

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA



**FORMACIÓN Y PERSISTENCIA DEL ANILLO DE
FtsZ DE DIVISIÓN BACTERIANA EN
“ESCHERICHIA COLI”**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Sonsoles Rueda González

Bajo la dirección de los doctores

Miguel Vicente Muñoz

Jesús Mingorance Cruz

Madrid, 2002

ISBN: 84-669-2042-0

T 25668

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
2002



DIBLIOTECA



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



5314043103

**FORMACION Y PERSISTENCIA DEL ANILLO de FtsZ DE
DIVISION BACTERIANA EN *Escherichia coli***

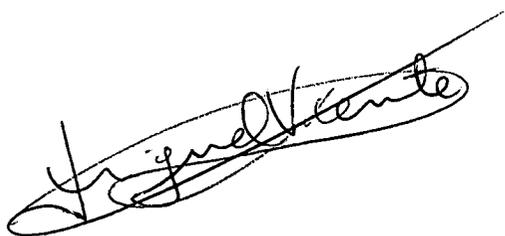
Autora: Sonsoles Rueda González

Directores: Miguel Vicente Muñoz
Jesús Mingorance Cruz

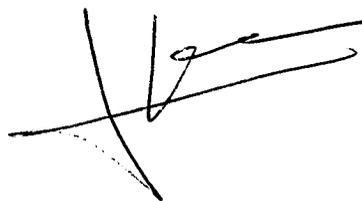
**FORMACION Y PERSISTENCIA DEL ANILLO de FtsZ DE DIVISION
BACTERIANA EN *Escherichia coli***

Memoria que para optar al Grado
de Doctor en Farmacia presenta
Sonsoles Rueda González
Madrid, Marzo 2002

Vº Bº Directores de Tesis

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Miguel Vicente Muñoz', written in a cursive style.

Miguel Vicente Muñoz

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Jesús Mingorance Cruz', written in a cursive style.

Jesús Mingorance Cruz

A mis padres

A Luis

Caminante, son tus huellas
el camino, y nada más;
caminante, no hay camino,
se hace camino al andar (...).
Antonio Machado

A mis directores, Miguel y Mingo, que no sólo ciencia me han enseñado, por su ayuda y apoyo en todo momento.

A mis compas de labo, los de ahora y los de antes, no hace falta decir vuestros nombres pues os llevo siempre conmigo. A Pilar por las aventuras compartidas con su “hijito”.

A mis padres que desde la distancia me han mantenido siempre a flote.

A mis amigos, y a nuestras escapadas lejos de Madrid.

A los paisajes castellanos, tan amados, a mi pueblo chiquitín, medio perdido.

Y a Luis, sobre todo a Luis, gracias mol.

ÍNDICE		Página
Abreviaturas		5
Resumen		7
Introducción General		11
1. Ciclo celular de <i>Escherichia coli</i>		11
2. Papel de FtsZ en la división celular		12
2.1. El gen <i>ftsZ</i> está muy conservado		13
2.2. La proteína FtsZ forma un anillo en el sitio de división		13
2.3. Identificación del lugar correcto de localización del anillo Z		14
3. Secuencia temporal de la localización de las proteínas de división		16
4. Proteínas que interaccionan con FtsZ		17
4.1. FtsA		17
4.2. ZipA		19
4.3. SulA		19
4.4. MinC		20
5. La estructura y actividad de FtsZ son similares a las de tubulina		20
5.1. Actividad bioquímica de FtsZ		21
6. Regulación de la expresión de FtsZ		22
6.1. Regulación transcripcional		22
6.2. Regulación por ciclo celular		23
6.3. Regulación postranscripcional		23
Objetivos		26
Capítulo 1. Persistencia del anillo Z en condiciones de baja síntesis de la proteína: Efectos en la división y viabilidad celular		27
Introducción		28
Resultados		31
1. Distinción entre anillos y acúmulos fluorescentes		31

2. Estudio de la persistencia del anillo Z en condiciones de baja expresión de <i>ftsZ</i>	35
3. Correlación entre la concentración de FtsZ, la morfología, el número de anillos Z y la viabilidad celular	38
Discusión	42
Capítulo 2. Niveles de las proteínas FtsZ, FtsA y ZipA y cinética de su localización en el anillo de división durante el ciclo celular	45
Introducción	46
Resultados	49
1. Comprobación del grado de sincronía	49
2. La concentración de las proteínas FtsZ, FtsA y ZipA permanece constante a lo largo del ciclo celular	51
3. Ensamblaje del anillo Z durante el ciclo celular	53
Discusión	57
Capítulo 3. Regulación metabólica de la formación del anillo Z	60
Introducción	61
Resultados	63
1. El mantenimiento del anillo Z requiere un metabolismo celular activo	63
2. La disminución de los niveles del GTP provoca un aumento en la concentración de FtsZ	64
3. Efecto de la respuesta estricta sobre la formación del anillo Z	66
4. El anillo Z necesita un nivel mínimo de proteína FtsZ para mantenerse	70
5. Método para determinar el estado de crecimiento de una población bacteriana	71
Discusión	73
Discusión general	78
1. Niveles de FtsZ y persistencia del anillo Z	78
2. Formación discontinua del anillo Z en el ciclo y constancia de la	

concentración de FtsZ	79
3. Relación entre los niveles de FtsZ y la viabilidad celular	80
4. Dependencia del anillo Z respecto al metabolismo energético	80
5. Desarrollos futuros	81
Materiales y Métodos	83
Materiales	83
1. Material Biológico	83
1.1. Estirpes bacterianas	83
1.2. Antisueños	84
2. Material químico y bioquímico	84
Métodos	86
1. Técnicas Microbiológicas	86
1.1. Mantenimiento y crecimiento de estirpes bacterianas	86
1.2. Sincronización de un cultivo B/rK por el método de elución de células recién nacidas	87
1.3. Medida de la viabilidad celular	89
2. Análisis de proteínas	90
2.1. Separación de proteínas	90
2.1.1. Obtención de extractos proteicos totales de <i>E. coli</i>	90
2.1.2. Electroforesis de proteínas	90
2.1.3. Transferencia de proteínas a membrana	90
2.2. Detección inmunológica de proteínas transferidas a membrana	90
2.3. Limpieza de sueros policlonales	91
2.4. Cuantificación de proteínas	91
2.5. Inmunolocalización de proteínas por microscopía de fluorescencia	92
Referencias	94

ABREVIATURAS

ATP	Adenosin trifosfato
BSA	Albúmina bovina
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DO	Densidad óptica
EF-Tu	Factor de elongación Tu
GTP	Guanosin trifosfato
IPTG	Isopropil β -D-tiogalactopiranosido
Kan	Kanamicina
LB	Medio de cultivo Luria Broth
M9	Medio de cultivo mínimo
NBT	Medio de cultivo Nutrient Broth conteniendo timina
O-PEDA	Orto-fenilendiamina
PBS	Tampón fosfato salino
ppGpp	Guanosin tetrafosfato
RNA	Ácido ribonucleico
SDS	Dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
Tris	Trihidroximetil-amino-metano
Ts	Sensibilidad a temperatura
ufc	Unidad formadora de colonia
τ	Tiempo de generación

RESUMEN

RESUMEN

En la estirpe VIP205 en la que se puede regular a voluntad el nivel de expresión del gen *ftsZ*, se pueden conseguir condiciones en las que la síntesis de la proteína FtsZ está disminuída. A 37 °C, se ha observado que los anillos de FtsZ (en adelante anillos Z) permanecen localizados en los sitios de división, incluso cuando los niveles de FtsZ son inferiores al 50 % con respecto a su parental. Por otra parte, por debajo de una concentración de FtsZ de aproximadamente el 60 % con respecto al parental, se produce una parada en la división. Este dato nos indica que los anillos Z formados no son totalmente funcionales o bien no son suficientes para continuar con la división. La persistencia y la funcionalidad de los anillos Z dependen de las condiciones de crecimiento, a 42 °C las cinéticas de desaparición de anillos Z y proteína son más rápidas que a 37 °C. Estos resultados nos indican que para que el anillo Z sea totalmente activo necesita una determinada concentración de FtsZ y que ésta depende además de otras condiciones del cultivo por ahora no determinadas.

Hemos comprobado que por debajo de un nivel del 50 % con respecto al parental de proteína FtsZ en la estirpe VIP205, aunque las células aumentan en masa, la viabilidad está comprometida. Una explicación a este hecho es que al disminuir la concentración de FtsZ pudieran quedar vacías regiones, quizás en los sitios potenciales de división, que puedan ser lábiles o bien que cambiaran drásticamente la permeabilidad de la cubierta celular o que atraparan de manera irreversible algún componente hipotético esencial para la viabilidad. Por el contrario en la estirpe salvaje MC1061 en condiciones de estrés nutricional o entrada en fase estacionaria, en las que no hay crecimiento y la concentración de FtsZ también se encuentra entre el 50 y el 60 % con respecto a condiciones en las que el crecimiento no está inhibido, al eliminar las condiciones de estrés las células recuperan el crecimiento y la cantidad de FtsZ, es decir que mantienen su viabilidad incluso a niveles bajos de FtsZ. Esto nos indica que en las células con el crecimiento inhibido o no se forman los sitios potenciales de división o bien quedan en estado de suspensión, por lo que estos sitios no puedan atrapar los hipotéticos elementos esenciales para la viabilidad ni dar lugar a regiones lábiles.

El análisis del ensamblaje del anillo Z en un ciclo celular revela que tiene lugar en tres etapas: las células recién nacidas no tienen anillo, con posterioridad se forma un anillo abierto, que se visualiza como dos puntos fluorescentes opuestos situados en el lugar de división, que aparece mientras el cromosoma está todavía replicándose. Y por último se transforma en un anillo cerrado formado antes de la constricción y que se mantiene hasta la separación de las células hijas. Aunque la segregación de los cromosomas no parece necesaria para la localización del anillo, sí lo debe ser para la división ya que el anillo cerrado aparece después de terminada la replicación.

Se ha descrito que hay un aumento en la transcripción del mensajero de *ftsZ* antes de la división (Garrido *et al.*, 1993), sin embargo en nuestro trabajo se observa que la concentración total de FtsZ es constante a lo largo del ciclo, indicando con ello que el número total de moléculas aumenta según progresa el ciclo. Proponemos que este número podría ser un factor que controlase la división, es decir que la división sólo ocurriría cuando el número total de moléculas de FtsZ presente en una célula superase un umbral. La cinética de aparición y ensamblaje en sus respectivos anillos, así como los niveles de proteína en el ciclo de FtsA y ZipA, las dos proteínas que siguen secuencialmente a FtsZ en su ensamblaje en el anillo de división, muestran resultados similares a los obtenidos para FtsZ.

El anillo Z requiere un metabolismo activo para el ensamblaje y mantenimiento de su estructura. La energía pudiera suministrarse a través del nucleótido GTP. La inhibición de la enzima ATP sintasa da lugar a una cinética de desaparición de los anillos Z muy rápida, sin afectar a la concentración de la proteína FtsZ. Se pueden disminuir los niveles de GTP celular mediante la inducción de la respuesta estricta (Cashel *et al.*, 1996). En estas condiciones hemos observado que el número de anillos Z y el nivel de FtsZ caen, aunque la disminución es más pronunciada en el caso de los anillos, y los niveles originales se recuperan al eliminar las condiciones de respuesta estricta. Nuestros datos sugieren que existe un nivel crítico de FtsZ, aproximadamente un 60 %, por debajo del cual la proteína es insuficiente para formar y mantener los anillos, y para que estos sean activos, lo que es coherente con los valores obtenidos mediante el abordaje experimental realizado en la estirpe VIP205, y que sugiere que deben existir mecanismos postranscripcionales que controlen los niveles de FtsZ.

Como resultado aplicado de nuestro trabajo proponemos un nuevo método para determinar si una población bacteriana presenta crecimiento activo, basado en la visualización del anillo Z y partiendo del hecho de que las células con anillo Z están en crecimiento activo. El método presenta la ventaja de que al fijarse la muestra en el momento de la toma, la información sobre el estado fisiológico original de las células se conserva.

INTRODUCCIÓN GENERAL

Ciclo celular de *Escherichia coli*

E. coli es una bacteria gram negativa ampliamente distribuída en los ecosistemas naturales. Esta característica refleja su capacidad de controlar de manera muy precisa la división celular y adaptar la frecuencia con la que se divide al medio en el que vive.

Podemos considerar que el ciclo celular comienza después del nacimiento de la bacteria. Si imaginamos a esta bacteria con una masa mínima, en el inicio la masa celular aumenta siguiendo una cinética exponencial. Cuando la célula ha alcanzado una determinada masa, llamada masa de iniciación **M_i**, después de un período de tiempo llamado **I**, y ha conseguido reunir todos los elementos necesarios para ello, inicia la replicación del cromosoma desde *oriC*. El período **C** es el tiempo que dura una ronda de replicación. Una vez que ha concluído este proceso comienza el período **D**, en el que tienen lugar dos sucesos importantes, la segregación de los nucleoides replicados a cada polo de la célula y la formación del septo entre los dos nucleoides. El tabique septal va constriñiéndose hasta que la célula madre se separa al término del período D en dos células hijas con todo el material genético necesario para comenzar de nuevo el ciclo (figura 1). La división es, por tanto, un proceso discreto que tiene lugar dentro del crecimiento continuo de la célula y que debe estar perfectamente acoplada a los procesos de duplicación del DNA. La relación existente entre ambos sucesos está determinada por la regla de $I+C+D=\tau$ (Helmstetter and Cooper, 1968), donde τ es el tiempo de generación o tiempo que requiere una célula para dar lugar a dos células hijas idénticas a la progenitora. El tiempo que duran los períodos I, C y D es variable, y depende de la estirpe de *E. coli* estudiada, de los medios de cultivo utilizados y de otros parámetros experimentales, de tal manera que en la estirpe B/rK y en medios de cultivo que permiten un $\tau \leq 60$ minutos los valores de C y D se aproximan a 40 y 20 minutos (Skarstad *et al.*, 1983). Esto se debe a que la eficacia de la maquinaria de replicación del DNA es limitada y no puede replicarse a mayor velocidad.



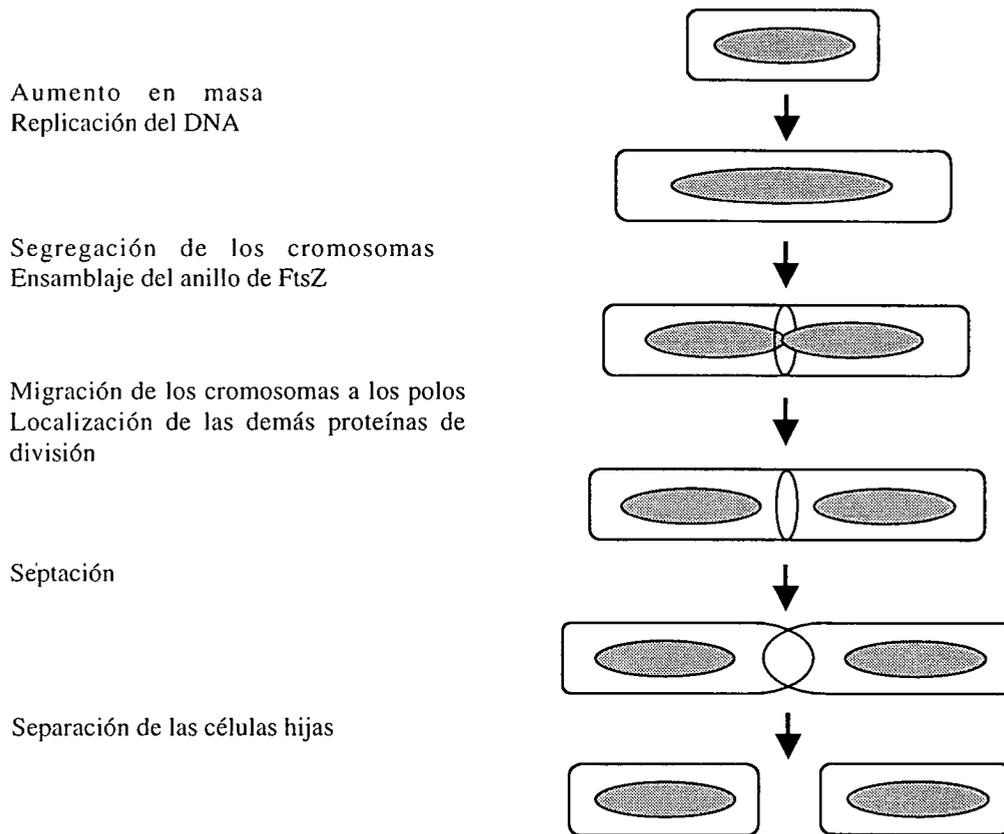


Figura 1. Esquema de la división celular. El nucleoide está representado por el óvalo de color gris y el anillo de FtsZ por el óvalo central. Después de alcanzar una determinada masa celular la célula duplica el DNA (períodos I y C). Al finalizar la replicación y antes de la segregación de los cromosomas se ensambla el anillo de FtsZ. Los cromosomas migran hacia los polos celulares y se forma el septo al localizarse las demás proteínas de división (período D). El tabique septal va constriñiéndose hasta que tiene lugar la separación de las dos células hijas.

Papel de FtsZ en la división celular

Numerosos genes de división que son esenciales, entre ellos el gen *ftsZ*, se identificaron por medio de mutaciones en estirpes termosensibles que interrumpían la división en alguna de las etapas causando filamentación, de ahí el nombre *fts* de filamentación termosensible (Donachie and Robinson, 1987; Donachie and Begg, 1990). El gen *ftsZ* se sitúa junto con otros genes de división y de síntesis de peptidoglicano en un grupo, en el minuto 2.5 del cromosoma bacteriano, llamado *dcw* (*division and cell wall*) (Ayala *et al.*, 1994). Los mutantes condicionales de *ftsZ* no pueden dividirse normalmente y dan lugar a largos filamentos que tienen replicados y segregados los

cromosomas pero no presentan señales de constricciones transversales (Tormo *et al.*, 1980). Gracias a estos resultados se comprobó que FtsZ en *E.coli* actúa en el primer paso conocido de la división celular.

El gen *ftsZ* está muy conservado

El gen *ftsZ* es el más conservado de todos los implicados en los procesos de división. Se ha encontrado en la mayoría de los genomas bacterianos secuenciados. Está ausente en las Chlamydias que carecen de pared celular y en otras dos especies: *Aeropyrum pernix* una arquea y *Ureaplasma urealyticum* un micoplasma (Margolin, 2000). La proteína FtsZ se ha conservado a lo largo de la evolución de la división ya que se han identificado homólogos de FtsZ en cloroplastos de algunas algas, *Guillardia theta* (Fraunholz *et al.*, 1998), y plantas superiores como *Arabidopsis thaliana* (Osteryoung and Vierling, 1995, Vitha *et al.*, 2001). En estos organismos el gen es nuclear y la proteína se importa al orgánulo para desarrollar allí su actividad en la división del mismo (Strepp *et al.*, 1998; Beech and Gilson, 2000). Se ha encontrado a su vez en mitocondrias de algas de la especie *Mallomonas splendens*, codificada por un gen nuclear (Beech *et al.*, 2000). La proteína es muy similar a FtsZ de proteobacterias y presenta homología con Dnm1, proteína que regula la división mitocondrial en levaduras y animales (Labrousse *et al.*, 1999; Sesaki and Jensen 1999). Hasta la fecha no se han encontrado homólogos de FtsZ en hongos ni en animales.

La proteína FtsZ forma un anillo en el sitio de división

Durante la mayoría del ciclo celular las moléculas de FtsZ, de 5000-20000 por célula, se encuentran en el citoplasma celular (Pla *et al.*, 1991), sin embargo en *E. coli* se ha observado mediante microscopía electrónica por inmunodetección con partículas de oro la localización de FtsZ en el futuro sitio de división (Bi and Lukenhaus, 1991). Posteriormente se ha comprobado con técnicas de microscopía de fluorescencia y por fusiones a la GFP (*Green Fluorescent Protein*) que en las células próximas a dividirse, FtsZ se localiza en una estructura característica con forma de anillo que se sitúa en el centro celular (Addinall *et al.*, 1996). Este anillo también se ha visualizado en otras bacterias como *Bacillus subtilis* y *Caulobacter crescentum*, en arqueas y en cloroplastos

de plantas (Levin and Losick, 1996; Wang and Lutkenhaus, 1996; Quardokus *et al.*, 2001; Vitha *et al.*, 2001).

La formación del anillo Z es esencial para la correcta localización del plano de división. En experimentos realizados con el mutante *tsftsZ26* se observa que la proteína mutante polimeriza en estructuras espirales que van a dar lugar a constricciones aberrantes con esa misma forma (Adinall and Lukhenhaus, 1996a). Aunque FtsZ no es capaz de desencadenar por sí sola el proceso de septación es la primera proteína capaz de localizarse en el anillo. Del ensamblaje de este anillo depende que todas las demás proteínas de división puedan localizarse. Por esa razón se dice que FtsZ tiene función nucleadora. Se ha visto que FtsZ permanece asociada al anillo durante la constricción del septo hasta la separación de las células hijas (Sun and Margolin, 1998).

Se ha sugerido, a la luz de la formación de este anillo, un papel estructural para la proteína FtsZ formando parte de un citoesqueleto similar al de células eucarióticas (Lutkenhaus *et al.*, 1993; Lutkenhaus and Addinall, 1997), teniendo en cuenta la homología funcional encontrada con tubulina, una proteína citoesquelética de células eucarióticas.

Identificación del lugar correcto de localización del anillo Z

Que el anillo Z se sitúe correctamente en el centro celular es una cuestión primordial para que la división se lleve a cabo de manera adecuada. El control de la posición se lleva a cabo mediante dos sistemas complementarios y de efectos negativos. Ambos sistemas impiden la formación del anillo en cualquier lugar excepto en el centro celular, (Lutkenhaus and Addinall, 1997; Rothfield *et al.*, 1999; Margolin 2000, 2001). El primer control lo lleva a cabo el nucleoide. El nucleoide ejerce un impedimento estérico que sólo permite que FtsZ preferentemente ensamble en las porciones de membrana que no están físicamente ocupadas por él (Mulder and Woldringh, 1989; Woldringh *et al.*, 1991; Yu and Margolin, 1999). Sin embargo, el ensamblaje temporal de FtsZ tiene lugar al final de la replicación del cromosoma, antes de la separación de los nucleoides, como se demostrará a lo largo de esta tesis y se esquematiza en la Fig. 1. Si se produce un daño del DNA celular se inhibe la formación del anillo a través de la interacción entre FtsZ y SulA (Bi and Lutkenhaus, 1993). Se ha visto que debe existir un

control adicional al del nucleoide, ya que en estirpes mutantes en genes implicados en la segregación del cromosoma como *parC* o *mukB* el efecto negativo del nucleoide en la formación del anillo se suprime parcialmente (Sun *et al.*, 1998; Yu *et al.*, 2001).

Este control adicional ejerce su acción a través de las actividades del producto de los genes situados en el operón *min*, las proteínas implicadas son MinC, MinD y MinE. Este sistema inhibe la polimerización del anillo en todas las posiciones excepto en el centro celular. MinC es una proteína citoplasmática que actúa como inhibidor de la polimerización de FtsZ *in vitro* sin afectar a la actividad GTPásica, por esta razón se piensa que inhibe el ensamblaje del anillo de Z en la célula (Hu *et al.*, 1999). MinD es una proteína periférica de membrana cuya función es activar MinC. Se ha observado mediante una fusión a la GFP que ambas proteínas en la célula oscilan de polo a polo de manera dependiente de MinE, con un período de oscilación de 10-60 segundos (Raskin and de Boer., 1999a; Hu and Lutkenhaus, 1999). MinE es una proteína de citoplasma que se asocia a la membrana celular en determinados momentos (Raskin and de Boer 1997). Antagoniza el efecto de MinC y MinD permitiendo que la inhibición tenga lugar en todas las posiciones celulares a excepción del centro. La proteína de fusión MinE-GFP se localiza en un anillo en la zona central de la célula o cerca de la misma. Estas estructuras suelen estar desplazados con respecto a los anillos Z y son independientes de la localización de esta proteína (Raskin and de Boer 1997), pudiendo ser probable que MinE sea el determinante específico de la localización de FtsZ en la célula. Se ha observado con esta misma fusión que la proteína oscila como las otras componentes del sistema (Raskin and de Boer, 1999b; Hale *et al.*, 2001; Fu *et al.*, 2001).

En estirpes con el sistema Min deletado los anillos Z se sitúan al azar entre los nucleoides y suelen aparecer de dos a tres anillos juntos (Yu and Margolin 1999), indicando que la localización de FtsZ depende de la presencia del sistema Min y que este sistema puede ejercer su efecto en todas las posiciones celulares donde no se encuentra el nucleoide, no sólo en el centro y en los polos, aunque los anillos que se forman en estos espacios sin cromosoma siempre se encuentran a cierta distancia entre sí. MinE a diferencia de FtsZ no se ve afectada en su localización por el nucleoide pudiendo hacerlo en el centro celular, aún en presencia del cromosoma (Sun and Margolin, 2001).

Secuencia temporal de la localización de las proteínas de división

Se ha comprobado mediante microscopía de fluorescencia la colocalización en el anillo Z de las demás proteínas de división. Esta localización se lleva a cabo de manera secuencial en el tiempo.

Las dos primeras proteínas que se localizan inmediatamente después de FtsZ y dependiendo de ella son FtsA y ZipA, la migración de las dos proteínas es independiente entre sí (Addinall *et al.*, 1996b; Hale *et al.*, 1999). FtsK necesita la actividad de FtsZ y FtsA (Yu *et al.*, 1998), FtsQ requiere la presencia en el anillo de FtsK (Buddelmeijer *et al.*, 1998; Chen and Beckwith, 2001), mientras que FtsL necesita además FtsQ (Ghigo *et al.*, 1999). La localización de FtsW es dependiente de todas las anteriores y FtsI precisa que FtsW se sitúe en el anillo (Mercer and Weiss, 2002; Weiss *et al.*, 1999). La última proteína en incorporarse al anillo es FtsN y requiere que previamente estén localizadas todas las demás (Addinall *et al.*, 1997a).

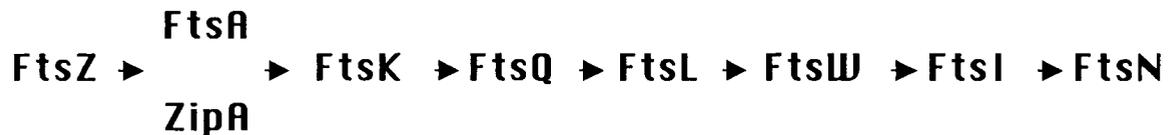


Figura 2. Modelo temporal del ensamblaje de las proteínas de división en el septo.

Hasta la fecha se desconoce la función precisa que desempeñan en la división celular la mayor parte de las proteínas implicadas en el proceso. Se sabe que FtsA y ZipA interaccionan con FtsZ, esta interacción se describirá más adelante.

FtsW y FtsK son proteínas de membrana esenciales. Algunos autores han propuesto para FtsW un papel en la estabilización del anillo Z, ya que una disminución de la proteína tiene el efecto de disminuir los anillos Z (Wang *et al.*, 1998; Khattar *et al.*, 1997), aunque este efecto no parece tener lugar en todas las estirpes (Mercer and Weiss, 2002). El dominio de membrana N terminal de FtsK es esencial para la división celular (Draper *et al.*, 1998) y el dominio citoplasmático C terminal tiene un papel en el acoplamiento entre la división celular y la segregación del cromosoma, impidiendo la escisión del septo hasta que los cromosomas se han separado (Liu *et al.*, 1998). FtsK es

similar a la proteína SpoIIIE de *B. subtilis*, responsable de la correcta partición del cromosoma durante la esporulación de esta bacteria (Sharpe and Errington, 1995).

FtsQ, FtsL, FtsI y FtsN poseen todas tres dominios, uno N terminal citoplasmático corto, otro transmembrana y otro más periplasmático relativamente largo. Todas estas proteínas se localizan en el anillo Z cuando la constricción es visible. FtsQ y FtsL están moderadamente conservadas en bacterias pero FtsN sólo se ha encontrado en *E. coli* y en *Haemophilus influenzae*. Poco o nada se conoce de sus funciones biológicas, sólo que interaccionan con FtsZ a nivel del anillo. La excepción se encuentra en la proteína FtsI, también conocida como PBP3, una transpeptidasa requerida para la síntesis de peptidoglicano septal y que actúa al final del proceso de septación (Adam *et al.*, 1997). Durante la división la síntesis de la pared celular cambia de orientación, pasando de ser en paralelo a perpendicular a la membrana citoplasmática. Este suceso necesita FtsI, otras proteínas de síntesis de peptidoglicano y diversas hidrolasas que en conjunto actúan en un complejo multienzimático (Höltje, 1998).

Proteínas que interaccionan con FtsZ

FtsA

La proteína FtsA es esencial para la división de *E. coli* y actúa en este proceso después de FtsZ. Esto se dedujo del trabajo desarrollado con mutantes en *ftsA* o en *ftsZ*. Los mutantes en *ftsA* presentan inicios de constricciones a lo largo de la célula filamentada, efecto que no se observa en mutantes de *ftsZ* (Tormo *et al.*, 1980). El gen *ftsA* está presente en muchos genomas bacterianos pero no en todos, así no se encuentra en micobacterias (*Mycobacterium tuberculosis*), cianobacterias (*Synechocystis*), en micoplasmas que son parásitos intracelulares que carecen de pared celular (*Chlamydia trachomatis*), ni en arqueas (Margolin, 2000).

FtsA pertenece a la superfamilia de las ATPasas que incluye actina y HSP70 de eucariotas, así como las proteínas DnaK y MreB de *E. coli* (Bork *et al.*, 1992). Se ha cristalizado recientemente la proteína FtsA de una eubacteria termófila *Thermotoga maritima* (Van den Ent and Löwe, 2000), mostrando que la estructura es más parecida a actina. Así que, dos proteínas de citoesqueleto en eucariotas, tubulina y actina tienen

homólogos en procariotas. En *B. subtilis* se han identificado otros homólogos de actina: MreB y Mbl (Jones *et al.*, 2001). La función bioquímica de la proteína es desconocida. FtsA purificada puede estar fosforilada y unir ATP (Sánchez *et al.*, 1994) pero no se ha demostrado la actividad ATPásica en *E. coli*, aunque sí de una proteína contaminante que copurifica con ella (J. Mingorance, comunicación personal). Recientemente se ha publicado que en *B. subtilis* FtsA, purificada siguiendo un protocolo parecido al de nuestro laboratorio, sí tiene estas funciones y forma un dímero (Feucht *et al.*, 2001), aunque estos autores no han comprobado si su preparación contenía alguna ATPasa no específica contaminante.

En la literatura se ha descrito la interacción *in vivo* entre FtsZ y FtsA mediante el sistema de doble híbrido en *E. coli*, *B. subtilis*, *Rhizobium meliloti*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Caulobacter crescentus* y *Staphylococcus aureus* (Wang *et al.*, 1997; Ma *et al.*, 1997). Se ha identificado el extremo carboxi terminal de FtsZ como responsable de la interacción entre ambas (Ma and Margolin, 1999; Din *et al.*, 1998; Yan *et al.*, 2000). Estos resultados han corroborado los datos de interacción entre ambas proteínas obtenidos de manera indirecta, ya sea la localización de FtsA dependiente de FtsZ (Ma *et al.*, 1996, 1997; Addinall and Lutkenhaus, 1996a; Addinall *et al.*, 1996), o la relación existente entre los niveles de las proteínas FtsA y FtsZ, que es crítica para la división. En *E. coli* la media de moléculas de FtsA y FtsZ por célula ha sido estimada entre 20-200 y 5000-20000 respectivamente, en una relación entre ellas de 1:100 (Bi and Lutkenhaus, 1991; Pla *et al.*, 1991, Wang and Gayda, 1992). La sobreexpresión de *ftsA* o *ftsZ* bloquea la división celular y el efecto puede ser suprimido por el incremento del nivel de la otra proteína (Dewar *et al.*, 1992; Dai and Lutkenhaus, 1992). Se ha propuesto para la proteína FtsA una función de estabilización en el ensamblaje del anillo Z (Pichoff and Lutkenhaus, 2002). Mediante la técnica del doble híbrido se ha podido comprobar que la proteína FtsA interacciona consigo misma y que el extremo carboxi terminal es muy importante para la autointeracción y la localización de la proteína en el centro celular (Yim *et al.*, 2000).

ZipA

ZipA es una proteína esencial que se aisló en una búsqueda de proteínas que interaccionaran con FtsZ purificada (Hale and de Boer, 1997). Los mutantes *zipA* forman largos filamentos y la hiperproducción da lugar a un bloqueo en la división (Hale and de Boer, 1997; 1999). A pesar de que es imprescindible en *E. coli* no está muy conservada, a excepción de *H. influenzae*. ZipA es una proteína de membrana con un largo dominio citoplasmático que requiere la presencia de FtsZ pero no de FtsA para su localización en el anillo (Hale and de Boer, 1999). Cuando no existe el producto del gen *zipA* se observan anillos Z pero en menor proporción de los esperados teniendo en cuenta la longitud celular, esto sugiere que ZipA estabilizaría el anillo Z inmediatamente después del ensamblaje (Raychaudhuri, 1999), por otra parte se han obtenido resultados similares en un estudio con un mutante *zipA* Ts (Pichoff and Lutkenhaus, 2002). La existencia de dos veces más de lo normal de la proteína ZipA puede suprimir la mutación termosensible *ftsZ84* a través de la estabilización del anillo formado por la proteína mutada (Raychaudhuri, 1999). Se ha demostrado a su vez, que ZipA purificada estabiliza *in vitro* los polímeros de FtsZ y de FtsZ84 modificando la estructura de los mismos (Hale *et al.*, 2000) de una manera similar a como lo hace el Ca²⁺. El dominio implicado en estos procesos es el C terminal citoplasmático. Por otra parte, se conoce por ensayos *in vivo* (doble híbrido) y de localización, que la interacción entre FtsZ y ZipA está mediada por el extremo C terminal de la proteína FtsZ (Ma and Margolin, 1999; Haney *et al.*, 2001), al igual que en el caso de FtsA, aunque los residuos de interacción son diferentes en ambos casos.

SulA

Además de con estas proteínas se ha verificado la interacción de FtsZ con SulA mediante el sistema del doble híbrido (Huang *et al.*, 1996). SulA es una proteína que se induce en la respuesta SOS provocada por un daño del DNA celular. El incremento de SulA inhibe la división y provoca filamentación de las células hasta que el cromosoma sea reparado (Huisman *et al.*, 1984). Hay mutantes en el gen *ftsZ*, llamados *sulB*, que confieren resistencia a SulA (Huisman *et al.*, 1984). La inducción de SulA inhibe la formación del anillo Z (Bi an Lutkenhaus, 1993) e *in vitro* se ha detectado una

disminución en la actividad GTPásica de FtsZ y por tanto de la polimerización (Mukherjee *et al.*, 1998; Trusca *et al.*, 1998). La sobreexpresión de *sulA* bloquea la multimerización de FtsZ apareciendo la mayor parte de esta proteína dimerizada con SulA (Justice *et al.*, 2000).

MinC

MinC como ya se ha comentado es parte del sistema MinCDE requerido para la correcta localización del anillo Z. Es un inhibidor de FtsZ. La sobreexpresión de *minCD* bloquea la división y da lugar a la formación de filamentos y de minicélulas (células sin DNA) pudiendo ser revertido este fenotipo por un aumento en la expresión del gen *ftsZ* (Bi and Lutkenhaus, 1990). Se ha comprobado que MinC bloquea la polimerización de FtsZ *in vitro* sin inhibir la actividad GTPásica (Hu *et al.*, 1999). *In vivo* parece que MinCD actúa inhibiendo las interacciones de FtsZ con FtsA (Justice *et al.*, 2000). A la vista de estos resultados podemos suponer que los mecanismos de acción de SulA y MinC, como inhibidores de FtsZ, son diferentes.

La estructura y actividad de FtsZ son similares a las de tubulina

La proteína FtsZ presenta homología con la proteína citoesquelética eucariótica tubulina, que forma microtúbulos y participa entre otras cosas en la mitosis. La homología a nivel de secuencia se reduce a unos pocos aminoácidos situados en la llamada caja G que interviene en la hidrólisis del GTP. La homología es mayor a nivel de la estructura tridimensional como se deduce de las estructuras cristalizadas de FtsZ de *Methanococcus jannaschii* y del dímero de tubulina (Löwe and Amos, 1998; Nogales *et al.*, 1998). Según la estructura cristalina (Löwe and Amos, 1998) y los alineamientos de los genes *ftsZ* de las especies bacterianas publicadas, la proteína puede ser dividida en tres dominios. El dominio N terminal está conservado y es bastante largo, de unos 320 residuos, e incluye el motivo de unión a GTP encontrado también en tubulinas. Experimentos realizados con una proteína que contiene sólo el dominio N terminal fusionado a la GFP, indican que el extremo C terminal no es necesario para la polimerización, ya que esta proteína de fusión da lugar a largos polímeros fluorescentes tanto *in vivo* como *in vitro*, (Ma *et al.*, 1996). Una delección de los primeros 32 residuos es suficiente para que la proteína no se localice en el anillo, sugiriendo que el N terminal

es esencial para el ensamblaje del anillo tanto en *E. coli* (Ma *et al.*, 1996) como en *Caulobacter crescentus* (Din *et al.*, 1998). El dominio C terminal de FtsZ es variable entre especies aunque contiene una región de 6-8 aminoácidos muy conservada. No ha sido posible cristalizarlo por lo que no se conoce su estructura, tampoco su función es conocida. Lo que si se ha comprobado es su importancia en la interacción con FtsA y con ZipA, y en la autointeracción (Yan *et al.*, 2001). Parece que no está implicado en la localización de la proteína en el anillo.

El dominio de enlace entre el N terminal y el C terminal tienen una gran variabilidad de longitud y secuencia entre los diferentes genomas y no se conoce nada de su función (Quardokus, *et al.*, 1996).

Actividad bioquímica de FtsZ

FtsZ es capaz de polimerizar *in vitro* dando lugar a filamentos que se asemejan a los protofilamentos de tubulina (Murkherjee and Lutkenhaus, 1994), aunque pueden adoptar una gran variedad de estructuras diferentes dependiendo de las condiciones de polimerización (Bramhill and Thompson, 1994; Erickson *et al.*, 1996; Trusca *et al.*, 1998; Löwe and Amos, 1999, 2000; Lu *et al.*, 2000). Mediante centrifugación analítica se ha visto que *in vitro* FtsZ se asocia entre sí siguiendo un proceso isodésmico y de manera dependiente de iones magnesio y de la concentración de la proteína (Rivas *et al.*, 2000). FtsZ, como tubulina, une e hidroliza GTP *in vitro*, siendo este nucleótido el que dirige el ensamblaje de los polímeros (de Boer *et al.*, 1992; RayChaudhuri and Park, 1992; Mukherjee *et al.*, 1993, 1998; Lu *et al.*, 1998). Se ha comprobado *in vitro* que la posición entre un monómero y el siguiente varía en presencia de GDP (Díaz *et al.*, 2001). El modo de polimerización y de hidrólisis de los polímeros se relaciona con la función biológica que podrían desempeñar. Se ha visto que el nucleótido unido al polímero es GTP (ó GDP+Pi), y que éste se intercambia a lo largo del polímero de manera muy rápida (Mingorance *et al.*, 2001). Esta característica de los polímeros de FtsZ les hace diferentes a los formados por tubulina donde el microtúbulo contiene GDP y sólo un remate con GTP en uno de los extremos (Desai and Mitchison, 1998).

Regulación de la expresión de FtsZ

Es necesario que la concentración de FtsZ esté bien controlada, ya que el defecto de proteína da lugar a largos filamentos y el exceso a minicélulas y filamentos. Para controlar la concentración de FtsZ la bacteria tiene distintos mecanismos reguladores de su expresión. El gen *ftsZ* se localiza al final del grupo *dcw*. La organización de esta región del cromosoma es muy compleja, y no aparece ningún terminador de la transcripción desde la cabecera hasta el final del mismo. De esta manera pueden existir, aunque hasta la fecha no han sido encontrados, transcritos de *ftsZ* que se inicien a partir del promotor *mraZ1p* situado al principio del grupo (Ayala *et al.*, 1994).

Regulación transcripcional

Se han descrito cuatro promotores más (*mraW1p*, *ftsL1p*, *ftsL2p*, *ftsI1p*) que se localizan en el inicio y parte media del grupo, sin embargo en la región final, donde se encuentra el gen *ftsZ*, se han detectado al menos siete promotores que se localizan dentro de las regiones codificantes para los genes *ddlB*, *ftsQ* y *ftsA*, que regulan la expresión de *ftsZ* (figura 3). Se ha demostrado mediante fusiones transcripcionales al gen *ftsZ* del reportero *lacZ* que esos promotores proximales contribuyen en un 33% al total de la transcripción (Flärdh *et al.*, 1998; de la Fuente *et al.*, 2001). Esto demuestra que deben existir otras señales corriente arriba de *ddlB*, requeridas para la expresión total del gen.

Se han identificado unos pocos factores de regulación que actúan de manera positiva sobre estos promotores (figura 3). Entre estos efectores se encuentra el producto del gen *sdiA*, que ejerce su acción sobre el promotor *ftsQ2p* en células que crecen en condiciones normales (Wang *et al.*, 1991). RcsB modifica la expresión de *ftsA* y *ftsZ* al actuar sobre el promotor *ftsA1p* (Gervais *et al.*, 1992). Hay promotores como el *ftsQ1p*, un *gearbox*, que son dependientes del factor de fase estacionaria σ^S (Ballesteros *et al.*, 1998). El nucleótido ppGpp parece que tiene un papel en la regulación de la división celular ya que incrementos en sus niveles suprimen la parada de la división del mutante *ftsZ84* (Powell and Court, 1998).

Regulación por ciclo celular

Se ha observado que existe un control ligado al ciclo celular (figura 3). En estudios en cultivos sincrónicos de *E. coli* en los que se ha medido el mensajero de *ftsZ* a lo largo del ciclo, se ha comprobado que este mensajero oscila y alcanza un máximo justo antes de la replicación (Garrido *et al.*, 1993; Zhou *et al.*, 1994).

Regulación postranscripcional

A nivel postranscripcional existe también una regulación de *ftsZ*. Dentro del grupo aparecen dos dianas para RNasaE (una endonucleasa de *E. coli*) justo antes de *ftsZ* (Cam *et al.*, 1996). La enzima actuaría a nivel del procesamiento estabilizando el mensajero (figura 3). Además se ha propuesto la existencia de un mecanismo de regulación antisentido y se han encontrado dos promotores responsables de esta acción. Uno de ellos, *stfZ*, dentro de la región codificante de *ftsZ*, y el otro, *dicF*, formando parte de un profago (Dewar and Donachie, 1993; Bouché and Bouché, 1989), aunque no se ha podido comprobar el efecto que pueden causar sobre la concentración de FtsZ.

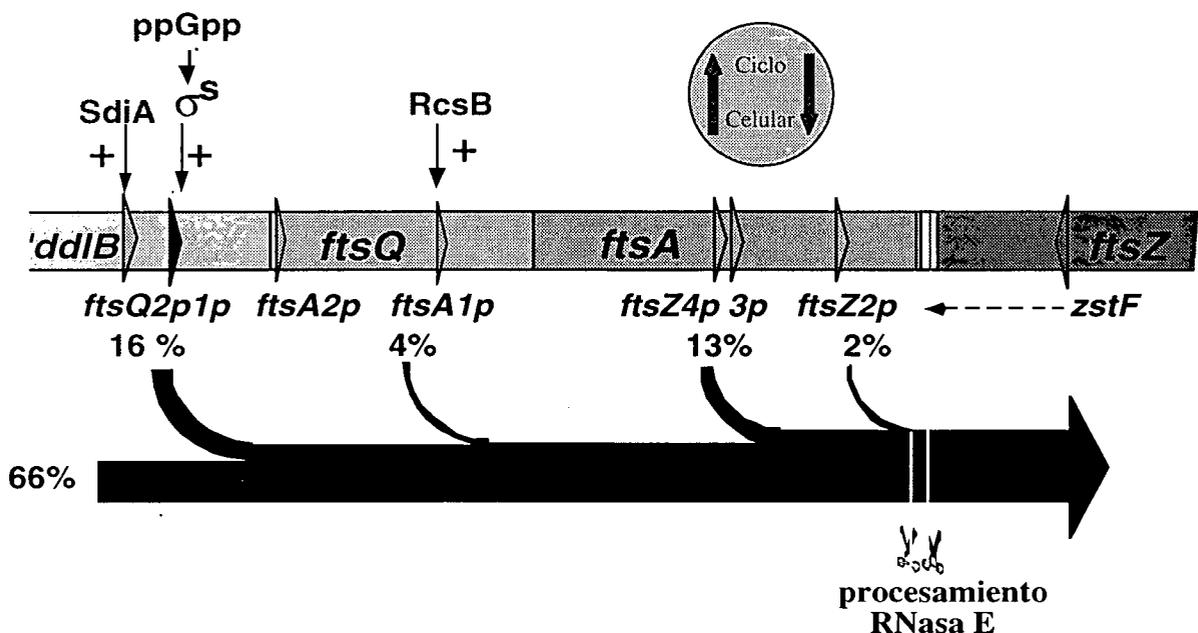


Figura 3. Región *ftsQAZ* del grupo *dcw* con sus señales reguladoras. Las flechas indican la posición de los promotores descritos hasta ahora. El promotor reconocido por *s*⁵ se muestra en negro y el promotor que da lugar a un RNA antisentido se localiza dentro del gen *ftsZ*. También se indican los reguladores transcripcionales descritos. Los porcentajes representan la contribución individual de cada promotor a la transcripción total de *ftsZ*. Las tijeras señalan los sitios de procesamiento del mensajero llevado a cabo por la RNasaE.

A lo largo de la introducción se ha querido dejar constancia de la importancia de la de la proteína FtsZ en la división. Su capacidad de formar un anillo en el centro celular sin el cual ninguna de las demás proteínas de división puede formar parte del septo y las similitudes de función con la proteína tubulina, hace plausible la idea de que esta proteína pudiera formar, si no un citoesqueleto, sí al menos una estructura que pudiera dirigir la división. El estudio del anillo Z es el tema de investigación de esta tesis.

OBJETIVOS

Para averiguar como interviene la proteína FtsZ en la fisiología de la división celular, proponemos los siguientes objetivos que profundizan en la descripción de las propiedades de los anillos Z, la estructura que parece jugar un papel fundamental en la septación.

Estudiar la **persistencia** del anillo formado por proteína FtsZ parental. Como resultado esperamos poder determinar el tiempo que este anillo está presente en las células desde que se deja de suministrar FtsZ y correlacionarlo con la concentración de proteína que existe en ese momento.

Como la **localización** del anillo Z es de suma importancia para el correcto desarrollo de la división, estudiar durante un ciclo celular completo su ensamblaje además del de FtsA y ZipA, así como medir los niveles de las tres proteínas de división durante el ciclo. Con ello determinar el momento en que el ensamblaje tiene lugar, relacionarlo con otros procesos celulares y con la concentración proteica.

De la dependencia de la **formación** del anillo Z respecto al metabolismo celular no se conoce demasiado, por lo que se ha investigado su formación en diferentes condiciones de crecimiento que disminuyen el GTP celular, para determinar si alguna condición metabólica específica regula el ensamblaje y el mantenimiento del anillo.

CAPÍTULO 1

Persistencia del anillo Z en condiciones de baja síntesis de la proteína: Efectos en la división y viabilidad celular

INTRODUCCIÓN

La concentración de FtsZ controla la división celular en *E. coli*. Se ha comprobado que tanto con altas como con bajas concentraciones de FtsZ la división no tiene lugar correctamente. Además el incremento del nivel génico de *ftsZ* conlleva un aumento en el nivel de la proteína, que da lugar a un fenotipo de minicélulas, caracterizado por la presencia de células pequeñas sin núcleo que se forman después de divisiones polares (Ward and Lutkenhaus, 1985). Estas divisiones suceden de forma adicional a las divisiones normales, indicando que el control cuantitativo se ha eliminado, si se entiende este control como una sólo división por duplicación de masa. El incremento en el nivel de FtsZ se relaciona con un pequeño descenso en el tamaño celular debido a que la división ocurre antes en el ciclo celular (Ward and Lutkenhaus, 1985).

Por otra parte la división celular se inhibe al reducirse el nivel de FtsZ (Pla *et al.*, 1991; Dai and Lutkenhaus, 1991). Las estirpes utilizadas en los trabajos de Pla y Dai, tienen el gen *ftsZ* cromosómico interrumpido y llevan copias adicionales del gen en un plásmido sujeto a replicación termosensible. Esto permite que a la temperatura restrictiva desaparezca FtsZ y cese la división. En otro trabajo posterior Tetart and Bouché, 1992, comprobaron que la expresión de un RNA antisentido bajo el control del promotor *Plac* reducía el nivel de FtsZ en un 80 %. Esta reducción en FtsZ provoca un descenso de la división, aunque los cultivos consiguen alcanzar un estado de equilibrio en el cual sólo se dividen las células de mayor tamaño, este resultado es consistente con la idea de que el nivel de FtsZ controla la división celular.

En la estirpe VIP 205 la concentración de FtsZ se regula con precisión sin alterar otros genes del grupo *dcw*. La estirpe contiene una copia única del gen estructural *ftsZ* en el cromosoma bajo el control artificial del promotor inducible *Ptac*, y se impide la transcripción desde los propios promotores por la presencia de cuatro terminadores (figura 4). La expresión del gen en VIP205, disociada de sus promotores naturales, es dependiente en un rango bastante amplio de IPTG para su supervivencia (Palacios *et al.*, 1996). Al eliminar la oscilación natural de la expresión del gen (Garrido *et al.*, 1993) la estirpe necesita un 40 % más de proteína para mantener los valores de longitud y

volumen celular similares a los de la estirpe parental MC1061. Si en las células el nivel de FtsZ es del 80 %, éstas se dividen con el mismo tiempo de duplicación que la estirpe silvestre, pero son 1,5 veces más largas, indicando que se necesitan la expresión del gen y la concentración de la proteína correctas para que tenga lugar una división normal (Palacios *et al.*, 1996).

cromosoma de *Escherichia coli*

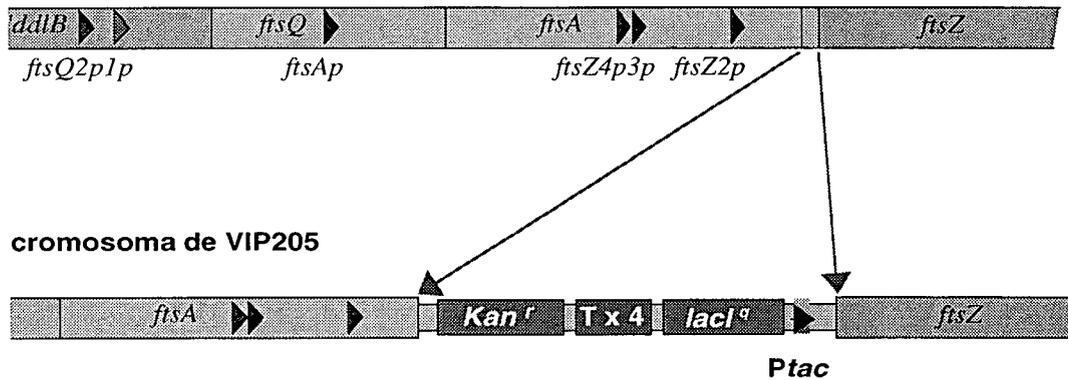


Figura 4. Estructura genética de las regiones de estudio del cromosoma de *E. coli* y de la estirpe VIP205. Las puntas de flecha marcan los promotores, denominados por sus nombres, y la dirección de la transcripción. El promotor *Ptac* se señala en negro. La letra T indica los terminadores de la transcripción.

El estudio del mutante *ftsZ84*, sensible a temperatura, indica que la inactivación de la proteína FtsZ84 que se produce a la temperatura restrictiva da lugar a una rápida desaparición de los anillos Z (Addinall *et al.*, 1997b). La vida media de la proteína FtsZ se ha estimado en trabajos previos como mayor que un tiempo de duplicación (Pla *et al.*, 1993; M. Sánchez, 1993). En las estirpes termosensibles, las empleadas en los estudios de Pla y Addinall la proteína puede verse afectada por la temperatura, al contrario que en la estirpe VIP205. El uso de la estirpe VIP205 nos ha permitido calcular la vida media de la concentración de la proteína y del número de anillos Z en la población bacteriana, así como la relación que existe entre la persistencia de la proteína silvestre y de los anillos que forma. Incluso en condiciones de no inducción cuando la concentración de FtsZ en la célula está por debajo del 50 % con respecto al silvestre, la proteína puede ser detectada como anillo localizado en los sitios de división. Los anillos todavía son funcionales cuando la concentración de la proteína es del 60 % con respecto al salvaje, pero por debajo de esos valores las células no se dividen y la viabilidad se pierde. Esto

sugiere que los anillos Z aunque pueden ser todavía visibles no son suficientes en número o no son lo bastante activos como para mantener una velocidad de división normal.

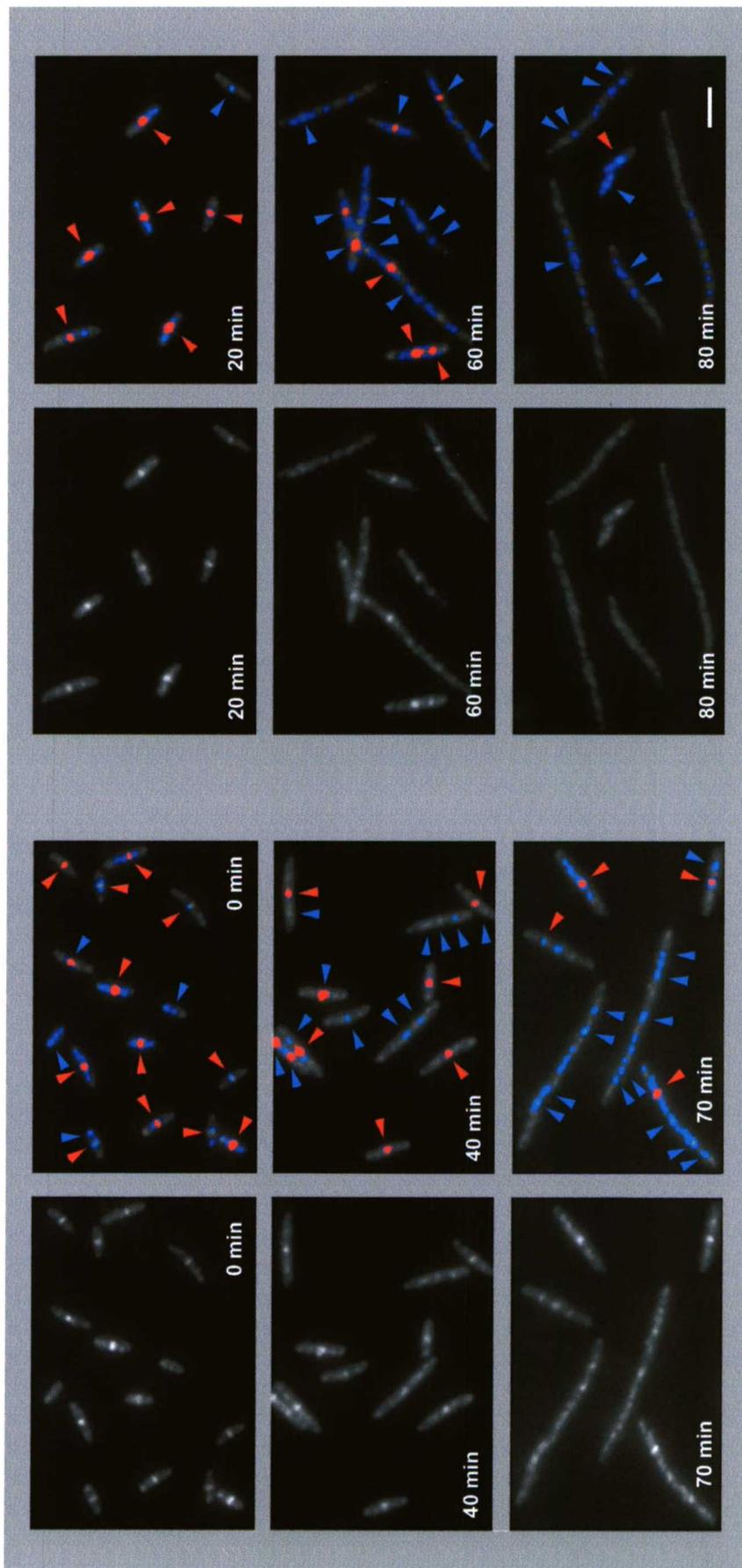
RESULTADOS

1. Distinción entre anillos y acúmulos fluorescentes

Como no existe un anticuerpo capaz de discriminar entre las moléculas de FtsZ que se ensamblan en el anillo Z y las moléculas que quedan dispersas o agregadas en el citoplasma celular, hemos utilizado una definición del anillo Z, la estructura que tiene un papel clave en la división, para distinguirlos de los acúmulos de FtsZ, que no participan en la misma.

Se ha definido un anillo como una emisión de fluorescencia que después de las técnicas de marcaje fluorescente se encuentra dentro de una célula y cumple con las siguientes condiciones. 1: Aparece como una banda transversal que es perpendicular al eje longitudinal de la célula. 2: Produce una imagen continua y ocupa todo el diámetro de la célula. 3: Su intensidad es mayor que la del material desorganizado que se encuentra dentro de la misma célula. El resto de las imágenes fluorescentes que aparecen en la célula se clasifican como acúmulos, pudiendo ser tanto material de FtsZ disperso como otro tipo de material que reconoce de manera inespecífica el anticuerpo. Hemos considerado que los acúmulos no tienen interés fisiológico para la división. En la figura 5 se muestran los resultados obtenidos en las células de la estirpe VIP205 cuando la expresión desde *P_{tac}* está inhibida al carecer del inductor IPTG. Debido a la disminución del contenido celular de FtsZ las células no pueden dividirse normalmente y forman filamentos, los filamentos contienen a la vez anillos y acúmulos. El material fluorescente presente en las células se clasificó de manera manual y de acuerdo con las definiciones propuestas, en las categorías de anillo o de acúmulo. Por otra parte, una misma imagen de las células obtenida del microcopio de fluorescencia, se analizó con el programa Photoshop 5.5. Se seleccionaron en dos pasos diferentes y pertenecientes a distintos niveles, los pixels que representan a los anillos y los que representan a los acúmulos. Los puntos de los anillos son más brillantes y están situados de manera continua y transversalmente al eje longitudinal de la célula, mientras que los acúmulos están formados por pixels menos brillantes. La comparación de la clasificación manual y la proporcionada por el programa de ordenador muestra la consistencia de nuestras definiciones, aunque en algún caso la concordancia no es total.

Figura 5. Clasificación y localización de las señales fluorescentes utilizando un suero anti FtsZ. En la figura se muestran las imágenes de las células de la estirpe VIP205 una vez que se cambian desde un medio con 30 μM de IPTG a un medio sin inductor. Las células se cultivaron a 37°C y se tomaron muestras a los tiempos indicados. El panel de izquierda de cada tiempo es una imagen de inmunofluorescencia obtenida según lo descrito en métodos (apartado 2.5). El panel de la derecha muestra los resultados de la clasificación manual de las señales fluorescentes en anillos (flechas rojas) o acúmulos (flechas azules), y de la clasificación realizada con el programa de ordenador Photoshop 5.5 según se indica en el texto. Los colores que representan a los anillos (rojo) y a los acúmulos (azul) no son reales y se aplicaron usando el ajuste color selectivo de la imagen del programa. La barra representa 10 μm .



En trabajos publicados por Tormo y Vicente, 1984, se había comprobado que los sitios potenciales de septación en filamentos de *E. coli* inducidos por una disminución de la proteína esencial de división FtsA, se sitúan en las posiciones 25, 50 y 75% de la longitud del filamento. Para validar nuestro procedimiento de diferenciación entre anillos y acúmulos se relativizaron las posiciones de las señales fluorescentes que aparecen en células cultivadas a 37 °C sin inductor, con respecto a la longitud celular. Se analizaron cinco tiempos de cultivo diferentes contando 100 células en el caso de los anillos y sólo 25 células en el caso de los acúmulos, por ser éstos mucho más abundantes. Los resultados mostrados en la figura 6 indican que los acúmulos aparecen casi uniformemente distribuidos a lo largo de toda la longitud del filamento, mientras que los anillos presentan una distribución diferente, concentrándose principalmente en la posición 50 %, y en menor medida en las del 25 y del 75 %.

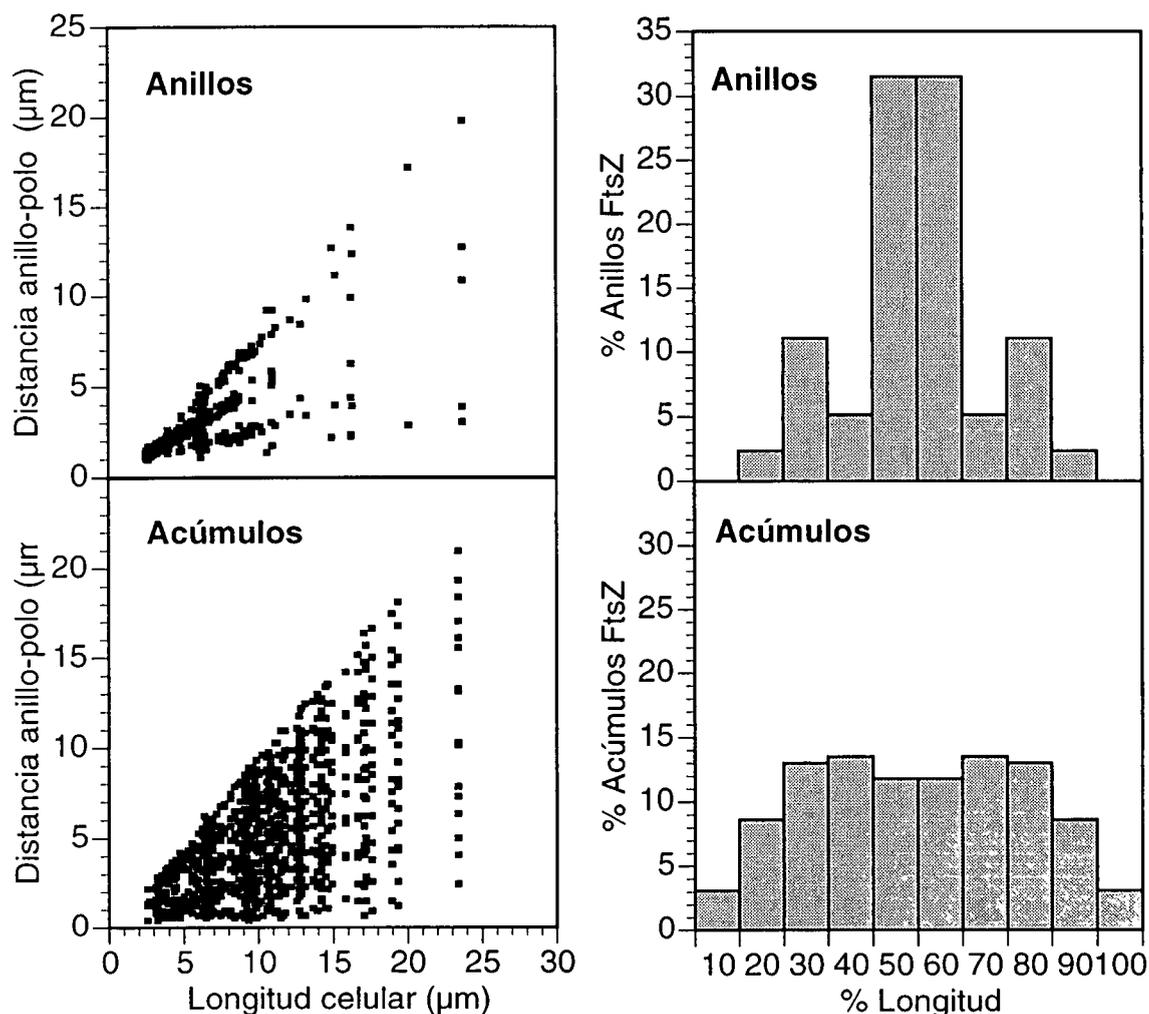


Figura 6. Distribución de los anillos y los acúmulos a lo largo de la longitud celular en células de la estirpe VIP205. El experimento se describe en la leyenda de la figura 5. La representación gráfica de los datos obtenidos por clasificación manual, se realiza de acuerdo a lo publicado por Tormo and Vicente, 1984.

Para confirmar el método de clasificación, este mismo tipo de estudio de la posición relativa que ocupan los anillos y los acúmulos, se realizó en filamentos de otras dos estirpes distintas. La estirpe RP41 tiene una mutación termosensible en el gen *ftsI* que codifica para una proteína esencial de división, PBP3. A 42 °C el gen se inhibe provocando un bloqueo en la septación dando lugar a filamentos. Lo mismo sucede si sobre un cultivo de células de la estirpe MC1061 se añade aztreonam, este antibiótico inhibe la proteína esencial de división PBP3. Tal y como se esperaba en ambos tipos de filamentos los anillos de FtsZ aparecen en las posiciones 25, 50 y 75 %, mientras que los acúmulos están casi uniformemente distribuidos (Fig. 7).

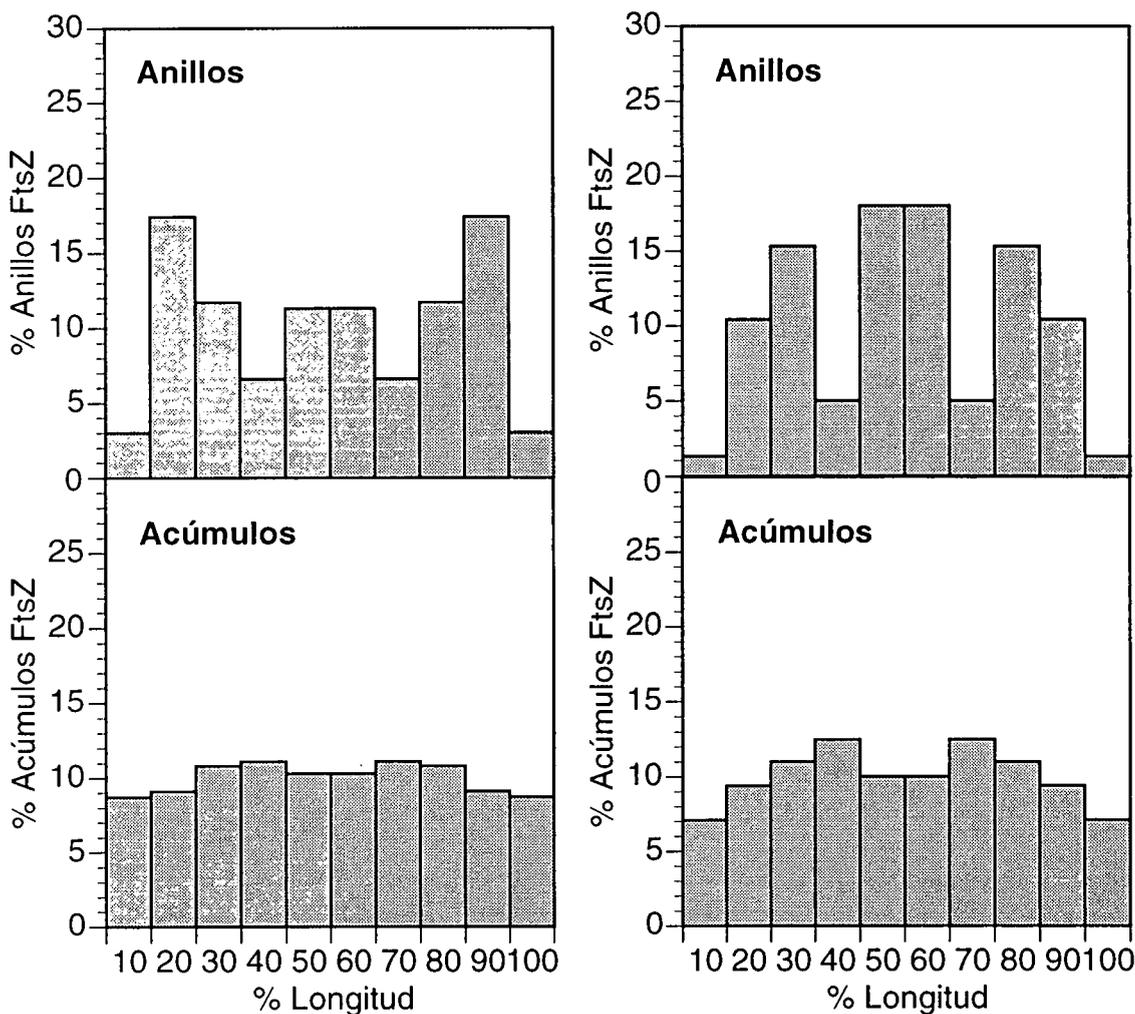


Figura 7. Distribución de anillos y acúmulos a lo largo de la longitud celular. En la sección de la izquierda se muestra la distribución en 100 células de la estirpe RP41 cultivada a 42 °C durante 1 hora. En la parte de la derecha se muestran los datos de 100 células de MC1061 tratadas con 2 µg/ml de aztreonam durante 1 hora. La representación gráfica de los datos obtenidos por clasificación manual, se realiza de acuerdo a lo publicado por Tormo and Vicente, 1984.

2. Estudio de la persistencia del anillo Z en condiciones de baja expresión de *ftsZ*

Para estudiar la persistencia y la capacidad del anillo Z para llevar a cabo la septación cuando la cantidad de proteína FtsZ está disminuída, la estirpe VIP205 se cultivó a 37 y 42 °C a concentraciones de 30 µM y 12 µM de IPTG respectivamente. A estas concentraciones de inductor las células presentan parámetros morfológicos similares a los de la estirpe parental MC1061 a cada temperatura. A cada cultivo se le transfirió al mismo medio de cultivo pero sin la presencia de inductor y se recogieron muestras a diferentes tiempos, en ellas se midió la concentración total de la proteína

FtsZ (ver apartado 2.4 de métodos), la persistencia de los anillos que forma y el incremento en partículas.

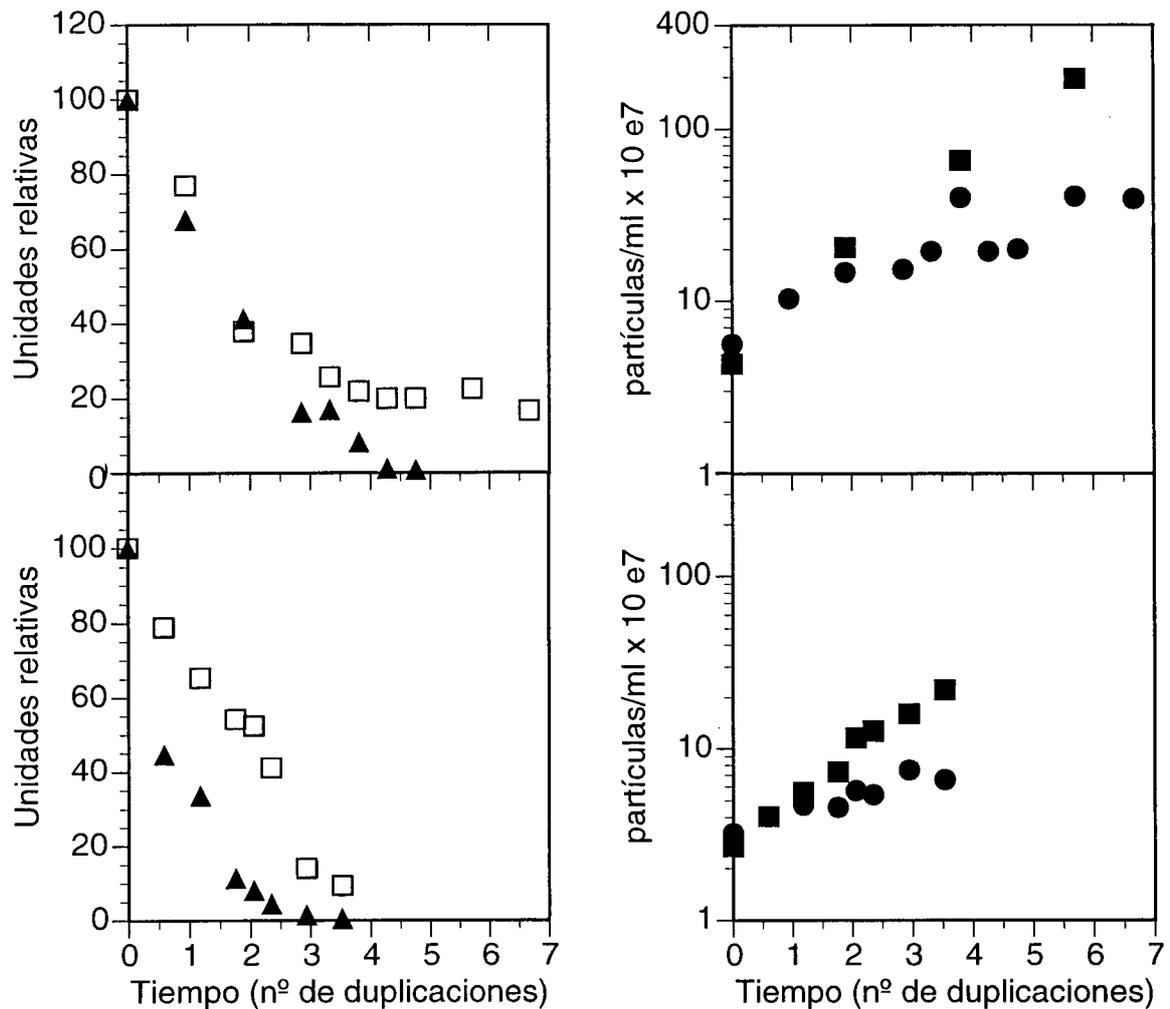


Figura 8. Cinética de la concentración celular de proteína FtsZ, del anillo formado por ella y del número de partículas, después de la inhibición de la expresión del gen *ftsZ*. Los cultivos de la estirpe VIP205 a 37 o 42 °C con IPTG (30 μ M o 12 μ M, respectivamente) se transfirieron a tiempo 0 a medio sin inductor y se mantuvieron a la misma temperatura. Se tomaron muestras a los tiempos indicados. En cada muestra se cuantificó el número de partículas (●); la concentración de FtsZ, (□), relativizada con respecto al EF-Tu, al parental MC1061 y al valor obtenido a tiempo cero; el número de anillos por unidad de longitud en 100 células por muestra (▲), en estos dos últimos casos al dato a tiempo cero se le asignó el valor relativo 100. Como control se representa el número de partículas en muestras cultivadas con IPTG tanto a 37 como a 42 °C (■). Los tiempos de duplicación fueron de 21 y 17 minutos respectivamente.

Como puede verse en la figura 8, la concentración de la proteína FtsZ en la célula y el número de anillos por unidad de longitud decrece gradualmente después de cambiar el medio por un medio sin inductor. Se observa que en esas condiciones, hay un

nivel residual de proteína FtsZ con respecto al tiempo cero, del 20 % a 37 y menor a 42°C, cuando el cultivo ha experimentado cuatro duplicaciones en masa, que se puede interpretar como un escape del promotor. Este escape no se diluye por el crecimiento ya que ni la replicación del DNA, ni la segregación de los cromosomas están afectados, (Palacios *et al.*, 1996; resultados no mostrados). La cinética de desaparición de la proteína y los anillos es más rápida a 42 que a 37 °C, y los anillos desaparecen más rápido que la proteína a ambas temperaturas. Con estos datos se han calculado los tiempos de vida media de la concentración de la proteína y del número de anillos en la población bacteriana, entendiendo “vida media” como el tiempo que tardan estos parámetros en reducirse al 50 %. Los tiempos calculados son para la proteína y los anillos de 31 y 23 minutos a 37 °C, y de 21 y 8 minutos a 42 °C respectivamente. Durante dos duplicaciones de masa del cultivo, el aumento en el número de partículas es similar en presencia o ausencia de inductor. Sin embargo, en ausencia de inductor y cuando la concentración de FtsZ es de aproximadamente el 40 % a 37 °C o del 50% a 42 °C relativo al valor inicial (equivalente al 60 y al 53 % de la concentración encontrada en la estirpe parental cultivada en las mismas condiciones) (ver Tabla 1), el número de partículas se mantiene constante o lo que es lo mismo, la división se detiene. Después de ese tiempo y a 37 °C la concentración de FtsZ permanece relativamente estable, no así el número de anillos Z que se reduce prácticamente a cero. Nuestros resultados sugieren que los anillos Z que se ensamblan por debajo de la concentración límite de proteína no son totalmente activos en división, o bien que su número no es suficiente para permitir la división de manera significativa. Parece que este número de anillos imprescindible para que la división tenga lugar es sensible a otras condiciones de crecimiento. La desaparición de la proteína de FtsZ y de los anillos a 42 es más rápida que a 37 °C, este hecho puede contribuir de manera importante en la rápida dinámica de desaparición del anillo que previamente describió Addinall *et al.*, 1997b al examinar la presencia de anillos formados por la proteína mutante FtsZ84 a 42 °C.

Tabla 1. Niveles de FtsZ en la estirpe VIP205 en ausencia de inductor a 37 y a 42 °C

	VIP205 37°C (0 µM)		VIP205 42°C (0 µM)	
	% [FtsZ/EF-Tu] _{MC1061} ^a	% [FtsZ/EF-Tu] _{VIP205} ^b	% [FtsZ/EF-Tu] _{MC1061} ^a	% [FtsZ/EF-Tu] _{VIP205} ^b
Tiempo 0	156	100	107	100
50% anillos	94	60	75	70
Anillo funcional	60	40	53	50
Anillo visible	50	35	43	40
Pérdida de Viabilidad	50	35	70	65

a: relativizado tomando como 100 el valor en la estirpe parental MC1061

b: relativizado tomando como 100 el valor en la estirpe VIP205

3. Correlación entre la concentración de FtsZ, la morfología, el número de anillos Z y la viabilidad celular

El mantenimiento de los parámetros morfológicos de longitud y volumen celular, dentro de los valores normales depende de la expresión adecuada del gen *ftsZ*. Esta expresión está regulada directamente por señales presentes en el grupo *dcw* (Palacios *et al.*, 1996; Flärdh *et al.*, 1998; de la Fuente *et al.*, 2001). En la figura 9 se representan los resultados de la persistencia de los anillos Z en relación a la concentración de la proteína FtsZ en la célula, los datos indican que las células de VIP205 cultivadas a 37 °C y con 30 µM de inductor, requieren entre el 140 y el 160 % de la concentración de FtsZ presente en la estirpe parental, para mantener los parámetros morfológicos normales. Estos resultados son coherentes con los valores obtenidos para esta variable en estudios previos (Garrido *et al.*, 1993; Palacios *et al.*, 1996). Sin embargo a 42 °C, la concentración de FtsZ necesaria para mantener estos parámetros morfológicos de VIP205 iguales a los de la estirpe parental a la misma temperatura, es aproximadamente del 107 % (ver Tabla 1). Esta observación indica que los parámetros morfológicos normales se alcanzan a diferentes niveles de la expresión del gen *ftsZ* dependiendo de las condiciones de crecimiento.

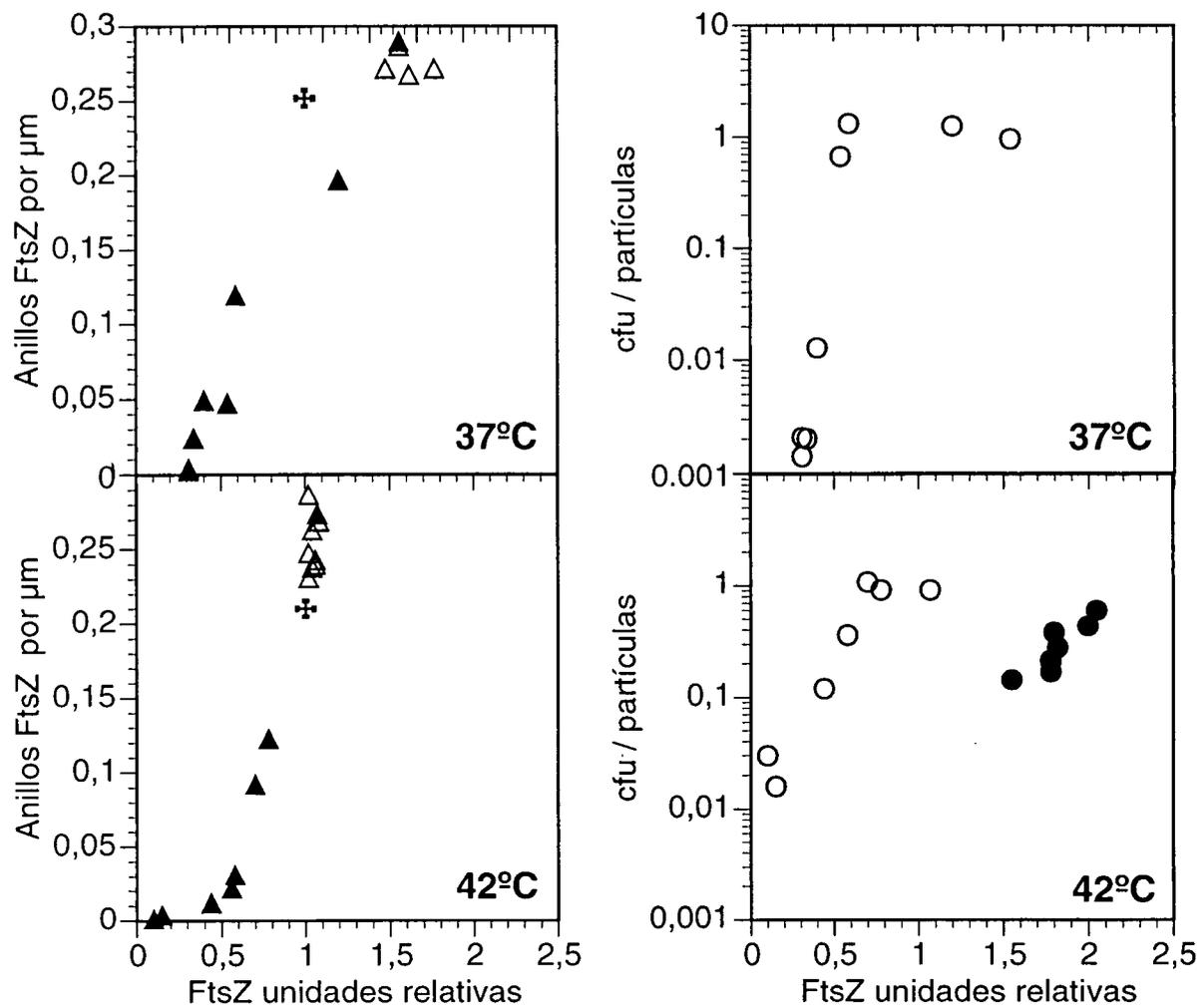


Figura 9. Número de anillos de Z y viabilidad celular en función de la concentración de FtsZ. En la parte izquierda de la figura se representan los datos de desaparición de anillos con respecto a la concentración de la proteína FtsZ, (▲), relativizada con respecto al EF-Tu, al parental MC1061. El número de anillos de Z por μm en los cultivos crecidos con $30 \mu\text{M}$ a 37 o $12 \mu\text{M}$ a 42°C están representados por el símbolo (△). Las cruces (✚) indican el número de anillos por μm en la estirpe parental a cada temperatura. En la parte derecha de la gráfica se muestran las células viables, medidas como unidades formadoras de colonias relativas al número de partículas (○), con respecto a la concentración de FtsZ. (●) se refiere a las células viables de la estirpe PAT84 a 42°C .

Los resultados de la figura 8 también indican que la concentración de FtsZ con la cual la mitad de los anillos desaparece se encuentra entre el 60 (37°C) y el 70 % (42°C), con respecto al valor inicial, (equivalente al 94 y al 75 % de la concentración presente en la estirpe parental en las mismas condiciones de crecimiento) (ver Tabla 1). Estas concentraciones se alcanzan a las dos temperaturas, aproximadamente al mismo

tiempo en el que la cinética de incremento de partículas cesa de aumentar y se mantiene constante. Esta observación también indica que la concentración de FtsZ necesaria para que los anillos Z sean activos en división puede cambiar, dependiendo de las condiciones de crecimiento. De acuerdo con estos datos, Palacios *et al.*, 1996 encontraron que las células de la estirpe VIP205 cuando crecen a 37 °C con concentraciones de IPTG que aportan un 80% de la concentración de FtsZ que existía en la estirpe parental, son más largas de lo normal. Estas células después de perder al menos una división restablecían los ciclos de división con un tiempo de duplicación similar al observado en las células que tienen un 140 % de la concentración de FtsZ y tienen una longitud normal. En vista de los resultados actuales podemos pensar que el menor número de anillos activos en división, cuando la concentración de FtsZ alcanza el 80% con respecto a la estirpe parental, impedía la división temporalmente.

Pla *et al.*, 1991, han encontrado que la desaparición de FtsZ en la estirpe VIP2, que contiene un alelo termonulo del gen *ftsZ*, tiene un efecto nocivo en la viabilidad celular. Se ha medido la viabilidad, como ufc en placas con 30 µM de inductor, de las células de la estirpe de VIP205 que se han pasado de IPTG a- IPTG, en estas condiciones la concentración de proteína de FtsZ disminuye progresivamente. Las células son capaces de crecer normalmente en ausencia de IPTG, medido por incremento de la DO a 600nm, durante el tiempo completo de los experimentos (datos no mostrados), por otra parte, no se ha observado lisis en los filamentos formados en los cultivos. Además se ha comprobado que el único gen afectado en los niveles de su expresión por la concentración de IPTG es *ftsZ* (Palacios *et al.*, 1996). Como se muestra en la figura 9 las células de esta estirpe crecidas a 37 °C son viables incluso a concentraciones de FtsZ que representan el 50 % de la cantidad presente en la estirpe parental (ver Tabla 1). La viabilidad, sin embargo, se pierde rápidamente a concentraciones de la proteína más bajas, tanto es así que con valores del 30 % la viabilidad está disminuía en dos órdenes de magnitud. No está claro el por qué la eliminación de FtsZ, cuya única función descrita es su participación en la división, tiene un efecto en viabilidad celular, sin embargo está claro que por debajo de un nivel mínimo de proteína la ausencia de FtsZ causa lesiones que son incompatibles con la vida de la célula.

En los resultados de la figura 9 también se muestra el efecto en la viabilidad celular de la expresión del alelo mutante *ftsZ84* a 42 °C durante 45 minutos. En este caso un cambio a la temperatura restrictiva causa un descenso menor (un orden de magnitud) en la viabilidad celular, que la pérdida de viabilidad de las células de VIP205 en ausencia de inductor a 42 °C (dos órdenes de magnitud), y sobre todo con respecto a 37°C (tres órdenes de magnitud). La presencia de niveles de proteína más altos y casi constantes en relación a los de la estirpe parental C600 acompañan esta mayor viabilidad de PAT84 a 42 °C.

DISCUSIÓN

El ensamblaje de la proteína FtsZ en un anillo es un requisito previo para la división de la bacteria (Lutkenhaus and Addinall 1997; Margolin, 2000). Mediante una fusión de la proteína FtsZ a la GFP (*Green Fluorescent Protein*), Sun and Margolin, 1998, determinaron que el ensamblaje de la proteína de fusión en el anillo ocurre antes de la división celular, incluso en los sitios que están considerados como pre-divisionales, y que ocupan las posiciones de un cuarto y tres cuartos del eje longitudinal de la célula. Por otra parte encontraron que el ensamblaje del anillo es dependiente de la concentración de FtsZ, y una vez que la división se completa la fusión rápidamente se desensambla del anillo. Se ha descrito en Addinall *et al.*, 1997b, que los anillos formados por la proteína termosensible FtsZ84 son, al igual que la proteína, sensibles a la temperatura y desaparecen rápidamente después de que el cultivo ha alcanzado la temperatura restrictiva. En ninguno de estos dos trabajos se han estudiado las propiedades de la proteína silvestre.

Los anillos Z formados por la proteína silvestre FtsZ son capaces de permanecer estables y activos bajo condiciones en las cuales la expresión del gen *ftsZ* está reducida. Aunque la cinética de desaparición de anillos Z por unidad de longitud es más rápida que la cinética de desaparición de la proteína, en la célula persisten algunos anillos incluso cuando los niveles de FtsZ caen al 50 % o por debajo, con respecto al salvaje. Sin embargo, los anillos formados cuando la concentración de FtsZ cae por debajo de un nivel (aproximadamente del 60 %), no son totalmente funcionales o bien no hay suficiente cantidad de ellos para continuar con la división normal. Esto queda indicado en el enlentecimiento que se observa en la curva del incremento del número de partículas. Nuestros datos sugieren que la total funcionalidad del anillo se logra a una determinada concentración de FtsZ, este hecho puede ser crucial para la división celular y para mantener un equilibrio preciso de los niveles de FtsZ, manteniendo una relación entre la síntesis de FtsZ y su inactivación. Mientras que en *Caulobacter crescentus* FtsZ se degrada rápidamente después del desensamblaje del anillo (Quardokus *et al.*, 1996; 2001), en *E. coli* no se conoce el destino de las moléculas de FtsZ una vez que se han desensamblado del anillo, ya sea durante o después de la división. Por otro lado, hay numerosas publicaciones que indican que la expresión del gen *ftsZ* puede estar

finamente regulada por las necesidades de la célula, por medio de la abundancia de señales reguladoras implicadas en la expresión del agrupamiento *dcw*, tanto al nivel transcripcional como post-transcripcional (de la Fuente *et al.*, 2001; Flärdh *et al.*, 1998; Palacios *et al.*, 1996).

La persistencia y funcionalidad de los anillos Z está también afectada por las condiciones de cultivo. Aunque a 42 °C la desaparición de la proteína FtsZ y los anillos Z es más rápida que a 37 °C, las células de VIP205 crecidas a 42 °C mantienen sus parámetros morfológicos parecidos al parental MC1061, con unos niveles de la proteína FtsZ muy similares. Esto no sucede a 37 °C donde la estirpe VIP205 requiere un nivel de proteína de 140 % con respecto al silvestre para dividirse con la misma longitud y el mismo volumen. Esta discrepancia sugiere que la regulación de la división celular y quizá el ensamblaje del anillo de Z pueden estar afectados por factores adicionales a FtsZ.

Es sorprendente el resultado de que las células de la estirpe VIP205, por debajo de un nivel de FtsZ, aunque sean capaces de crecer en masa (resultados no mostrados), pierdan su viabilidad. Es posible que en ausencia de FtsZ, como ya ha sido apuntado antes (Pla *et al.*, 1991), los sitios potenciales de división no estén ocupados por la proteína, y de esta manera puedan atrapar o actuar como sumideros de algún componente esencial de crecimiento. Los componentes de la maquinaria de replicación y segregación del nucleóide bacteriano pueden quedar excluidos como posibles candidatos a ser captados, ya que el número y la posición de los nucleóides no se ven afectados por el descenso en la concentración de FtsZ en VIP205 (resultados no mostrados). Por otra parte, quizá los sitios potenciales de división sin FtsZ puedan generar regiones lábiles que a medida que las células van creciendo fueran haciéndose más débiles y que finalmente contribuyeran a matar a la bacteria.

A 42 °C la presencia de la proteína mutante FtsZ84 que se encuentra en mayores niveles que en su parental C600, podría aliviar la pérdida de viabilidad de las células de la estirpe PAT84. A esta temperatura FtsZ84 no es activa en división y se desensambla muy rápidamente desde los anillos Z (Addinall *et al.*, 1997b). Esta proteína aunque inactivada térmicamente podría, no obstante, retener cierta actividad que

previniera los efectos nocivos en la viabilidad debidos a los mecanismos de trampa o de debilitamiento. En conjunto los efectos de la inactivación o disminución de proteína sobre la viabilidad celular sugieren que la localización del septo o el mantenimiento de la localización pueden incluir a otros componentes celulares diferentes a FtsZ, y que la proteína FtsZ pudiera tener actividades adicionales a la formación del anillo Z durante la división celular.

CAPÍTULO 2

Niveles de las proteínas FtsZ, FtsA y ZipA y cinética de su localización en el anillo de división durante el ciclo celular

INTRODUCCIÓN

Durante el ciclo celular de *E. coli* ocurren varios sucesos discretos, tales como la iniciación de la replicación del cromosoma, la segregación del nucleoide, el ensamblaje del anillo de FtsZ, y la división celular (Margolin, 2000; Donachie, 2001), mientras que el crecimiento ocurre de manera continua. Cuando una bacteria crece con tiempos de generación de 20 minutos su cromosoma tiene múltiples horquillas de replicación de DNA, observándose la superposición de ciclos de replicación y de división (Helmstetter and Pierucci, 1976). Para evitar que la bacteria se encuentre siempre en período D en nuestro trabajo se cultivó la estirpe B/rK a 37 °C en un medio mínimo M9 suplementado con glucosa al 0,2%, en el que el tiempo de generación de la estirpe es de 49 minutos (datos no mostrados). Se ha elegido esta estirpe porque la mayoría de los estudios fisiológicos sobre ciclo celular de *E. coli* se han realizado con ella, además las células se adhieren de manera muy eficaz a membranas de ésteres de celulosa, lo que la hace adecuada para sincronizarla mediante la técnica de elución de células recién nacidas, según el apartado 1.2 de Métodos. En estas condiciones se ha estudiado, mediante microscopía de inmunofluorescencia, el ensamblaje del anillo de división y por inmunodetección (*western blot*) los niveles de las proteínas FtsZ, FtsA y ZipA, las tres proteínas que se localizan antes en el septo (ver introducción general), durante un ciclo celular completo.

Se ha descrito que la localización espacial del anillo Z en el centro celular se puede controlar a través de dos mecanismos complementarios, la oclusión producida por el nucleoide y la acción que ejercen las proteínas del sistema MinCDE (ver introducción general). Por otra parte, el momento temporal en el que tiene lugar el ensamblaje del anillo parece depender de la replicación del cromosoma, o bien de la fase de elongación como en *Bacillus subtilis* (Regamey *et al.*, 2000), o bien de la fase de terminación como en *E. coli* (den Blaauwen *et al.*, 1999). Aunque también se ha postulado que el ensamblaje del anillo puede ocurrir de manera independiente de la replicación del cromosoma y dependiente del tamaño celular, ya que en células en crecimiento activo en las que se ha inhibido el inicio de la replicación se forman anillos Z (Gullbrand and Nordström, 2000). Se ha encontrado que las actividades enzimática y de polimerización de la proteína FtsZ dependen de su concentración, no siendo capaz de polimerizar por

debajo de una concentración de $1\mu\text{M}$ (Wang and Lutkenhaus, 1993; Sossong *et al.*, 1999). Esto sugiere que el ensamblaje del anillo Z podría controlarse, al menos en parte, a través de la regulación de los niveles intracelulares de FtsZ.

Existen indicios para pensar que los niveles de FtsZ puedan variar a lo largo del ciclo, varios grupos han demostrado que el transcrito de *ftsZ* oscila durante el ciclo (Garrido *et al.*, 1993; Robin *et al.*, 1990; Zhou and Helmstetter, 1994), y que esto es importante, pues las estirpes en las que se ha eliminado esta oscilación presentan problemas al dividirse (Palacios *et al.*, 1996). Se sabe que la transcripción de *ftsA* y *ftsZ* está acoplada a la replicación del cromosoma (Tormo *et al.*, 1985; Liu *et al.*, 2001). Por otra parte, se ha visto en *Caulobacter crescentus* que los niveles de FtsZ se regulan de manera dependiente del ciclo celular (Quardokus *et al.*, 1996). FtsZ se sintetiza durante la diferenciación de las células no móviles y la localización del anillo Z tiene lugar en ese momento. Aunque se aumente de manera artificial los niveles de FtsZ en las células móviles, no se forman anillos (Quardokus *et al.*, 2001), esto demuestra que el posicionamiento y el momento en el que aparecen los anillos está acoplado al ciclo celular y que no sólo depende de los niveles de FtsZ. También se han descrito las variaciones dependientes de ciclo celular en el nivel de esta proteína en *Prochlorococcus sp* (Holtzendorf *et al.*, 2001).

Trabajos de Lutkenhaus y colaboradores no han encontrado oscilaciones en los niveles de 750 proteínas durante el ciclo celular de *E. coli* (Lutkenhaus *et al.*, 1979). Un estudio más reciente muestra una cierta variación en tres proteínas de entre un total de 1000 analizadas (Bechtloff *et al.*, 1999), aunque la relación de estas proteínas (los productos de los genes *dps*, *gapA* y *pyrI*) con el ciclo celular es incierta. En una aproximación más directa se ha descrito el caso de la proteína DnaK, proteína de la familia de actina que se induce por choque térmico y que está implicada en los procesos de inicio en la síntesis de DNA. En *C. crescentus* tanto el mensajero como la proteína DnaK sufren una variación dependiente de ciclo celular (Gomes *et al.*, 1990), sin embargo la síntesis de la proteína DnaK durante el ciclo celular de *E. coli* es constante (Hupp *et al.*, 1994). Por otro lado se ha investigado la dependencia respecto a ciclo de la mayoría de las proteínas de unión a penicilina de *E. coli* (Wientjes *et al.*, 1983) y se ha encontrado que no varían.

Para que se puedan localizar las proteínas FtsA y ZipA es necesaria la presencia en el anillo de FtsZ. Es conocido desde hace tiempo que la relación que existe entre los niveles de las proteínas FtsZ y FtsA es crítica para la división y que existe una interacción entre estas dos proteínas. Se ha podido comprobar que también existe una interacción entre FtsZ y ZipA y que el extremo C terminal de FtsZ es indispensable para ello (ver introducción general).

RESULTADOS

1. Comprobación del grado de sincronía

Las células de la estirpe B/rK de *E. coli* cultivadas en medio mínimo M9 suplementado con 0,2 % de glucosa a 37 °C tienen un tiempo de generación de 49 minutos (datos no mostrados). A partir de este cultivo y mediante la técnica de elución de membrana (Helmstetter, 1969), se obtuvieron células recién nacidas según lo descrito en el apartado 1.2 de métodos.

Se controló el grado de sincronía de los cultivos siguiendo la distribución del número de partículas por mililitro y del tamaño celular de una población (moda y la mediana). Mientras las células aumentan en masa el número de partículas no varía, pero en el momento de la división se produce un incremento al doble aproximadamente (figura 10 A), sin embargo esta medida es poco fiable debido a la incertidumbre que se introduce al elegir los puntos que forman los segmentos horizontales de la representación gráfica. Las células recién nacidas tienen aproximadamente el mismo tamaño celular, a lo largo del crecimiento este tamaño va progresivamente aumentando hasta llegar al momento de la división en el que disminuye al repartirse entre las dos hijas, por lo tanto la mediana en el momento de la división disminuye (figura 10 B), este es un modo de representación más fiable ya que no existe incertidumbre en la representación de un valor que disminuye de manera brusca en un tiempo determinado. La representación de la moda (figura 10 C) de un cultivo sincrónico, en los tiempos que coinciden con la división de las células, se caracteriza por una curva bimodal, donde uno de los valores de la moda, el mayor, se refiere a las células no divididas, y el otro dato a las células ya divididas.

Una medida más exacta del grado de sincronía se puede calcular en base a la fórmula desarrollada por Scherbaum *et al.*, 1959.

$$F = \left[\frac{(n - n_0)}{n_0} \right] * \left[1 - \left(\frac{t}{\tau} \right) \right]$$

F es el grado de sincronía, **n₀** es el número inicial de partículas, **n** el número final, **t** el intervalo de tiempo en el que coexisten dos modas y **τ** es el tiempo de generación. La

sincronía será tanto mayor cuanto más se aproxime F a 1. Para cada uno de los tres cultivos estudiados el factor F fue de 0,75, 0,76 y 0,82. Estos datos muestran que el grado de sincronía es aceptable y útil para hacer estudios de sucesos durante el ciclo celular.

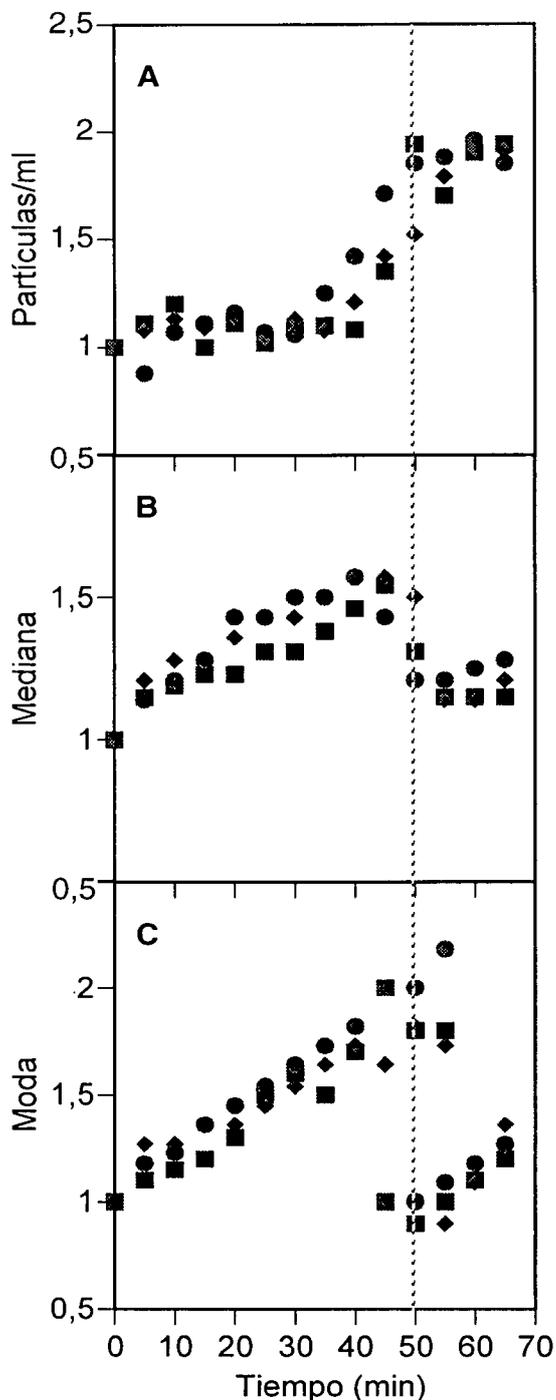


Figura 10. Cinética del aumento del tamaño celular y de las partículas durante un cultivo sincrónico en la estirpe Br/K. Se tomaron muestras en tres experimentos diferentes cada 5 minutos y se procesaron según lo explicado en el apartado 1.2 de métodos. En el panel A se representa la moda, el B la mediana y el C el número de partículas por ml. Todos los valores se relativizaron con respecto al tiempo cero. La línea discontinua indica el tiempo de generación (49 minutos).

2. La concentración de las proteínas FtsZ, FtsA y ZipA permanece constante a lo largo del ciclo celular

Se han analizado los niveles de FtsZ durante un ciclo celular completo mediante *western blot* (apartados 2.2 y 2.4 de métodos), en tres cultivos sincrónicos independientes. El número de moléculas de FtsZ por célula en esta estirpe y en fase exponencial es de aproximadamente 3100 (datos no mostrados), este número está por debajo del límite inferior del rango 5000-20000 calculado para las estirpes K12 (Pla *et al.*, 1991; Bi and Lutkenhaus, 1991). Este hecho y la baja densidad celular obtenida en los cultivos sincrónicos (10^6 células/ml) dificulta la obtención de una medida directa y fiable del número de moléculas de FtsZ por célula, ya que pequeñas pérdidas de muestra pueden ser importantes. De esta manera se usó el factor de elongación Tu (EF-Tu) como marcador interno para corregir las pérdidas de muestra y los errores de carga, debido a que este factor está relacionado con la masa celular (Furano, 1975), así la relación que hay entre los niveles de FtsZ y EF-Tu se tomó como una medida de la concentración de la proteína FtsZ en las células (unidades de FtsZ por unidad de masa celular) (ver apartado 2.4 de métodos). La comparación de los resultados de los tres experimentos muestra que esta concentración es constante a lo largo del ciclo celular (figura 11 A). La dispersión de los datos dentro de cada experimento es similar al error experimental de la técnica, para cada experimento los coeficientes de variación fueron de 8,8, 11,1 y 18,8 % y el error experimental de una serie de resultados a partir de una misma muestra analizada en un mismo y en diferentes geles de acrilamida fue del 11,7 %. Si hubiera alguna variación de los niveles de la proteína asociada al ciclo celular sería más baja que el error experimental de la técnica, y es difícil suponer que una variación tan pequeña tenga alguna relevancia fisiológica.

Se analizaron los niveles de las proteínas FtsA (figura 11 B) y ZipA (figura 11C) en dos experimentos sincrónicos, mostrando que la concentración de ambas proteínas, con respecto al EF-Tu, es también constante durante el ciclo celular.

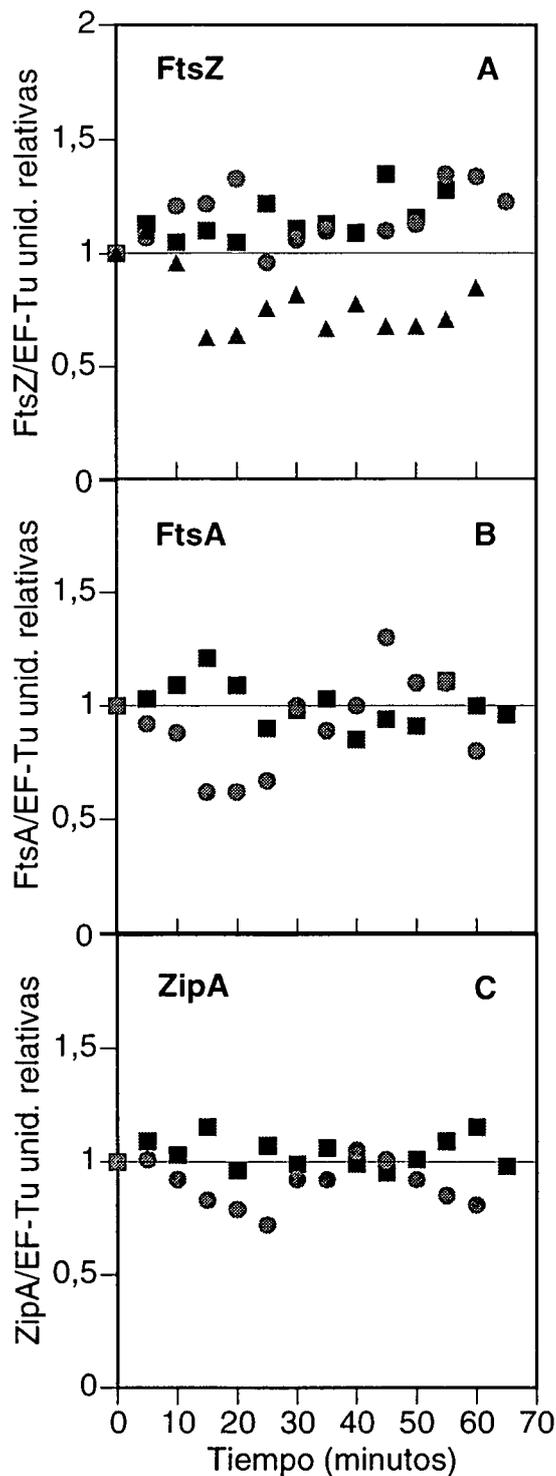


Figura 11. Niveles relativos de FtsZ, FtsA y ZipA durante un ciclo celular completo. Se tomaron muestras cada 5 minutos (apartado 1.2 de materiales y métodos) y analizaron por inmunodetección usando anticuerpos específicos para cada proteína (apartado 2.2 de métodos). Todas las medidas se relativizaron con respecto a EF-Tu, y en todos los casos a la relación entre FtsZ/EF-Tu a tiempo cero se le asignó el valor de 1. En cada gráfica se representan los datos de dos experimentos, excepto para FtsZ que son tres.

3. Ensamblaje del anillo Z durante el ciclo celular

El análisis del ensamblaje del anillo Z por microscopía de inmunofluorescencia muestra tres tipos de células: células sin anillos (figura 12 A), células caracterizadas por la presencia de dos puntos fluorescentes a ambos lados del centro celular (figura 12 B), y células con un anillo completo de localización más precisa, según la definición de anillo descrita en el capítulo 1 (figura 12 C). Un anillo puede observarse como dos puntos opuestos debido a que las imágenes de fluorescencia son representaciones bidimensionales de intensidades fluorescentes tridimensionales que causan en los bordes de las bacterias una sobreexposición comparada con la superficie central (Sun and Margolin *et al.*, 1998). A estas estructuras se les ha denominado “anillos abiertos” frente a los “anillos cerrados” presentes en el tercer tipo de células (den Blaauwen *et al.*, 1999). Alguna de las células sin anillos muestran un único punto con poca señal de fluorescencia en el futuro sitio de división, estos puntos pudieran ser los precursores de los anillos abiertos, pero como resultaron ser difíciles de discriminar con respecto a los acúmulos inespecíficos se consideraron como células sin anillo.

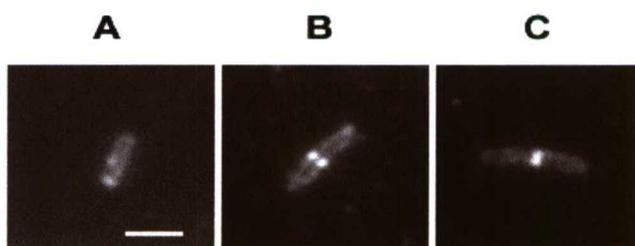


Figura 12. Etapas en la formación del anillo de FtsZ. Las células se observaron por microscopía de inmunofluorescencia con el anticuerpo monoclonal Mab4 en un cultivo sincrónico. Panel A, célula recién nacida sin anillo. Panel B, célula con un anillo abierto. Panel C, célula con un anillo cerrado. La barra mide 2 μm .

La frecuencia de estos tipos celulares en la población (figura 13) varía con la longitud celular, dando lugar a una secuencia de estados bien diferenciados en el ensamblaje del anillo Z. Las células recién nacidas son las más pequeñas y no tienen anillo, a medida que la longitud celular aumenta las células desarrollan la estructura llamada anillo abierto, que más tarde da lugar a un anillo cerrado, formado antes que la constricción y que se mantiene hasta la separación de las dos células hijas.

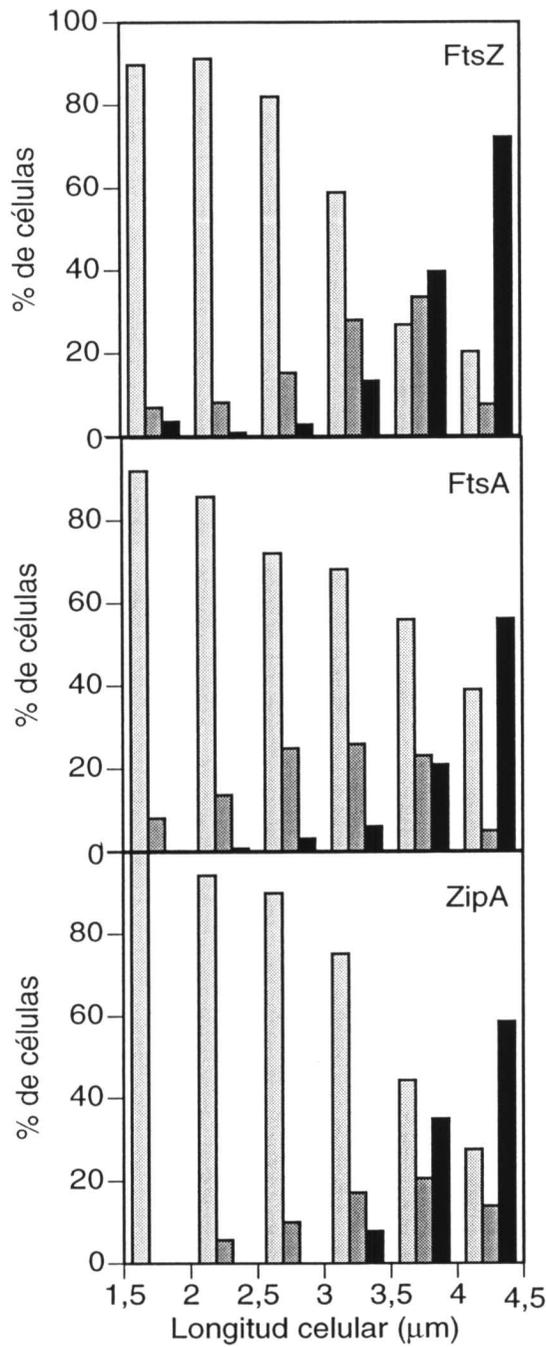


Figura 13. Patrones de localización de FtsZ, FtsA y ZipA en relación con la longitud celular durante el ciclo. Se tomaron muestras cada 5 minutos (apartado 1.2 de métodos) y se analizaron por microscopía de inmunofluorescencia usando anticuerpos específicos para cada proteína (apartado 2.2 de métodos). En gris claro se representa el porcentaje de células sin anillo, en gris oscuro el de células con anillo abierto y en negro el de células con anillo cerrado. La longitud media de las células recién nacidas fue de 2,26 (FtsZ), 2,36 (FtsA) y 2,26 μm (ZipA). Se desestimaron las células de longitud superior a 2 veces la longitud media inicial, en las que las proporciones de células de una y otra clase eran aberrantes, debido tanto a la sospecha de que las células estuvieran fisiológicamente alteradas al no ocurrir en estas células la división a longitudes normales, como a que su número era inferior al 2 % del total.

Para poder relacionar el momento del ensamblaje del anillo Z con otros sucesos del ciclo celular como la replicación y segregación del cromosomas, realizamos una representación de los porcentajes de los diferentes tipos celulares con respecto al tiempo (figura 14). La figura muestra que la etapa de anillo abierto abarca un amplio período de tiempo, alcanzando un máximo entre los 25 y los 40 minutos. Por otra parte la etapa de anillo cerrado está más delimitada teniendo un máximo entre los 40 y los 45 minutos. El tiempo de replicación del DNA (período C) para la estirpe B/rK cultivada en medio mínimo es de 42 minutos y el tiempo que tardan las células una vez que han replicado su material genético en dividirse (período D) es de 14 minutos (Helmstetter and Pierucci, 1976). Para un cultivo con un tiempo de generación de 49 minutos, el período C comienza 7 minutos antes de la división y finaliza en el minuto 35, cuando las células están ya en la etapa de anillo abierto. Esto significa que el ensamblaje del anillo Z en el centro celular comienza mientras el cromosoma está todavía replicándose. No parece necesario que tenga lugar la segregación de los cromosomas para la localización del anillo, aunque sí para la división ya que la etapa de anillo cerrado se alcanza después de terminada la replicación. A partir del minuto 50 del sincrónico se observa una caída paulatina del porcentaje de células con anillo tanto abierto como cerrado, esto coincide con el momento de la división, y la separación de las células hijas mediante la ruptura del septo de división. Estas células hijas no tienen anillo, lo que ocasiona que el número de células sin anillo en la población se mantenga siempre alto.

Los patrones de inmunolocalización de FtsA y ZipA son prácticamente idénticos al de FtsZ, mostrando también tanto anillos abiertos como cerrados (figuras 13 y 14). Previamente se ha descrito que la localización de FtsZ en el anillo es independiente de ambas proteínas, mientras que la localización de FtsA y ZipA depende de FtsZ (Addinall *et al.*, 1996b; Hale and de Boer 1999). La técnica de elución de membrana empleada no permite distinguir entre sucesos que ocurren con una diferencia de tiempo pequeña (2-3 minutos) (Grover and Helmstetter, 1995), lo que quiere decir que si los patrones de localización de FtsZ, FtsA y ZipA fueran distintos la diferencia se encontraría por debajo del poder de resolución de la técnica. En el caso de las proteínas FtsA y ZipA la etapa de anillo abierto aparece al mismo tiempo que para FtsZ, y en todos los casos antes de la formación del anillo cerrado. Este dato demuestra que las tres

proteínas se ensamblan pronto en el ciclo celular en un anillo difuso que da lugar posteriormente a un anillo completo, antes de la división celular.

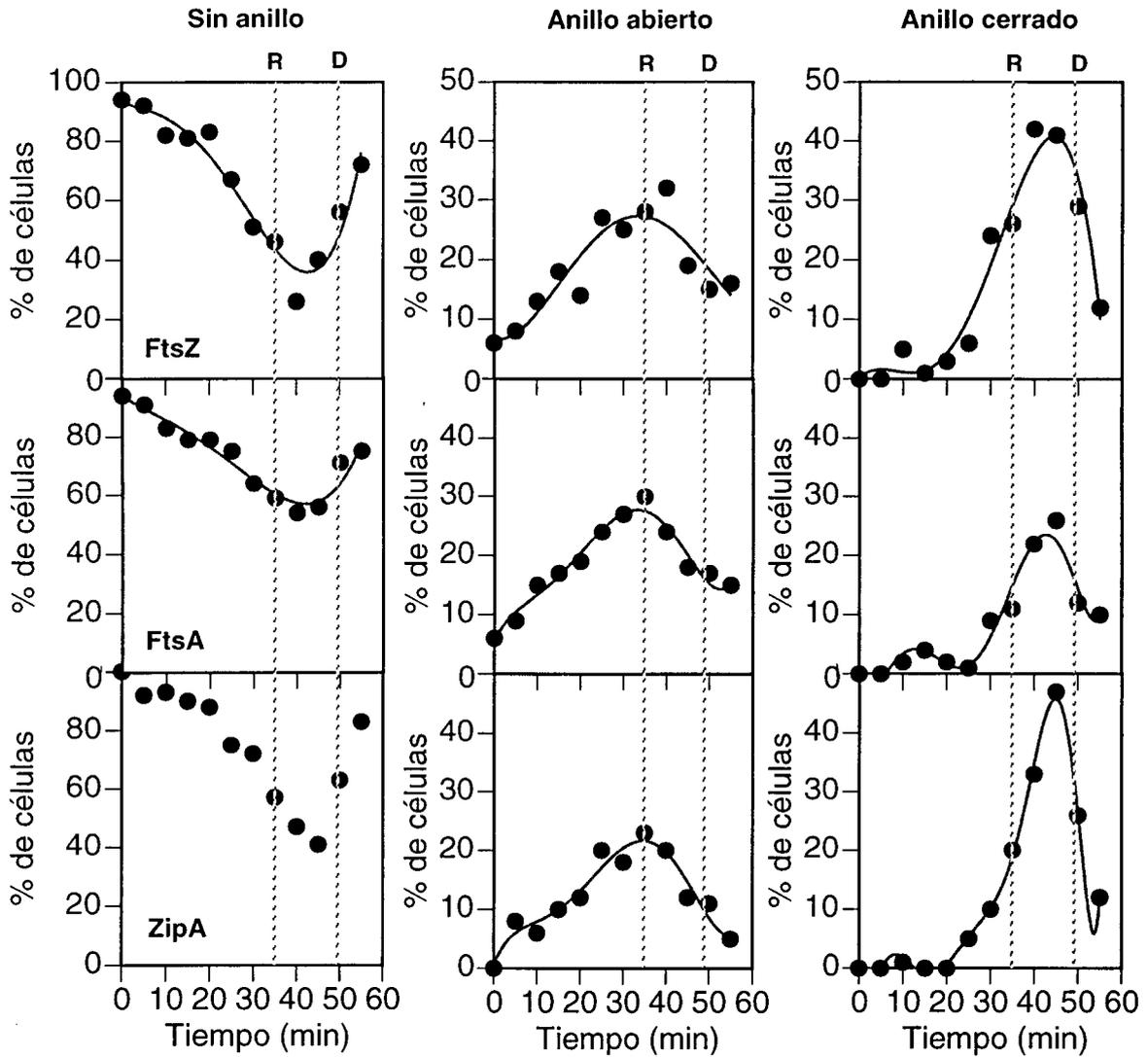


Figura 14. Secuencia temporal de localización de FtsZ, FtsA y ZipA durante un ciclo celular completo. Se tomaron muestras cada 5 minutos (apartado 1.2 de métodos) y se analizaron por microscopía de inmunofluorescencia usando anticuerpos específicos para cada proteína (apartado 2.2 de métodos). La letra **R** indica el final de la replicación (35 minutos) y la **D** el final de la división (49 minutos).

DISCUSIÓN

En cultivos sincrónicos de la estirpe B/rK, obtenidos por la técnica de elución de membrana de células recién nacidas, se han analizado los niveles de FtsZ, FtsA y ZipA, además del ensamblaje de estas proteínas de división en un anillo, durante un ciclo celular completo.

Mientras que los niveles de las tres proteínas son constantes durante el ciclo, el ensamblaje del anillo es un proceso periódico con tres etapas; después de la división las células recién nacidas no tienen anillos. Después aparece una estructura difusa caracterizada por dos puntos fluorescentes a cada lado del centro celular y en una última etapa se desarrolla un anillo completo de localización más precisa. Estos resultados son similares a los obtenidos del análisis de la formación del anillo Z en cultivos de crecimiento muy lento y mantenidos en equilibrio (den Blaauwen *et al.*, 1999) y en células que expresan una proteína de fusión FtsZ-GFP (Sun and Margolin, *et al.*, 1998). El mismo patrón se ha observado con los anillos de las proteínas FtsA y ZipA. Por lo tanto las tres proteínas de división ensamblan en un anillo abierto durante la replicación y en un anillo cerrado antes de la segregación de los cromosomas.

Es bien conocido que los niveles de FtsZ pueden controlar la división celular (Ward and Lutkenhaus, 1985; Palacios *et al.*, 1996), además entre las proteínas de división conocidas es la primera que se ensambla en el anillo, y es diana de inhibidores de la división celular como *sulA* y *minC* (ver introducción general). Todos estos datos sugieren que FtsZ podría controlar el momento en el que la maquinaria de división entra en funcionamiento. El control pudiera tener lugar a través de la concentración de FtsZ durante el ciclo celular, o bien a través de su actividad enzimática o de polimerización, ambas, a su vez, dependientes de la concentración (Wang and Lutkenhaus, 1993; Sossong *et al.*, 1999). Este mecanismo de control por la concentración se ha encontrado en *Caulobacter crescentus* (Quardokus *et al.*, 1996; 2001) y probablemente también en *Prochlorococcus sp* (Holtzendorf *et al.*, 2001). En *Bacillus subtilis*, por el contrario, los niveles de FtsZ no están relacionados con el ciclo celular (Rowland *et al.*, 1997).

La carencia de periodicidad en la concentración de las proteínas de división, y en particular de FtsZ que hemos encontrado fue inesperada. Varios grupos han demostrado que el mRNA de *ftsZ* varía cíclicamente en cultivos sincrónicos (Garrido *et al.*, 1993; Robin *et al.*, 1990; Zhou and Helmstetter, 1994). No está claro si esto representa un suceso regulado relativo al ciclo celular o si simplemente refleja un aumento de copias de la región *ftsQAZ* del cromosoma al pasar la horquilla de replicación por el minuto 2.5 (Zhou and Helmstetter, 1994). En cualquier caso la oscilación del mensajero parece que se requiere para que la célula se divida normalmente ya que en la estirpe VIP205 que tiene una expresión continua de FtsZ a partir de un promotor inducible, las células necesitan un 40 % más de proteína para no filamentar (ver capítulo 1). Se ha propuesto que la oscilación puede derivar de un mecanismo de acoplamiento entre la división celular y la replicación del cromosoma (Liu *et al.*, 2001). Un mRNA que oscila y produce un patrón constante de proteína podría indicar que existen mecanismos de regulación postranscripcional controlando el nivel de FtsZ, es posible imaginar una modulación de la traducción por un mRNA antisentido. En realidad, se ha encontrado que la traducción del mRNA de *ftsZ* puede ser inhibida por dos RNAs antisentido diferentes, *dicF*, codificado en un profago defectivo (Bouché and Bouché, 1989) y *stfZ*, que se inicia en la región 5' de *ftsZ* y abarca parte del 3' de *ftsA* (Dewar and Donachie, 1993).

Que la concentración de FtsZ en las células de *E. coli* sea constante a lo largo del ciclo celular, implica que el número de moléculas por célula oscila, incrementándose a medida que la célula aumenta en masa y disminuyendo justo después de la división. Estos datos apoyan la idea de que la división requiere una cantidad fija de FtsZ y que la división tiene lugar una vez que esta cantidad se alcanza (Aldea *et al.*, 1990; Pla *et al.*, 1991; Sun and Margolin, 1998).

Hemos demostrado que las concentraciones de FtsA y ZipA también son constantes, al igual que FtsI (Wienttjes *et al.*, 1983). Esto no es sorprendente porque estas tres proteínas dependen de FtsZ para su localización en el anillo. De hecho, la localización de todas las demás proteínas de división depende de FtsZ y no pueden, por lo tanto, regular el control temporal del ensamblaje del anillo Z. Estos resultados parecen

indicar que las proteínas de ciclo celular en *E. coli* se sintetizan de manera continua, de acuerdo con el estudio de Lutkentaus, 1979.

Para que el ensamblaje y el desensamblaje del anillo Z esté basado solamente en los mecanismos dependientes de la concentración de polimerización/despolimerización, es necesario que los niveles de FtsZ oscilen alrededor de la concentración crítica de polimerización. Esta concentración *in vitro* es de 1 μM (Wang and Lutkenhaus, 1993; Sossong *et al.*, 1999), mientras que la concentración de FtsZ en células de *E. coli* en crecimiento exponencial es de alrededor de 10 μM (Pla *et al.*, 1991; Dai and Lutkenhaus, 1992; Lu *et al.*, 1998). Nuestros datos no muestran que exista una oscilación semejante, por lo que se puede suponer que en la regulación del ensamblaje del anillo además de la polimerización de FtsZ, debe existir algún otro mecanismo. Se ha sugerido que la proteína FtsZ puede sufrir cambios en la estabilidad, o en la regulación de su actividad por modificaciones covalentes (Joseleau-Petit *et al.*, 1999). Este último mecanismo implica la existencia de más de una forma de proteína con actividades diferentes. Aunque se han encontrado preparaciones de FtsZ heterogéneas en algunos trabajos (RayChaudhuri and Park, 1992; Lu *et al.*, 1998), el origen de esta heterogeneidad y su relevancia fisiológica son desconocidas. Quizá el control temporal del ensamblaje se pueda alcanzar a través de variaciones cíclicas en la actividad de FtsZ o en la concentración de una de sus formas específica para ser activa en la septación.

CAPÍTULO 3

Regulación metabólica de la formación del anillo Z

INTRODUCCIÓN

La formación del anillo Z es el primer suceso molecular conocido que tiene lugar en el proceso de división bacteriana (Bi and Lutkenhaus, 1991). Su aparición en el momento adecuado y su colocación en el lugar preciso son dos sucesos clave para que la división celular sea normal (Addinall and Lutkenhaus, 1996a; Margolin, 2000, 2001). Durante estos últimos años se ha estudiado la presencia del anillo Z en células en crecimiento exponencial, es decir en células en desarrollo activo, lo que ha sido muy útil para determinar la relación del anillo Z con otras proteínas de división utilizando mutantes en esas proteínas (Addinall *et al.*, 1996b; Hale *et al.*, 1999; Yu *et al.*, 1998; Chen and Beckwith, 2001; Mercer and Weiss, 2002). FtsZ purificada es capaz de formar polímeros *in vitro* de manera acoplada al consumo del nucleótido GTP y dependiente, entre otras condiciones de la concentración de proteína en el medio (ver introducción general). De esta manera, cuando el nucleótido se agota el polímero de FtsZ se desarma (Mukherjee and Lutkenhaus, 1998). Además es necesario la presencia del ión Mg^{2+} para que se produzca el ensamblaje de los filamentos. También se ha comprobado que la adición de calcio al medio da lugar a la formación de haces de polímeros (Mukherjee and Lutkenhaus, 1999), debido a que la actividad GTPasa de FtsZ está disminuída de manera que los polímeros de FtsZ permanecen durante más tiempo. Este mismo efecto se ha observado con DEAE-dextrano (Erickson *et al.*, 1996) o en presencia de la proteína ZipA purificada (Hale *et al.*, 2000). En este trabajo hemos analizado la formación del anillo Z en cultivos con diferentes condiciones de crecimiento, en presencia de azida sódica, del antibiótico decoínina o provocando en las células una respuesta estricta, que se sabe disminuyen el metabolismo energético y los niveles del GTP celular (Grossman *et al.*, 1988; Huh *et al.*, 1996; Cashel *et al.*, 1996), para determinar alguno de los factores metabólicos que puedan estar implicados en la regulación del ensamblaje.

La azida sódica es un inhibidor irreversible del complejo enzimático ATP sintasa, entre otras enzimas (Oliver *et al.*, 1990). Este complejo está formado por dos sectores cada uno con varias subunidades, el sector F_1 que tiene actividad de síntesis de ATP y el sector F_0 implicado en el transporte de protones. La azida sódica se une al sector F_1 impidiendo la síntesis de ATP (Hutcheon *et al.*, 2001). Sin embargo este

tratamiento es muy poco específico, ya que agota el ATP y por tanto el GTP, totalmente, para evitar este problema se buscaron inhibidores específicos como la decoina. Este producto inhibe de manera reversible la GMP sintasa, así se bloquea la conversión de XMP a GMP, lo cual causa una caída en las concentraciones de GDP y GTP de la célula sin afectar a los niveles de ppGpp y pppGpp (Grossman *et al.*, 1988; Huh *et al.*, 1996). Las células de *B. subtilis* en fase exponencial de crecimiento, incluso en medio rico, incrementan tres veces su tiempo de generación tras la adicción de este producto a una concentración de 500 µg/ml (Grossman *et al.*, 1988), y terminan esporulando al cabo del tiempo (Fouet *et al.*, 1989).

La respuesta estricta es otro método, aunque menos específico, para reducir el nivel de GTP de la célula. Es consecuencia de la caída en la capacidad de la aminoacilación del tRNA, así la célula por un lado acumula ppGpp y pppGpp debido a la translocación fallida entre los sitios A y P del ribosoma, y por otro lado no puede mantener normalmente la demanda de síntesis de proteínas (Cashel *et al.*, 1996). Muchos de los efectos que provoca esta respuesta se deben a la acumulación de los derivados de GTP: ppGpp y pppGpp. El conjunto de ambas moléculas es conocido con las siglas (p)ppGpp (Cashel, 1969). Las células con un crecimiento rápido en fase exponencial tienen un nivel basal de (p)ppGpp de 10-30 pmol, este nivel se incrementa de 10-20 veces después de inducir la respuesta estricta por carencia de uno o más aminoácidos requeridos, y el nivel de GTP cae aproximadamente al 50% durante ese tiempo (Cashel, 1969; Fiil *et al.*, 1972). Después de añadir al medio de cultivo los aminoácidos requeridos se produce una caída de los niveles de (p)ppGpp (Gallant *et al.*, 1972). El ppGpp es un regulador global de la expresión que afecta a la expresión del factor de fase estacionaria σ^s , se ha observado que la filamentación producida por una RNA polimerasa alterada puede suprimirse por un aumento en los niveles de ppGpp (Vinella and D'Ari, 1994). Se ha demostrado por Powell and Court, 1998 que un incremento en los niveles de esta molécula provoca una mayor transcripción del gen *ftsZ*, otros autores han observado que con los niveles elevados de ppGpp la PBP2 no es necesaria en *E. coli* (Vinella *et al.*, 1992).

RESULTADOS**1. El mantenimiento del anillo Z requiere un metabolismo celular activo**

La azida sódica es un inhibidor irreversible de la enzima ATP sintasa (Oliver *et al.*, 1990), que provoca una caída total en los niveles de ATP y GTP en la célula (Hutcheon *et al.*, 2001), y da lugar a la muerte celular. En estas condiciones nos propusimos comprobar lo que sucedía con el anillo Z en un período de tiempo corto. Pudiera ser que el anillo Z mantuviera su estructura aunque no fuera funcionalmente activo, o por el contrario que se desarmara rápidamente. Este último suceso indicaría que el anillo formado por el ensamblaje de monómeros de la proteína FtsZ necesita energía, es decir un metabolismo activo para permanecer en la célula.

En la figura 14 se puede observar cómo el número de anillos en tan sólo dos minutos después de haber añadido azida sódica, desciende a un 20 %, llegando a un 1 % a los cinco minutos. Sin embargo, la concentración de la proteína FtsZ no varía a lo largo del experimento, indicándonos que la ausencia de anillos no se debe a la degradación de la proteína. Dado que la azida sódica paraliza el sistema energético (Hutcheon *et al.*, 2001), y que nuestros resultados indican que el porcentaje de los anillos sufre un descenso del 99 % de manera rápida con este producto, se puede concluir que el anillo no es una estructura estable, sino que depende de un metabolismo activo, posiblemente porque requiere GTP, teniendo en cuenta que los polímeros formados en solución por esta proteína contienen fundamentalmente GTP (Mingorance *et al.*, 2001) u otros intermediarios de su metabolismo.

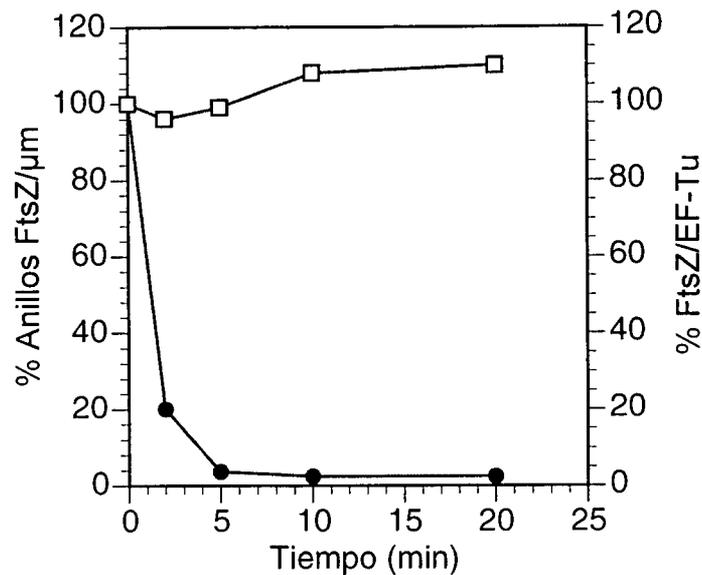


Figura 14. Cinética del nivel de FtsZ y del número de anillos en presencia de azida sódica. A un cultivo en crecimiento exponencial de la estirpe MC1061 a 37°C se le añadió 15 mM de azida sódica a tiempo cero. La proteína se detectó mediante *western blot* con los anticuerpos anti FtsZ MVJ9 y el anti EF-Tu (ver apartado 2.4 de Métodos). Para la inmunofluorescencia se usó el anticuerpo monoclonal Mab4 y se analizaron 100 células por tiempo. Al tiempo cero en ambos experimentos se le asignó el valor relativo de 100, y los valores reales fueron de 1 para FtsZ/EF-Tu y de 0,25 para anillos/μm. Los símbolos representan: □ % FtsZ/EF-Tu y ● % anillos/μm.

2. La disminución de los niveles del GTP celular provoca un aumento en la concentración de FtsZ

El tratamiento con azida sódica es muy poco específico puesto que afecta a los niveles de ATP, y por tanto a los de GTP de manera indirecta. Para determinar si el consumo de energía del anillo se realiza únicamente a causa de la actividad GTPasa de FtsZ o si hay algún otro factor dependiente de ATP, pero independiente de GTP, se realizó un experimento con decoina. Este antibiótico al inhibir a la enzima GMPsintasa se puede utilizar para disminuir de manera específica el nivel de GTP en la célula.

El resultado obtenido no fue muy claro, pues no puede eliminarse totalmente el GTP sin que se produzca la muerte celular. El crecimiento celular sí que está afectado, como se puede comprobar comparando los tiempos de generación (figura 15) con el inhibidor (41 minutos) y sin él (26 minutos).

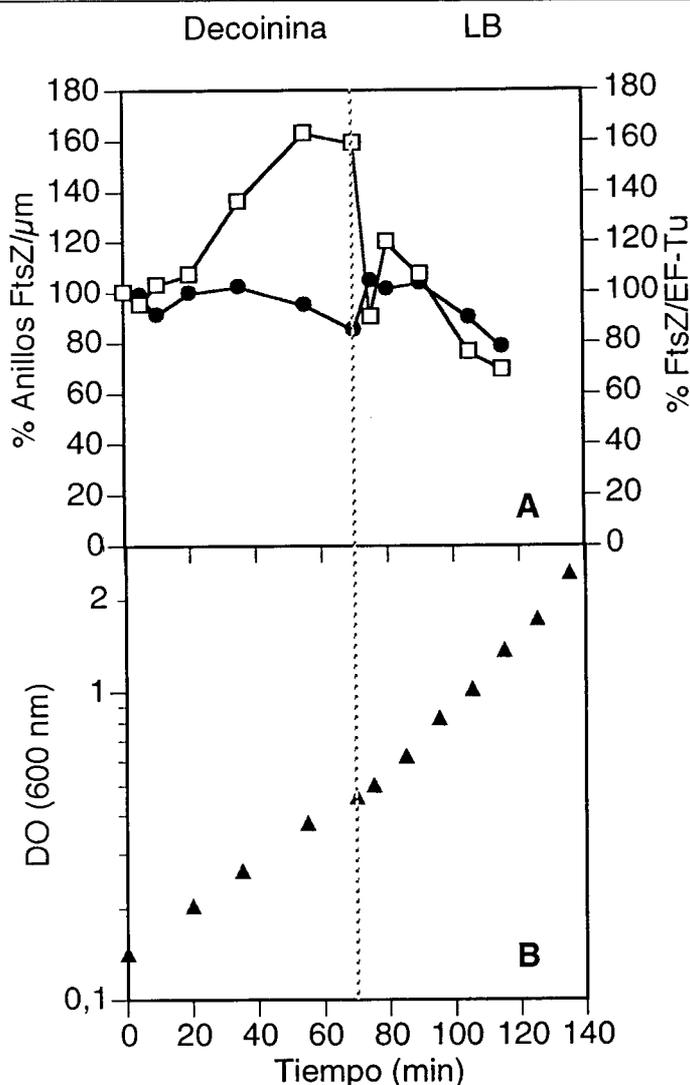


Figura 15. Cinética del nivel de FtsZ y del número de anillos en presencia de decoumarina. A un cultivo de MC1061 a 37 °C y en fase exponencial de crecimiento, se le añadió decoumarina a 500 μg/ml, y posteriormente se eliminó el inhibidor por filtración (línea discontinua). Las medidas se hicieron como se indica en el pie de la figura 14. Al tiempo cero en ambos experimentos se le asignó el valor relativo de 100, y los valores reales fueron de 1 para FtsZ/EF-Tu y de 0,24 para anillos/μm. Siendo el ● %anillos/μm, el □ % FtsZ/EF-Tu y el ▲ DO a 600 nm. Los resultados son la media de dos experimentos.

El nivel de FtsZ se incrementa hasta el 160 % con respecto al tiempo cero en presencia de decoumarina, y rápidamente es degradada al 62 % en el momento en que el antibiótico se elimina del medio de cultivo. No obstante, el número de anillos por unidad de longitud prácticamente no varía. Una interpretación a este aumento de FtsZ en presencia de un compuesto que disminuye el GTP-GDP celular, es que se produjese una inducción específica de la expresión de *ftsZ* (y quizá de otros genes del grupo *dcw*), o una estabilización de la proteína, que pudiera favorecer el ensamblaje del anillo o la

unión entre los monómeros de FtsZ que oligomerizan con GDP (Rivas *et al.*, 2000). De esta manera, las células podrían mantener el anillo de división. En este experimento se ha observado que el tamaño de las células tratadas con decoinina se mantiene en un valor medio de 3.0 μm (datos no mostrados), pero una vez que se elimina el inhibidor y se restablecen los niveles normales de GTP en la célula, se produce una disminución transitoria del tamaño celular, debida quizá, a que en ese momento con exceso en la cantidad de proteína y con suficiente cantidad de nucleótido la célula se divide inmediatamente, dando lugar a dos células hijas de tamaño inferior al que tenía la célula madre.

3. Efecto de la respuesta estricta sobre la formación del anillo Z

Otro método diferente y menos específico para reducir el nivel de GTP en la célula es la inducción de la respuesta estricta, llevada a cabo mediante el cambio de medio de cultivo, desde uno rico como es LB (Lennox, 1955) a un medio sin fuente de nitrógeno (aminoácidos requeridos) y/o de carbono. En una primera aproximación, se realizó un experimento con cambio de medio a PBS (tampón fosfato salino), medio compuesto exclusivamente por sales, y que carece, por tanto, de fuente de nitrógeno y de carbono. En la literatura se han descrito las alteraciones fisiológicas producidas por los cambios de medio de cultivo, tanto desde uno rico a uno pobre como al contrario. Se conoce desde hace años que la síntesis de RNA y de proteínas varía durante los cambios de medio. Las células cultivadas en un medio rico sufren una inhibición en la síntesis de RNA y de las proteínas en el momento del cambio a un medio pobre, que persiste hasta que se alcanza una nueva velocidad de crecimiento (Maaloe *et al.*, 1966). Por el contrario, cuando el cambio es desde un medio mínimo a uno rico, la síntesis del RNA se incrementa rápidamente para aprovechar las características del nuevo medio, seguida de un aumento en la síntesis de proteínas. La síntesis de DNA y la división celular se mantiene hasta que el cultivo se adapta al medio rico (Brunschede *et al.*, 1977).

En el experimento que hemos realizado con PBS, el crecimiento celular, medido como incremento en la DO, se detuvo inmediatamente, sin embargo al volver a medio rico el crecimiento se recupera rápidamente (τ de 30 minutos) (Fig. 16). El nivel de la proteína FtsZ no se ha calculado como en casos anteriores, relativizándolo con

respecto al EF-Tu, debido a que esta proteína está bajo el control de la respuesta estricta (Furano and Wittel, 1975), y el número de moléculas de EF-Tu lejos de ser constante, varía entre un medio rico y otro mínimo (ver apartado 2.4 de métodos). El nivel de FtsZ en las células con PBS se reajusta en tan sólo 2 minutos hasta un nuevo nivel, aproximadamente un 60 % del valor obtenido para FtsZ en medio rico (tiempo cero), en el que permanece estable. Por otra parte, al realizar el nuevo cambio a LB, los niveles de FtsZ de manera muy rápida alcanzan los que ya existían a tiempo cero, probablemente debido a la síntesis de un 40 % más de nueva proteína. Esta síntesis, al igual que la degradación son muy rápidas. El número de anillos por unidad de longitud cae gradualmente de manera más lenta, aunque más pronunciada que la proteína, llegando al mínimo a los 30 minutos; siendo la recuperación más rápida que la pérdida. Los datos demuestran que con un 60 % de FtsZ con respecto al valor en LB, las células son capaces de mantener durante 10 minutos el 70 % de los anillos, y que posteriormente este porcentaje cae hasta el 15 %, sin que varíen los niveles de FtsZ. La recuperación del número de los anillos en LB, así como del crecimiento y la división celular, sugiere que existe un nivel crítico de FtsZ, correspondiente al 60 %, por debajo del cual la proteína es insuficiente para formar y mantener los anillos, y para que éstos sean activos.

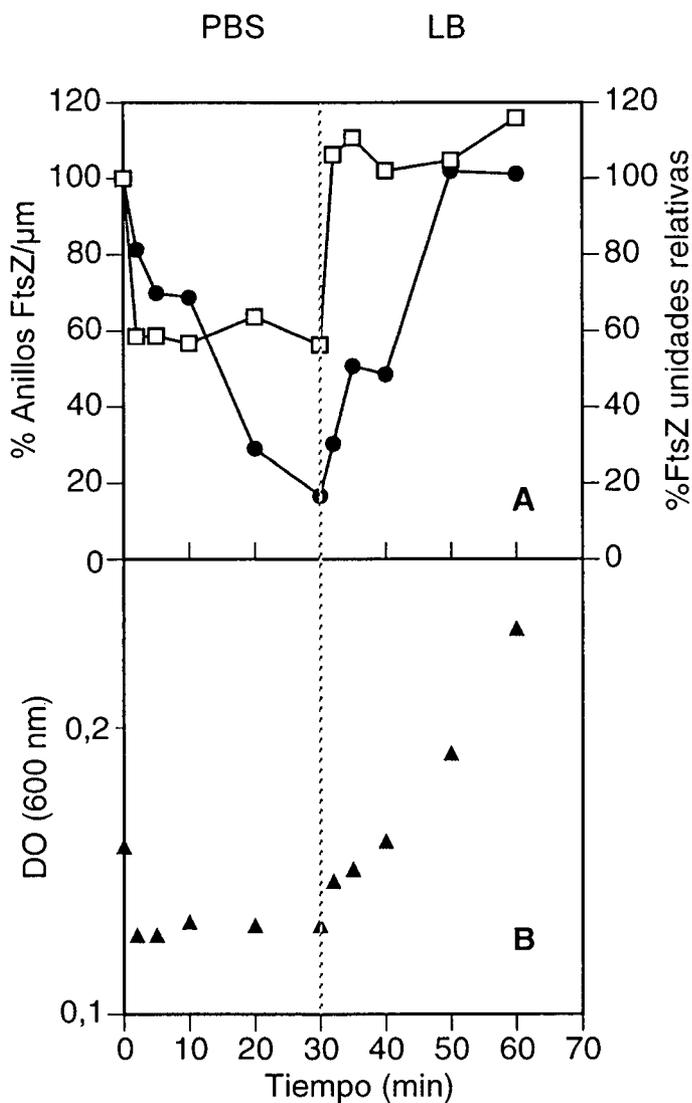


Figura 16. Persistencia del anillo Z y nivel de FtsZ en medio de cultivo PBS. Un cultivo en fase exponencial de MC1061 a 37°C en LB, a tiempo cero se filtró, se lavó y se resuspendió en PBS. La línea vertical en la gráfica señala el cambio a medio rico. La proteína se detectó mediante *western blot* con el anticuerpo anti FtsZ MVJ9. Para la inmunofluorescencia se usó el anticuerpo monoclonal Mab4 y se estudiaron 100 células por tiempo. Al tiempo cero en ambos experimentos se le asignó el valor relativo de 100, y los valores reales fueron de 1 para FtsZ y de 0,25 para anillos/μm. Siendo el ● % anillos/μm, el □ % FtsZ y el ▲ DO a 600 nm. Los resultados son la media de dos experimentos.

Para confirmar los resultados obtenidos se realizó un experimento similar con medio mínimo M9 suplementado con glucosa al 0.2%, provocando en este caso la respuesta estricta por ayuno exclusivamente de los aminoácidos requeridos. Los resultados del experimento son similares a los obtenidos con el medio PBS (Fig. 16). En tan sólo dos minutos el nivel de la proteína FtsZ desciende hasta su nuevo nivel del 60%,

con respecto al valor obtenido para FtsZ en medio rico (tiempo cero), y otros dos minutos tarda en recuperarse la proteína después del cambio a LB. Este dato nos sugiere que la degradación de la proteína FtsZ cuando la misma no se utiliza en división (DO constante en M9) es muy rápida, tanto como la síntesis cuando es necesaria (τ de 30 minutos en LB). En la figura 17 se observa que por debajo del 60 % de FtsZ los anillos no se mantienen, provocando una caída en su número de hasta el 75 % con respecto al valor a tiempo cero, sin embargo cuando el nivel de la proteína supera este umbral, y puesto que la división celular se restablece, podemos suponer que la proteína se ensambla en anillos funcionales.

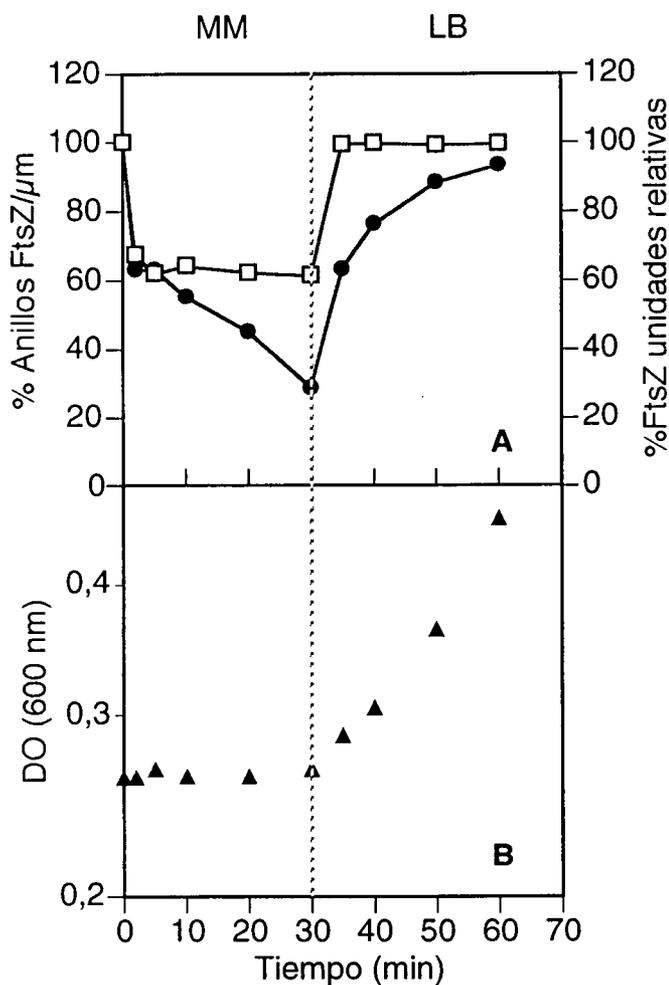


Figura 17. Persistencia del anillo Z y nivel de FtsZ en medio de cultivo M9. Un cultivo en fase exponencial de MC1061 a 37°C en LB, a tiempo cero se filtró, se lavó y se resuspendió en MM+0,2% glucosa. La línea vertical en la gráfica señala el cambio a medio rico. Las medidas se hicieron como se indica en el pie de la figura 16. Al tiempo cero en ambos experimentos se le asignó el valor relativo de 100, y los valores reales fueron de 1 para FtsZ y de 0,25 para anillos/ μm . Siendo el ● % anillos/ μm , el □ % FtsZ y el ▲ DO a 600 nm. Los resultados son la media de dos experimentos.

4. El anillo Z necesita un nivel mínimo de proteína FtsZ para mantenerse

Los resultados de los experimentos realizados con PBS y MM apuntan a que los niveles intracelulares de la proteína disminuyen hasta alcanzar un nivel mínimo que permanece inalterable, en concordancia con lo descrito por Aldea *et al.*, 1990. En estas condiciones las células contienen anillos. Para confirmar si estos niveles se deben a la inducción de la respuesta a estrés nutricional o si se alcanzan en otras circunstancias, se estudió la concentración de FtsZ y la presencia de anillos en la estirpe MC1061 a lo largo de las diferentes fases de crecimiento de una población celular. Podíamos suponer que a medida que el cultivo alcanzase la fase estacionaria, la síntesis de proteínas no típica de esta fase como FtsZ, se detendría progresivamente, al igual que el número de anillos, sin embargo se ha demostrado la existencia de promotores *gearbox* para el gen *ftsZ* que se inducen por entrada en fase estacionaria, aunque el aporte al mensajero total de *ftsZ* es pequeño (Aldea *et al.*, 1990; Ballesteros *et al.*, 1998).

En la figura 18 se observa que en fase estacionaria el nivel de proteína FtsZ no desciende más de un 50 % con respecto al valor inicial en fase exponencial, y que por debajo de este porcentaje de proteína no hay anillos Z. Esta concentración obtenida es similar al nivel de FtsZ, calculado en los experimentos de cambio de medio, necesario para que los anillos Z permanezcan. A la vista de estos resultados podemos concluir que para que la proteína FtsZ se ensamble en anillos y que éstos sean activos en división, es necesaria una concentración de FtsZ de aproximadamente un 60 %, con respecto al valor en fase exponencial y en medio rico. Este dato concuerda con el descrito en el Capítulo 1, en el que mediante otro abordaje experimental se determinó el nivel de FtsZ por debajo del cual las células no se dividen y la viabilidad se pierde. En fase estacionaria, en la cual observamos una caída en el número de anillos Z y una parada en el crecimiento, la concentración de FtsZ disminuye al igual que lo hace el tamaño celular, esto significa que el número total de moléculas presentes en la célula también disminuye. Este resultado es coherente con lo descrito en el capítulo 2 en el que hemos propuesto que lo que determina la división es el número de moléculas: cuando se supera un umbral de FtsZ la división se produce.

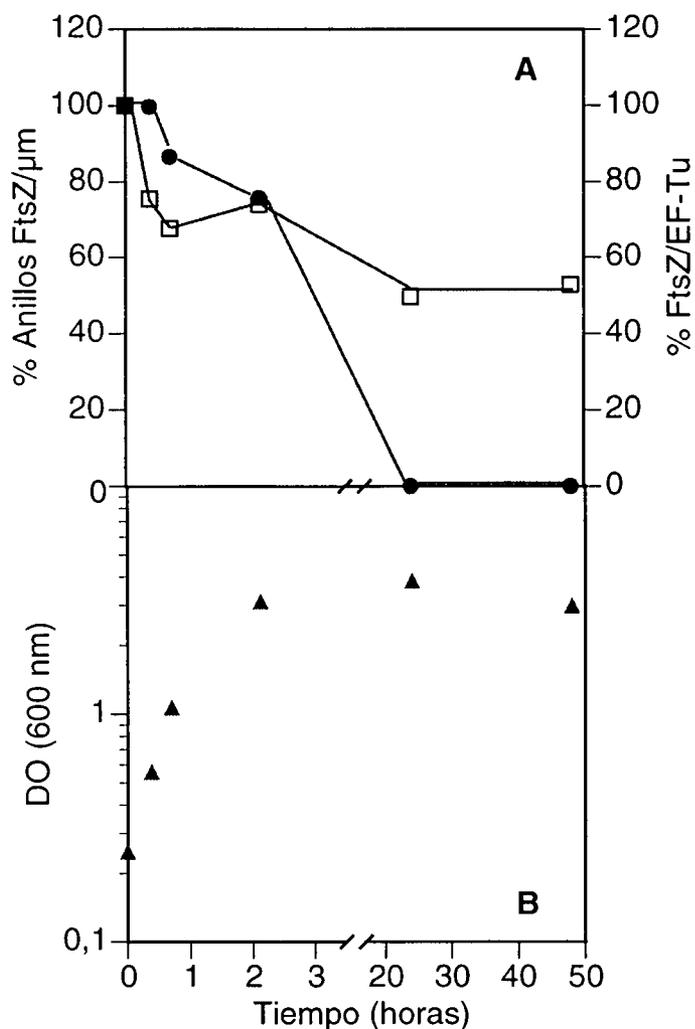


Figura 18. Cinética del nivel de FtsZ y del número de anillos en las diferentes fases de crecimiento. La estipe MC1061 se cultivó según se describe en el texto. Las medidas se hicieron como se indica en el pie de la figura 14. Al tiempo cero en ambos experimentos se le asignó el valor relativo de 100, y los valores reales fueron de 1 para FtsZ/EF-Tu y de 0,25 para anillos/μm. Siendo el ● % anillos/μm, el □ %FtsZ/EF-Tu y el ▲ DO a 600 nm.

5. Método para determinar el estado de crecimiento de una población bacteriana

Como resultado aplicado de nuestro trabajo proponemos un nuevo método para determinar de forma fiable el estado fisiológico de una población bacteriana en un momento determinado, basado en la visualización del anillo Z. Las células cuando están creciendo de manera activa, entendiéndose por ello la capacidad de aumentar sus componentes hasta duplicarlos y después dividirse, forman un anillo antes de la división que se mantiene hasta la separación de las células hijas (figura 19). Si se detiene el

crecimiento activo mediante la retirada de los nutrientes del medio de cultivo o por entrada en fase estacionaria, por ejemplo, el número de anillos de la población disminuye tal y como se muestra en las figuras 16, 17 y 18. De esta manera podemos determinar si una célula está en crecimiento activo, si esta célula presenta un anillo Z, o si no lo está cuando no lo contiene.

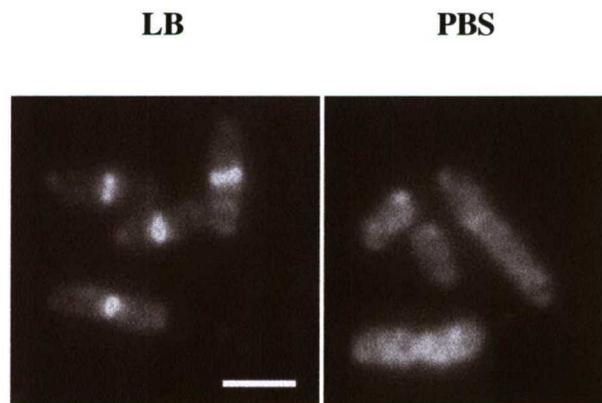


Figura 19. Muestras de células con y sin anillo. En el panel de la izquierda se muestran células en crecimiento activo con anillo de FtsZ, detectado con el anticuerpo monoclonal Mab4 mediante inmunofluorescencia. En el panel de la derecha se muestran las células con el crecimiento inhibido por carencia de nutrientes y sin anillo. La barra representa 2 μm .

DISCUSIÓN

Hemos estudiado si el crecimiento, señal de un metabolismo activo, influye en la formación del anillo de FtsZ. Se ha comprobado por experimentos en los que se provoca la muerte celular mediante el uso de un inhibidor de la enzima ATP sintasa, que el anillo Z una vez que está formado y no se produce un aporte de energía, se desensambla rápidamente. Este resultado indica que es necesario un metabolismo activo para el ensamblaje y mantenimiento de la estructura del anillo, así como para que éste sea funcional. Podemos suponer que la energía que requiere el anillo pudiera suministrarse a través del nucleótido GTP, si nos basamos en el hecho de que *in vitro*, FtsZ purificada no es capaz de ensamblar en filamentos en ausencia de GTP o GDP (Lu *et al.*, 1998), y que en mutantes de FtsZ en los que está afectada la actividad GTPasa los anillos se desensamblan a la temperatura restrictiva (Addinall *et al.*, 1997). En experimentos en los que se ha descrito previamente que hay una disminución en el nivel de GTP y GDP en el citoplasma celular (Cashel *et al.*, 1996), hemos comprobado que los anillos necesitan para permanecer, además de un metabolismo activo, un nivel adecuado de FtsZ. Se ha postulado que el aumento de ppGpp activa la expresión de *ftsZ* (Powell and Court, 1998), sin embargo esto no parece suficiente para mantener el número de anillos Z de la población. Se ha descrito en *B. subtilis* que es posible disminuir el nivel de GTP y GDP sin afectar los niveles de ppGpp en la célula (Grossman *et al.*, 1988; Huh *et al.*, 1996), en *E. coli* hemos comprobado que la concentración de FtsZ en la población bacteriana tratada de igual manera, sorprendentemente aumenta. Este exceso de proteína puede deberse a una activación de la expresión del gen *ftsZ* o a una estabilización de la proteína (desconocemos cuál de los dos sistemas está actuando), de manera que se favorezca la unión al GTP y la formación de polímeros para el ensamblaje del anillo (Mingorance *et al.*, 2001), o la unión de los monómeros de FtsZ que oligomerizan con GDP (Rivas *et al.*, 2000).

Hemos observado que el número de anillos Z de la población bacteriana sigue la misma cinética descendente que la concentración de la proteína FtsZ. Esta cinética es diferente en los distintos medios de cultivo ensayados, lo cual nos sugiere que la persistencia y la funcionalidad de los anillos Z en las células depende de las condiciones

de crecimiento. No se conoce si la disminución en el número de anillos Z se debe al desensamblaje de los ya formados y que no han sido utilizados en la división, o bien a que no haya suficientes moléculas de FtsZ para que puedan formarse. Se ha determinado que por debajo del 60 % de proteína con respecto al nivel existente en un cultivo en medio rico y en exponencial, se produce una parada en la división, lo que parece indicar que los anillos Z formados en tales condiciones no son totalmente funcionales. Este último dato está en concordancia con la concentración de FtsZ encontrada mediante otro abordaje experimental en la estirpe VIP 205. Tomados en conjunto estos resultados nos indican que los niveles de FtsZ controlan la división celular, lo que es coherente con lo descrito por Pla et al., 1991; Dai and Lutkenhaus, 1991 y Sun and Margolin, 1998.

En los diferentes medios mínimos de cultivo estudiados hemos comprobado que los niveles intracelulares de la proteína FtsZ disminuyen hasta alcanzar un nivel mínimo que permanece inalterable. La rapidez de la respuesta (2 minutos) en condiciones de ayuno de aminoácidos o de aminoácidos y glucosa, así como la rapidez en la recuperación de los niveles normales en medio rico (este también es el caso del cultivo tratado con decoína), nos lleva a proponer la existencia de mecanismos de regulación postranscripcionales que controlen el nivel de transcrito de *ftsZ*, teniendo en cuenta que la vida media del mensajero de *ftsZ* es de 1,5 minutos (Garrido *et al.*, 1993). Se conoce la existencia de dos dianas para RNasaE (una endonucleasa de *E. coli*); esta enzima podría actuar a nivel del procesamiento, estabilizando el mensajero (Cam *et al.*, 1996). Además se ha propuesto la existencia de un mecanismo de regulación antisentido (Dewar and Donachie, 1993; Bouché and Bouché, 1989), aunque no se ha podido comprobar el efecto que pueden causar sobre la concentración de FtsZ. En la fase estacionaria la concentración de FtsZ alcanza también el mismo nivel mínimo (60%) que en cultivos en medio mínimo, por lo que podemos suponer que los mecanismos postranscripcionales no sólo actuarían en condiciones de inducción de la respuesta a estrés, sino que también lo harían en otras circunstancias, como la fase estacionaria.

En el capítulo 1 se ha demostrado la relación entre la viabilidad celular y la concentración de proteína FtsZ, sorprendentemente por debajo del 50 % de proteína la viabilidad de la estirpe VIP205 es prácticamente cero. Una interpretación a este hecho pudiera ser que los sitios potenciales de división al no estar ocupados por la proteína FtsZ actuaran como captadores de algún componente de crecimiento, o bien que estos sitios de división sin FtsZ generaran regiones lábiles que a medida que las células crecieran pudieran hacerse más débiles y que terminaran por matar a la célula. Esta explicación contrasta con nuestras observaciones en la estirpe salvaje MC1061 en condiciones de estrés nutricional o entrada en fase estacionaria, en las que no hay crecimiento y la concentración de FtsZ también se encuentra entre el 50 y el 60 % con respecto a condiciones en las que el crecimiento no está inhibido. En estos casos las células al eliminar las condiciones de estrés recuperan el crecimiento y la cantidad de FtsZ, es decir que mantienen su viabilidad incluso a niveles bajos de FtsZ. Esto nos indica que en las células con el crecimiento inhibido o no se forman los sitios potenciales de división o bien quedan en estado de suspensión, por lo que estos sitios no puedan atrapar los hipotéticos elementos esenciales para la viabilidad ni dar lugar a regiones lábiles.

Proponemos un nuevo método, basado en nuestros resultados, para determinar si una población bacteriana presenta crecimiento activo o no, considerando que en el momento de toma de muestras, las células con un crecimiento activo son aquellas que tienen ensamblado un anillo Z. La principal ventaja del método radica en la fijación de las células en el momento de la toma de muestras, de manera que la información sobre el crecimiento de las mismas, se preserve. La determinación del anillo Z hace posible analizar muestras de diferentes organismos, tanto de cultivos realizados en laboratorio como de muestras obtenidas de ecosistemas naturales, a menudo difícilmente cultivables, puesto que *ftsZ* es un gen que se encuentra en la mayoría de los genomas conocidos (Margolin, 2000; Introducción general). Se han desarrollado otros métodos fluorescentes (Nebe-von-Caron *et al.*, 2000; Villarino *et al.*, 2000) que determinan este mismo parámetro y que están basados en la medida de la integridad de las membranas celulares, en la determinación de actividades enzimáticas, en las medidas de respiración

o del potencial de membrana. Sin embargo, estos métodos requieren de una incubación de la muestra en medios definidos para la incorporación de las sondas fluorescentes, con lo que se pierde la información acerca del estado de las células en la muestra original, de manera que el propio método de medición puede alterar la magnitud que se intenta medir, y además pueden no ser aplicables a microorganismos no cultivables.

DISCUSION GENERAL

DISCUSIÓN GENERAL

La división celular es una etapa crucial en el ciclo celular de *Escherichia coli*, que tiene lugar con diferente frecuencia dependiendo del medio en el que vive. Comienza con el ensamblaje de un elemento estructural en el sitio de división conocido como anillo Z, que actúa posiblemente como anclaje para las demás proteínas de división (ver introducción general). La formación del anillo es compleja y se ha comprobado en esta tesis que durante la replicación del cromosoma aparece en el lugar de la división una estructura denominada anillo abierto, posteriormente este anillo se convierte en un anillo cerrado que se mantiene hasta la separación de las células hijas, acontecimiento que tiene lugar después de la migración de los cromosomas, uno a cada polo de la célula. Esta tesis se ha centrado en el estudio de las propiedades de persistencia, constancia y dependencia del anillo Z para determinar cómo actúa la proteína FtsZ en el proceso de la división celular.

Niveles de FtsZ y persistencia del anillo Z

Se han relacionado los niveles de la proteína FtsZ con la capacidad de controlar el momento de la división (Ward and Lutkenhaus, 1985; Palacios *et al.*, 1996; Pla *et al.*, 1991). De los datos obtenidos en nuestro trabajo se deduce que los niveles de FtsZ son constantes durante el ciclo celular, lo que significa que el número de moléculas de esta proteína aumenta hasta alcanzar la cantidad suficiente que permita el ensamblaje del anillo de FtsZ, esta observación es coherente con los datos de Sun and Margolin, 1998, que demostraron que el ensamblaje del anillo depende de la concentración de FtsZ. En trabajos previos se ha publicado que el mRNA del gen *ftsZ* oscila durante el ciclo (Garrido *et al.*, 1993; Zhou and Helmstetter, 1994), este hecho es importante ya que en las estirpes donde se ha anulado la oscilación la división no se lleva a cabo correctamente (Palacios *et al.*, 1996). La oscilación del mensajero pudiera corresponderse con un aumento en una forma activa de FtsZ en división, aún desconocida, y si se tiene en cuenta que la proteína tiene actividad enzimática (de Boer *et al.*, 1992) y polimeriza *in vitro* de manera dependiente de la concentración y de GTP (Bramhill and Thompson, 1994) no sería extraño postular la existencia de tal forma. Por

otra parte esta oscilación sugiere que podrían existir mecanismos postranscripcionales que regularan el nivel de mRNA y por tanto el nivel de proteína FtsZ.

Se ha calculado en la población el nivel mínimo de proteína con el que los anillos Z son funcionales, siendo aproximadamente un 60 % con respecto al porcentaje de FtsZ en condiciones de crecimiento en medio rico, tanto en la estirpe VIP205 como en MC1061. La rapidez (2 minutos) con que este nivel se alcanza en medios mínimos o se recupera después del cambio a LB nos sugiere que deben existir mecanismos postranscripcionales que controlen efectivamente la concentración de FtsZ, puesto que la vida media de la proteína es mucho más larga. La relación entre la concentración de proteína FtsZ y la presencia de anillos en el interior celular, depende de la estirpe y de las condiciones de cultivo. Así lo demuestran los resultados obtenidos con la estirpe MC1061 cultivada en diferentes medios, y la estirpe VIP205 cultivada en medio rico a 37 y a 42°C, siendo la persistencia del anillo a concentraciones límites de proteína, diferente a cada temperatura. Tomados en conjunto estos resultados apuntan a que además de los niveles de FtsZ (número de moléculas de FtsZ) en la división celular también influyen otras condiciones de crecimiento.

Formación discontinua del anillo Z en el ciclo y constancia de la concentración de FtsZ

La regulación de la transcripción del gen *ftsZ* es muy compleja lo que quizás permitiría a la célula ajustar la expresión de *ftsZ* a las condiciones ambientales y fisiológicas (Flärdh *et al.*, 1998; de la Fuente *et al.*, 2000; ver introducción general). La vida media de la proteína FtsZ calculada en nuestro trabajo tanto a 37 como a 42 °C, es superior a un tiempo de generación, coincidiendo esta dato con lo publicado previamente (Pla *et al.*, 1993; M. Sánchez, 1993). Este resultado, junto al discutido anteriormente, indica que la proteína FtsZ está presente en la célula durante todo el ciclo celular. Por el contrario el ensamblaje del anillo Z tiene lugar en tres etapas diferentes asociadas al ciclo cuando se alcanza, posiblemente, el número de moléculas de FtsZ necesario para ello (este trabajo; den Blauwen *et al.*, 1999).

Relación entre los niveles de FtsZ y la viabilidad celular

Los primeros indicios de que la viabilidad celular está afectada por la concentración de FtsZ se obtuvieron con mutantes termonulos (Bi and Lutkenhaus, 1991; Dai *et al.*, 1994; Pla *et al.*, 1991), estos mutantes a la temperatura restrictiva daban lugar a filamentos que posteriormente lisaban. La estirpe VIP205 con un 50% de proteína es capaz de formar anillos, sin embargo pierde la viabilidad. Una posibilidad es que FtsZ, cuya única función atribuida es la participación en división, deje libres los sitios septales y éstos puedan actuar como captadores de elementos implicados en el crecimiento, o bien que estas regiones sin FtsZ queden debilitadas y sean susceptibles de lisis. Por el contrario la estirpe MC1061 en condiciones de estrés nutricional y de fase estacionaria, en la que la concentración de FtsZ nunca fue inferior al 50 %, mantiene la viabilidad. Este resultado nos permite proponer que en las células en las que el crecimiento está inhibido o no se forman los sitios potenciales de división o no son capaces de captar los elementos de crecimiento ni de dar lugar a regiones lábiles. Por otra parte, cuando la proteína FtsZ se inactiva en la estirpe mutante PAT84, los niveles de FtsZ84 no disminuyen tanto como en VIP205. En estas condiciones la viabilidad se conserva mejor, por lo que proponemos que FtsZ84, si bien no tiene actividad en la división, sí que conserva alguna función biológica que protegería a la célula frente a la pérdida de viabilidad.

Dependencia del anillo Z respecto al metabolismo energético

Cuando se elimina o se reduce el nivel de los nucleótidos ATP o GTP en la célula, el porcentaje de anillos en la población disminuye hasta llegar prácticamente a cero. Este resultado indica que para mantenerse en la célula, una vez que está formado, el anillo requiere energía. Está bien documentada la capacidad de FtsZ para formar filamentos *in vitro* en presencia de GTP o de GDP (Lu *et al.*, 1998) y se cree que el ensamblaje del anillo *in vivo* es consecuencia de esta polimerización. Estos filamentos de FtsZ contienen principalmente en su estructura GTP y el intercambio que se produce de este nucleótido en ellos es muy rápido (Mingorance *et al.*, 2001), lo que supone una demanda importante de GTP por parte del anillo que sólo podría llevarse a cabo cuando la célula estuviera en fase activa de crecimiento. Los datos obtenidos en condiciones de

estrés nutricional (estirpe MC1061) parecen apoyar esta hipótesis, en estas células cuando el crecimiento se ha detenido y se ha disminuido el nivel de GTP, se produce una bajada en el número total de anillos de la población. Además el ensamblaje del anillo sólo tiene lugar en células en crecimiento activo en un determinado momento del ciclo celular, lo que parece coherente con el hecho de que el número total de anillos Z disminuya en la población cuando la concentración de la proteína FtsZ lo hace.

Desarrollos futuros

A lo largo de este trabajo han surgido una serie de interrogantes que quedan por responder. Es el caso de la existencia en la célula de dos formas de FtsZ con actividad bioquímica diferente, ya que hemos comprobado que la expresión del gen *ftsZ* depende de ciclo celular, mientras que la concentración de la proteína FtsZ es constante.

Otro aspecto no aclarado es el efecto que pueda tener el estado metabólico celular sobre la expresión del gen *ftsZ*. Queda por determinar si existe algún promotor implicado o algún mecanismo postranscripcional específico que asegure una determinada concentración de FtsZ.

Por otra parte no se ha podido encontrar el mecanismo que pudiera explicar la pérdida de viabilidad, en ausencia de FtsZ, que parece asociada al crecimiento, pues sólo en células con un crecimiento activo la disminución de la concentración de FtsZ provoca una pérdida de viabilidad significativa.

MATERIALES Y METODOS

MATERIALES

1. Material Biológico

1.1. Estirpes bacterianas

Las estirpes de *E. coli* que se han utilizado en este trabajo se indican en la tabla 2.

Tabla 2. Estirpes bacterianas utilizadas en este trabajo

Estirpe	Genotipo	Referencia
B/rK	<i>Escherichia coli</i> B resistente a UV: F ⁻ malB	Helmstetter <i>et al.</i> , 1968
C600	<i>E. coli</i> K12: F ⁻ <i>thr1</i> , <i>leu6</i> , <i>thi1</i> , <i>supE44</i> , <i>lacY1(stable)</i> , <i>tonA21</i> , <i>lambda-</i> , <i>phi80r</i>	Bachmann <i>et al.</i> , 1972
MC1061	<i>E. coli</i> K12: F ⁻ <i>araD139</i> , $\Delta(\textit{ara-leu})7697$, $\Delta(\textit{lac})X74$, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>strA</i>	Busby <i>et al.</i> , 1982
PAT84	<i>E. coli</i> K12: F ⁻ <i>thr1</i> , <i>leu6</i> , <i>argH1</i> , <i>his</i> , <i>trp</i> , <i>dapA</i> , <i>lysA</i> , <i>thi</i> , <i>thy</i> , <i>lacY1</i> , <i>malA1</i> , <i>xyl7</i> , <i>mtl2</i> , <i>rpsL(str)</i> , <i>mel</i> , <i>tonA2</i> , <i>supE44</i> , <i>ftsZ84(ts)</i>	Lutkenhaus <i>et al.</i> , 1980
RP41	<i>E. coli</i> K12: <i>ftsI</i> (Ts), <i>thrA</i> , <i>proA</i> , <i>lysA</i> , <i>dra</i> , <i>drm</i>	García del Portillo and de Pedro, 1990
VIP205	<i>E. coli</i> K12: F ⁻ <i>araD139</i> , $\Delta(\textit{ara-leu})7697$, $\Delta(\textit{lac})X74$, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>strA</i> , Kan, <i>ptac::ftsZ</i>	Garrido <i>et al.</i> , 1993

1.2. Antisueros

En esta tesis se han utilizado los antisueros que se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Antisueros empleados en la detección de las proteínas FtsZ, FtsA, ZipA y EF-Tu.

Antisero	Características	Referencia o procedencia
MVJ9	Anti Cro-FtsZ, policlonal. Usado en la detección e inmunolocalización de FtsZ	Este laboratorio
Mab4	Anti FtsZ, monoclonal. Usado en la inmunolocalización de FtsZ	Voskuil <i>et al.</i> , 1994
MVJ4	Anti EF-TU. Usado en la detección de esta proteína	Este laboratorio
MVM1	Anti FtsA, policlonal. Usado en la detección de FtsA.	Este laboratorio Yim <i>et al.</i> , 2000
MVC1	Anti ZipA, policlonal. Usado en la detección de ZipA	Este laboratorio

2. Material químico y bioquímico

El material químico y bioquímico usado se detalla en la tabla 4, junto con su utilidad y proveedor. En todos los casos se siguieron las instrucciones del proveedor.

Tabla 4. Material químico y bioquímico utilizado en esta tesis.

Producto	Utilidad	Proveedor
Antibióticos (Kan, Amp)	Selección de marcadores	Roche
IPTG	Inducción de <i>Ptac</i>	Roche
Extracto de levadura, peptona, Nutrient Broth y agar	Medios de cultivo	Difco, Pronadisa
Acrilamida, N-N'-metilen-bisacrilamida	Electroforesis de proteínas	Bio Rad
TEMED, persulfato amónico	Electroforesis de proteínas	Bio Rad
Kit de quimioluminiscencia	Detección de proteínas por inmunotransferencia	Roche
Proteína-A peroxidasa	Inmunotransferencia	Bio Rad
Anti-IgG de conejo conjugado a Cy3	Inmunolocalizaciones	Amersham-Pharmacia
Anti-IgG de ratón conjugado a Cy3	Inmunolocalizaciones	Amersham-Pharmacia
Azida sódica	Inhibidor de ATP sintasa	Merck
Decoinina	Inhibidor de GMP sintasa	Quimigranel
Lisozima	Permeabilización de la membrana celular	Sigma
O-PEDA (ortofenilendiamina)	Retardo en la pérdida de fluorescencia	Sigma
Poli- L- Lisina	Tratamiento de porta-objetos	Sigma
Resto de productos químicos	Generales	Merck, Sigma

METODOS

1. Técnicas Microbiológicas

1.1. Mantenimiento y crecimiento de estirpes bacterianas

Las estirpes bacterianas se mantuvieron a 4 °C en placa, o a -80 °C en congelador, según el método descrito por Silhavy *et al.*, 1984. Para el crecimiento de la estirpe VIP205 se utilizó medio rico, Luria Broth (Lennox 1955). La estirpe se cultivó durante toda la noche a 37 °C con Kan a 50 µg/ml y 30 µM de IPTG, a esta concentración de inductor el tamaño celular de la estirpe VIP205 es similar al de la estirpe parental MC1061. El cultivo se mantuvo en fase exponencial de crecimiento con medio precalentado mediante sucesivas diluciones, al menos tres veces por cada experimento, por lo que la densidad óptica fluctuó entre 0,1 y 0,3. A tiempo cero se filtró el cultivo para eliminar el IPTG y se dividió el cultivo en dos fracciones cada una con una concentración diferente de IPTG: 30 µM y 0 µM. Los cultivos se mantuvieron en fase exponencial y se obtuvieron muestras para análisis de proteínas y para estudios mediante microscopía de fluorescencia. Siguiendo el mismo procedimiento, se cultivó la estirpe VIP205 a 42°C con una concentración de IPTG de 12 µM, con esta concentración el tamaño celular del VIP205 es similar al de estirpe parental MC1061, y a 0 µM.

Las estirpes PAT84 y su parental C600 se cultivaron en NB durante toda la noche a 30 °C (condiciones permisivas). Se diluyeron posteriormente y se mantuvieron en fase exponencial. A tiempo cero se pasaron los cultivos a 42 °C (condiciones restrictivas) y se obtuvieron muestras durante de 45 minutos para medir la concentración de proteínas.

La estirpe B/rK se cultivó a 37°C durante toda la noche en LB, se diluyó posteriormente en medio mínimo M9 (Sambrook *et al.*, 1989) suplementado con glucosa al 0.2% y se mantuvo en fase exponencial de crecimiento durante al menos 10 generaciones momento en el cual se procedió a sincronizar el cultivo.

La estirpe MC1061 se cultivó a 37 °C y después de mantener el cultivo en fase exponencial durante no menos de 5 generaciones, se le añadió en dos experimentos por separado azida sódica o decoinina, para comprobar el efecto producido sobre la proteína FtsZ. La azida sódica es un inhibidor irreversible de la enzima ATP sintasa y la decoinina es un inhibidor específico y reversible de la GMP sintasa y bloquea la conversión de XMP a GMP, lo cual provoca una caída en los niveles de GTP celular. En el caso del cultivo tratado con decoinina, posteriormente se filtró el cultivo para eliminar el inhibidor y se continuó el experimento con LB. Se obtuvieron muestras durante el experimento para análisis de proteínas por inmunodetección e inmunolocalización.

En los experimentos de cambio de medio de crecimiento se cultivó la estirpe MC1061 a 37 °C, a tiempo cero se filtró el cultivo y las células se inocularon en PBS (tampón fosfato salino), o en medio mínimo M9 (Sambrook *et al.*, 1989) con glucosa al 0,2 %. Después de un tiempo en este medio el cultivo se filtró de nuevo y se cultivó en LB. Se tomaron muestras durante todo el experimento para análisis de proteínas por inmunodetección e inmunolocalización.

El crecimiento en masa de los cultivos se siguió mediante el registro de la variación de la densidad óptica a 600 nm para el medio LB o a 450 nm para el medio mínimo, en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1203. El número de partículas y las distribuciones del volumen celular de la población se midieron en muestras de cultivos fijadas con formaldehído al 0.75 % en un aparato Coulter Counter ZM, con orificio de 30 µm y un Channelyzer C1000 (Coulter Electronics).

1.2. Sincronización de un cultivo B/rK por el método de elución de células recién nacidas

Un cultivo sincrónico ideal está formado por células que se encuentran en el mismo estadio de su ciclo celular, es decir que tienen la misma edad. Existen dos técnicas para lograr que a partir de un cultivo en fase exponencial se obtenga un cultivo sincrónico, una de ellas es la elución, a partir de células adheridas a una membrana de ésteres de celulosa de células recién nacidas, utilizándose un sistema especial (Helmstetter, 1969). La otra es la sincronización de cultivos por selección de células de pequeño tamaño en gradiente de sacarosa (Mitchison and Vincent, 1965). Se ha

comprobado que en un porcentaje que oscila alrededor del 20%, las células al dividirse originan dos células hijas de longitudes diferentes. Es preferible obtener los cultivos sincrónicos por selección de células recién nacidas, porque las células tienen todas la misma edad aunque sus longitudes puedan variar ligeramente. En los cultivos sincrónicos obtenidos por centrifugación en gradientes de sacarosa las células son de longitud homogénea pero de edad variable, además se ha comprobado que la sacarosa modifica la densidad de flotación celular (Martínez-Salas *et al.*, 1981). También existe la sincronización por inducción, se habla en ese caso de cultivo sincronizado, pudiéndose provocar por ayuno de timina o parada de la replicación al cultivar a 42 °C una estirpe con replicación termosensible. Con este método no se logra la sincronización del crecimiento, sólo de la replicación, por lo que puede dar lugar a artefactos no deseables.

La estirpe B/rK se sincronizó por el método de elución de células recién nacidas. La estirpe se cultivó a 37 °C durante toda la noche en LB (Lennox 1955), se diluyó posteriormente en medio mínimo M9 (Sambrook *et al.*, 1989) suplementado con glucosa al 0.2 %, y se mantuvo en fase exponencial de crecimiento durante al menos 10 generaciones. Se trabajó en una cámara de 37 °C para mantener la temperatura constante. Se filtraron 100 ml de cultivo a una DO (450 nm) de 0.3 a través de un filtro GS de Millipore de 0.22 µm y 14 cm de diámetro, acoplado al dispositivo que se esquematiza en la figura 20, a velocidad alta de flujo (14 ml/min). Una vez filtrado el cultivo, y eliminadas las células que no se han pegado a la membrana mediante lavado con medio de cultivo durante 15-20 minutos, a un flujo de 14 ml/min, y habiéndose comprobado que el número de partículas permanece más o menos constante, se eluyeron las células recién nacidas, con un flujo de 7 ml/min. Se recogieron en un matraz las células eluidas durante periodos de 90 segundos a lo largo de 65 minutos y con un intervalo de 5 minutos. La primera alícuota obtenida se incubó a 37 °C durante 65 minutos, la alícuota siguiente se incubó 60 minutos, y así sucesivamente, de tal manera que la última alícuota obtenida no sufre ninguna incubación. De cada muestra se tomaron antes y después de la incubación 400 µl que se fijaron con formaldehído para medir el número de partículas y la distribución del tamaño celular. El resto se procesó para *western blot* o para inmunofluorescencia según lo explicado respectivamente en los apartados 2.1 y 2.5.

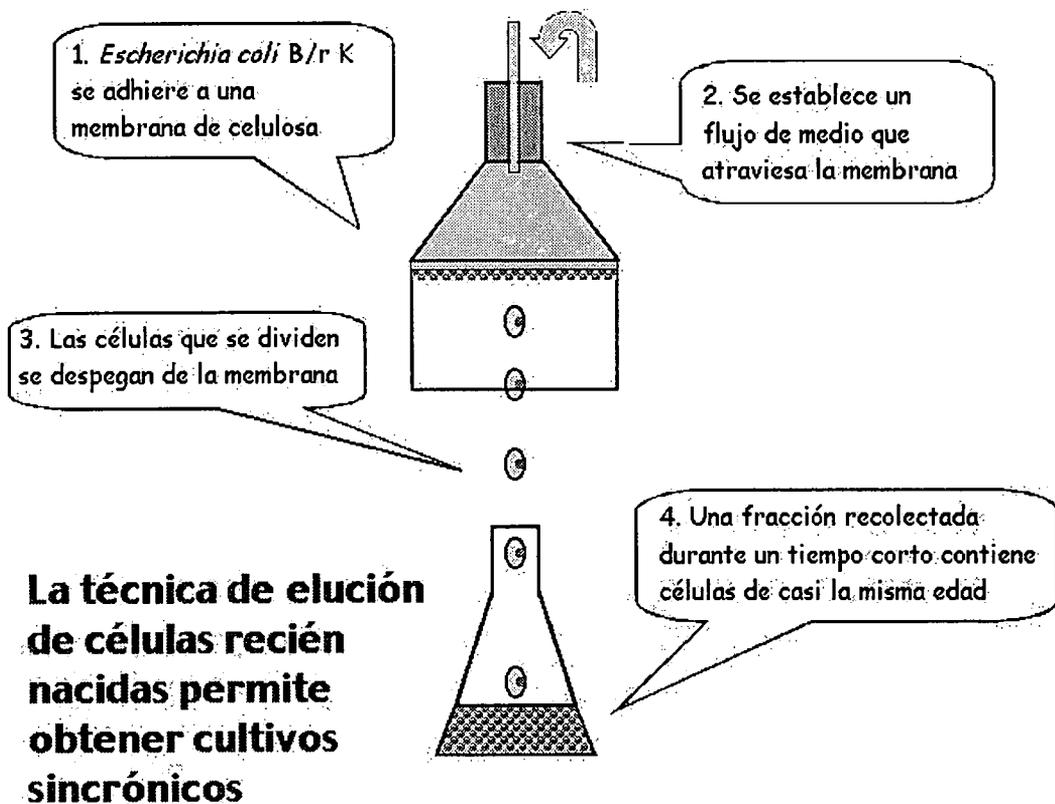


Figura 20. Esquema del sistema de elución de células recién nacidas. Un cultivo de B/rK se cultivó como se describe en el texto y se filtró a través de una membrana de celulosa, en la que quedan adheridas las células. Después de lavar con el mismo medio de cultivo para eliminar aquellas células mal adheridas, se recogieron las células recién nacidas eluidas, con las que comenzar el experimento.

1.3. Medida de la viabilidad celular

La estirpe VIP205 se cultivó en LB como se describe en el apartado 1.1 de Materiales tanto a 37 como a 42 °C. A tiempo cero el cultivo se filtró para eliminar el IPTG y posteriormente se recolectaron muestras que se plaquearon en el mismo medio de cultivo al que se le había añadido 30 μM (37 °C) o 12 μM (42 °C) de IPTG, concentración a la que el tamaño celular del VIP205 es similar al del parenteral, MC1061. Pasadas 24 horas se contabilizaron las ufc (unidad formadora de colonia) relativizadas con respecto al número de partículas. En el caso de la cuantificación de viables de la estirpe PAT84, se recolectaron muestras de un cultivo a 42 °C, que se plaquearon en NBT y se mantuvieron a 30 °C (temperatura permisiva) donde se contabilizaron las ufc.

2. Análisis de proteínas

2.1. Separación de proteínas

2.1.1. Obtención de extractos proteicos totales de *E. coli*

Para la preparación de extractos totales de proteínas de las estirpes VIP205, PAT84 y C600, se les añadió a las muestras, en el momento en que se tomaron, ácido tricloroacético a una concentración final de 0,5%. Las muestras se centrifugaron, se lavaron con acetona fría al 80% y se resuspendieron en tampón de lisis 1x (Laemmli *et al.* 1973), calentándose después a 95°C durante 5 minutos. En el caso de las estirpes B/rK y MC1061 las muestras se centrifugaron en el momento de su recogida, se resuspendieron en tampón de lisis 1x y se calentaron a 95°C.

2.1.2. Electroforesis de proteínas

Las proteínas se separaron en geles de SDS-poliacrilamida SDS-PAGE (Laemmli *et al.*, 1973) al 10%.

2.1.3. Transferencia de proteínas a membrana

Las proteínas separadas por SDS-PAGE se transfirieron a membranas de PVC (*Immobilón* de Millipore) según describen Towbin *et al.*, 1979 en cubetas de transferencia en semiseco de Millipore (*Milliblot™-Graphite Electoblotter I*).

2.2. Detección inmunológica de proteínas transferidas a membrana

Las membranas con las proteínas transferidas se bloquearon con solución de incubación (25mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 5mM NP40 y 0,05% EDTA) y leche desnatada en polvo. Posteriormente las membranas se incubaron con una dilución (1000 - 250 veces) del anticuerpo primario anti FtsZ, MVJ9, limpio. La incubación se prolongó desde 2 horas hasta O/N dependiendo de la cantidad de proteína transferida. Se añadió después de 3 lavados de 10 minutos con tampón de incubación, el anticuerpo secundario, Proteína A peroxidasa (BioRad), diluída 5000 veces y se incubó durante 1 hora. Posteriormente se realizaron 4 lavados de 15 minutos con tampón de incubación y se reveló la membrana con las soluciones de revelado del *Kit* de quimioluminiscencia de

Roche. Cuando los experimentos lo requirieron se usaron los anticuerpos frente a FtsA (MVM1), ET-Tu (MVJ4) y ZipA (MVC1).

2.3. Limpieza de sueros policlonales

Los anticuerpos policlonales contenidos en sueros se purificaron por afinidad en membrana, técnica descrita por Talian *et al.*, 1983. Para el caso de los anticuerpos MVJ9 y MVM1 se usó proteína FtsZ y FtsA purificadas. Se realizó una electroforesis con la proteína purificada, cortándose la membrana con la proteína una vez que se ha visualizado ésta con Rojo Ponceau. La membrana se bloqueó como se describe en el apartado 2.4 y se incubó con el antisuero correspondiente durante 2 horas. Los anticuerpos adheridos a la membrana se despegaron con una solución de 0,2M glicina y 1mM EGTA a pH 2,7. La disolución se neutralizó con un volumen igual de una disolución de 100mM Tris (base). Los anticuerpos así obtenidos se conservaron a -20°C .

2.4. Cuantificación de proteínas

Las bandas obtenidas al revelar las membranas por quimioluminiscencia se cuantificaron, después de ser escaneadas, utilizando el programa NIHImage 2.0. El error experimental de la técnica de cuantificación por western blots se ha calculado mediante la cuantificación de una misma muestra cargada en un mismo y en diferentes geles de acrilamida, y este ha sido del 11,7 %. La medida del nivel de las proteínas en la población se calculó relativizando los valores obtenidos con el anticuerpo anti FtsZ o anti FtsA o anti ZipA, con los valores obtenidos con el anticuerpo anti factor de elongación Tu. El factor de elongación Tu es proporcional a la masa en células que crecen en fase exponencial, ya que la síntesis del factor de elongación Tu está coordinada con la de los ribosomas (Furano 1975). El contenido celular de ribosomas y del factor de elongación Tu es una función del tiempo de generación, incrementándose según lo hace la velocidad de crecimiento. Por ello, esta medida es adecuada para el cálculo de la concentración de FtsZ en los experimentos en los que el medio de cultivo no varía y la temperatura permanece constante. Al cambiar un medio mínimo por un medio que lleva aminoácidos, la síntesis de proteínas por ribosoma aumenta inmediatamente, antes de que la concentración de EF-Tu lo haya hecho (Brunschede *et al.*, 1977). Se ha comprobado que el factor de elongación Tu está bajo el control de la

respuesta estricta (Furano and Wittel, 1975). Por todo ello, en los experimentos de cambio de medio no se pudieron relativizar los valores de proteína con respecto a los valores obtenidos para EF-Tu, ya que el número de moléculas de EF-Tu varía de un medio a otro.

2.5. Inmunolocalización de proteínas por microscopía de fluorescencia

La inmunolocalización se realiza esencialmente según el protocolo descrito por Addinall *et al.*, 1996. La concentración de lisozima usada varía en un rango de 4-7 $\mu\text{g/ml}$, dependiendo de la antigüedad de las muestras, y el tiempo de permeabilización es de 1 minuto. Las muestras se bloquean con BSA (albúmina bovina), y se incuban durante toda la noche a 4 °C con 30 μl de una dilución 1:150 o 1:200 del anticuerpo correspondiente. Después de 10 lavados con PBS se añade el anticuerpo secundario, un anti-IgG de conejo o de ratón, dependiendo de si el anticuerpo es poli o monoclonal, conjugado al fluoróforo Cy3, a una dilución 1:100 y se incuba en oscuridad durante 2 horas. Como retardador de la pérdida de fluorescencia se usó O-PEDA disuelto en PBS a una concentración de 10 mg/ml .

Las células se observaron por microscopía de fluorescencia usando un microscopio Carl Zeiss HBO 50 con objetivo de inmersión 100x. Se utiliza un filtro HQ: Cy3 (λ de excitación 545/30nm, λ de emisión 610/75nm y paso de banda 565LP). Las imágenes se capturan con un cámara CCD Sensys de Photometrics y se procesan usando los programas IPLab Spectrum y Adobe Photoshop 5.5.

REFERENCIAS

- Adam, M., C. Fraipont, N. Rhazi, M. Nguyen-Disteche, B. Lakaye, J.M. Frere, B. Devreese, J. Van Beeumen, Y. van Heijenoort, and J.M. Ghuysen. 1997. The bidomular G57-V577 polypeptide chain of the class B penicillin binding protein 3 of *Escherichia coli* catalyzes peptide bond formation from thioesters and does not catalyze glycan chain polymerization from the lipid II intermediate. *J. Bacteriol.* **179**:6005-6009.
- Addinall, S.G., and J. Lutkenhaus. 1996a. FtsZ-spirals and arc determine the shape of the invaginating septa in some mutants of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **22**:231-237.
- Addinall, S.G., and J. Lutkenhaus. 1996b. FtsA is localized to the septum in an FtsZ-dependent manner. *J. Bacteriol.* **178**:7167-7172.
- Addinall, S.G., E. Bi, and J. Lutkenhaus. 1996. FtsZ ring formation in *fts* mutants. *J. Bacteriol.* **178**:3877-3884.
- Addinall, S.G., C. Cao, and J. Lutkenhaus. 1997a. FtsN, a late recruit to the septum in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **25**:303-309.
- Addinall, S.G., C. Cao, and J. Lutkenhaus. 1997b. Temperature shift experiments with an *ftsZ84(Ts)* strain reveal rapid dynamics of FtsZ localization and indicate that the Z ring is required throughout septation and cannot reoccupy division sites once constriction has initiated. *J. Bacteriol.* **179**:4277-4284.
- Aldea, M., T. Garrido, J. Pla, and M. Vicente. 1990. Division genes in *Escherichia coli* are expressed coordinately to cell septum requirements by gearbox promoters. *EMBO J.* **9**:3787-3794.
- Ayala, J.A., T. Garrido, M.A. de Pedro, and M. Vicente. 1994. Molecular biology of bacterial septation. In *Bacterial Cell Wall*. Ghuysen, J.M., and R. Hakenbeck (Eds.) Amsterdam: Elsevier Science B.V., pp 73-101.
- Bachmann, B.J. 1972. Pedigrees of some mutant strains of *Escherichia coli* K-12. *Bacteriol. Rev.* **36**:525-557.
- Ballesteros, M., S. Kusano, A. Isihama, and M. Vicente. 1998. The *ftsQ1p* gearbox promoter of *Escherichia coli* is a major sigma S-dependent promoter in the *ddlB-ftsA* region. *Mol. Microbiol.* **30**:419-430.
- Beech, P.L., and P.R. Gilson. 2000. FtsZ organelle division in Protists. *Protist.* **151**:11-16.
- Beech P.L., T. Nheu, T. Schultz, S. Herbert, T. Lithgow, P. Gilson, and G. McFadden. 2000. Mitochondrial FtsZ in a chromophyte alga. *Science* **287**:1276-1279.
- Bechtloff, D., B. Grünenfelder, T. Akerlund, and K. Nordström. 1999. Analysis of protein synthesis rates after initiation of chromosome replication in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **181**:6292-6299.

- Bi, E., and J. Lutkenhaus. 1990. Interaction between the *min* locus and *ftsZ*. J. Bacteriol. **172**:5610-5616.
- Bi, E., and J. Lutkenhaus. 1991. FtsZ ring structure associated with division in *Escherichia coli*. Nature **354**:161-164.
- Bi, E., and J. Lutkenhaus. 1993. Cell division inhibitors SulaA and minCD prevent formation of the FtsZ ring. J. Bacteriol. **175**:1118-1125.
- den Blaauwen, T., N. Buddelmeijer, M. Aarsman, C. Hameete, and N. Nanninga. Timing of FtsZ assembly in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **181**:5167-5175.
- de Boer, P., R. Crossley, and L. Rothfield. 1992. The essential bacterial cell-division protein FtsZ is a GTPase. Nature **359**:254-56.
- Bork, A., C. Sander, and A. Valencia. 1992. An ATPase domain common to prokaryotic cell cycle proteins, sugar kinases, actin and hsp70 heat shock proteins. Proc. Natl. Acad. Sci USA **89**:7290-7294.
- Bramhill, D., and C.M. Thompson. 1994. GTP-dependent polymerization of *Escherichia coli* FtsZ protein to form tubules. Proc. Natl. Acad. Sci USA **91**:5813-5817.
- Bouché, F., and J.P. Bouché. 1989. Genetic evidence that DicF, a second division inhibitor encoded by the *Escherichia coli* *dicB* operon, is probably RNA. Mol. Microbiol. **3**:991-994.
- Brunschede, H., T.L. Dove, and H. Bremer. 1977. Establishment of exponential growth after a nutritional shift-up in *E. coli* B/r: accumulation of deoxyribonucleic acid, ribonucleic acid and protein. J. Bacteriol. **129**:1020-1033.
- Buddelmeijer, N., M. Aarsman, A. Kolk, M. Vicente, and N. Nanninga. 1998. Localization of cell division protein FtsQ by immunofluorescent microscopy in dividing and nondividing cells of *E. coli*. J. Bacteriol. **180**:6107-6116.
- Busby, S., H. Aiba, and B. de Crombrughe. 1982. Mutations in the *Escherichia coli* operon that define two promoters and the binding site of the cyclic AMP receptor protein. J. Mol. Biol. **154**:211-227.
- Cam, K., G. Rome, H.M. Krisch, and J.P. Bouché. 1996. RNase E processing of essential cell division genes mRNA in *Escherichia coli*. Nucleic Acids Res. **24**: 3065-3070.
- Cashel, M. 1969. The control of ribonucleic acid synthesis in *E. coli* IV. Relevance of unusual phosphorylated compounds from amino acid starved stringent strains. J. Biol. Chem. **244**:3133-3141.

- Cashel, M., D.R. Gentry, J. Hernandez, and D. Vinella. 1996. The stringent response, p. 1458-1496. In F.C. Neidhardt, J.L. Ingraham, K.B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter and H.E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. ASM Press, Washington, D.C.
- Chen, J. C., and J. Beckwith. 2001. FtsQ, FtsL and FtsI requires FtsK, but not FtsN, for co-localization with FtsZ during *Escherichia coli* cell division. *Mol. Microbiol.* **42**:395-413.
- Dai, K., and J. Lutkenhaus. 1991. FtsZ is an essential cell division gene in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **173**:3500-3506.
- Dai, K., and J. Lutkenhaus. 1992. The proper ratio of FtsZ to FtsA is required for cell division to occur in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **174**:6145-6151.
- Desai, A., and T.J. Mitchison. 1998. Tubulin and FtsZ structures: functional and therapeutic implications. *Bioessays* **20**:523-527.
- Dewar, S.J., and W.D. Donachie. 1993. Antisense transcription of the *ftsZ-ftsA* gene junction inhibits cell division in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **175**:7097-7101.
- Dewar, S.J., K.J. Begg, and W.D. Donachie. 1992. Inhibition on cell division initiation by an imbalance in the ratio of FtsA to FtsZ. *J. Bacteriol.* **174**:6314-6316.
- Díaz, J.F., A. Kralicek, J. Mingorance, J.M. Palacios, M. Vicente, and J.M. Andreu. 2001. Activation of Cell Division Protein FtsZ. Control of switch loop T3 conformation by the nucleotide γ -phosphate. *J. Biol. Chem.* **276**:17307-17315.
- Din, N., E.M. Quardokus, M.J. Sackett, and Y.V. Brun. 1998. Dominant C terminal deletions of FtsZ that affect its ability to localize in *Caulobacter* and its interactions with FtsA. *Mol. Microbiol.* **27**:1051-1063.
- Donachie, W.D. 2001. Co-ordinate regulation of the *Escherichia coli* cell cycle or the cloud of unknowing. *Mol. Microbiol.* **40**:779-785.
- Donachie, W.D., and K. Begg. 1990. Genes and the replication cycle of *Escherichia coli*. *Res. Microbiol.* **141**:64-75.
- Donachie, W.D., and A.C. Robinson, 1987, in F.C. Neidhardt, J.L. Ingraham, K. Brooks Low, B. Magasanik, M. Schaechter and H.E. Umbarger (Eds.), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and Molecular Biology, Vol. 2, American Society for Microbiology, Washington DC, pp.1578-1593.
- Donch, J., and J. Greenberg. 1968. Ultraviolet sensitivity gene of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **95**:1555-1559.

- Draper, G.C., N. McLennan, K. Begg, M. Masters, and W.D. Donackie. 1998. Only the N terminal domain of FtsK functions in cell division. *J. Bacteriol.* **180**:4621-4627.
- Erickson, H.P., D.W. Taylor, K.A. Taylor, and D. Bramhill. 1996. Bacterial cell division protein FtsZ assembles into protofilament sheets and minirings, structural homologs of tubulin polymers. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* **93**:519-523.
- Feucht, A., I. Lucet, M.D. Yudkin, and J. Errington. 2001. Cytological and biochemical characterization of the FtsA cell division protein of *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **40**:115-125.
- Fiil, N., K. von Meyenberg, and J. Friesen. 1972. Accumulation and turnover of guanosine tetraphosphate in *E. coli*. *J. Mol. Biol.* **71**:769-783.
- Flårdh K., P. Palacios, and M. Vicente. 1998. Cell division genes *ftsQAZ* in *Escherichia coli* require distant cis-acting signals upstream of *ddlB* for full expression. *Mol. Microbiol.* **30**:305-315.
- Fouet, A., and A.L. Sonenshein. 1989. A target for carbon source-dependent negative regulation of the *citB* promoter of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **172**:835-844.
- Fraunholz, M.J., E. Moerschel, and U.G. Maier. 1998. The chloroplast division protein FtsZ is encoded by a nucleomorph gene in cryptomonads. *Mol. Gen. Genet.* **260**:207-211.
- Fu, X., Y.L. Shih, Y. Zhang, and L. Rothfield. 2001. The MinE ring required for proper placement of the division site is a mobile structure that changes its cellular location during the *Escherichia coli* division cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**:980-985.
- de la Fuente, A., P. Palacios, and M. Vicente. 2001. Transcription of the *Escherichia coli dcw* cluster: evidence for distal upstream of *ddlB* for full expression. *Mol Microbiol.* **30**: 305-315.
- Furano, A. 1975. Content of elongation factor TU in *E. coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **72**:4780-4784.
- Furano, A., and F. Wittel. 1976. Synthesis of elongation factors Tu and G are under stringent control in *E. coli*. *J. Biol. Chem.* **251**:898-901.
- Gallant, J., G. Margason and B. Finch. 1972. On the turnover of ppGpp in *E. coli*. *J. Mol. Biol.* **247**:6055-6058.
- García del Portillo, F., and M.A. de Pedro. 1990. Differential effect of mutational impairment of penicillin-binding proteins 1A and 1B on *Escherichia coli* strains harboring thermosensitive mutations in the cell division genes *ftsA*, *ftsQ*, *ftsZ* and *pbpB*. *J. Bacteriol.* **172**:5863-5870.

- Garrido, T., M. Sánchez, P. Palacios, M. Aldea, and M. Vicente. 1993. Transcription of *ftsZ* oscillates during the cell cycle of *Escherichia coli*. *EMBO J.* **12**:3957-3965.
- Gervais, F.G., P. Phoenix, and G.R. Drapeau. 1992. The *rscB* gene, a positive regulator of colanic acid biosynthesis in *Escherichia coli*, is also an activator of *ftsZ* expression. *J. Bacteriol.* **174**: 3964-3971.
- Ghigo, J.M., D.S. Weiss, J.C. Chen, J.C. Yarrow, and J. Beckwith. 1999. Localization of FtsL to the *Escherichia coli* septal ring. *Mol. Microbiol.* **31**:725-737.
- Gomes, S.L., J.W. Gober, and L. Shapiro. 1990. Expression of the *Caulobacter crescentus* heat shock gene *dnaK* is developmentally controlled during grow at normal temperatures. *J. Bacteriol.* **172**:3051-3059.
- Grossman, A.D., and R. Losick. 1988. Extracelular control of spore formation in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**:4369-4373.
- Grover, N.B., and C. Helmstetter. 1995. Characterization of cell-cycle-specific events in synchronous cultures of *Escherichia coli*: a theoretical evaluation. *Microbiol.* **141**:59-62.
- Gullbrand, B., and K. Nordstöm. 2000. FtsZ ring formation without subsequent cell division after replication runout in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **36**:1379-1359.
- Hale, C.A., and P. de Boer. 1997. Direct binding of FtsZ to ZipA, an essential component of the septal ring structure that mediates cell division in *E. coli*. *Cell* **88**:175-185.
- Hale C.A., and P. de Boer. 1999. Recruitment of ZipA to the septal ring of *Escherichia coli* is dependent on FtsZ and independent of FtsA. *J. Bacteriol.* **181**:167-176.
- Hale C.A., H. Meinhardt, and P. de Boer. 2001. Dynamic localization cycle of the cell division regulator MinE in *Escherichia coli*. *EMBO J.* **20**:1563:1572.
- Hale C.A., A. Rhee, and P. de Boer. 2000. ZipA-induced bundling of FtsZ polymers mediated by an interaction between C-terminal domains. *J. Bacteriol.* **182**:5153-5166.
- Haney, S., E. Glasfeld, C. Hale, D. Keeney, Z., and P. de Boer. 2001. Genetic analysis of the *Escherichia coli* FtsZ-ZipA interaction in the Yeast Two-hybrid system. *J. Biol. Chem.* **276**:11980-11987.
- Helmstetter, C. 1969. Methods for studing the microbial division cycle. *Methods Microbiol.* **1**:327-363.
- Helmstetter, C., and Cooper, 1968. DNA synthesis during the division cycle of rapidly growing *Escherichia coli* B/r. *J. Mol. Biol.* **31**:507-518.

- Höltje, J.V. 1998. Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**:181-203.
- Holtzendorff, J., F. Partensky, S. Jacquet, F. Bruyant, D. Marie, L. Garzarek, I. Mary, D. Vaultot, and W.R. Hess. 2001. Diel expression of cell cycle-related genes in synchronized cultures of *Prochlorococcus sp.* strain PCC9511. *J. Bacteriol.* **183**:915-920.
- Hu, Z., and J. Lutkenhaus. 1999. Topological regulation of cell division in *E. coli* involves rapid pole to pole oscillation of the division inhibitor MinC under the control of MinD and MinE. *Mol. Microbiol.* **34**:82-90.
- Hu, Z., A. Mukherjee, S. Pichoff, and J. Lutkenhaus. 1999. The MinC component of the division site selection system in *E. coli* interacts with FtsZ to prevent polymerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**:14819-14824.
- Huang, J., C. Chune, and J. Lutkenhaus. 1996. Interaction between FtsZ and inhibitors of cell division. *J. Bacteriol.* **178**:5080-5085.
- Huh, J.W., J. Shima, and K. Ochi. 1996. ADP-Ribosylation of protein in *Bacillus subtilis* and its possible importance in sporulation. *J. Bacteriol.* **178**:4935-4941.
- Hutcheon, M.L., T.M. Duncna, H. Ngai, and R.L. Cross. 2001. Energy-driven subunit rotation at the interface between subunit a and the c oligomer in the F₀ sector of *Escherichia coli* ATP synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**:8519-24.
- Huisman, O., R. D'Ari, and S. Gottesman. 1984. Cell division control in *Escherichia coli*: specific induction of the SOS function SfiA protein is sufficient to block septation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **81**:4490-4494.
- Hupp, T.R., J.D. Keasling, S. Cooper, and J.M. Kaguni. 1994. Synthesis of DnaK protein during the division cycle of *Escherichia coli*. *Res. Microbiol.* **145**:99-109.
- Jones, L.F.J., R. Carbadillo-López, and J. Errington. 2001. Control of the cell shape in bacteria: helical, actin-like filaments in *Bacillus subtilis*. *Cell* **104**:913-922.
- Joseleau-Petit, D., D. Vinella, and R. D'Ari. 1999. Metabolic alarms and cell division in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **181**:9-14.
- Justice, S.S., J. García-Lara, L. Rothfield. 2000. Cell division inhibitors Sula and MinC/MinD block septum formation at different steps in the assembly of the *Escherichia coli* division machinery. *Mol. Microbiol.* **37**:410-423.
- Khattar, M., S.G. Addinall K.H. Stedul, D.S. Boyle, J. Lutkenhaus, and W.D. Donachie. 1997. Two polypeptide products of the *Escherichia coli* cell division gene *ftsW* and a possible role for FtsW in FtsZ function. *J. Bacteriol.* **179**:784-793.

- Labrousse A.M., M.D. Zappaterra, D.A. Rube, and A.M. van der Blik. 1999. *C. elegans* dynamin-related protein DRP-1 controls severing of the mitochondrial outer membrane. *Mol Cell*. **4**:815-826.
- Laemmli, U.K., and M. Favre. 1973. Maturation of the head of bacteriophage T4. DNA packaging events. *J. Mol. Biol.* **80**:575-599.
- Lennox, E.S. 1955. Transduction of linked genetic characters of the host by bacteriophage P1. *Virology*. **1**:190-206.
- Levin, P.A., and R. Losick. 1996. Transcription factor SpoA switches the localization of the cell division protein FtsZ from a medial to a bipolar pattern in *Bacillus subtilis*. *Gen. Dev.* **10**:478-488.
- Liu, G., K. Begg, and W.D. Donachie. 2001. Transcription of essential cell division genes is linked to chromosome replication in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **40**:909-916.
- Liu, G., G.C., Draper and W.D. Donachie. 1998. FtsK is a bifunctional protein involved in cell division and chromosome localization in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **29**:893-903.
- Löwe, J., and L.A. Amos. 1998. Crystal structure of the bacterial cell-division protein FtsZ. *Nature* **391**: 203-206.
- Löwe, J., and L.A. Amos. 1999. Tubulin-like protofilament in Ca²⁺-induced FtsZ sheet. *EMBO J.* **18**:2364-2371.
- Löwe, J., and L.A. Amos. 2000. Helical tubes of FtsZ from *Methanococcus jannaschii*. *Biol. Chem.* **381**:993-999.
- Lu, C., M. Reedy, and H.P. Erickson. 1998. FtsZ from *Escherichia coli*, *Azotobacter vinelandii* and *Thermotoga maritima* quantification, GTP hydrolysis and assembly. *Cell Motil Cytoskeleton* **40**:71-86.
- Lu, C., M. Reedy, and H.P. Erickson. 2000. Straight and curved conformations of FtsZ are regulated by GTP hydrolysis. *J. Bacteriol.* **182**:164-170.
- Lutkenhaus, J. 1993. FtsZ ring in bacterial cytokinesis. *Mol. Microbiol.* **9**:403-409.
- Lutkenhaus, J., and S.G. Addinall. 1997. Bacterial cell division and the Z ring. *Annu. Rev. Biochem.* **66**:93-116.
- Lutkenhaus, J., H. Wolf-Watz, and W.D. Donachie. 1980. Organization of genes in the *ftsA-envA* region of the *Escherichia coli* genetic map and identification of a new *fts* locus (*ftsZ*). *J. Bacteriol.* **142**:615-620.

- Lutkenhaus, J., B.A. More, M. Masters, and W.D. Donachie. 1979. Individual proteins are synthesized continuously throughout the *Escherichia coli* cell cycle. *J. Bacteriol.* **138**:352-360.
- Ma, X., and W. Margolin. 1999. Genetic and functional analysis of the conserved C-terminal core domain of *Escherichia coli* FtsZ. *J. Bacteriol.* **181**:7531-7544.
- Ma, X., D.W. Ehrhardt, and W.D. Margolin. 1996. Colocalization of cell division protein FtsZ and FtsA to cytoskeletal structures in living *Escherichia coli* cells by using green fluorescent protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**:12998-13003.
- Ma, X., Q. Sun, R. Wang, G. Singh, E.L. Jonietz, and W. Margolin. 1997. Interactions between heterologous FtsA and FtsZ proteins at the FtsZ ring. *J. Bacteriol.* **179**:6788-6797.
- Maaloe, O., and N. Kjeldgaard. 1966. Control of macromolecular synthesis. W.A. Benjamin, New York.
- Margolin, W. 2000. Themes and variations in prokaryotic cell division. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**:531-548.
- Margolin, W. 2001. Bacterial cell division: A moving MinE sweeper boggles the MinD. 2001. *Current Biol.* **11**:R395-R398.
- Martínez-Salas, E., J.A. Martín, and M. Vicente. 1981. Relationship of *Escherichia coli* density to growth rate and cell age. *J. Bacteriol.* **147**:97-100.
- Mercer. K.L.N., and D.S. Weiss. 2002. The *Escherichia coli* cell division protein FtsW is required to recruit its cognate transpeptidase, FtsI (PBP3), to the division site. *J. Bacteriol.* **184**:904-912.
- Mitchison, J.M., and R.S. Vincent. 1965. Preparation of synchronous cell cultures by sedimentation. *Nature* **205**:987-989.
- Mingorance, J. S. Rueda, P. Gómez-Puertas, A. Valencia, and M. Vicente. 2001. *Escherichia coli* FtsZ polymers contain mostly GTP and have a high nucleotide turnover. *Mol. Microbiol.* **41**:83-91.
- Mulder, E., and C.L. Woldringh. 1889. Actively replicating nucleoids influence positioning of division sites in *Escherichia coli* filaments forming cells lacking DNA. *J. Bacteriol.* **171**:4303-4314.
- Mukherjee, A., C. Cao, and J. Lutkenhaus. 1998. Inhibition of FtsZ polymerization by SulA, an inhibitor of septation in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**:2885-2890.

- Murkherjee, A., and J. Lutkenhaus. 1994. Guanine nucleotide-dependent assembly of FtsZ into filament. *J. Bacteriol.* **176**:2754-2758.
- Murkherjee, A., and J. Lutkenhaus. 1998. Dynamic assembly of FtsZ regulated by GTP hydrolysis. *EMBO J.* **17**:462-469.
- Murkherjee, A., and J. Lutkenhaus. 1999. Analysis of FtsZ assembly by light scattering and determination of the role of divalent metal cations. *J. Bacteriol.* **181**:823-832.
- Mukherjee, A., K. Dai, and J. Lutkenhaus. 1993. *Escherichia coli* cell division protein FtsZ is a guanine nucleotide binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**:1053-1057.
- Nebe-von-Caron, G., P. Stephens, J. Hewitt, J.R. Powell, and R.A. Badley. 2000. Analysis of bacterial function by multi-colour fluorescence flow cytometry and single cell sorting. *J. Microbiol. Meth.* **42**:97-114.
- Nogales, E., S.G. Wolf, and K.H. Downing. 1998. Structure of the $\alpha\beta$ tubulin dimer by electron crystallography. *Nature* **391**:199-202.
- Oliver, D.B., R.J. Cabelli, K.M. Dolan, and G.P. Jarosik. 1990. Azide-resistant mutants of *Escherichia coli* alter the SecA protein, an azide-sensitive component of the protein export machinery. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**:8227-8231.
- Osteryoung K.W., and E. Vierling, 1995. Conserved cell and organelle division. *Nature* **376**:473-474.
- Palacios, P., M. Vicente, and M. Sánchez. 1996. Dependency of *Escherichia coli* cell-division size, and independency of nucleoid segregation on the mode and level of *ftsZ* expression. *Mol. Microbiol.* **20**:1093-1098.
- Pla, J., M. Sánchez, P. Palacios, M. Vicente, and M. Aldea. 1991. Preferential cytoplasmic location of FtsZ, a protein essential for *Escherichia coli* septation. *Mol. Microbiol.* **5**:1681-1686.
- Pla, J., P. Palacios, M. Sánchez, T. Garrido, and M. Vicente. 1993. Stability of components of the *Escherichia coli* septator. *Bacterial Growth and Lysis*, Plenum Press, New York.
- Pichoff, S., and J. Lutkenhaus. 2002. Unique and overlapping roles for ZipA and FtsA in septal ring assembly in *Escherichia coli*. *EMBO J.* **21**:685-693.
- Powell, B.S., and D.L. Court. 1998. Control of *ftsZ* expression, cell division, and glutamine metabolism in Luria-Bertani medium by the alarmone ppGpp in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **180**:1053-1062.

- Quardokus, E.M., N. Din, and Y.V. Brun. 1996. Cell cycle regulation and cell type-specific localization of the FtsZ division initiation protein in *Caulobacter*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **93**:6314-6319.
- Quardokus, E.M., N. Din, and Y.V. Brun. 2001. Cell cycle and positional constraints on FtsZ localization and the initiation of cell division in *Caulobacter crescentus*. Mol. Microbiol. **39**:949-959.
- Raskin, D.M., and P. de Boer. 1997. The MinE ring: an FtsZ-independent cell structure required for selection of the correct division site in *E. coli*. Cell **91**:685-694.
- Raskin, D.M., and P. de Boer. 1999a. MinDE dependent pole to pole oscillation of division inhibitor MinC in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **181**:6419-6424.
- Raskin, D.M., and P. de Boer. 1999b. Rapid pole to pole oscillation of a protein required for directing division to the middle of *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96**:4971-4976.
- RayChaudhuri, D. 1999. ZipA is a MAP-Tau homolog and is essential for structural integrity of the cytokinetic FtsZ ring during bacterial cell division. EMBO J. **18**:2372-2383.
- RayChaudhuri, D., and J.T. Park. 1992. *Escherichia coli* cell-division gene *ftsZ* encodes a novel GTP-binding protein. Nature **359**:251-254.
- Regamey, A., E.J. Harry, and R.G. Wake. 2000. Midcell Zring assembly in the absence of entry into the elongation phase of the round of replication in bacteria: coordinating chromosome replication with cell division. Mol. Microbiol. **38**:423-434.
- Rivas, G., A. López, J. Mingorance, M.J. Ferrándiz, S. Zorrilla, A. Minton, M. Vicente, and J.M. Andreu. 2000. Magnesium-induced linear self-association of the FtsZ bacterial cell division protein monomer. J. Biol. Chem. **275**:11740-11749.
- Robin, A., D. Joseleau-Petit, and R. D'Ari. 1990. Transcription of the *ftsZ* gene and cell division in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **172**:1392-1399.
- Rothfield, L., S. Justice, and J. García Lara. 1999. Bacterial cell division. Annu. Rev. Genet. **33**:423-448.
- Rowland, S.L., V.L. Katis, S.R. Partridge, and R.G. Wake. 1997. DivIB, FtsZ and cell division in *Bacillus subtilis*. Mol. Microbiol. **23**:295-302.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor N.Y.

- Sánchez, M., 1993. Tesis doctoral: Proteínas FtsQ, FtsA y FtsZ. Tres componentes esenciales del septador de *Escherichia coli*. Universidad Autónoma de Madrid.
- Sánchez, M., A. Valencia, M-J. Ferrándiz, C. Sander, and M. Vicente. 1994. Correlation between the structure and biochemical activities of FtsA, an essential cell division protein of the actin family. *EMBO J.* **13**:4919-4925.
- Scherbaum, O.H. 1959. A comparasion or the degree of synchronous multiplication in various microbial systems. *J. Protozool. Suppl.* **6**:17.
- Sesaki H., and R.E. Jensen. 1999. Division versus fusion: Dnm1p and Fzo1p antagonistically regulate mitochondrial shape. *J. Cell. Biol.* **174**:699-706.
- Sharpe, M.E., and J. Errington. 1995. Postseptational chromosome partitioning in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**:8630-8634.
- Silhavy, T.J., M.L. Berman, and L.W. Enquist. 1984. In *Experiments with gene fusions*. Silhavy, T.J., M.L. Berman, and L.W. Enquist (eds.). Cold Spring Harbor Laboratory. New York.
- Skarstad, K., H.B. Steen, and E. Boye. 1985. Cell cycle parameters of slowly growing *Escherichia coli* B/r studied by flow cytometry. *J. Bacteriol.* **163**:661-668.
- Sosson, T.M., Jr., M.R. Brigham-Burkey, P. Hensley, and K.H., Jr., Pearce. 1999. Self-activation of guanosine triphosphatase activity by oligerization of the bacterial cell division protein FtsZ. *Biochemistry* **38**:14843-14850.
- Strepp R., S. Schoolz, S. Kruse, V. Speth, and R. Reski. 1998. Plant nuclear gene knockout reveals a role in plastid division for the homolog of the bacterial cell division protein FtsZ, an ancestral tubulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**:4368-4373.
- Sun, Q., and W. Margolin. 1998. FtsZ dynamics during the division cycle of live *Escherichia coli* cells. *J Bacteriol.* **180**:2050-2056.
- Sun, Q., and W. Margolin. 2001. Influence of the nucleoid on placement of FtsZ and MinE rings in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **183**:1413-1422.
- Sun, Q., X.C. Yu, and W. Margolin. 1998. Assembly of the FtsZ ring at the central division site in the absence of the chromosome. *Mol. Microbiol.* **29**:491-503.
- Talian, J.C., J.B. Olmsted, and R.D. Goldman. 1983. A rapid procedure for preparing fluorescein-labeled specific antibodies from whole antiserum: its use in analyzing cytoskeletal architecture. *J. Cell. Biol.* **97**:1277-1282.
- Tétart F., and J.P. Bouché. 1992. Regulation of the expression of the cell-cycle gene *ftsZ* by DicF antisense RNA. Division does not require a fixed number of FtsZ molecules. *Mol. Microbiol.* **6**:615-620.

- Tormo, A., and M. Vicente. 1984. The *ftsA* gene product participates in formation of *Escherichia coli* septum structure. *J. Bacteriol.* **157**:779-784.
- Tormo, A., E. Martínez-Salas, and M. Vicente. 1980. Involvement of the *ftsA* gene product in late stages of the *Escherichia coli* cell cycle. *J. Bacteriol.* **141**: 806-813.
- Tormo, A., A. Dopazo, A. de la Campa, M. Aldea, and M. Vicente. 1985. Coupling between DNA replication and cell division mediated by the FtsA protein in *Escherichia coli*: a pathway independent of the SOS response, the "TER" pathway. *J. Bacteriol.* **164**:950-953.
- Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **76**:4350-4354.
- Trusca, D., S. Scott, C. Thompson, and D. Bramhill. 1998. Bacterial SOS checkpoint protein Sula inhibits polymerization of purified FtsZ cell division protein. *J. Bacteriol.* **180**:3946-3953.
- Van den Ent, and J. Löwe. 2000. Crystal structure of the cell division protein FtsA from *Thermotoga maritima*. *EMBO J.* **19**:5300-5307.
- Villarino, A., O.M.M. Bouvet, B. Regnault, S. Martin-Delautre, and P.A.D. Grimont. 2000. Exploring the frontier between life and death in *Escherichia coli*: evaluation of different viability markers in live and heat- or UV-killed cells. *Res. Microbiol.* **151**:755-768.
- Vinella, D., and R. D'Ari. 1994. Thermoinducible filamentation in *Escherichia coli* due to an altered RNA polymerase beta subunit is suppressed by high levels of ppGpp. *J. Bacteriol.* **176**:966-972.
- Vinella, D., R. D'Ari, A. Jaffé, and P. Boulloc. 1992. Penicillin binding protein 2 is dispensable in *Escherichia coli* when pppGpp synthesis is induced. *EMBO J.* **11**:1493-501.
- Vitha, S., R. McAndrew, and K. Osteryoung. 2001. FtsZ ring formation at the chloroplast division site in plants. *J. Cell Biology.* **153**:111-119.
- Voskuil, J.A., A.M. Westerbeek, Ch. Wu, H.J. Kolk, and N. Nanninga. 1994. Epitope mapping of *E. coli* cell division protein with monoclonal antibodies. *J. Bacteriol.* **176**:1886-1893.
- Wang, H., and R.C. Gayda. 1992. Quantitative determination of FtsA at different growth rates in *Escherichia coli* using monoclonal antibodies. *Mol. Microbiol.* **6**:2517-2524.

- Wang X., and J. Lutkenhaus. 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**:435-442.
- Wang L., and J. Lutkenhaus. 1996. FtsZ ring: the eubacterial division apparatus conserved in archaeobacteria. *Mol. Microbiol.* **21**:313-320.
- Wang, X., P. de Boer, and L.I. Rothfield. 1991. A factor that positively regulates cell division by activating transcription of the mayor cluster of essential cell division genes of *Escherichia coli*. *EMBO J.* **10**:3363-3372.
- Wang, X., J. Huang, A. Mukherjee, C. Cao, and J. Lutkenhaus. 1997. Analysis of the interaction of FtsZ with itself, GTP and FtsA. *J. Bacteriol.* **179**:5551-5559.
- Wang L., M.K. Khattar, W.D. Donachie, and J. Lutkenhaus. 1998. FtsI and FtsW are localized to the septum in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **180**:2810-2816.
- Ward J.E., Jr., and J. Lutkenhaus, 1985. Overproduction of FtsZ induces minicell formation in *E.coli*. *Cell* **42**:621-627.
- Weiss, D.S., J.C. Chen, J.M. Ghigo, D. Boyd, and J. Beckwith. 1999. Localization of FtsI (PBP3) to the septal ring requires its membrane anchor, the Z ring, FtsA, FtsQ and FtsL. *J. Bacteriol.* **181**:508-520.
- Wientjes, F.B., T.J.M. Olijhoek, U. Schwarz, and N. Nanninga. 1983. Labeling pattern of major penicillin-binding proteins of *Escherichia coli* during the division cycle. *J. Bacteriol.* **153**:1287-1293.
- Woldringh, C.L., P.G. Mulder, P.G. Huls, and N.O.E. Vischer 1991. Toporegulation of bacterial division according to the nucleoid occlusion model. *Res. Microbiol.* **142**:309-320.
- Yan, K., K.H. Pearce, and D. Payne. 2000. A conserved residue at the extreme C-terminus of FtsZ is critical for the FtsA-FtsZ interaction in *Staphylococcus aureus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **270**:387-392.
- Yan, K., T.M. Sossong, and D. Payne. 2001. Regions of FtsZ important for self-interaction in *Staphylococcus aureus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **284**:515-518.
- Yim, L., G. Vandenbussche, J. Mingorance, S. Rueda, M. Casanova, J-M. Ruyschaert, and M. Vicente. 2000. Role of the carboxy terminus of *Escherichia coli* FtsA in self-interaction and cell division. *J. Bacteriol.* **182**:6366-6373.
- Yu, X.C., and W. Margolin. 1999. FtsZ ring clusters in *min* and partition mutants: role of both the Min system and the nucleoid in regulating FtsZ ring localization. *Mol. Microbiol.* **32**:315-326.

Yu, X.C., A.H. Tran, Q. Sun, and W. Margolin. 1988. Localization of cell division protein FtsK to the *Escherichia coli* septum and identification of a potential N-terminal targeting domain. *J. Bacteriol.* **180**:1296-1304.

Yu, X.C., Q. Sun, and W. Margolin. 2001. FtsZ rings in *mukB* mutants with or without the Min system. *Biochimie.* **83**:125-129.

Zhou, P., and C. Helmstetter. 1994. Relationship between *ftsZ* gene expression and chromosome replication in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **176**:6100-6106.



BIBLIOTECA