros cortos, gruesos y pocos definidos por lo que no se pudo medir su ancho. También se distinguen semicírculos y estructuras cilíndricas muy bien definidas al parecer formadas por la interacción lateral de pequeños anillos que muestran un ancho de $19,2 \pm 0,9$ nm.

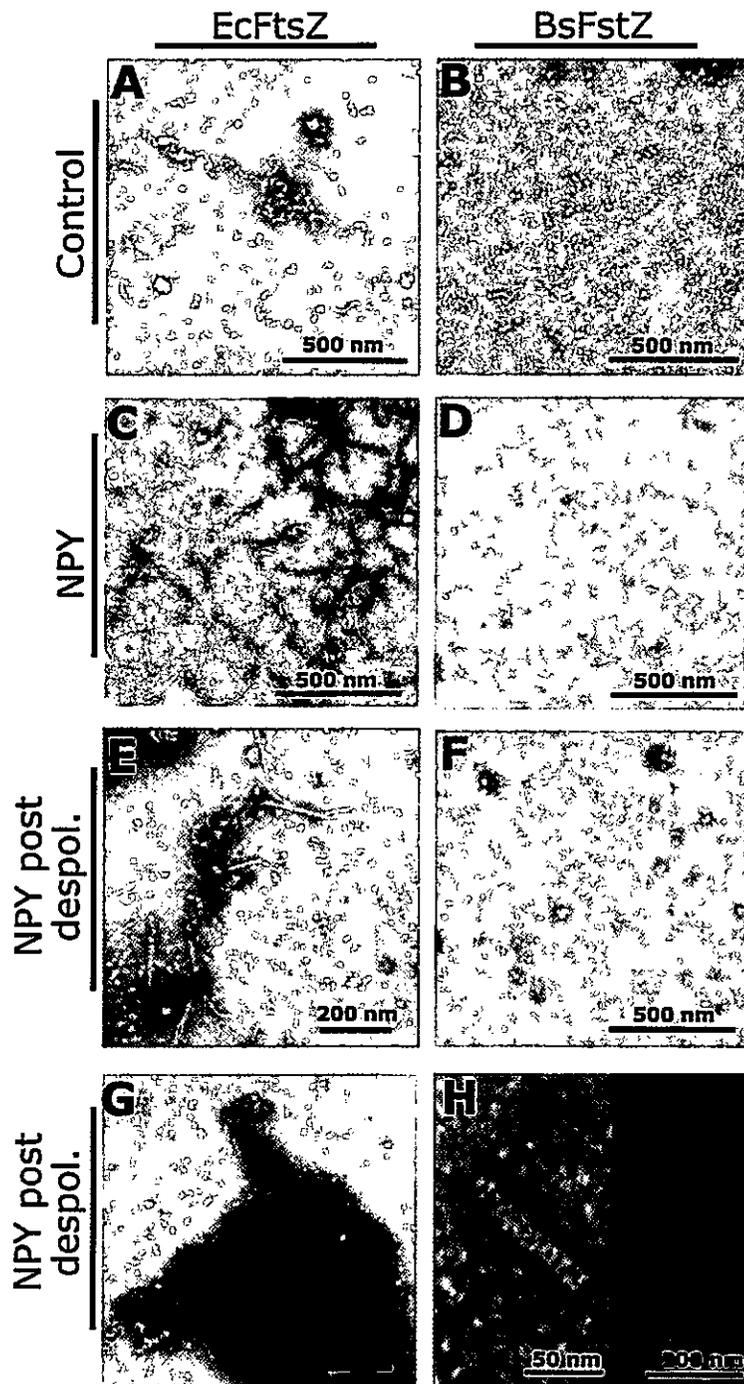


Figura 8. Efecto de NPY sobre la morfología de los polímeros de EcFtsZ y BsFtsZ inducidos por GTP. Microscopías electrónicas con tinción negativa de muestras tomadas durante la polimerización de EcFtsZ y BsFtsZ en ausencia (A y B, respectivamente) y en presencia de 32 μM de NPY (C y D, respectivamente) durante el estado estacionario de la polimerización. En E)-G) y F)-H) se muestran polímeros de EcFtsZ y BsFtsZ, respectivamente, de muestras tomadas después de la despolimerización. Las polimerizaciones se

hicieron en amortiguador HEPES 50 mM pH 7,2, KCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM, DMSO 1%, GTP 1 mM, PEP1 mM y PK. FtsZ se utilizó a 12,5 μM. En cada fotografía está indicada la escala de medida.

3.1.2. Polimerización en presencia de B2T. En la figura 9 se muestra la curva control de EcFtsZ con sus tres etapas características (descritas anteriormente), conducta que también se observa en las curvas en presencia de B2T. Al aumentar la concentración de B2T de 4 a 64 μM se observa una disminución progresiva del ΔI al inicio del estado estacionario, no viéndose mayormente afectado la duración del mismo ni la velocidad de despolimerización. Al expresar la disminución del ΔI como porcentaje de la inhibición de la polimerización en función de la concentración de B2T (Fig. MS6), se obtiene un comportamiento sigmoideo con $I_{0,5} = 27,42 \pm 7,20 \mu\text{M}$ y $n_h = 1,47 \pm 0,28$.

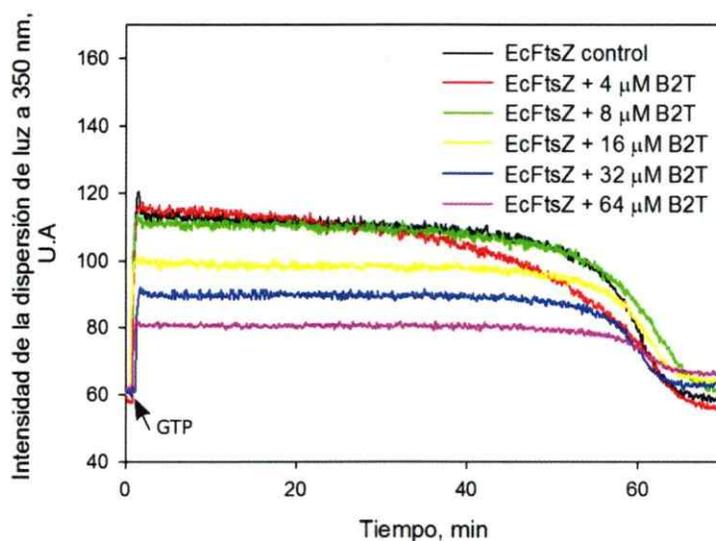


Figura 9. Efecto de B2T sobre la polimerización de EcFtsZ inducida por GTP. Cinéticas de polimerización de EcFtsZ seguidas por dispersión de luz a 350 nm en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de B2T a 30 °C. En estos ensayos se utilizó el amortiguador HEPES 50 mM pH 7,2, KCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM, DMSO 1%, GTP 1 mM, PEP1 mM y PK. FtsZ se utilizó a 12,5 μM y B2T entre 4 y 64 μM.

En la figura 10 se observa la curva control de BsFtsZ, descrita anteriormente. Al aumentar la concentración de B2T de 4 a 64 μM se observa una disminución progresiva del ΔI al inicio del estado estacionario y una leve disminución de la extensión del mismo en presencia del compuesto en el rango de 4 a 16 μM. Por el contrario, a las concentraciones 32 y 64 μM el estado estacionario muestra una duración mayor al del control y la velocidad de despolimerización disminuye.

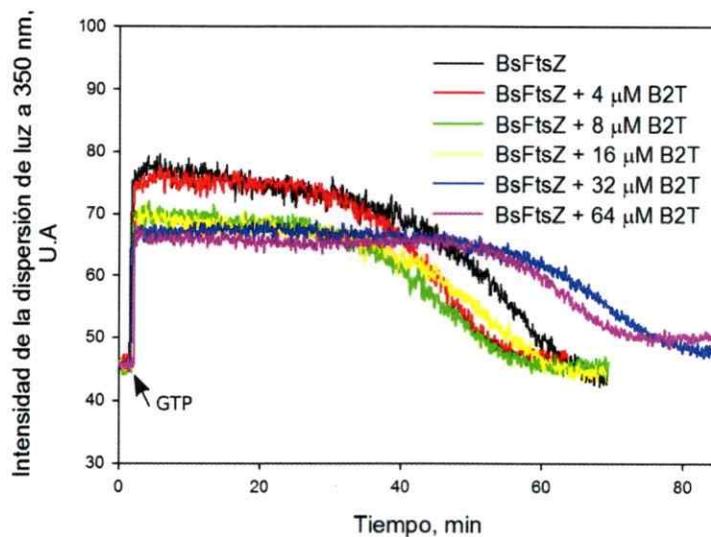


Figura 10. Efecto de B2T sobre la polimerización de BsFtsZ inducida por GTP. A) Cinéticas de polimerización de BsFtsZ seguidas por dispersión de luz a 350 nm en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de B2T a 30 °C. En estos ensayos se utilizó el amortiguador HEPES 50 mM pH 7,2, KCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM, DMSO 1%, GTP 1 mM, PEP1 mM y PK. FtsZ se utilizó a 12,5 μM y B2T entre 4 y 64 μM.

Al expresar la disminución del ΔI como porcentaje de la inhibición de la polimerización en función de la concentración de B2T (Fig. MS7), se obtiene un comportamiento hiperbólico con un $I_{0,5} = 14,13 \pm 2,30 \mu\text{M}$.

3.1.2.1. Morfología de los polímeros inducidos por B2T. Para confirmar que el cambio en la dispersión de luz provocado por B2T se debía a un cambio en la forma de los polímeros, éstos se visualizaron por microscopía electrónica. Los polímeros analizados corresponden al estado estacionario de la polimerización inducida por GTP en ausencia y presencia de 64 μM de B2T. En la figura 11A, se observan principalmente filamentos simples, largos, curvos y de forma

helicoidal de EcFtsZ en ausencia de los compuestos (control). En presencia de B2T (Fig. 11C) los filamentos se acortan a un poco menos de la mitad del valor del control y pierden la forma helicoidal, manteniendo su curvatura. Aparecen filamentos simples, dobles y triples, en una proporción 47, 39 y 14 % (ver Fig. MS5), respectivamente, y con un largo promedio 298 ± 140 nm, 385 ± 140 nm y 374 ± 165 nm, respectivamente. En la figura 11D se observan solo filamentos simples de BsFtsZ, más cortos (largo promedio 207 ± 59 nm) y menos curvos que los EcFtsZ, en ausencia de B2T (control). Éstos filamentos muestran un largo menor (largo promedio 135 ± 60 nm) y son más curvados que el control.

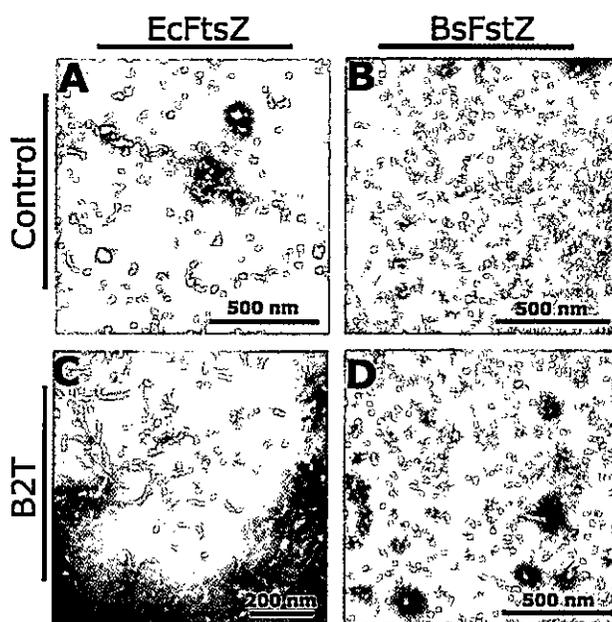


Figura 11. Efecto de B2T sobre la morfología de los polímeros de EcFtsZ y BsFtsZ. Microscopías electrónicas con tinción negativa de muestras tomadas durante la polimerización de EcFtsZ y BsFtsZ en ausencia (A y B, respectivamente) y en presencia de $64 \mu\text{M}$ de B2T (C y D, respectivamente) durante el estado estacionario de la polimerización. Las polimerizaciones se hicieron en amortiguador HEPES 50 mM pH 7,2, KCl 50 mM, MgCl_2 10 mM,



DMSO 1%, GTP 1 mM, PEP1 mM y PK. FtsZ se utilizó a 12,5 μM .

3.1.3. Concentración crítica. Para dilucidar si NPY y B2T, además de afectar la forma de los polímeros e inhibir la polimerización de EcFtsZ y BsFtsZ, genera un efecto sobre el equilibrio entre las especies monoméricas y poliméricas, se determinó la concentración crítica en presencia y ausencia de los compuestos. La concentración crítica es el valor de la intersección de la recta en el eje de la abscisa en el gráfico de dispersión de luz versus concentración de FtsZ. Conscientes que la dispersión de luz no permite obtener parámetros termodinámicos, hicimos experimentos de sedimentación de los polímeros para obtener la masa de los polímeros sedimentados a diferentes concentraciones de FtsZ, desafortunadamente bajo todas las condiciones probadas no pudimos sedimentar en forma cuantitativa los polímeros. Por lo tanto, evaluamos la concentración crítica mediante dispersión de luz. En la figura 12 se muestran los resultados obtenidos para EcFtsZ (Fig. 12A) y BsFtsZ (Fig. 12B) y en cada caso en ausencia y presencia de 32 μM de NPY y 64 μM de B2T. En todos los ensayos se observa una relación lineal entre el ΔI y la concentración de proteína en el rango estudiado (3 a 12,5 μM), tanto en ausencia (control) como en presencia de los compuestos. Además, se muestra que la pendiente de las rectas disminuye en presencia de los compuestos respecto al control, siendo menor la obtenida con NPY, tanto para EcFtsZ como BsFtsZ. Respecto a la concentración crítica, se observa que su valor (intersección de la recta con el eje-x) es independiente de la presencia del inhibidor.

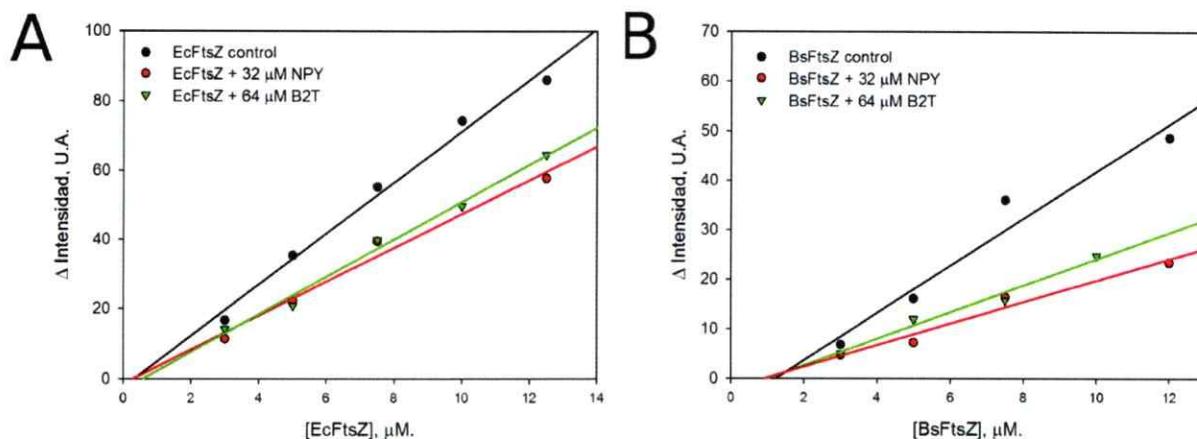


Figura 12. Efecto de NPY y B2T sobre la concentración crítica de EcFtsZ y BsFtsZ. Gráficos de concentración crítica de EcFtsZ y BsFtsZ, A) y B) respectivamente, en ausencia (control) y presencia de 32 μM de NPY y 64 μM de B2T.

Los valores de las concentraciones críticas obtenidas se muestran en la tabla I y se observa que éstos no son significativamente diferentes para cada una de las proteínas tanto en presencia como en ausencia de los inhibidores.

Tabla I. Concentraciones críticas de EcFtsZ y BsFtsZ en presencia de NPY y B2T.

Condición	Cc [μM]
EcFtsZ control	0,43
EcFtsZ + 32 μM NPY	0,30
EcFtsZ + 32 μM B2T	0,39
BsFtsZ control	1,0
BsFtsZ + 32 μM NPY	0,7
BsFtsZ + 32 μM B2T	1,03

Estos resultados en su conjunto son coherentes, pues confirman que la disminución de la dispersión de luz se debe a una disminución del largo de los filamentos y no a una disminución de la masa de ellos, como lo demuestran los valores similares de concentración crítica y la disminución de la pendiente en presencia de los compuestos.

3.2. Actividad GTPásica.

La unión a nucleótido es esencial para la función de FtsZ, debido a que polimeriza en presencia de GTP y despolimeriza cuando éste se hidroliza a GDP. Moléculas que afectan la actividad GTPásica modifican el comportamiento dinámico de la proteína alterando la correcta función de la

misma.

En la tabla II se muestran los valores de la velocidad de hidrólisis de GTP obtenidos para EcFtsZ y BsFtsZ en ausencia (control) y presencia de los compuestos estudiados. Estos valores se expresaron en μmoles de GTP hidrolizado por litro por minuto ($\mu\text{M}/\text{min}$) y se normalizaron por la concentración de FtsZ. Los valores se obtuvieron del promedio de 6 mediciones independientes por condición. La desviación estándar se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$d.e = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (\text{Ecuación 3})$$

Donde $d.e$ es la desviación estándar, x es la actividad GTPásica obtenida en el ensayo individual, \bar{x} corresponde al promedio (media) de todos los valores obtenidos en los ensayos y n es el número de observaciones. Se observa que la actividad GTPásica disminuye en presencia de los compuestos y que B2T es mejor inhibidor que NPY para EcFtsZ (18,95 y 6,6 % de inhibición, respectivamente) y para BsFtsZ la inhibición es similar para ambos compuestos, NPY 5,37 % y B2T 8,6 %.

Tabla II. Actividad GTPásica de EcFtsZ y BsFtsZ en ausencia y presencia de NPY y B2T.

Condición	Act. GTPásica [P _i /FtsZ/min]
EcFtsZ control	1,688 ± 0,021
EcFtsZ + 32 μM NPY	1,576 ± 0,019
EcFtsZ + 64 μM B2T	1,368 ± 0,017
BsFtsZ control	0,744 ± 0,048
BsFtsZ + 32 μM NPY	0,704 ± 0,037
BsFtsZ + 64 μM B2T	0,68 ± 0,03

Los valores fueron sometidos a un análisis estadístico para determinar si la diferencia observada entre la condición control y en presencia de compuesto es estadísticamente significativa. Para ello se utilizó un intervalo de confianza del 95% y se obtuvo que para todos los casos la diferencia entre estos valores es estadísticamente significativa, con un $P < 0,001$ para la comparación entre EcFtsZ control en las condiciones 32 μM de NPY y 64 μM de B2T y BsFtsZ control con 64 μM de B2T. Para la comparación de los valores de velocidad de hidrólisis de GTP de BsFtsZ control y 32 μM NPY se obtuvo un $P = 0,029$.

Estos resultados son consistentes con los obtenidos por microscopía electrónica para ambas proteínas, pues se sabe que la formación de filamentos dobles y triples produce inhibición de la actividad GTPásica.

3.3. Análisis del efecto de NPY luego de la despolimerización.

Se ha dejado para el final el análisis del efecto de NPY sobre el aumento de la dispersión de luz después de la despolimerización de EcFtsZ y BsFtsZ. NPY produce un aumento lineal de la dispersión de luz que tiende a alcanzar un *plateau*. Éste es un fenómeno no antes descrito que ocurre con la forma GDP de estas proteínas, que en ausencia del compuesto permanecen como dímeros y monómeros después de la polimerización.

3.3.1. Polimerización de EcFtsZ-GDP con NPY. Para entender el efecto de NPY sobre la polimerización de EcFtsZ, en la figura 13A se tomaron los resultados de la polimerización en presencia del sistema de regeneración de GTP, GTP 1mM y 32 μ M de NPY con su respectivo control desde la figura 6. Estos resultados se suplementan con los de la polimerización en presencia de GDP 2 mM y 32 μ M de NPY y el control que corresponde a EcFtsZ con 2 mM de GDP. Los resultados muestran un aumento de la dispersión de luz en presencia de NPY con EcFtsZ-GDP respecto al control, de esto se infiere que el aumento de la pendiente después de la despolimerización es un efecto de NPY sobre EcFtsZ-GDP. Para evitar cualquier interferencia del sistema de regeneración de GTP se hizo un experimento de polimerización de EcFtsZ con 1 mM GTP o 2 mM GDP sin sistema de regeneración en presencia de 32 μ M de NPY (Fig.13B). Los resultados muestran una típica conducta de polimerización con GTP y que en presencia de GDP se produce un aumento en la dispersión de luz. Se observa que después de la despolimerización en presencia de GTP ambas curvas se superponen, indicando una conducta idéntica para EcFtsZ en

presencia de GDP. Para determinar la influencia de la concentración de GDP (o más bien la influencia del GDP libre) en el efecto de NPY sobre EcFtsZ, se realizaron dos ensayos comparativos más en presencia de NPY, uno con GDP en el sitio del nucleótido (proveniente de la preparación de proteína) y otro con un exceso de 2 mM de GDP. En la figura 13C se observa que en presencia de un exceso de GDP la velocidad de la reacción es mayor y el máximo alcanzado es menor que con solo GDP unido a la proteína (tabla III).

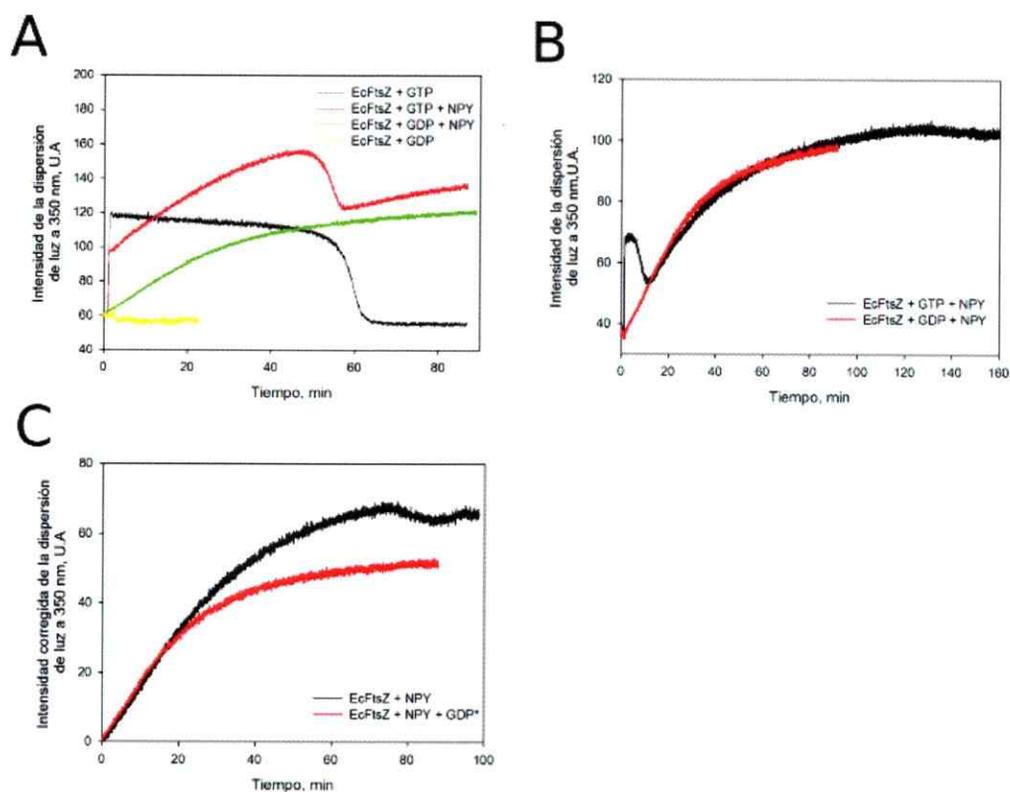


Figura 13. Efecto de NPY sobre EcFtsZ. Las cinéticas de polimerización se midieron por dispersión de luz a 350 nm a 30 °C. A) Efecto de NPY sobre EcFtsZ-GDP y EcFtsZ-GTP. Se midieron las cinéticas de polimerización de EcFtsZ en amortiguador de polimerización con sistema de regeneración de GTP

(PK/PEP) y 1 mM GTP, en ausencia y presencia de 32 μ M de NPY (cinéticas en negro y rojo, respectivamente). Se midió también la polimerización de EcFtsZ en amortiguador de polimerización con 2 mM de GDP, en ausencia y presencia de 32 μ M de NPY (en amarillo y verde, respectivamente). B) Efecto de NPY sobre la polimerización de EcFtsZ sin sistema de regeneración. Se midió la polimerización de EcFtsZ en presencia de 32 μ M de NPY, tanto en amortiguador de polimerización sin sistema de regeneración y 1 mM de GTP (en negro) como en amortiguador de polimerización sin sistema de regeneración y 2 mM de GDP (en rojo). C) Influencia de la concentración de GDP en el efecto de NPY sobre la polimerización de EcFtsZ-GDP. Se midió la dispersión de luz de los polímeros de EcFtsZ-GDP obtenidos en presencia de 32 μ M de NPY y de un exceso de GDP (* = 2 mM). Para todos los ensayos, EcFtsZ se utilizó a una concentración final de 12,5 μ M.

Tabla III. Efecto de NPY sobre la dispersión de luz de EcFtsZ y BsFtsZ en presencia de un exceso de GDP^a.

Condición	A, U.A	k'	Velocidad inicial, min ⁻¹
EcFtsZ + 32 μ M NPY	72,14	0,0317 \pm 0,0001	1,46
EcFtsZ + 32 μ M NPY + 2 mM GDP	53,07	0,0428 \pm 0,0001	1,70
BsFtsZ + 32 μ M NPY	60,79	0,0006	2,98
BsFtsZ + 32 μ M NPY + 2 mM GDP	54,94	0,0011	3,18

^a Los valores experimentales se ajustaron a la ecuación $I = A(1 - \exp^{-k't})$, donde I es la intensidad de la dispersión de luz, A es la intensidad máxima y k' es la constante de velocidad. La velocidad inicial es el valor de la pendiente de la parte lineal al inicio de las curvas de progreso.

3.3.1.1. Efecto de la concentración de proteína sobre la polimerización de EcFtsZ-GDP en presencia de NPY y morfología de los polímeros. La polimerización a diferentes concentraciones de FtsZ en presencia de GTP (filamentos rectos) muestra una concentración crítica cuyo valor aumenta considerablemente si la polimerización se induce con GDP (filamentos curvos) (Huecas y Andreu, 2004). Para comprobar si NPY reduce la concentración crítica de polimerización de EcFtsZ en presencia de GDP ensayamos la polimerización a diferentes concentraciones de proteína, con 2 mM de GDP en presencia de 32 μ M de NPY. En la figura 14A se observa que al aumentar la concentración de proteína se produce un aumento en la dispersión de luz hasta alcanzar un *plateau*, lo cual indica que la polimerización es dependiente de la concentración de proteína. En la figura MS8A se observa que la relación entre el aumento de la dispersión de luz del *plateau* y la concentración de EcFtsZ es lineal, cuya curva de regresión es una recta que pasa por el origen cuya pendiente es igual a 4,65. Este resultado muestra que el fenómeno de polimerización de EcFtsZ-GDP inducida por NPY no presenta una concentración crítica, lo que sugiere que NPY elimina la concentración crítica de la polimerización de EcFtsZ-GDP. Esta conducta es propia de un mecanismo de polimerización isodésmico (Romberg y cols., 2001).

Para determinar la morfología de los polímeros, las muestras para las micrografías se prepararon utilizando 12,5 μ M de proteína, 2 mM de GDP y 32 μ M de NPY, y se tomaron una vez alcanzado el equilibrio de la reacción de polimerización a los 90 minutos. En la figura 14B se muestran las estructuras

más representativas de los polímeros de EcFtsZ-GDP con NPY. Se observan estructuras curvas algunas veces espiraladas con un ancho de más o menos 18 nm, que se agrupan en forma desordenada (cúmulos).

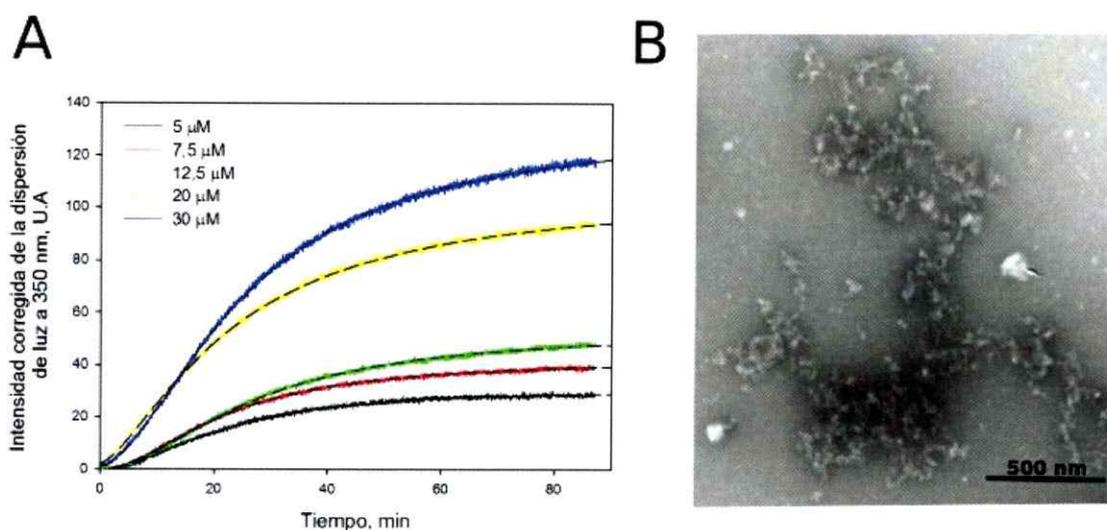


Figura 14. Efecto de NPY sobre distintas concentraciones de EcFtsZ en presencia de GDP. Se midió por dispersión de la luz a 350 nm a 30 °C la polimerización de EcFtsZ a distintas concentraciones de proteína (A) en amortiguador de polimerización con 2 mM de GDP y 32 μM de NPY. B) Microscopía electrónica con tinción negativa de los productos de la polimerización inducida por GDP 2 mM para EcFtsZ a 12,5 μM, en presencia de 32 μM de NPY.

3.3.2. Polimerización de BsFtsZ-GDP con NPY. Para entender el efecto de NPY sobre la polimerización de BsFtsZ, en la figura 15A se han tomado los resultados de la polimerización en presencia del sistema de regeneración de GTP, GTP 1 mM y 32 μM de NPY con su respectivo control desde la figura 7. Estos resultados se suplementaron con los de la polimerización en presencia de 2 mM GDP y 32 μM de NPY y el control que corresponde a BsFtsZ con 2 mM

GDP. Los resultados muestran un aumento de la dispersión de luz en presencia de NPY para BsFtsZ-GDP respecto al control, y al igual que para EcFtsZ en la misma condición, se infiere que el aumento de la pendiente después de la despolimerización es un efecto de NPY sobre BsFtsZ-GDP. Para descartar posibles interferencias del sistema de regeneración de GTP se hizo un experimento de polimerización de BsFtsZ con GTP 1 mM o GDP 2 mM sin sistema de regeneración en presencia de 32 μ M de NPY (Fig.15B). Los resultados muestran con GTP un pequeño aumento en la dispersión de luz que se mantiene casi constante, a diferencia a lo que se observa con GDP donde el aumento es mucho mayor. Para determinar la influencia de la concentración de GDP (o más bien la influencia del GDP libre) en el efecto de NPY sobre BsFtsZ, se realizaron dos ensayos comparativos más en presencia de NPY, uno con GDP en el sitio del nucleótido (proveniente de la preparación de proteína) y otro con un exceso de 2 mM. En la figura 15C se observa que en presencia de un exceso de GDP la velocidad de la reacción es mayor y el máximo alcanzado es menor que con solo GDP unido a la proteína (tabla III).

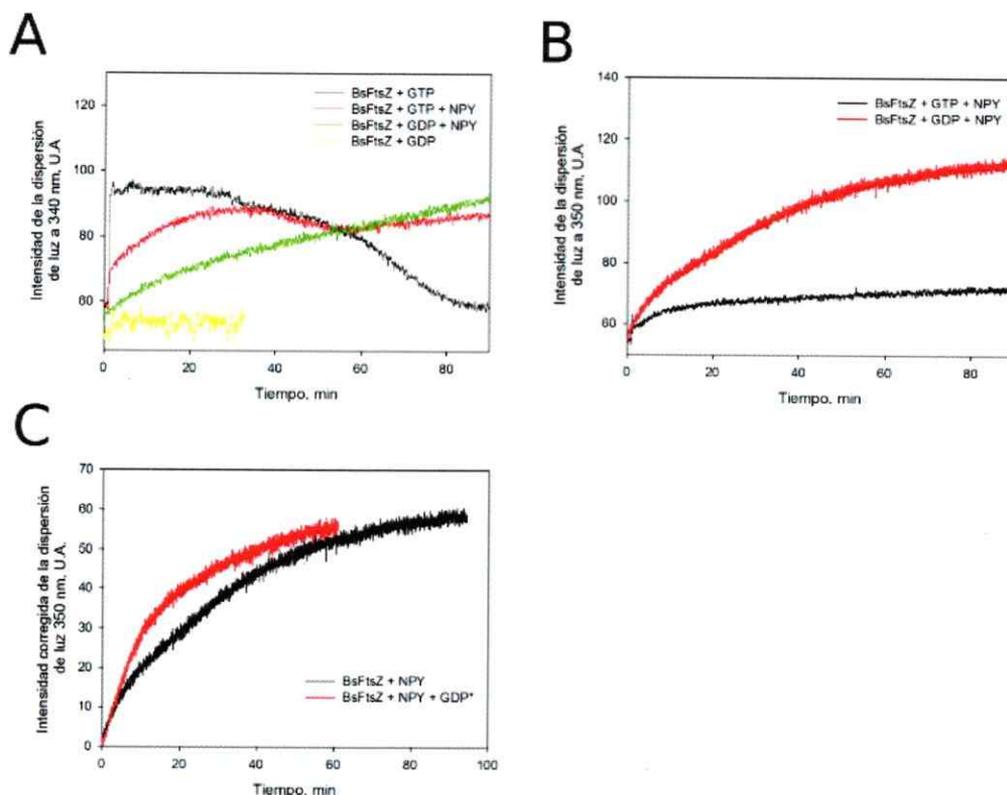


Figura 15. Efecto de NPY sobre BsFtsZ. Las cinéticas de polimerización se midieron por dispersión de luz a 350 nm a 30 °C. A) Efecto de NPY sobre BsFtsZ-GDP y BsFtsZ-GTP. Se midieron las cinéticas de polimerización de BsFtsZ en amortiguador de polimerización con sistema de regeneración de GTP (PK/PEP) y 1 mM de GTP, en ausencia y presencia de 32 μ M de NPY (cinéticas en negro y rojo, respectivamente). Se midió también la polimerización de BsFtsZ en amortiguador de polimerización con 2 mM de GDP, en ausencia y presencia de 32 μ M de NPY (en amarillo y verde, respectivamente). B) Efecto de NPY sobre la polimerización de BsFtsZ sin sistema de regeneración. Se midió la polimerización de BsFtsZ en presencia de 32 μ M de NPY, tanto en amortiguador de polimerización sin sistema de regeneración y 1 mM de GTP (en negro) como en amortiguador de polimerización sin sistema de regeneración y 2 mM de GDP (en rojo). C) Influencia de la concentración de GDP en el efecto de NPY sobre la polimerización de BsFtsZ-GDP. Se midió la dispersión de luz de los polímeros de BsFtsZ-GDP obtenidos en presencia de 32 μ M de NPY y de un exceso de GDP (* = 2 mM). Para todos los ensayos, BsFtsZ se utilizó a una concentración final de 12,5 μ M.

3.3.2.1. Efecto de la concentración de proteína sobre la polimerización de BsFtsZ-GDP con NPY y morfología de los polímeros. Al igual que con EcFtsZ, para comprobar si NPY reduce la concentración crítica de polimerización de BsFtsZ en presencia de GDP, ensayamos la polimerización en las mismas condiciones antes señaladas para EcFtsZ. En la figura 16A se observa que al aumentar la concentración de proteína se produce un aumento en la dispersión de luz hasta alcanzar un *plateau*, lo cual indica que la polimerización es dependiente de la concentración de proteína. En la figura MS8B se observa que la relación entre el aumento de la dispersión de luz del *plateau* y la concentración de BsFtsZ es lineal, cuya curva de regresión es una recta que pasa por el origen con una pendiente igual a 5,05. El mayor valor obtenido para la pendiente de BsFtsZ respecto al informado para EcFtsZ indica que los polímeros no son los mismos. Este resultado muestra que el fenómeno de polimerización de BsFtsZ-GDP inducido por NPY no presenta una concentración crítica, lo que sugiere que NPY elimina la concentración crítica de la polimerización de BsFtsZ-GDP a través de un mecanismo de polimerización isodésmico.

Para determinar la morfología de los polímeros, las muestras para las micrografías se prepararon utilizando 12,5 μM de proteína, 2 mM de GDP y 32 μM de NPY, y se tomaron una vez alcanzado el equilibrio de la reacción de polimerización a los 90 minutos. En la figura 16B se muestran las estructuras más representativas de los polímeros de BsFtsZ-GDP con NPY. A la derecha, se observan estructuras curvas, algunas veces espiraladas, con un ancho de

más o menos 18 nm, que se agrupan en forma desordenada (cúmulos). También aparecen estructuras cilíndricas con un diámetro de $19,3 \pm 2,4$ nm (izquierda figura 16B). Al calcular el perímetro y dividirlo por el ancho de un monómero se obtiene que un anillo del cilindro está compuesto por 12 monómeros. Al hacer el mismo cálculo con anillos de $18,9 \pm 4,3$ nm de diámetro que se encuentran libres, se obtiene un valor de 12 monómeros por anillo. Esto nos permite especular que los anillos libres encontrados serían los precursores en la formación de los cilindros.

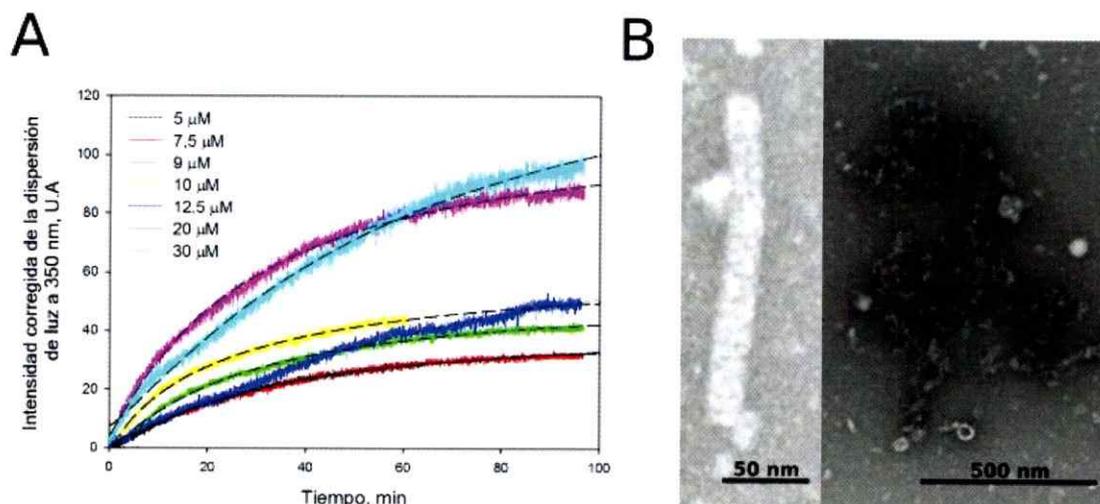


Figura 16. Efecto de NPY sobre distintas concentraciones de BsFtsZ en presencia de GDP. Se midió por dispersión de la luz a 350 nm a 30 °C la polimerización de BsFtsZ a distintas concentraciones de proteína (A) en amortiguador de polimerización con 2 mM de GDP y 32 μM de NPY. B) Microscopía electrónica con tinción negativa de los productos de la polimerización inducida por GDP 2 mM para BsFtsZ a 12,5 μM, en presencia de 32 μM de NPY.

Los resultados en su conjunto nos muestran que el efecto de NPY sobre la

polimerización de EcFtsZ y BsFtsZ es similar, pues afecta las etapas de polimerización y despolimerización de ambas proteínas. Una explicación razonable a esta conducta es la aparición de una reacción de polimerización paralela a la inducida por GTP, con productos diferentes para ambas proteínas que dependen de la presencia de GDP. Es interesante observar de estas conductas que los valores de las constantes de inhibición se mantienen en un rango entre 2 y 9 μM indicando que la causa de la inhibición es común para ambas proteínas, probablemente debido a la formación de los polímeros curvos dependientes de GDP y a un incremento de las interacciones laterales.

3.4. Efecto de Mg^{2+} sobre EcFtsZ y BsFtsZ en presencia de NPY.

Se sabe que EcFtsZ en presencia de GDP y ausencia de Mg^{2+} permanece en un equilibrio monómero-dímero en solución, y al agregar 10 mM de Mg^{2+} induce la formación de oligómeros de masa molecular promedio de 387 kDa, equivalentes a la masa de un polímero promedio de 10 monómeros (Rivas y cols., 2000).

En la figura MS9A, en ausencia de Mg^{2+} y a dos concentraciones de EcFtsZ se observa que se produce un lento aumento de la dispersión de luz en presencia de NPY, que alcanza un equilibrio. El desplazamiento del equilibrio a polímeros que dispersan más luz depende de la concentración de proteína. En presencia de 10 mM de Mg^{2+} aparece un período de latencia seguido por un aumento lineal de la dispersión de luz hasta alcanzar un equilibrio al menos un orden de magnitud mayor que en ausencia de Mg^{2+} para ambas concentraciones de

proteína. La velocidad de la reacción después del período de latencia es dependiente de la concentración de proteína. Al parecer la polimerización en ausencia de Mg^{2+} inducida por NPY presenta una concentración crítica, pues a $12,5 \mu M$ no hay aumento de la dispersión de luz, la cual aumenta alrededor de 4 veces al aumentar la concentración de proteína 2,4 veces. La cantidad de EDTA utilizada para eliminar el Mg^{2+} de la reacción es suficiente con 1 mM, pues al aumentar la concentración a 5 mM no se observa un mayor efecto sobre la reacción. El control sin NPY y con Mg^{2+} muestra que la polimerización tanto en presencia como en ausencia de Mg^{2+} depende de la presencia del compuesto. En la figura MS9B se muestra que el comportamiento de BsFtsZ no es idéntico al de EcFtsZ, pues las cinéticas en presencia de Mg^{2+} y NPY no presentan periodo de latencia y en su parte inicial son más rápidas. En ausencia de Mg^{2+} la dispersión de luz parece no depender de la concentración de proteína. Al igual que EcFtsZ, la intensidad de la dispersión de luz en el equilibrio depende de la concentración de proteína en presencia de Mg^{2+} .

4. Efecto de NPY y B2T sobre el crecimiento bacteriano.

In vivo se analizó el efecto de los compuestos sobre la viabilidad y morfología de bacterias Gram positivas y negativas, mediante ensayos de halos de inhibición, curvas de crecimiento y microscopía óptica de campo claro y de fluorescencia.

4.1. Ensayos de sensibilidad en placa.

La figura 17 muestra los diámetros de halos de inhibición generados por distintas cantidades (μg) de los compuestos disueltos en DMSO 100% sobre diferentes cepas de bacterias Gram positivas y negativas. Se observa en la figura 17A que las bacterias Gram positivas son más sensibles a NPY que las Gram negativas y la más sensible es *B. subtilis*. Sobre 16 μg se pierde la proporcionalidad entre la cantidad de NPY y el diámetro de los halos en *B. subtilis*. Una explicación razonable para la pérdida de sensibilidad es la baja solubilidad del compuesto. Para *E. coli* K12, se observa que presenta sensibilidad a 8 μg de NPY. En la figura 17B se observa nuevamente que *B. subtilis* es la cepa más sensible a la acción de B2T. Bajo 16 μg de B2T algunas cepas presentaron halos difusos que no pudieron ser medidos.

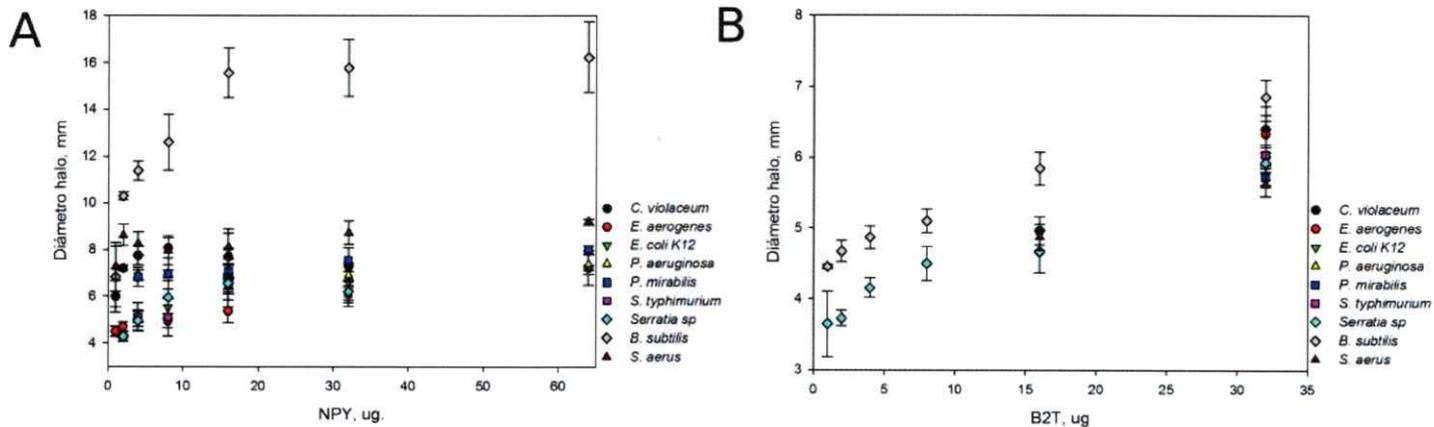


Figura 17. Efecto *in vivo* de NPY y B2T sobre la viabilidad bacteriana mediante ensayos de sensibilidad en placas. Se hicieron céspedes bacterianos en medio Mueller Hinton y se sembraron cantidades crecientes de los compuestos disueltos en DMSO 100%. Se incubaron las placas a 37 °C por 5 horas y luego se observó la presencia de halos de inhibición. Estos fueron

medidos y se graficó el diámetro del halo en función de la cantidad de compuesto. A) Diámetro del halo generado por cantidades crecientes de NPY. B) Diámetro del halo generado por cantidades crecientes de B2T.

Encontramos que casi todas las cepas, salvo *B. subtilis* y *S. aureus*, presentaron pequeños halos de inhibición con sólo DMSO 100%. (tabla fig. MS10). Para evaluar el efecto de los compuestos sobre las cepas de menor sensibilidad se probó el efecto de distintas concentraciones de DMSO y se encontró que bajo el 30% no mostraba halos de inhibición (tabla figura MS10). De este modo, se repitió el experimento de sensibilidad de las cepas utilizadas disolviendo el compuesto en DMSO 30%. En este caso se usó un rango de cantidades de NPY que caen en la parte inicial de la curva de inhibición del crecimiento de las cepas mostradas en la figura 17. En la Tabla IV se observa que la mayoría de las cepas son sensibles a cantidades mayores de 0,5 µg de NPY. Para B2T se usó un rango que va de 1 a 25 µg, y se observa que la mayoría de las cepas son sensibles a cantidades mayores a 15 µg de B2T, entre ellas *E. coli* K12 (tabla V).

Tabla IV. Efecto de NPY disuelto en DMSO 30% sobre la viabilidad bacteriana^a

CEPA	0,05 ug	0,1 ug	0,3 ug	0,5 ug	1 ug	2 ug
<i>B. subtilis</i>	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
<i>C. violaceum</i>	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
<i>E. aerogenes</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
<i>E. coli K-12</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
<i>P. mirabilis</i>	(-)	(-)	¿(+)?	(+)	(+)	(+)
<i>P. aeruginosa</i>	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
<i>Serratia sp</i>	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
<i>S. thyphimurium</i>	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
<i>S. aureus</i>	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)

Tabla V. Efecto de B2T disuelto en DMSO 30% sobre la viabilidad bacteriana^a

CEPA	0,5 ug	1 ug	2,5 ug	5 ug	10 ug	20 ug
<i>B. subtilis</i>	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
<i>C. violaceum</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
<i>E. aerogenes</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
<i>E. coli K-12</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
<i>P. mirabilis</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
<i>P. aeruginosa</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
<i>Serratia sp</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
<i>S. thyphimurium</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
<i>S. aureus</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

^aEn las tablas IV y V (-) corresponde a la ausencia y (+) a la presencia de halo de inhibición.

Estos resultados en su conjunto indican que la membrana externa de las bacterias Gram negativas actúa como barrera para la internalización de los compuestos y de este modo se ven afectadas en mayor grado las bacterias Gram positivas.

4.2. Curvas de crecimiento.

En los experimentos de la inhibición del crecimiento en placa por NPY y B2T se observó que NPY inhibe a *B. subtilis* con cantidades más bajas que a *E. coli* K12. Lo mismo sucede con B2T, en menor grado. Surge entonces la pregunta ¿es ésta inhibición producida sobre la división bacteriana, específicamente sobre FtsZ? Para responder esta pregunta se hicieron curvas de crecimiento de ambas cepas en presencia de ambos compuestos. Si la inhibición se produce sobre la división de la bacteria debiéramos esperar filamentación de las células. Para evaluar esta posibilidad, también se visualizó la morfología de estas bacterias por microscopía óptica.

En la figura 18A se observan las curvas de crecimiento de *E. coli* K12 en ausencia (control y control DMSO) y en presencia de 32 μM de NPY y 64 μM de B2T, las cuales presentan todas una conducta similar, con una típica fase exponencial y estacionaria. Estos resultados se condicen con la baja sensibilidad mostrada en los ensayos en placa. La figura 18B muestra las curvas de crecimiento para *B. subtilis* en ausencia (control y control DMSO) y en presencia de distintas concentraciones de NPY y de B2T. Se observa que a medida que se aumenta la concentración de NPY la fase de latencia aumenta de manera casi proporcional, y que la fase estacionaria se alcanza a DO menores. En algunos casos, la concentración más alta fue suficiente para inhibir el crecimiento totalmente. Para B2T se observa que la fase exponencial es muy similar a la de los controles, diferenciándose en la fase estacionaria que se alcanza a una DO más baja que los controles a las concentraciones 12 y 64 μM

de compuesto.

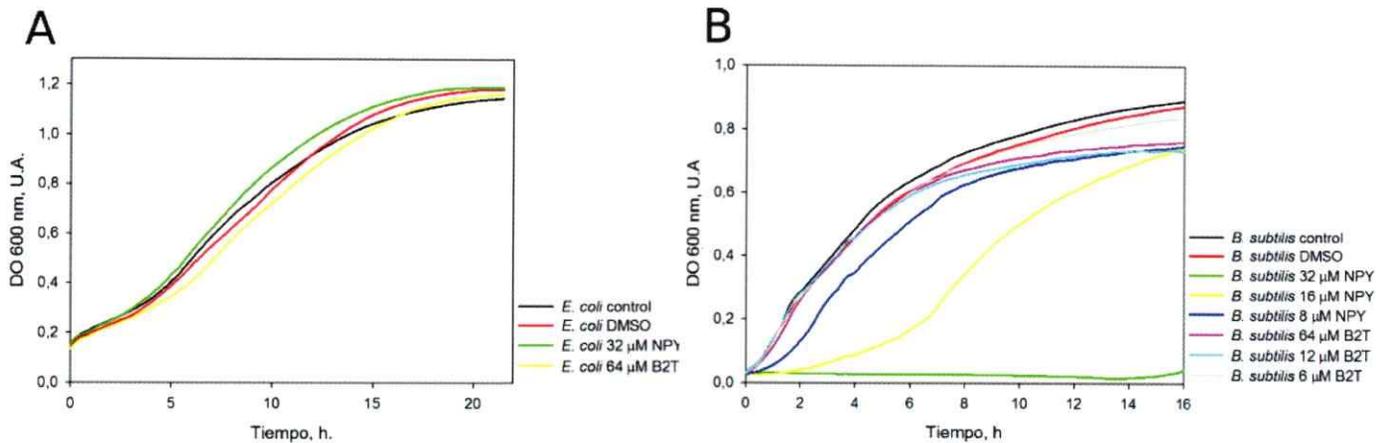


Figura 18. Efecto *in vivo* de NPY y B2T sobre el crecimiento de *E. coli* K12 y *B. subtilis*. Se midió la DO a 600 nm a distintos tiempos a cultivos de *E. coli* K12 y *B. subtilis* crecidos a 37 °C en ausencia (control y control DMSO) y presencia de los compuestos. A) Curvas de crecimiento de *E. coli* K12 en medio Mueller Hinton, en ausencia y en presencia de 32 µM de NPY y 64 µM B2T. B) Curva de crecimiento de *B. subtilis* en medio Mueller Hinton, en ausencia y en presencia de varias concentraciones de NPY (8, 16 y 32 µM) y B2T a varias concentraciones (6, 12 y 64 µM).

Estos resultados son coherentes con los obtenidos en placa, debido a que se observa un mayor efecto de ambos compuestos sobre la inhibición del crecimiento de *B. subtilis* respecto al de *E. coli* K12.

El crecimiento de *B. subtilis* en presencia de NPY después de una fase de latencia se puede deber a que la bacteria adquiere resistencia contra la acción del compuesto. En este caso, si se vuelven a crecer bacterias cosechadas después de la fase de latencia en presencia del compuesto debiera no verse afectado el crecimiento por NPY. En la figura 19 se muestran curvas de crecimiento de *B. subtilis*, inoculado con bacterias de un cultivo *over night*

crecido en presencia de 16 μM de NPY, en tres condiciones: control, control DMSO y con 16 μM de NPY. Se observa un comportamiento casi idéntico para las tres curvas, tanto en la fase exponencial como en la fase estacionaria, alcanzando una DO similar. Este resultado indica que el crecimiento después de la fase de latencia se debe a la aparición de resistencia a la acción del compuesto.

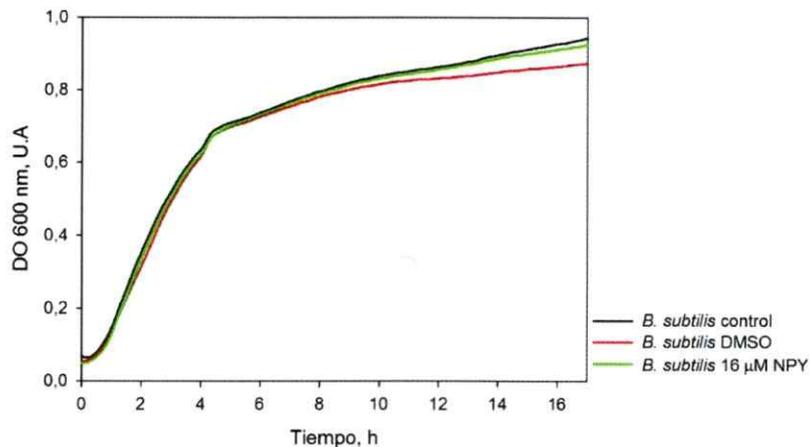


Figura 19. *B. subtilis* y resistencia a NPY. Se realizaron curvas de crecimiento de *B. subtilis* previamente expuesto a NPY para determinar si la bacteria adquiere resistencia al compuesto. Para ello se midió la DO a 600 nm a distintos tiempos a un cultivo de *B. subtilis* en presencia de NPY 16 μM , cuyo inóculo correspondió a un pre cultivo en estado estacionario crecido con NPY a la misma concentración. Se muestran también las curvas de crecimiento controles (mismo inóculo, sin compuesto y en presencia de DMSO). Los cultivos se crecieron con agitación a 37 °C en medio Mueller Hinton.

4.3. Morfología celular de las bacterias.

La figura 20 muestra fotografías de microscopía de las bacterias en ausencia y presencia de los compuestos, donde se aprecia la morfología de las bacterias.

Se observa que *E. coli* no muestra diferencias en tamaño o forma celular al ser crecida en ausencia (control) o presencia de los compuestos, tanto en estado exponencial como en estado estacionario (fotografías de campo claro en escala de grises). Las fotografías de campo claro de *B. subtilis* muestran la presencia de otras estructuras en presencia de ambos compuestos, las cuales son pequeñas y circulares y no se observan en el control. Estas estructuras, indicadas con flechas en la figura 20, se encuentran tanto en fase exponencial como estacionaria. Al utilizar yoduro de propidio en las muestras (fotografías de fluorescencia en rojo y negro), el cual tiñe material genético, sólo algunas de estas estructuras se marcan, indicándonos que las que no se tiñen podrían corresponder a minicélulas. Para discernir a que corresponden las estructuras que no se tiñeron con yoduro de propidio, se utilizó verde de malaquita, tinción que reconoce esporas de manera específica. Los resultados muestran que varias de estas estructuras desconocidas se marcan con la tinción. Estos experimentos en su conjunto nos indican que NPY y B2T tienen efecto sobre *B. subtilis*, induciendo la formación de esporas y minicélulas en estado exponencial y estacionario.

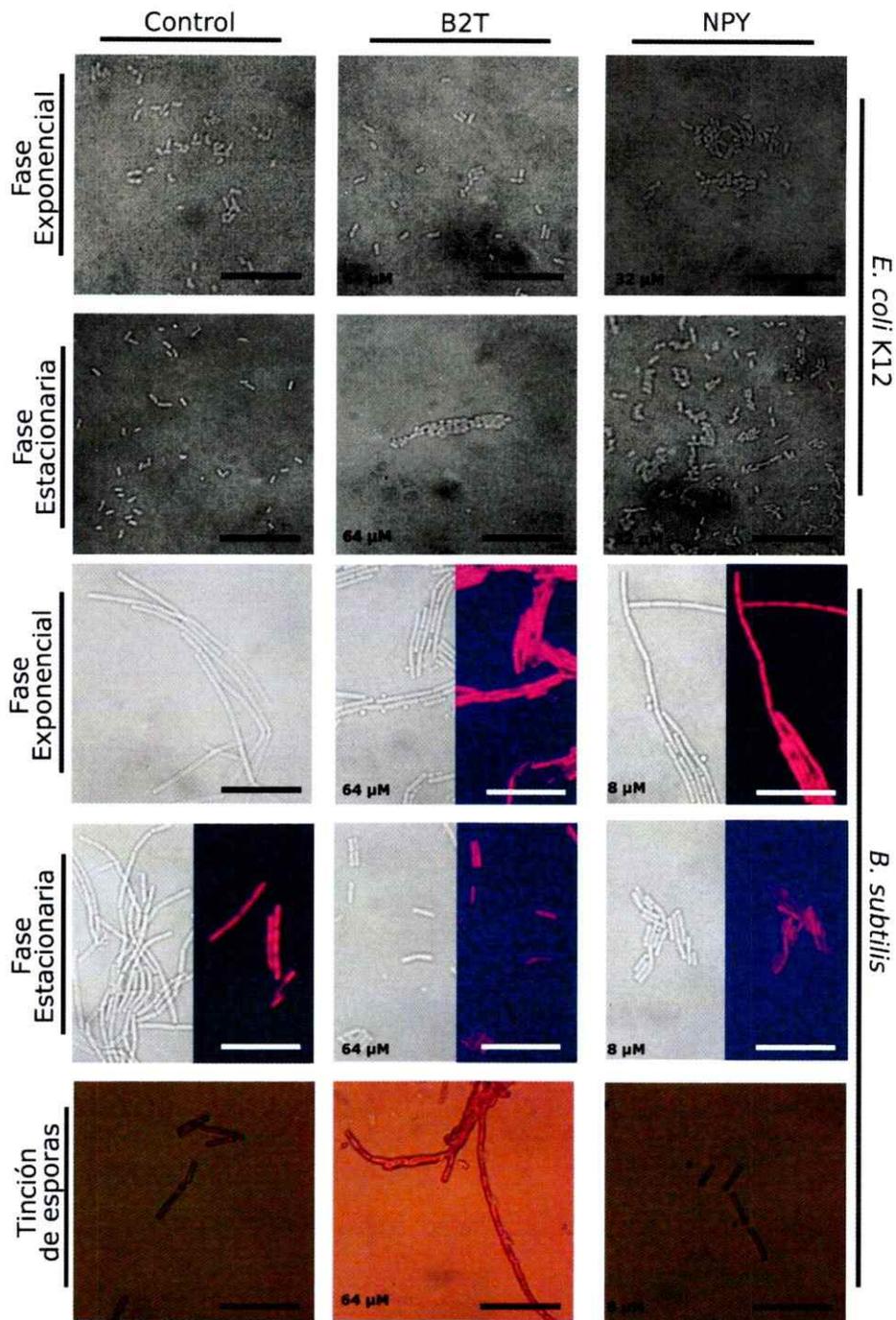


Figura 20. Morfología celular de *E. coli* y *B. subtilis* en presencia y ausencia de NPY y B2T. Fotografías de microscopía de campo claro (escala de grises), de fluorescencia con yoduro de propidio (color en rojo y negro) y campo claro con tinción de esporas (verde de malaquita). Las flechas indican estructuras que podrían corresponder a esporas (E) y minicélulas (MC). Barra = 25 μ m.



Discusión

En la hipótesis planteada en esta tesis se postula que “la similitud del efecto inhibitorio de DAPI en tubulina y FtsZ, permite predecir que los compuestos derivados de fenstatina que se unen a tubulina deberían también unirse a FtsZ de *Escherichia coli* (EcFtsZ) y de *Bacillus subtilis* (BsFtsZ) e inhibirlas”. Los resultados para las dos moléculas de la serie de moléculas de dihidroxinaftil (serie N) y bencil aril cetonas (serie B), específicamente 1,4-dihidroxinaftalen-2-il)(1H-pirrol-2-il) metanona (NPY) y (2,5-dihidroxifenil)(tiofen-2-il) metanona (B2T), muestran, por un lado, que NPY inhibe al heterodímero de tubulina en el rango micromolar bajo (Gutiérrez y cols., 2015) y que B2T no la inhibe, aún a concentraciones altas en este rango. Por otro lado, NPY es mucho mejor inhibidor del crecimiento bacteriano que B2T y de manera más efectiva sobre *B. subtilis* que sobre *E. coli*. *In vitro* la inhibición de la polimerización de FtsZ por NPY ocurre en el mismo rango que para tubulina. Al correlacionar esta inhibición con la división bacteriana, se encontró que efectivamente ambos compuestos inhiben la polimerización *in vitro* de EcFtsZ y BsFtsZ por mecanismos diferentes. Es así como NPY es el mejor inhibidor de la polimerización de FtsZ de ambas bacterias y muestra un mecanismo de inhibición indirecto al secuestrar la forma GDP de FtsZ, como polímeros no funcionales. Es interesante observar que con ambos compuestos no hay

cambios en la concentración crítica de polimerización y que la actividad GTPásica es levemente inhibida. Los resultados de microscopía electrónica muestran que la morfología de los filamentos se ve alterada, de modo que con NPY y B2T la longitud de los polímeros se hace más corta, responsable de una baja en la dispersión de luz. La polimerización inducida por NPY después que el GTP se hidroliza, es debida a la formación de pequeños semianillos que se agrupan para formar cúmulos, y, en el caso de BsFtsZ, forma además estructuras cilíndricas producto del apilamiento de los anillos. Este fenómeno, a nuestro conocimiento antes no descrito, muestra un nuevo mecanismo de inhibición de la división bacteriana.

Discutiremos a continuación el efecto de los compuestos sobre: el crecimiento bacteriano de *E. coli* y *B. subtilis*, la polimerización *in vitro* de FtsZ de ambas bacterias y por último, plantearemos un modelo que explique el mecanismo de inhibición de los compuestos sobre la polimerización de FtsZ.

1. Efecto de los compuestos NPY y B2T sobre el crecimiento bacteriano.

El crecimiento bacteriano se puede caracterizar de manera directa por la descripción y conteo de colonias (totales y viables) en placa, y también de manera indirecta por el seguimiento de la densidad óptica de un cultivo líquido en la llamada curva de crecimiento. Con el objeto de determinar el efecto inhibitor del crecimiento de los compuestos NPY y B2T, se midió la inhibición a través de la formación de halos sobre céspedes bacterianos en placa, y de

manera indirecta a través de la caracterización de las curvas de crecimiento. En placa se encontró un mayor efecto de NPY sobre bacterias Gram positivas, en especial *B. subtilis* que mostró sensibilidad a cantidades tan bajas como 0,1 µg, y a cantidades mayores hubo efecto de B2T sobre cepas Gram positivas y negativas (tabla IV y V). *E. coli* mostró sensibilidad a NPY y B2T a 5 y 10 µg, respectivamente. Lo habitual para un buen inhibidor es que presente su efecto a cantidades menores que 4 a 8 µg para diferentes antibióticos (Picazo, 2000). *E. coli* y *B. subtilis* están descritas como modelos clásicos de estudio en bacterias. Por estas razones, se escogieron como cepas representativas. Las curvas de crecimiento en presencia de ambos compuestos a su máxima solubilidad, que es menor que la cantidad usada en placas, mostraron que sólo *B. subtilis* es sensible a los compuestos a las concentraciones utilizadas (Fig. 18). El período de latencia del crecimiento aumenta con la concentración de NPY, típico comportamiento bacteriostático, pero a la más alta concentración permitida por la solubilidad, más bien se comporta como un bactericida en el tiempo en que medimos el crecimiento (2 días). Este comportamiento hace de NPY un muy buen candidato para convertirlo en un antibiótico, pues se comporta como bactericida a una concentración de 32 µM (8 µg/mL) similar a la de otros antibióticos conocidos, como la ampicilina o el cloranfenicol (Picazo, 2000). La morfología de la célula en presencia de NPY indica un aumento significativo en la esporulación y la formación de minicélulas en la fase exponencial. En la misma fase de crecimiento, B2T produce un mayor aumento en la formación de minicélulas que en la esporulación, sin un cambio en la fase de latencia

respecto al control y con una disminución de la densidad óptica en la fase estacionaria por sobre 12 μM de B2T (2,6 $\mu\text{g/mL}$). Para descartar un posible efecto de B2T sobre reguladores de la transcripción que actúan en la esporulación, se probaron dos concentraciones 5 y 10 veces más bajas y se observó que a la concentración más baja se perdía el efecto, descartando una posible inhibición a nivel transcripcional. Una posible explicación de la recuperación del crecimiento después del período de latencia a 8 y 16 μM de NPY, puede ser la adquisición de resistencia a este compuesto. Para probar esta hipótesis se tomó una alícuota de un cultivo de *B. subtilis* en fase estacionaria (24 horas) crecido en presencia de 16 μM de NPY y se utilizó como inóculo para un nuevo cultivo, el cual se dividió y creció en 3 condiciones: control, control DMSO y 16 μM de NPY (Fig.19). Los resultados de esta figura son compatibles con la adquisición de resistencia de la bacteria. Estos resultados también descartan la posibilidad que una insuficiente concentración de NPY haya dejado una pequeña población de células vivas, pues estas debieran haber sido sensibles al compuesto.

Una explicación razonable para la insensibilidad de *E. coli* a los compuestos es la impermeabilidad de su membrana externa. Sin embargo, otra explicación podría ser la acción de bombas de eflujo que disminuyeran la concentración efectiva del compuesto en el interior de la célula. Esta última posibilidad la medimos utilizando el inhibidor de bombas de eflujo tipo RND (*Resistance-Nodulation-cell Division*) denominado *Phenylalanine-arginine β -naphthylamide* (PA β N), que desgraciadamente inhibió *per se* el crecimiento de *E. coli* y no

permitió medir el efecto inhibitor de los compuestos. Así, la explicación más razonable sigue siendo que la membrana externa de *E. coli* actúa como barrera para la entrada de los compuestos, al igual como lo hace la membrana plasmática de células eucariontes debido al bajo valor de LogP, (2,41 y 2,62 para NPY y B2T, respectivamente), su solubilidad en la membrana se ve disminuida, con lo que disminuye la posibilidad de una simple difusión a través de ella (Benites y cols., 2016).

2. Efecto de los compuestos NPY y B2T sobre la polimerización de EcFtsZ y BsFtsZ.

La polimerización con GTP de FtsZ de ambas bacterias muestra un rápido incremento de la dispersión de luz seguido de un *plateau* y de una disminución de ésta producto de la despolimerización de los filamentos. En presencia de NPY no se alcanza un *plateau*, pues la dispersión de luz continúa aumentando hasta un punto en el cual cae producto de la despolimerización y alcanza un valor mayor que el control. Se observa que una vez que despolimeriza hay un aumento lineal de la dispersión de luz. Las velocidades del aumento de la dispersión de luz observadas durante la polimerización y luego de la despolimerización dependen directamente de la concentración de NPY. Interpretamos este comportamiento como la polimerización simultánea de dos clases de polímeros, una formación de filamentos con GTP más cortos y curvos que permanecen hasta su despolimerización y otra polimerización, inducida por NPY, que se hace evidente después de la despolimerización con la formación

de anillos y seminillos cortos con BsFtsZ-GDP, que se agrupan como cilindros, y la formación de cúmulos de filamentos curvos con EcFtsZ-GDP.

Así, para EcFtsZ en presencia de NPY se observa un aumento lineal de la pendiente del estado estacionario, propio de una velocidad constante en la formación de los nuevos polímeros inducidos por este compuesto. En cambio, la polimerización de BsFtsZ con GTP muestra un *overshoot* no evidente en el control y una actividad GTPásica menor a la de EcFtsZ, que explicaría la pendiente levemente negativa durante el aumento de la dispersión de luz en la etapa correspondiente al estado estacionario (Figuras 6 y 7). En presencia de NPY, se observa un aumento de la dispersión que va desacelerando hasta llegar a un máximo, lo que puede ser explicado por la sumatoria de la dispersión de luz de los nuevos polímeros inducidos por NPY y la reducción del largo de los polímeros inducidos por GTP (fig. MS5) previo a su despolimerización. La disminución acelerada de la dispersión se puede explicar por la rápida despolimerización de polímeros más cortos (más puntas). Pese a esta aceleración, la pendiente de despolimerización es menor que para EcFtsZ, lo que se explica también por la actividad GTPásica más baja (tabla III). El mecanismo planteado se resume en el esquema de la figura 21.

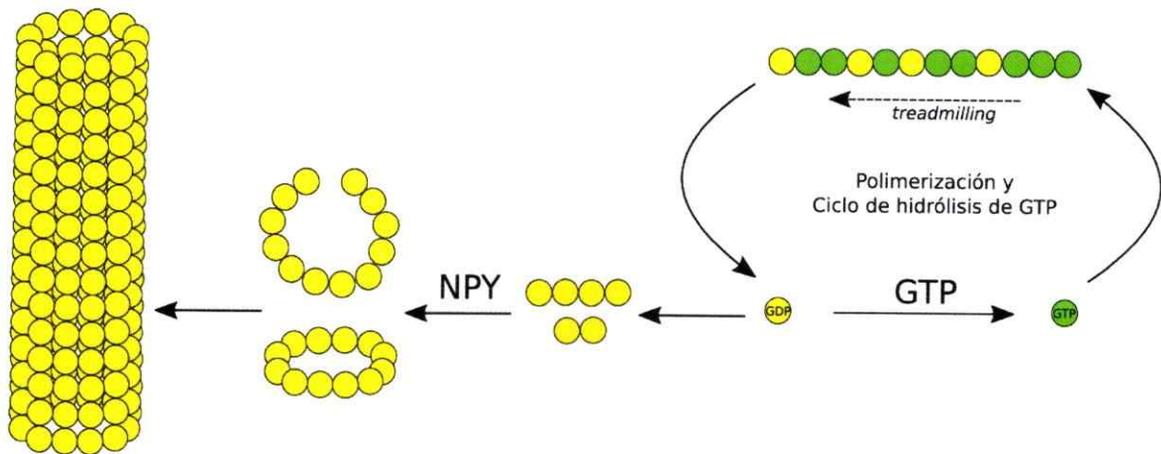


Figura 21. Esquema del mecanismo propuesto para la formación de semianillos, anillos y cilindros inducidos por NPY. Se incluye en este esquema la polimerización de los filamentos inducidos por GTP para explicar el mecanismo de inhibición de la polimerización de FtsZ producido por NPY. Se indica con esferas amarillas la forma FtsZ-GDP y con esferas verdes la forma FtsZ-GTP. Este esquema daría cuenta de una inhibición por pérdida de la proteína apta para la formación de filamentos.

Los resultados de microscopía electrónica, de actividad GTPásica y de concentración crítica de los polímeros formados en presencia de NPY apoyan la hipótesis planteada (figura 11, tabla II y figura 12).

Para demostrar la presencia de polímeros de FtsZ-GDP inducidos por NPY, como se muestra en el esquema de la figura 21, se indujo la polimerización de EcFtsZ y BsFtsZ con NPY, en presencia de un exceso de GDP (2 mM) (ver figuras 13, 14, 15 y 16). Los resultados mostraron que con BsFtsZ se formaban cilindros de anillos, que no aparecen con EcFtsZ, además de otras estructuras (tabla VI). La formación de estos polímeros resultó ser dependiente de la concentración de proteína y de Mg^{2+} , fenómeno ya descrito para EcFtsZ-GDP (Rivas y cols., 2000). Estas estructuras, a nuestro entender no antes descritas,

resultan interesantes porque por un lado explican el efecto inhibitorio de NPY y por otro la inducción de interacciones laterales entre los anillos, que estabilizan estas estructuras secuestrando a FtsZ. Especulando, podríamos decir que una baja en la concentración de FtsZ funcional es la responsable del estrés celular producido en *B. subtilis*, que induce la esporulación y la formación de minicélulas (Feucht y Errington, 2005).

Tabla VI. Características morfológicas de los polímeros de EcFtsZ y BsFtsZ en ausencia y presencia de los compuestos.

Condición	EcFtsZ	BsFtsZ
Control	Filamentos simples, largos, helicoidales y curvos.	Filamentos cortos y curvos, más algunos largos.
NPY	<p>P^a. Filamentos simples, dobles y triples, más cortos que el control y curvos.</p> <p>D^b. Manojos rectos de 8-30 nm de ancho. Cúmulos de filamentos cortos y curvos.</p> <p>P^c. Filamentos curvos algunas veces espiralados con un ancho de más o menos 18 nm y que forman semianillos que se agrupan en forma desordenada (cúmulos).</p>	<p>P^a. Filamentos más cortos y curvos que el control, incluso semicírculos.</p> <p>D^b. Filamentos cortos, curvos, anchos y poco definidos. Semicírculos y estructuras cilíndricas formadas por anillos apilados de $19,2 \pm 0,9$ nm de diámetro.</p> <p>P^c. Filamentos curvos algunas veces espiralados con un ancho de más o menos 18 nm y que forman semianillos que se agrupan en forma desordenada (cúmulos). Semianillos de $18,9 \pm 4,3$ nm de diámetro. También aparecen estructuras cilíndricas de estos anillos con un diámetro de $19,3 \pm 2,4$ nm.</p>
B2T	Filamentos simples, dobles y triples, más cortos y curvos que el control.	Filamentos más cortos y curvos que el control.
Largo filamentos		
EcFtsZ>EcFtsZ _{B2T} >EcFtsZ _{NPY} >BsFtsZ>BsFtsZ _{NPY} >BsFtsZ _{B2T}		
<p>^a Durante la polimerización GTP</p> <p>^b Post despolimerización GTP</p> <p>^c Polimerización GDP</p>		

La discusión de los resultados de B2T los haremos respecto a NPY considerando sus estructuras, sus afinidades por FtsZ y la conducta de inhibición de la polimerización de FtsZ y esta última la complementaremos con los resultados de microscopía electrónica. Al comparar las dos estructuras se observa que NPY tiene una estructura más voluminosa que B2T debido a la presencia del anillo naftil en NPY respecto al anillo bencil en B2T (ver figura 2). Por lo tanto, uno esperaría que la hidrofobicidad de NPY fuese mayor que la de B2T debido al grupo naftil en NPY. Sin embargo, los valores de LogP teóricos indican lo contrario, por lo tanto esta diferencia se puede explicar por la presencia de un grupo NH en el anillo pirrol, con capacidad de formar un puente de hidrógeno y que está ausente en B2T al reemplazarse por un azufre, de acuerdo la estructura del sitio de unión determinado para los compuestos en laboratorio por bionformática (Poblete, B. 2012). Así, estas propiedades serían las responsables de la aparición de polímeros de FtsZ-GDP con NPY y que se encuentran ausentes durante la polimerización y despolimerización de EcFtsZ y BsFtsZ en presencia de B2T. Por lo tanto, el efecto inhibitor de B2T se explica por una inhibición parcial de la polimerización de FtsZ que responde a una conducta de saturación (ver figuras 9 y 10). Se observa además que la afinidad, expresada como afinidades relativas para el efecto de la inhibición de la polimerización de la proteína con GTP, es casi dos veces menor para NPY respecto a B2T, lo que implica una menor afinidad de este compuesto por FtsZ-GTP, indicando que el efecto y mecanismo inhibitor de B2T es distinto al de NPY y confirmando que el efecto inhibitor de NPY se debe principalmente a la

inducción de polímeros FtsZ-GDP (ver figura 21). De este modo, B2T induce la aparición de filamentos dobles y más cortos (figura 11 y MS5). Esto es responsable de que no ocurra un cambio en la concentración crítica con una disminución en la pendiente de la recta, y que se produzca una pequeña disminución de la actividad GTPásica para ambas proteínas, EcFtsZ y BsFtsZ.

Resumen de resultados

1. NPY es mejor inhibidor de la polimerización *in vitro* de EcFtsZ y BsFtsZ y del crecimiento bacteriano de *B. subtilis*.
2. La inhibición de la polimerización *in vitro* de EcFtsZ y BsFtsZ por NPY se explica por un nuevo mecanismo que consiste en el reclutamiento de la proteína en estado GDP en nuevas estructuras poliméricas (semianillos, anillos, cilindros y cúmulos).
3. La inhibición del crecimiento bacteriano por NPY y B2T es exclusiva para *B. subtilis*, e induce la formación de esporas y minicélulas.

Conclusiones

1. NPY es mejor inhibidor de la polimerización de tubulina *in vitro* que de FtsZ, sin embargo resultados del laboratorio muestran que NPY no es inhibidor del crecimiento de células eucariontes. Por el contrario, los resultados de esta tesis muestran que NPY es un buen inhibidor de bacterias Gram positivas, convirtiéndolo en un muy bien candidato a antibiótico.
2. B2T no inhibe la polimerización de tubulina *in vitro*, pero si la de FtsZ. Sin embargo, a diferencia de NPY, no es un buen inhibidor del crecimiento bacteriano.

Bibliografía

Anderson, D.E., Kim, M.B., Moore, J.T., O'Brien T.E., Sorto, N.A., Grove, C.I., Lackner, L.L., Ames, J.B. y Shaw, J.T. Comparison of small molecule inhibitors of the bacterial cell division protein FtsZ and identification of a reliable cross-species inhibitor. *ACS Chem Biol.* 7(11):1918-1928.

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

Barreteau, H., Kovac, A., Boniface, A., Sova, M., Gobec, S. y Blanot, D. 2008. Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Micro Rev.* 32(2):168-207.

Benites, J., Rios, D., Díaz, P. y Valderrama, J.A. 2011. The solar-chemical photo-Friedel-Crafts heteroacylation of 1, 4-quinones. *Tetrahedron Lett.* 52(5):609-611.

Benites, J., Valderrama, J.A., Ríos, D., Lagos, R., Monasterio, O. y Buc Calderon, P. 2016. Inhibition of cancer cell growth and migration by dihydroxynaphthyl aryl ketones. *Mol Cel Toxicol.* 12(3):237-242.

Bisson, W., Hsu, Y., Squyres, G., Kuru, E., Wu, F., Jukes, C., Dekker, C., Holden, S., VanNieuwenhze, M., Brun, Y. y Garner, E. 2016. Treadmilling by FtsZ filaments drives peptidoglycan synthesis and bacterial cell division. *bioRxiv.* doi: <https://doi.org/10.1101/077560>

Casadaban, M. y Cohen, S. 1980. Analysis of gene control signals by DNA fusion and cloning in *Escherichia coli*. *J Mol Biol.* 138:179-207.

Cockerill, F.R., Wikler, M.A., Alder, J., Dudley, M.N., Eliopoulos, G.M., Ferraro, M.J., Hardy, D.J., Hecht, D.W., Hindler, J.A., Patel, J.B., Powell, M., Swenson, J.M., Thomson, R.B., Traczewski, M.M., Turnidge, J.D., Weinstein, M.P. y Zimmer, B.L. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved standard. 2009. 9ª Edition M07-A9. 32(2):2162-2914.

Delcour, A.H. 2009. Outer membrane permeability and antibiotic resistance.

Biochem Biophys Acta. 1794(5): 808-816.

den Blaauwen, T., Andreu, J.M. y Monasterio, O. 2014. Bacterial cell division proteins as antibiotic targets. *Bioorg Che.* 55:27-38.

Fanale, D., Bronte, G., Passiglia, F., Caló, V., Castiglia, M., Di Piazza, F., Barraco, N., Cangemi, A., Catarella, M.T., Insalaco, L., Listì, A., Maragliano, R., Massihnia, D., Pérez, A., Toia, F., Cicero, G. y Bazan, V. 2015. Stabilizing versus destabilizing the microtubules: a double-edge sword for an effective cancer treatment option. *Anal Cell Pathol.* ID 690916.

Feucht, A. y Errington, J. 2005. FtsZ mutations affecting cell division frequency, placement and morphology in *Bacillus subtilis*. *Microbiol.* 151:2053-2064.

Garcés, A. 2007. Predicción y caracterización de las superficies de interacción intramolecular e intermolecular de la proteína FtsZ de *Escherichia coli*. Tesis de pregrado. Universidad de Chile, Chile.

Gualerzi, D.O., Brandi, L., Fabbretti, A. y Po, C.L. 2014. Antibiotics: Target, Mechanism and Resistances. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Boschstr. 12, 69469 Weinheim, Germany

Gutiérrez, E., Benites, J., Valderrama, J.A., Calderon, P.B., Verrax, J., Nova, E., Villanelo, F., Maturana, D., Escobar, C., Lagos, R. y Monasterio, O. 2015. Binding of dihydroxynaphthyl aryl ketones to tubulin colchicine site inhibits microtubule assembly. *Biochem Biophys Res Commun.* 466(3):418-25.

Huecas S1, Andreu JM. 2004. Polymerization of nucleotide-free, GDP- and GTP-bound cell division protein FtsZ: GDP makes the difference. *FEBS Lett.* 569(1-3):43-48.

Hussey, M. y Zayaitz, A. 2007. Endospore stain protocol. American Society for Microbiology. Laboratory protocols.

Läppchen, T., Pinas, V.A., Hartog, A. F., Koomen, G., Schaffner-Barbero, C., Andreu, J. M., Trambaiolo, D., Löwe, J., Juhem, A., Popov, A. y den Blaauwen, T. 2008. Probing FtsZ and tubulin with C8-Substituted GTP analogs reveals differences in their nucleotide binding sites. *Chem Biol.* 15(2):189-199.

Li, X. y Ma, S. 2015. Advances in the discovery of novel antimicrobials targeting the assembly of bacterial cell division protein FtsZ. *Eur J Med Chem.* 95:1-15.

Löwe, J. y Amos, L.A. 1998. Crystal structure of the bacterial cell-division protein FtsZ. *Nature.* 391(6663):203-206.

Margalit, D.N., Romberg, L., Mets, R.B., Hebert, A.M., Mitchison, T.J., Kirschner,

- M.W. y RayChaudhuri, D. 2004. Targeting cell division: Small-molecule inhibitors of FtsZ GTPase perturb cytokinetic ring assembly and induce bacterial lethality. *Proc Natl Acad Sci.* 101(32):11821-11826.
- Monasterio, O, y Timasheff, S. 1987. Inhibition of tubulin self-assembly and tubulin-colchicine GTPase activity by guanosine 5'-(γ -fluorotriphosphate). *Biochem.* 26: 6091-6099.
- Morens, D.M., Folkers, G.K. y Fauci, A.S. 2004. The challenge of emerging and re-emerging infectious diseases. 2004. *Nature Rev.* 430, 242-249.
- Mukherjee, A. y Lutkenhaus, J. 1999. Analysis of FtsZ assembly by light scattering and determination of the role of divalent metal cations. *J Biol Chem* 181(3):823-832.
- Nguyen, Y. y Sperandio, V. 2012. Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) pathogenesis. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2:90.
- Nogales, E., Wolf, S.G. y Downing, K.H. 1998. Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography. *Nature.* 391(6663):199-203.
- Nova, E., Montecinos, F., Brunet, J.E., Lagos, R. y Monasterio, O. 2007. 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) induces bundling of *Escherichia coli* FtsZ polymers inhibiting the GTPase activity. *Arch Biochem Biophys.* 465(2):315-319. Epub 2007 Jul 10.
- Oliva, M.A., Trambaiolo, D. y Löwe, J. 2007. Structural insights into the conformational variability of FtsZ. *J Mol Biol.* 373:1229-1242.
- Picazo, J.J (ed). 2000. *Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Capítulo 11: Métodos básicos para el estudio de sensibilidad a los antimicrobianos.*
- Poblete, B. 2012. Análisis bioinformático del efecto de inhibidores de FtsZ. Tesis pregrado. Universidad de Talca, Chile.
- Rivas, G., López, A., Mingorance, J., Ferrándizi, M.J., Zorrilla, S., Minton, A.P., Vicente, M. y Andreu, J.M. 2000. Magnesium-induced linear self-association of the FtsZ bacterial cell division protein monomer. The primary steps for FtsZ assembly. *J Biol Chem.* 275(16):11740-11749.
- Romberg, L., Simon, M. y Erickson, H.P. 2001. Polymerization of Ftsz, a bacterial homolog of tubulin. is assembly cooperative?. *J Biol Chem.* 276(15):11743-53

Singh, P., Jindal, B., Surolia, A. y Panda, D. A. 2012. Rhodanine derivative CCR-11 inhibits bacterial proliferation by inhibiting the assembly and GTPase activity of FtsZ. *Biochem.* 51:5434-5442.

Studier, F.W. y Moffatt, B.A. 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high level expression of cloned genes. *J Mol Biol.* 189:60-89.

Sutherland, A. G., Alvarez, J., Ding, W., Foreman, K.W., Kenny, C. H., Labthavikul, P., Mosyak, L., Petersen, P. J., Rush, T. S., Ruzin, A., Tsao, D. H. y Wheless, K.L. 2003. Structure-based design of carboxybiphenylindole inhibitors of the ZipA-FtsZ interaction. *Org Biomol Chem.* 1(23):4138-4140.

Walsh, C. y Wencewicz, T. 2016. Antibiotics: challenges, mechanisms, opportunities. pag. 5, 13 y 182. ASM Press. Washington, DC.

Wang, J., Galgoci, A., Kodali, S., Herath, K.B., Jayasuriya, H., Dorso, K., Vicente, F., González, A., Cully, D., Bramhill, D. y Singh, S. 2003. Discovery of a small molecule that inhibits cell division by blocking FtsZ, a novel therapeutic target of antibiotics. *J Biol Chem.* 278:4424-44428.

Wang, X. y Lutkenhaus, J. 1993. The FtsZ protein of *Bacillus subtilis* is localized at the division site and has GTPase activity that is dependent upon FtsZ concentration. *Mol Microbiol.* 9(3):435-442.

Yang, X., Lyu, Z., Miguel, A., McQuillen, R., Huang, K. y Xiao, J. 2016. GTPase activity-coupled treadmilling of the bacterial tubulin FtsZ organizes septal cell-wall synthesis. *bioRxiv.* doi: <https://doi.org/10.1101/>

Zgurskaya, H.I, López, C.A, Gnanakaran, S. 2015. Permeability barrier of Gram-negative cell envelopes and approaches to bypass it. *ACS Infect Dis.* 1(11):512-522.



MATERIAL SUPLEMENTARIO

1. *Pureza de EcFtsZ y BsFtsZ.* En la figura MS1 se muestra el SDS-PAGE de EcFtsZ y de BsFtsZ purificadas, a diferentes concentraciones de proteínas. Para EcFtsZ se observa una banda principal que corresponde al valor de la masa molecular de la proteína. Para BsFtsZ se observan dos bandas, siendo la de mayor masa molecular y más abundante BsFtsZ sobreexpresada en *E. coli*, y la menos abundante corresponde a EcFtsZ expresada en un plásmido de muy bajo número de copias, necesaria para la viabilidad bacteriana. Estos resultados muestran que aun a la mayor concentración de proteína utilizada solo se observan algunas bandas de mayor masa molecular y muy baja intensidad respecto a la banda principal para EcFtsZ. Estas no están presentes en la preparación de BsFtsZ.

2. *Polimerización de tubulina.* En la figura MS2 se observa la cinética de polimerización del heterodímero de tubulina de cerebro de pollo, inducida por el aumento de temperatura a 37 °C. La cinética muestra dos fases, la primera hasta los 5 minutos es más lenta que la segunda medida hasta los 15 minutos. Este fenómeno es anómalo, pues debiese haber una sola fase con características más similares a la segunda. Al bajar la temperatura a los 15 minutos de polimerización, se observa una rápida despolimerización que

alcanza sólo el 50% para el control. Esta conducta se podría explicar por la polimerización o agregación de otros polímeros resistentes a la baja de temperatura, que estarían relacionados con la primera fase de polimerización. Se observa además que B2T no modifica la conducta de polimerización y sólo se observa una menor despolimerización (90,9%) al bajar la temperatura. Podemos concluir que, en términos de la polimerización, B2T no tiene efecto.

3. *Efecto de NPY sobre la polimerización in vitro de EcFtsZ.* En la figura MS3 se muestran los 3 análisis realizados a partir de las cinéticas de polimerización de EcFtsZ en presencia de NPY seguidas por *light scattering*. Estos análisis muestran la relación entre los cambios de la intensidad de la dispersión de luz y la concentración de NPY en diversos puntos de las cinéticas. Los ajustes obtenidos de estos análisis entregan valores de $I_{0,5}$ similares, los cuales indican que la mitad del efecto inhibitorio dado por NPY se obtiene a una concentración de alrededor de 4-5 μM .

4. *Efecto de NPY sobre la polimerización in vitro de BsFtsZ.* En la figura MS4 se muestran los 2 análisis realizados a partir de las cinéticas de polimerización de BsFtsZ en presencia de distintas concentraciones de NPY seguidas por *light scattering*. Estos análisis muestran la relación entre los cambios de la intensidad de la dispersión de luz y la concentración de NPY en diversos puntos de las cinéticas. Los ajustes obtenidos de estos análisis entregan valores de $I_{0,5}$ similares, los cuales indican que la mitad del efecto inhibitorio dado por NPY se

obtiene a una concentración de alrededor de 4-9 μM .

5. *Dimensiones los filamentos de EcFtsZ y BsFtsZ.* En la figura MS5 se muestra el efecto de los compuestos NPY y B2T sobre el ancho y el largo de los filamentos de EcFtsZ y sobre el largo de los filamentos de BsFtsZ. Se observa que NPY induce una disminución del ancho de los filamentos de EcFtsZ, aumentando la población de filamentos simples, respecto al control, con un aumento de la heterogeneidad de la población. B2T aumenta la población de filamentos triples y disminuye los filamentos simples y dobles. Respecto al largo de los filamentos, se observa que los filamentos de EcFtsZ son más largos que los de BsFtsZ. Al comparar el efecto de NPY y B2T, se observa que para EcFtsZ se produce una disminución del largo, lo mismo que para B2T con BsFtsZ. Interesantemente, NPY aumenta el largo de los filamentos de BsFtsZ.

6. *Efecto de B2T sobre la polimerización in vitro de EcFtsZ.* En la figura MS6 se muestra el análisis de las cinéticas de polimerización de EcFtsZ en presencia de distintas concentraciones de B2T, seguidas por *light scattering*. Éste análisis se expresó como % de inhibición en función de la concentración de B2T. El % de inhibición se obtuvo a partir de la diferencia entre la intensidad de dispersión de luz (ΔI) al inicio de la polimerización y la línea base. El valor obtenido para el $I_{0,5}$ de 27,42 μM indica la concentración de B2T a la cual se obtiene la mitad del efecto inhibitorio.

7. *Efecto de B2T sobre la polimerización in vitro de BsFtsZ.* En la figura MS7 se muestra el análisis de las cinéticas de polimerización de BsFtsZ en presencia de distintas concentraciones de B2T, seguidas por *light scattering*. Este análisis se expresó como % de inhibición en función de la concentración de B2T. El % de inhibición se obtuvo a partir de la diferencia entre la intensidad de dispersión de luz (ΔI) al inicio de la polimerización y la línea base. Los puntos experimentales se ajustaron a una hipérbola, de donde se obtuvo un $I_{0,5} = 14,13 \pm 2,30 \mu\text{M}$, valor que indica la concentración de B2T a la cual se alcanza la mitad de su efecto inhibitorio.

8. *Concentración crítica de FtsZ-GDP en presencia de NPY.* A partir del ajuste de cinéticas de EcFtsZ-GDP y BsFtsZ-GDP, a distintas concentraciones de proteína en presencia de NPY, a la ecuación $I = A (1 - \exp^{-k't})$, es posible obtener el máximo de intensidad, para cada condición. Estos valores se graficaron en función de la concentración de proteína como se muestra en la figura MS8 y se ajustó a una recta para obtener el valor de la concentración crítica. Para ambas proteínas, la recta intersecta en x en 0, lo cual nos indica la ausencia de concentración crítica o de una concentración mínima de FtsZ para que se produzca la polimerización inducida por NPY.

9. *Influencia de Mg^{2+} en el efecto de NPY sobre FtsZ-GDP.* En la figura MS9 se muestran los resultados que se obtuvieron para determinar la influencia de Mg^{2+} en la polimerización de EcFtsZ-GDP (A) y BsFtsZ-GDP (B) en presencia de

NPY, a dos concentraciones de proteína, tanto en ausencia (EDTA) como en presencia de Mg^{2+} . Se observa que para ambas proteínas se produce un lento aumento de la dispersión de luz en presencia de NPY y ausencia de Mg^{2+} , que alcanza un equilibrio. El desplazamiento del equilibrio a polímeros que dispersan más luz depende de la concentración de proteína para EcFtsZ, no así para BsFtsZ. En presencia de 10 mM de Mg^{2+} , EcFtsZ (A) muestra un período de latencia, seguido por un aumento lineal de la dispersión de luz hasta alcanzar un equilibrio al menos un orden de magnitud mayor que en ausencia de Mg^{2+} para ambas concentraciones de proteína. La velocidad de la reacción después del período de latencia es dependiente de la concentración de proteína. En (B) se muestra que el comportamiento de BsFtsZ no es idéntico al de EcFtsZ, pues las cinéticas en presencia de Mg^{2+} y NPY no presentan periodo de latencia y en su parte inicial son más rápidas, pero dependen de la concentración de proteína. De los ensayos se observa también que 1 mM de EDTA es suficiente para establecer la condición sin Mg^{2+} .

10. *Tabla de efectos de minociclina, DMSO 30% y DMSO 100% sobre la viabilidad bacteriana.* En la figura MS10 se muestran los controles realizados para los ensayos de halos de inhibición. El control positivo es el antibiótico minociclina, al cual todas las cepas ensayadas se mostraron sensibles. Se muestra el control DMSO 100%, para el cual dos cepas, *C. violaceum* y *S. aerus*, son sensibles, y el control DMSO 30%, para el cual ninguna de las cepas presenta sensibilidad.

Pureza de EcFtsZ y BsFtsZ

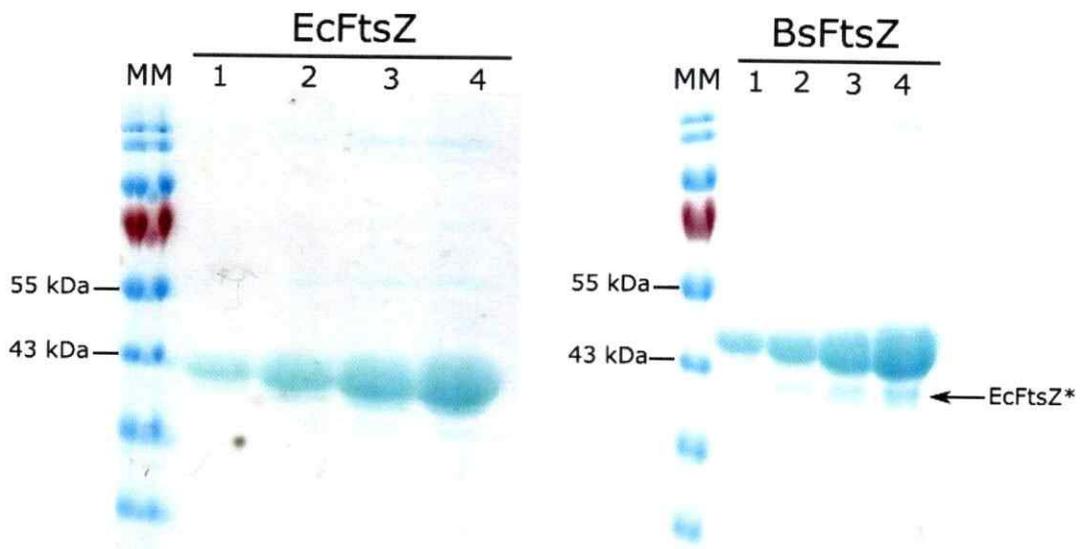


Figura MS1. SDS-PAGE de EcFtsZ y de BsFtsZ purificadas por ciclos de polimerización. En la figura se muestran los geles en los que se observan las bandas correspondientes a EcFtsZ y BsFtsZ en distintas cantidades. MM es el estándar de masa molecular; 1, 2, 3 y 4 son distintas cantidades de EcFtsZ y BsFtsZ (1,25; 2,5; 5 y 10 μ g, respectivamente). Para EcFtsZ se observa en cada carril una banda principal que corresponde a una masa molecular de 40 kDa, coherente con la masa molecular de la proteína. Para BsFtsZ, en cada carril se observa una banda sobre los 43 kDa, de acuerdo a lo esperado, y a las concentraciones más altas aparece una banda de menor intensidad y con menos masa molecular (indicada con una flecha) que corresponde a EcFtsZ, la cual es co-purificada debido a que es necesaria su expresión durante la sobreexpresión de BsFtsZ en *E. coli* para lograr la viabilidad celular.

Polimerización de tubulina

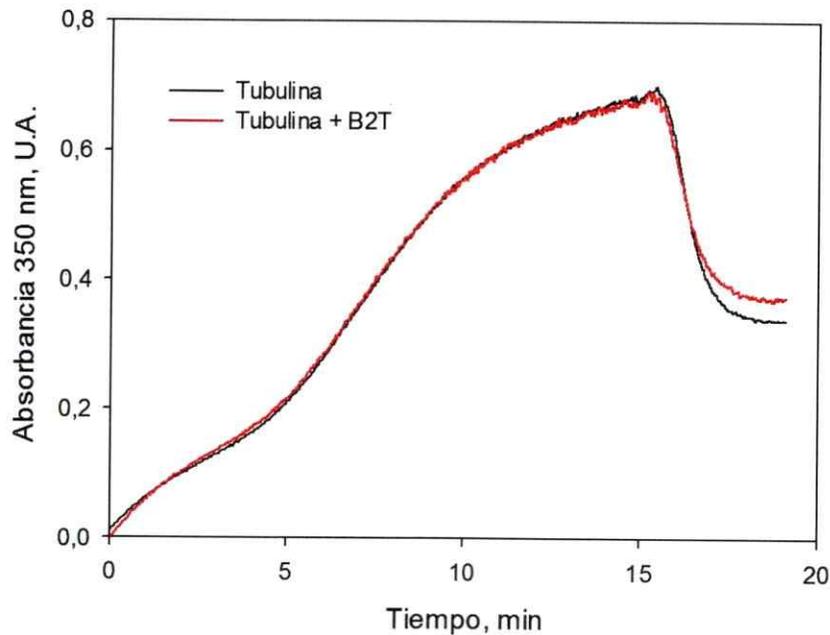


Figura MS2. Efecto de B2T sobre la polimerización de tubulina. La polimerización de tubulina en ausencia y presencia de B2T se midió siguiendo los cambios de la turbidez a 350 nm, por un aumento de la temperatura desde 0 a 37 °C (tiempo 0) para inducir la polimerización. La despolimerización se indujo bajando la temperatura a 4 °C alrededor de los 15 minutos de comenzada la polimerización. La concentración de proteína utilizada fue de 1,5 mg/mL y la de B2T de 64 μ M. El amortiguador de polimerización utilizado contiene fosfato de sodio 10 mM pH 7, GTP 0,1 mM, $MgCl_2$ 16 mM, EGTA 1 mM y glicerol 25 % (v/v).

Ajuste a una conducta sigmoidea de las cinéticas de polimerización de EcFtsZ en presencia de NPY

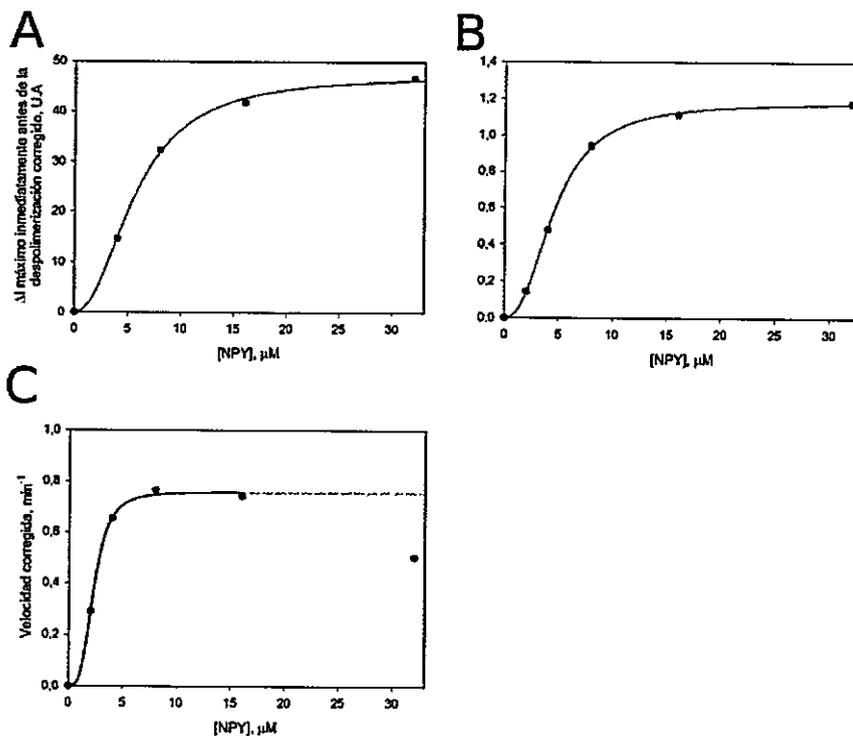


Figura MS3. Análisis del efecto de NPY sobre la polimerización de EcFtsZ inducida por GTP. A) ΔI alcanzado inmediatamente antes de la despolimerización, respecto al control, en función de la concentración de NPY. Estos valores se ajustaron a una sigmoidea, arrojando un $I_{0,5} = 5,74 \pm 0,21 \mu\text{M}$ y un $n_h = 2,17 \pm 0,18$. B) Pendientes de la intensidad de la dispersión de luz durante la polimerización expresadas como velocidad en función de la concentración de NPY. Estos valores se ajustaron a una ecuación sigmoidea, de la cual se obtuvo los siguientes valores $I_{0,5} = 4,64 \pm 0,08$ y $n_h = 2,42 \pm 0,08$. C) Pendientes de la dispersión de luz post despolimerización en función de la concentración de NPY. Estos datos experimentales presentan una conducta sigmoidea, con un valor de $I_{0,5} = 2,3 \pm 0,06 \mu\text{M}$ y un $n_h = 3,42 \pm 0,35$. La línea punteada en rojo corresponde a la extrapolación del ajuste de los datos hasta $32 \mu\text{M}$, sin considerar el valor experimental de este punto.

Ajuste a una conducta sigmoidea e hiperbólica de las cinéticas de polimerización de BsFtsZ en presencia de NPY

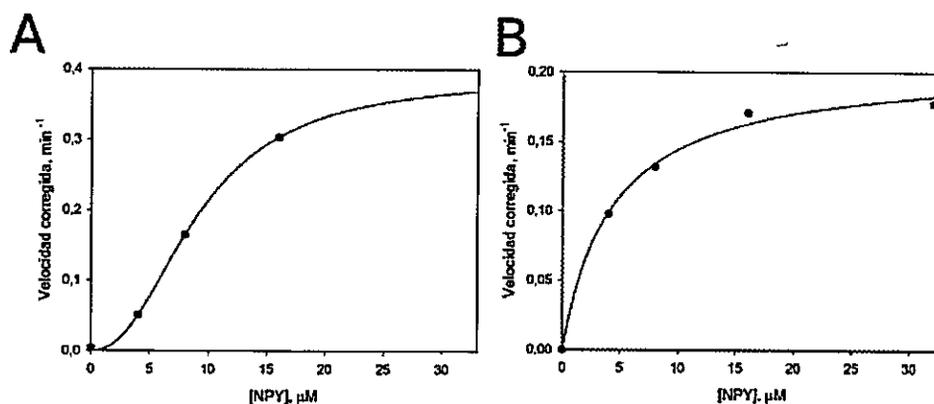


Figura MS4. Análisis del efecto de NPY sobre la polimerización de BsFtsZ inducida por GTP. A) Pendientes de la intensidad de la dispersión de luz durante la polimerización expresadas como velocidad en función de la concentración de NPY. Estos valores se ajustaron a una ecuación sigmoidea, de la cual se obtuvo los siguientes valores de $I_{0,5} = 9,13 \pm 0,66 \mu\text{M}$ y $n_h = 2,29 \pm 0,20$. B) Pendientes de la intensidad de luz después de la despolimerización, expresadas como velocidad en función de la concentración de NPY. Estos valores se ajustaron a una hipérbola, de la cual se obtuvo un $I_{0,5} = 4,37 \pm 0,62 \mu\text{M}$.

Dimensiones de los filamentos de EcFtsZ y BsFtsZ

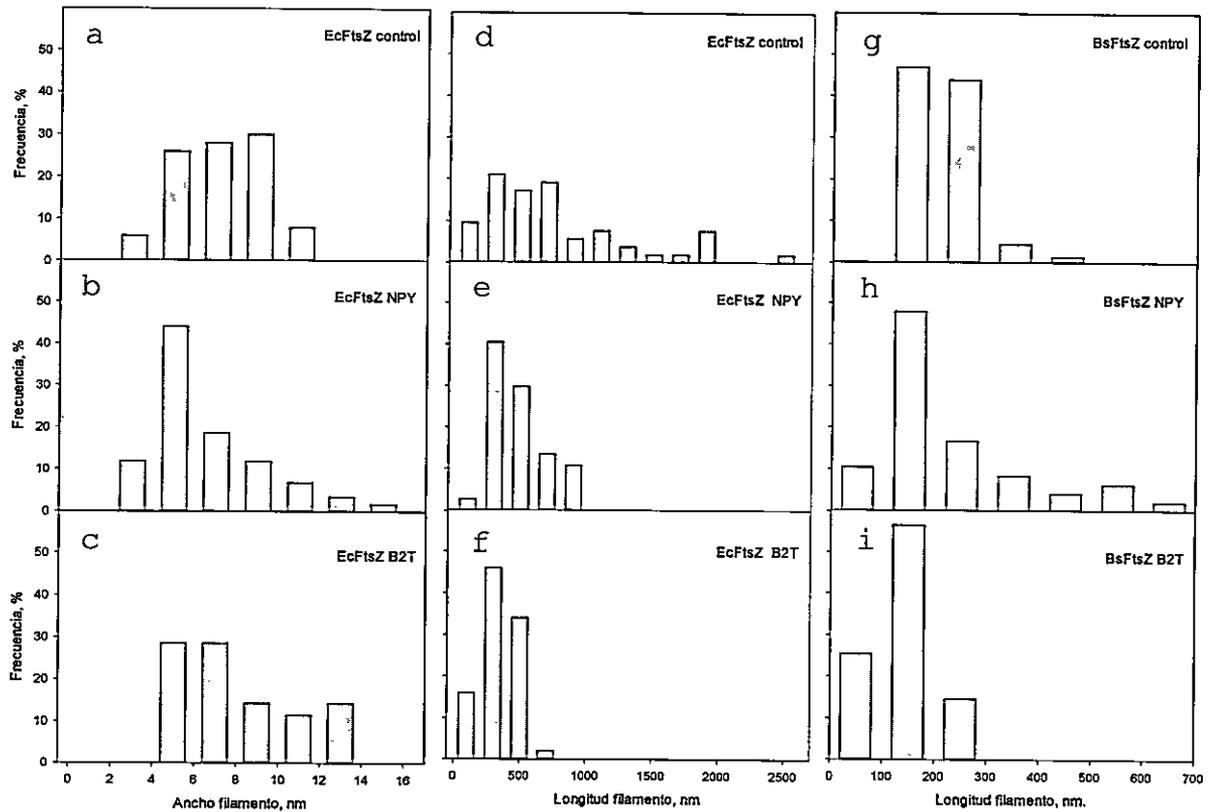


Figura MS5. Efecto de NPY y B2T sobre el largo y ancho de los filamentos de EcFtsZ y sobre el largo de los filamentos de BsFtsZ. La polimerización de EcFtsZ y BsFtsZ se indujo con GTP en el medio de polimerización con sistema de regeneración, en ausencia (control) y en presencia de 32 μM de NPY y 64 μM de B2T. Los filamentos se visualizaron por microscopía electrónica y se midieron utilizando ImageJ. Los gráficos muestran la frecuencia de distribución del ancho y largo (longitud) de los filamentos de EcFtsZ control y en presencia de NPY y B2T, y el largo de los filamentos de BsFtsZ control y en presencia de los compuestos. A partir de los gráficos del ancho de los filamentos (a, b y c) se determinaron las poblaciones de filamentos simples, dobles y triples y en los filamentos controles de EcFtsZ (a) se observa una proporción de 33, 59 y 8 %, respectivamente. La polimerización en presencia de NPY (b) muestra una proporción de 76, 19 y 5 % para filamentos simples, dobles y triples, respectivamente, y para B2T (c) esta proporción es de 47, 39 y 14 %, respectivamente. Respecto al largo de los filamentos, en ausencia de los compuestos el largo promedio de EcFtsZ es de 854 ± 546 nm (d). En presencia de NPY los filamentos se acortan aproximadamente a la mitad respecto al control, con un largo promedio de $485,1 \pm 215$ nm (e). En presencia

de B2T, la longitud de los filamentos también muestra una disminución respecto al control, con un largo promedio 350 ± 140 nm (f). Para BsFtsZ, los resultados muestran que en ausencia de los compuestos (control) el largo promedio corresponde a 207 ± 59 nm (g). En presencia de NPY los filamentos de BsFtsZ muestran una población heterogénea, mayoritariamente con un largo entre 100 y 200 nm, y otra población de filamentos más largos, respecto al control, con un largo promedio de 218 ± 137 nm (h). En presencia de B2T, la longitud de los filamentos muestra una disminución respecto al control, con un largo promedio de 135 ± 60 nm (i)

Ajuste a una conducta sigmoidea de las
cinéticas de polimerización de EcFtsZ en presencia de B2T

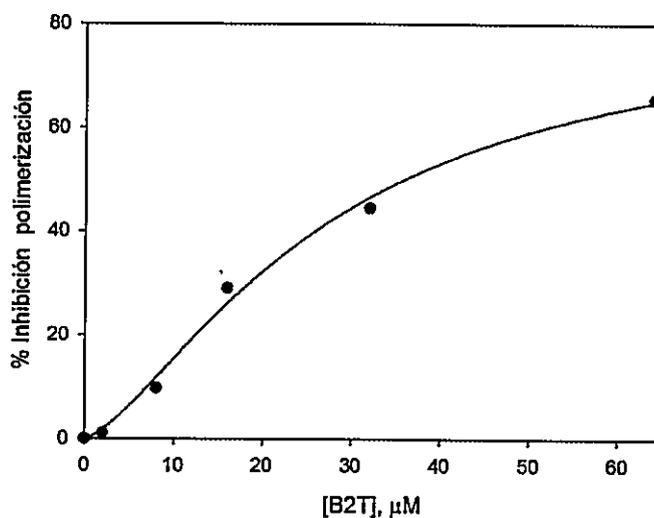


Figura MS6. Análisis del efecto de B2T sobre la polimerización de EcFtsZ inducida por GTP. Efecto de B2T sobre la polimerización de EcFtsZ expresado como % de inhibición en función de la concentración de NPY, obtenidos a partir de la diferencia entre la intensidad de dispersión de luz (ΔI) al inicio de la polimerización y la línea base. Los puntos experimentales se ajustaron a una sigmoidea, de donde se obtuvo un $I_{0,5} = 27,42 \pm 7,20 \mu\text{M}$ y $n_h = 1,47 \pm 0,28 \mu\text{M}$.

Ajuste a una conducta hiperbólica de las
cinéticas de polimerización de BsFtsZ en presencia de B2T

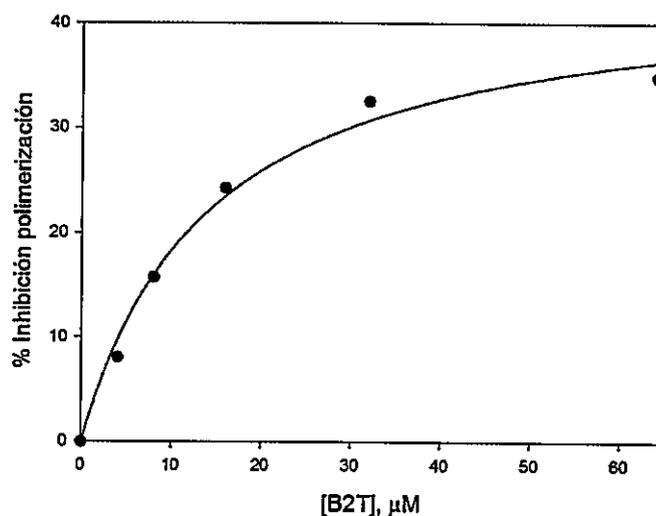


Figura MS7. Análisis del efecto de B2T sobre la polimerización de BsFtsZ inducida por GTP. Efecto de B2T sobre la polimerización de BsFtsZ expresado como porcentaje de inhibición de la polimerización en función de la concentración de B2T, obtenidos a partir de la diferencia entre la intensidad de dispersión de luz (ΔI) al inicio de la polimerización y la línea base. Estos valores se ajustaron a una ecuación hiperbólica, de la cual se obtuvo el siguiente valor de $I_{0,5} = 14,13 \pm 2,30 \mu\text{M}$.

Ajuste a una conducta de regresión lineal de las cinéticas de polimerización de EcFtsZ-GDP y BsFtsZ-GDP en presencia de NPY

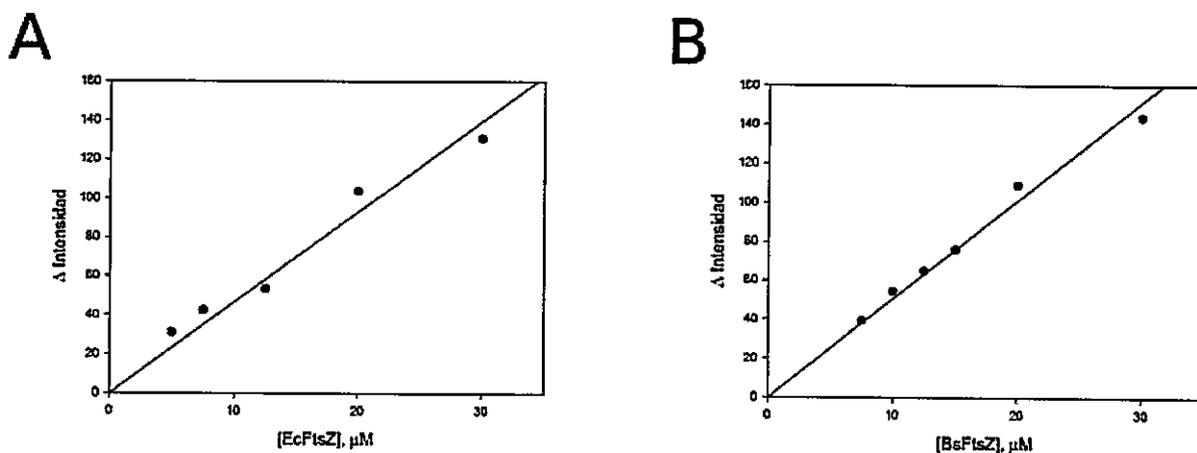


Figura MS8. Análisis de la influencia de la concentración de FtsZ-GDP sobre el efecto de NPY. Las cinéticas de EcFtsZ y BsFtZ (figuras 14 y 16) se ajustaron a la ecuación $I = A (1 - \exp^{-k't})$, de las cuales se obtuvo el máximo de intensidad, que equivale al valor de A en la ecuación, para cada concentración. Estos valores se graficaron en A) y B), respectivamente para cada proteína, para obtener la concentración crítica.

Influencia de Mg^{2+} en el efecto de NPY sobre la polimerización de FtsZ

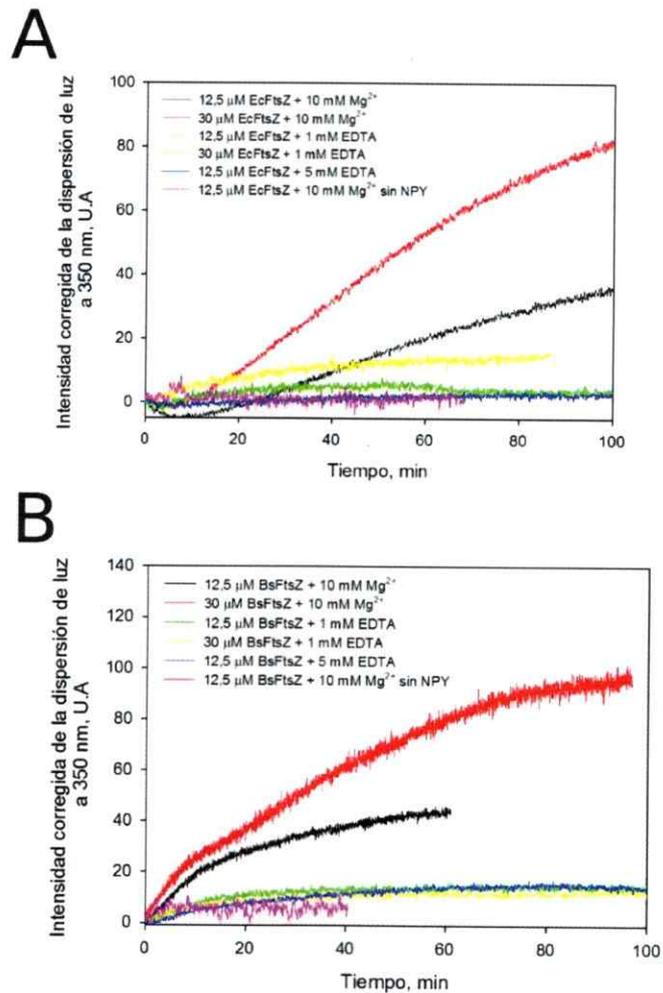


Figura MS9. Influencia de Mg^{2+} sobre la polimerización de EcFtsZ y BsFtsZ en presencia de NPY. Cinéticas de polimerización de EcFtsZ-GDP (A) y BsFtsZ-GDP (B) con 32 μ M de NPY seguidas por dispersión de luz a 350 nm a 30 °C, en presencia y ausencia de Mg^{2+} . Los ensayos se realizaron en presencia de Mg^{2+} en amortiguador HEPES 50 mM pH 7,3, KCl 50 mM y $MgCl_2$ 10 mM. Los ensayos en ausencia de Mg^{2+} se realizaron en amortiguador HEPES 50 mM pH 7,3, KCl 50 mM y EDTA 1 y 5 mM. Las concentraciones de FtsZ utilizadas fueron de 12,5 y 30 μ M.

Tabla de los controles de los ensayos en placa

CEPA	Minociclina	DMSO 30%	DMSO 100%
<i>B. subtilis</i>	(+)	(-)	(+)
<i>C. violaceum</i>	(+)	(-)	(-)
<i>E. aerogenes</i>	(+)	(-)	(+)
<i>E. coli K-12</i>	(+)	(-)	(+)
<i>P. mirabilis</i>	(+)	(-)	(+)
<i>P. aeruginosa</i>	(+)	(-)	(+)
<i>Serratia sp</i>	(+)	(-)	(+)
<i>S. typhimurium</i>	(+)	(-)	(+)
<i>S. aureus</i>	(+)	(-)	(-)

Figura MS10. Tabla de efectos de minociclina, DMSO 30% y DMSO 100% sobre la viabilidad bacteriana. ^aEn la tabla (-) corresponde a la ausencia y (+) a la presencia de halo de inhibición en el césped bacteriano indicado.

