**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

VALDIR BLASIOS JUNIOR

**Caracterização da interação entre o regulador
espacial MinC e seu alvo FtsZ em
*Bacillus subtilis***

Versão corrigida

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

02/07/2014

VALDIR BLASIOS JUNIOR

**Caracterização da interação entre o regulador
espacial MinC e seu alvo FtsZ em
*Bacillus subtilis***

*Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em Ciências (Bioquímica)*

Orientador: Prof. Dr. Frederico José Gueiros Filho

São Paulo

2014

***Aos meus pais,
que sempre apoiaram minhas decisões.***

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pelo apoio em todos os momentos, sem exceção.

Aos membros veteranos, pelo apoio e amizade desde o início da minha trajetória até aqui, José Roberto Tavares (Jotinha), Guilherme Louzada, Patrícia Castelab, Alexandre Bisson Filho, Valquíria Santos (Killer), Rodrigo Ribeiro, Camelote. Aos membros juvenis, pela convivência nos momentos finais de doutorado, André (Garrafinha), Jhonathan (Chilelê), Diego e Danilo (Justin).

Aos amigos e amiga de república por serem minha família em São Paulo, Murilo Sena, Renato Grempel, Vinícius Coutinho (Feto), André (01), Cícero (Batata), Maurício (Cariri), Matheus (Caboclo), Hans Waldenmaier, Jocasta (Peugeot) e Ian (Bolinha).

A Marluce, pelo apoio, dedicação e paciência nessa fase final da tese.

A Luci Navarro pelos serviços de sequenciamento executados sempre com agilidade e qualidade.

A todos os colegas de trabalho do IQ, incluindo pós-graduandos e funcionários.

Aos colaboradores do LNBio, Patrícia Castellen, Ana Carolina Zeri, Rodrigo Vargas Honorato e Paulo Sérgio Lopes de Oliveira

Aos colaboradores que executaram as microscopias eletrônicas do LNNano, Rodrigo Portugal e Jefferson Bettini

Por discussões científicas enriquecedoras, Diorge Paulo de Souza

Pelos ensinamentos, discussões e experimentos realizados nessa tese, Alexandre Bisson Filho.

Ao Fredy, agradeço pela oportunidade, aprendizado científico e orientação.

Ao IQ-USP pela disponibilidade de equipamentos, reagentes e participações em congressos.

Ao CNPq pelo apoio financeiro dado ao laboratório.

A FAPESP pela bolsa de doutorado concedida.

“Just toothpicks and logic”
Sydney Brenner

RESUMO

Blasios, V. **Caracterização da interação entre o regulador espacial da divisão MinC e seu alvo FtsZ em *Bacillus subtilis***. 2014. 98p. Tese - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A divisão celular bacteriana é orquestrada por FtsZ, uma proteína homóloga à tubulina eucariótica que possui a capacidade de polimerizar e gerar uma estrutura chamada de anel Z. O local onde esta estrutura citoesquelética contrátil é formada determina o futuro sítio de divisão. O complexo MinCD é um dos principais reguladores da posição da divisão, favorecendo a montagem do anel Z precisamente na região medial da bactéria. MinCD age como um inibidor sítio específico da polimerização de FtsZ, atuando preferencialmente nos polos celulares. MinC é a proteína do complexo que atua diretamente sobre FtsZ e inibe sua polimerização. Essa tese elucida a interação entre FtsZ e MinC e sugere o mecanismo exercido por MinC em *Bacillus subtilis*. Foi triada uma biblioteca de mutantes randômicos de FtsZ para identificação de mutantes resistentes à ação de MinC. Dentre estes, as substituições K243R e D287V, quando caracterizados usando espalhamento de luz e espectroscopia de fluorescência impediram a interação com MinC. Como as mutações estavam localizados em torno das hélices H-9 e H-10 no domínio C-terminal de FtsZ, concluímos que esta região representa o sítio de interação com MinC desta proteína.

Como complemento ao mapeamento do sítio de ligação de MinC em FtsZ, identificamos a região de MinC que interage com FtsZ. Para tanto, escolhemos resíduos de MinC para mutagênese e caracterização. A escolha priorizou os resíduos conservados entre espécies Gram-positivas, experimentos de RMN, carga e exposição ao solvente dos mesmos. Dentre os resíduos de MinC mutados que afetaram sua capacidade de inibir a polimerização de FtsZ *in vitro* foram: Y8 e K12 (β -1), K15 (alça-2), H55 (β -3), H84 (β -4) e K149 (C-terminal). Sendo assim, podemos concluir que a face de interação para FtsZ em MinC de *B. subtilis* é a única folha β do domínio N-terminal desta proteína.

Com base nos sítios mapeados das duas proteínas experimentalmente, criamos um modelo *in silico* do complexo MinC-FtsZ por *docking molecular*. De acordo com o modelo gerado, MinC interage com a porção lateral de polímeros de FtsZ. Isto sugere que MinC atue na inibição da formação de feixes de filamentos de

FtsZ, impedindo assim a formação de anéis Z funcionais. Esse mecanismo de ação do sistema Min é diferente do proposto para *E. coli*, no qual MinC interage com a face de polimerização FtsZ-FtsZ e impede a formação de protofilamentos de FtsZ.

Palavras-chave: Divisão celular, FtsZ, MinC, anel Z, citoesqueleto, interação proteína-proteína.

ABSTRACT

Blasios, V. **Characterization of interaction between the spatial regulator for bacterial division MinC and its target FtsZ in *Bacillus subtilis***. 2014. 98p. PhD Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Bacterial cell division is orchestrated by FtsZ, a protein homologous to eukaryotic tubulin that has the ability to polymerize and generate a cytoplasmic structure called the Z ring. The subcellular location where this cytoskeletal structure is formed determines the future division site. The MinCD complex is one of the main regulators of the position of cell division, driving the assembly of Z-ring precisely at the medial region of the cell. MinCD acts as a site-specific inhibitor of FtsZ polymerization, blocking Z ring formation at the cell poles. MinC is the protein of the complex that acts directly on FtsZ and inhibits its polymerization. This thesis elucidates the interaction between FtsZ and MinC and suggests the MinC mechanism in *Bacillus subtilis*. An *ftsZ* randomly mutagenized library was screened to identify mutants that are resistant to MinC action. Using right-angle light scattering and fluorescence spectroscopy we showed that substitutions K243R and D287V lost the interaction to MinC. These substituted residues clustered around the H-9 and H-10 helices in the C-terminal domain of FtsZ, thus, we conclude that this region is the binding site for MinC.

In addition to mapping the MinC binding site on FtsZ, we also identified the FtsZ binding site in MinC. Based on residue conservation, NMR experiments and exposure to solvent, we chose residues of MinC for mutagenesis and characterization. The substituted residues that disrupted MinC ability to inhibit FtsZ polymerization *in vitro* were: Y8 and K12 (β -1), K15 (turn-2), H55 (β -3), H84 (β -4) and K149 (C-terminal). Thus, we conclude that the binding site of MinC for FtsZ is located on the only β sheet at the N-terminal domain of MinC from *B. subtilis*.

Finally, based on the binding sites of the two proteins mapped experimentally, we created a model of the complex between MinC and FtsZ by molecular docking. According to the generated model, MinC interacts with the lateral portion of FtsZ polymers. This indicates that MinC should inhibit assembly of higher order FtsZ polymers, thereby preventing the formation of a functional Z-ring. This mechanism of

Min is different from that proposed in *E. coli*, in which MinC interacts with FtsZ polymerization interface and inhibits FtsZ protofilament formation.

Keywords: Cell division, FtsZ, MinC, Z-ring, cytoskeleton, protein-protein interaction.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BCA: Ácido bicinconínico

BSA: Albumina sérica bovina

CTP: Peptídeo do extremo C-terminal de FtsZ

DNA: Ácido desoxirribonucléico

DO₆₀₀: Densidade óptica a 600 nm

EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético

EPP: PCR propensa a erros

GDP: Guanosina difosfato

GFP: Proteína fluorescente verde

GTP: Guanosina trifosfato

GTPase: Enzima hidrolase que se liga e hidroliza GTP

IPTG: Isopropil β -D-tiogalactopiranosídeo

kb: Quilobase

kDa: Quilodáton

LB: Meio lisogênico (Luria-Bertani)

NO: Oclusão do nucleóide

PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida

PCR: Reação em cadeia da polimerase

PDB: Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/>)

PMSF: Fluoreto de fenilmetilsulfonila

RMN: Ressonância magnética nuclear

SAXS: Espalhamento de raios-x a baixo ângulo

SDS: Dodecil sulfato de sódio

TKG: Tampão 50 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 10% glicerol, pH 8

TKEG: Tampão 50 mM Tris-HCL, 50 mM KCl, 1 mM EDTA, 10% glicerol, pH 8

TRIS: Tris (hidroximetil) aminometano

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 FtsZ e a divisão celular em bactérias	13
1.2. Proteínas moduladoras da divisão bacteriana	17
1.2.1. Moduladores positivos	17
1.2.1.1. FtsA e ZipA	17
1.2.1.2. ZapA	19
1.2.1.3. SepF	20
1.2.2. Reguladores negativos	21
1.2.2.1. Noc/SlmA	21
1.2.2.3. EzrA	22
1.2.2.3. Sula	23
1.3. O sistema Min	23
1.3.1. Ação de MinC na estabilidade do anel Z	27
2. OBJETIVOS	30
2.1. Objetivos específicos	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1. Cepas bacterianas e condições de crescimento	31
3.2. Manipulação de DNA	31
3.3. Purificação de MinC e FtsZ	34
3.4. Mapeamento de resíduos nas estruturas 3D de FtsZ e MinC	35
3.5. Espalhamento de luz	35
3.6. Fluorescência intrínseca do triptofano	36
3.7. Espectrometria de massas	37
3.8. Microscopia de fluorescência	37
3.9. Microscopia eletrônica	37
3.10. Mutagênese sítio dirigida	38
3.11. <i>Western blotting</i>	39

3.12. Dicroísmo circular	39
3.13. Ensaio de sedimentação	40
4. RESULTADOS.....	41
Parte I	41
4.1. Isolamento de mutantes FtsZ resistentes à MinC	41
4.2. Sequenciamento e classificação	43
4.3. Especificidade dos mutantes FtsZ	45
4.4. Caracterização de mutações específicas selecionadas	48
4.5. Microscopia de fluorescência	48
4.6. Caracterização in vitro dos mutantes de FtsZ insensíveis a MinC	51
4.6.1. Monitoramento da polimerização dos FtsZs mutantes por espalhamento de luz	51
4.6.2 Monitoramento da polimerização de FtsZs mutantes por microscopia eletrônica	54
4.6.3. Medida da interação entre FtsZ e MinC por experimentos de fluorescência	55
4.6.3.1. Mutação sítio-dirigida para triptofano em MinC.....	55
4.6.3.2. Interação direta entre MinC e FtsZ	57
Parte II	61
4.7. Estratégia adotada para construção de MinC mutantes	61
4.8. Estrutura de MinCN de <i>B. subtilis</i>	66
4.9. Caracterização <i>in vitro</i> dos mutantes MinC.....	68
4.10. O mutante MinC ^{K57A}	69
4.11. Caracterização in vivo dos mutantes de MinC	72
5. DISCUSSÃO	78
6. REFERÊNCIAS.....	90
LISTA DE ANEXOS.....	98

1. INTRODUÇÃO

1.1 FtsZ e a divisão celular em bactérias

Os estudos sobre o mecanismo, e também a regulação, da divisão celular bacteriana foram iniciados há aproximadamente 40 anos atrás. Mutantes cuja divisão ficava prejudicada em alta temperatura, chamados de *fts* (*filamentation thermosensitive*), deram início aos estudos sobre genes envolvidos em divisão bacteriana, identificando genes mutantes que alteravam um ou mais aspectos da divisão (Hirota *et al.*, 1968). Esses mutantes, quando expostos à temperatura de 40° C sofrem um fenômeno chamado de filamentação (bloqueio da divisão). Hoje, algumas décadas depois desses primeiros resultados, conhecemos mais de 20 proteínas caracterizadas como parte integrante do complexo multiproteico que executa a divisão, o divisomo, ou não são parte do complexo, mas regulam seu funcionamento. Apesar de todas essas proteínas terem sido identificadas como parte desse fascinante processo, ainda sabe-se pouco sobre a função e o mecanismo de interação entre essas proteínas.

A proteína fundamental no processo de divisão é chamada de FtsZ. FtsZ (*Filamentation Temperature-Sensitive protein Z*) é uma proteína essencial e altamente conservada em bactérias. Além disso, FtsZ pode ser encontrada em cloroplastos e mitocôndrias (Vaughan *et al.*, 2004). Essa proteína é a primeira a localizar no futuro sítio de divisão, uma vez localizada, o anel Z serve como base para o divisomo (Bi e Lutkenhaus, 1991). A função citoesquelética de FtsZ foi demonstrada pela polimerização de FtsZ em filamentos e mini-anéis *in vitro* (Mukherjee e Lutkenhaus, 1994) (Bramhill e Thompson, 1994). FtsZ é um homólogo de tubulina, sendo assim possui propriedades semelhantes e atua como um citoesqueleto. Os filamentos de FtsZ são formados por interação “cabeça cauda”, o

N- e o C-terminal de duas consecutivas subunidades de FtsZ interagem formando o filamento (Figura 1) (Oliva, *et al.*, 2004). Os contatos longitudinais do filamento são similares entre FtsZ e tubulina (Erickson *et al.*, 1996). A semelhança estrutural e dos polímeros de FtsZ, quando comparado à tubulina eucariótica, se devem ao fato dessas duas proteínas derivarem de um ancestral comum (Erickson *et al.*, 1996) (Lowe e Amos, 1998).

A estrutura cristalográfica de FtsZ também revelou que a proteína é dividida em dois domínios globulares (Figura 1), separados por uma hélice (H7) e seguidos por uma cauda desestruturada com 70 aminoácidos no extremo C-terminal (CTP), sendo os últimos 17 aminoácidos altamente conservados. Esta última região não é essencial para interação “cabeça cauda” de FtsZ-FtsZ, mas mostrou-se importante para interação lateral entre polímeros de FtsZ (Buske e Levin, 2012). Essa região também é conhecida por ser alvo para ancoragem de diversos moduladores da polimerização de FtsZ (Adams e Errington, 2009) (Buske e Levin, 2012).

Figura 1. Estruturas cristalográficas de FtsZ: monomérico (*Bacillus subtilis* 2VAM) e dimérico (*Methanocaldococcus jannaschii* 1W5B). A estrutura monomérica está dividida em dois domínios, N- e C-terminal que estão representados em azul e preto, respectivamente. Entre os domínios, em verde, está destacada a α -hélice H-7 que divide a proteína nos dois domínios. A estrutura dimérica mostra os contatos envolvidos na auto-associação dos monômeros de FtsZ no filamento. As setas em azul indicam o eixo de polimerização de FtsZ. O CTP não está presente em nenhuma das estruturas, pois essa região não possui estrutura definida (imagens criadas usando o software PyMol).

Assim como a tubulina eucariótica, FtsZ possui a capacidade de polimerizar *in vivo* e *in vitro* (Erickson, 1997) (Lutkenhaus e Addinall, 1997). Quando comparada à tubulina, FtsZ apresenta similaridades de sequência e indica um sítio de ligação a GTP também similar. A polimerização de FtsZ é induzida por GTP e a polimerização, por sua vez, ativa a hidrólise de GTP. (Mukherjee e Lutkenhaus, 1994). Dessa forma, uma FtsZ mutante incapaz de ligar GTP, não consegue polimerizar, ao passo que uma mutante capaz de ligar, mas não hidrolisar GTP, permanece apta à polimerização (Mukherjee e Lutkenhaus, 1994).

A propriedade de polimerização, ou automontagem, exibida por FtsZ possibilita a formação de protofilamentos (polímeros em que cada monômero se associa com o subsequente via uma interação “cabeça cauda”, a estrutura

polimérica básica de FtsZ (Figura 2)). Os protofilamentos, por sua vez, se organizam no meio da célula formando o anel Z. O anel Z é formado por protofilamentos curtos (80-200 nm), associados à face interna da membrana e que se agrupam em feixes por interações laterais (Figura 2) (Si *et al.*, 2013) (Strauss *et al.*, 2012) (Li *et al.*, 2007).

Figura 2. Esquema das interações entre subunidades de FtsZ. Em cinza está representada a interação “cabeça cauda”, formando protofilamentos. Em preto, a interação lateral entre protofilamentos de FtsZ.

O anel Z serve como uma estrutura organizadora para montagem do divisoma. Após a sua formação, o anel Z recruta mais de vinte proteínas que agem de forma coordenada para realizar o processo de divisão. Essa elaborada maquinaria molecular promove a invaginação da membrana e da parede celular, formando o septo de divisão que divide a célula-mãe em duas células-filhas idênticas.

A construção do septo é iniciada logo após a formação do divisomo, quando componentes deste complexo envolvidos na síntese de peptidoglicano (PBP2B; PBP1) são concentrados no sítio de divisão e promovem o crescimento transversal da parede celular (Popham e Young, 2003). Uma questão ainda não resolvida é a origem da força que promove o invaginamento da membrana plasmática e o crescimento interno da parede celular. As evidências que FtsZ é capaz de gerar essa força constritora *in vitro* são convincentes (Meier e Goley, 2014). Os dados atuais demonstraram que a reciclagem de subunidades de FtsZ no filamento é

fundamental para a constrição acontecer (Osawa e Erickson, 2011). Aparentemente, a participação de FtsA, um outro componente conservado do divisomo, é essencial para completa fissão de vesículas *in vitro*, principalmente com diâmetros menores que 250-500 nm (Arumugam *et al.*, 2012) (Osawa e Erickson, 2013).

1.2. Proteínas moduladoras da divisão bacteriana

O controle do posicionamento de FtsZ no futuro sítio de divisão, é dado pela inibição da formação de anel Z nos locais indesejáveis por proteínas que ligam FtsZ diretamente e modulam sua polimerização (Monahan *et al.*, 2014). Estas proteínas moduladoras são responsáveis pela precisão espacial e a perfeita coordenação com a replicação e segregação do material genético (Wu e Errington, 2012). O sucesso da divisão da célula depende diretamente dessa regulação espaço-temporal da divisão celular. Sabemos que há um comprometimento da integridade celular quando o anel Z é montado no momento e região inapropriados, como formação de minicélulas e septo sobre o nucleóide (Erickson *et al.*, 2010). No caso de *B. subtilis*, modelo para bactérias Gram-positivas, temos a descrição de diversos moduladores ligados a FtsZ (Adams e Errington, 2009). Estas proteínas, de forma geral, controlam a polimerização e despolimerização de FtsZ e assim dirigem a montagem ou desmontagem do anel Z (Adams e Errington, 2009).

1.2.1. Moduladores positivos

1.2.1.1. FtsA e ZipA

Os moduladores positivos são fatores que regulam positivamente a formação do anel Z, dando estabilidade à estrutura e frequentemente conectando os filamentos de FtsZ à membrana. O primeiro destes moduladores a ser identificado foi

FtsA, uma proteína estruturalmente similar à actina que está associada à membrana e é um dos moduladores positivos mais bem estudados (Pichoff e Lutkenhaus, 2005) (Jensen, 2005). Sua função foi associada com a estabilização e ancoramento do anel Z à membrana (Pichoff e Lutkenhaus, 2005). FtsA possui a capacidade de interagir com FtsZ por meio do extremo C-terminal de FtsZ (Ma e Margolin, 1999) (Haney *et al.*, 2001) (Szwedziak *et al.*, 2012). Recentemente, foi mostrado que além de FtsA ancorar FtsZ à membrana, ela causa uma aparente desestabilização dos protofilamentos *in vitro*, iniciando assim uma movimentação direcional dos mesmos (*treadmilling*). Dados obtidos com lipossomos sugerem que apenas FtsZ e FtsA são suficientes para a divisão dos mesmos. Assim, é possível sugerir a participação de FtsA na contração do anel Z (Loose e Mitchison, 2014) (Schwille, 2014) (Osawa e Erickson, 2013).

ZipA é uma proteína integral de membrana presente apenas em enterobactérias que participa diretamente na ancoragem e estabilização do anel Z (Pichoff e Lutkenhaus, 2002) (Hale e de Boer, 1997) (Hernández-Rocamora *et al.*, 2012) e, portanto, tem um papel aparentemente redundante a FtsA em *E. coli*. Como ZipA ancora FtsZ à membrana, a região de ZipA responsável pela interação com a membrana é o domínio N-terminal transmembrana (Hale e de Boer, 1997). Na região citoplasmática de ZipA existem três domínios: repetição Map-Tau, região rica em prolina e glutamina (*P/Q domain*) e o domínio C-terminal globular. O domínio globular de ZipA interage diretamente com FtsZ, domínio este também chamado de FZB (*FtsZ-binding domain*) (Mosyak *et al.*, 2000). Esse domínio interage com FtsZ por meio da região conservada no peptídeo C-terminal de FtsZ (Haney *et al.*, 2001). ZipA é capaz de proteger FtsZ da degradação por ClpX, papel este que não pode ser exercido FtsA. Dessa forma, a ação considerada específica de ZipA,

compreende proteger e estabilizar FtsZ da degradação nas fases iniciais da formação do anel Z (Pazos *et al.*, 2013).

1.2.1.2. ZapA

ZapA é uma proteína amplamente conservada e atua como modulador positivo de FtsZ, promovendo diretamente a estabilidade do anel Z. ZapA atua induzindo a interação lateral entre protofilamentos, promovendo assim a estabilidade de estruturas multifilamento, como o anel Z (Gueiros-Filho e Losick, 2002) (Low *et al.*, 2004) (Small *et al.*, 2007) (Mohammadi *et al.*, 2009). ZapA foi descoberta em *B. subtilis*, por meio de uma triagem para supressores do sistema Min, devido à sua capacidade de resgatar a divisão numa situação de superexpressão de MinD, um inibidor da divisão (Gueiros-Filho e Losick, 2002). ZapA parece capaz de proteger FtsZ da ação de Min, tanto *in vivo* como *in vitro* (Scheffers, 2008). Sua concentração intracelular é praticamente equimolar a FtsZ em *E. coli* e estimada em 5 % do nível de FtsZ em *B. subtilis* (Mohammadi *et al.*, 2009) (Gueiros-Filho e Losick, 2002). Uma deleção no gene que codifica ZapA em *B. subtilis* não causa um efeito muito danoso, o observado é apenas um aumento de 20-30% no tamanho das células (Gueiros-Filho, 2012). Já em *E. coli* o efeito observado é muito maior, a deleção de ZapA causa defeitos significativos na citocinese, evidenciados pela presença de células filamentosas (Dajkovic *et al.*, 2010).

Porém, ZapA não é uma proteína essencial para formação do anel Z em condições normais. ZapA tornou-se mais importante quando foi reduzida a disponibilidade de FtsZ citoplasmático ou se mutações secundárias forem introduzidas a fim de perturbar a formação do anel Z (Gueiros-Filho e Losick, 2002).

Isso sugere que o papel de ZapA na estabilização do anel Z pode ser exercido por outras proteínas, como por exemplo, FtsA e SepF.

Além de ZapA, existem outros moduladores positivos Zap, como ZapB, ZapC e ZapD. Esses moduladores atuam induzindo a formação de feixes de FtsZ, mas ao contrário de ZapA, estão presentes apenas em *E. coli* (Durand-Heredia *et al.*, 2011) (Durand-Heredia *et al.*, 2012) (Hale *et al.*, 2011). Dentre eles, o mais estudado é ZapB. Sabe-se que ele é recrutado por ZapA para o sítio de divisão e é capaz de formar uma estrutura em forma de anel (Galli e Gerdes, 2010) (Galli e Gerdes, 2012). Em *Caulobacter crescentus*, existe outra proteína (FzIA) membro da família Zap que também interage diretamente com FtsZ (Goley *et al.*, 2010). FzIA foi caracterizada por alterar diretamente a regulação da estrutura e/ou dinâmica de FtsZ durante a divisão (Goley *et al.*, 2010).

1.2.1.3. SepF

SepF é um regulador presente somente em bactérias Gram-positivas e cianobactérias. Presente no sítio de divisão, depende de FtsZ para a sua localização e *in vitro* interage com ela mesma e FtsZ (Hamoen *et al.*, 2006). Em ensaios de *pull-down* SepF confirmou sua afinidade direta por FtsZ, mais especificamente pela região CTP de FtsZ (Król *et al.*, 2012). Além de ligar-se a FtsZ, SepF possui um domínio de ligação à membrana por meio de uma hélice anfipática (Duman *et al.*, 2013) (Singh *et al.*, 2008). A deleção do gene que codifica SepF afeta somente estágios tardios da divisão (construção do septo), já a combinação da deleção de SepF e EzrA resulta em um letal sintético (Hamoen *et al.*, 2006). Há uma alteração do septo causada pela ausência de SepF, isso indica que sua função envolve a manutenção do anel Z, principalmente no período de desenvolvimento do septo

(Duman *et al.*, 2013). Dessa forma, seu papel parece ser correlacionado, ou até mesmo complementar à função de FtsA. Sendo que a super-expressão de SepF suprime a ausência de FtsA. SepF portanto atua ancorando o anel Z à membrana e deve recrutar proteínas do divisomo (Duman *et al.*, 2013).

1.2.2. Reguladores negativos

Dentre os reguladores negativos da polimerização de FtsZ que foram identificados até o momento, Sula e MinC são os melhores estudados. Porém, alguns inibidores como Noc/SlmA e EzrA tem destaque visto que desempenham papéis fundamentais em conjunto com o sistema Min.

1.2.2.1. Noc/SlmA

A coordenação da divisão celular com a replicação/segregação do nucleóide foi proposta há mais de duas décadas atrás (Woldringh *et al.*, 1991). O modelo original postula que na divisão celular, há um reconhecimento da posição ocupada pelo nucleóide na bactéria e ocorre a inibição da formação do septo sobre o mesmo. Esse efeito foi chamado de oclusão do nucleóide (*nucleoid occlusion* - NO) (Woldringh *et al.*, 1991). A oclusão do nucleóide é exercida por proteínas associadas ao DNA que funcionam como inibidores da formação do anel Z. Os moduladores negativos envolvidos nesse sistema são: SlmA em *E. coli* e Noc em *B. subtilis* (Wu e Errington, 2004) (Bernhardt e de Boer, 2005). Noc liga-se a regiões específicas do DNA, se associando de forma desigual ao longo do cromossomo (Wu *et al.*, 2009). A localização de Noc no cromossomo faz com que o anel Z só se forme depois que a região do término do cromossomo esteja replicada e os nucleóides parcialmente segregados. Apesar de tratado como um modulador de FtsZ, ainda não foi detectada

interação direta entre Noc e FtsZ. Não está descartado que Noc tenha um alvo diferente de FtsZ no divisomo (Wu e Errington, 2012).

Em *E. coli* essa mesma função, evitar a perturbação da replicação e segregação do DNA, é exercida pela proteína SlmA (Bernhardt e de Boer, 2005). Apesar da falta de similaridade de sequência primária (pertencem a diferentes famílias de proteínas que ligam DNA), SlmA e Noc possuem propriedades genéticas e citológicas similares (Bernhardt e de Boer, 2005). SlmA se liga diretamente a FtsZ com alta afinidade ($K_d \sim 87$ nM) ativada por uma região específica de ligação ao DNA (SBS) e inibe a formação estruturas de FtsZ de alta ordem (Cho *et al.*, 2011) (Tonthat *et al.*, 2011). Um modelo do complexo entre FtsZ e SlmA, baseado em experimentos de SAXS, mostra que a interação ocorre com os resíduos básicos no C-terminal de SlmA dimérico e múltiplos glutamatos no C-terminal de FtsZ (Tonthat *et al.*, 2011).

1.2.2.3. EzrA

Outro modulador influente na regulação da formação do septo é EzrA, proteína transmembrana que possui função desestabilizadora do anel Z (Levin *et al.*, 1999). Seu efeito não é sentido na porção medial da célula devido a presença de estabilizadores, como FtsA e ZapA, que contrapõem sua ação. Já nos polos celulares, EzrA tem efeito adjuvante ao sistema Min, inibindo a formação do anel Z (Levin *et al.*, 1999) (Chung, 2007). A inibição da polimerização de FtsZ se dá por interação direta com a parte CTP de FtsZ (Singh *et al.*, 2007). Apesar de interagir diretamente com FtsZ, EzrA é incapaz de desfazer protofilamentos já formados, agindo apenas na prevenção da montagem (Haeusser *et al.*, 2004). O mecanismo sugerido para ação regulatória negativa de EzrA é que ele reduza a afinidade de

FtsZ por GTP e, ao mesmo tempo, aumente a atividade GTPásica (Chung *et al.*, 2007). Essa habilidade de EzrA auxilia na prevenção da polimerização de FtsZ principalmente nos polos celulares.

1.2.2.3. Sula

SulA é uma proteína de *E. coli* e espécies Gram-negativas relacionadas que atua na resposta SOS ao dano do DNA, bloqueando a divisão até o DNA ser reparado (Bi e Lutkenhaus, 1993). SulA liga diretamente a FtsZ inibindo a formação do anel Z, consequentemente inibindo a atividade GTPásica (Trusca *et al.*, 1998) (Mukherjee *et al.*, 1998) (Chen *et al.*, 2012). A estrutura cristalográfica do complexo FtsZ-SulA mostra que SulA interage com o domínio C-terminal de FtsZ, mais especificamente com a alça T7. Esta alça é imprescindível para hidrólise do GTP, isso porque é a região onde está localizado o aminoácido catalítico de FtsZ (Cordell *et al.*, 2003). Dessa forma, o modelo proposto, já que SulA se liga na região de interação FtsZ-FtsZ, é que há um sequestro das subunidades de FtsZ da reação de montagem dos protofilamentos (Chen *et al.*, 2012). Com as subunidades de FtsZ sendo sequestradas dos polímeros, a montagem do aparato de divisão é prejudicada.

1.3. O sistema Min

O sistema Min é constituído por um par de proteínas conservadas, MinC e MinD, que possuem um papel fundamental na inibição polar da formação de anéis Z. Mutações que inativam as proteínas Min levam à divisão na extremidade polar das células e formação de minicélulas desprovidas de DNA (Adler *et al.*, 1967) (Reeve *et al.*, 1973) (Levin *et al.*, 1992). O nome Min deriva do fenótipo de produção de

minicélulas. Em conjunto com NO, que inibe a formação do septo sobre o nucleóide, as proteínas Min garantem a formação do anel Z no centro da célula. O inibidor da polimerização de FtsZ do sistema Min é a proteína MinC. Porém o mecanismo, bem como, o modo de interação MinC-FtsZ, ainda permanecem sem resposta.

MinD é uma proteína periférica de membrana que recruta MinC para membrana e promove sua localização. Esse recrutamento de MinC para a membrana plasmática é conhecidamente potencializador do efeito negativo exercido sobre o anel Z (Marston e Errington, 1999). Sua estrutura mostra uma organização em forma de dímeros, que é dependente de sua ligação ao ATP (Wu *et al*, 2011). A presença de ATP permite que MinD dimerize e forme um complexo com MinC.

MinC é uma proteína citoplasmática com ação inibidora da formação do anel Z mas, ao contrário de Sula, não inibe a atividade GTPásica de FtsZ (Hu *et al.*, 1999) (Dajkovic *et al.*, 2008). Especulava-se que MinC poderia ser uma proteína dividida em domínios, C-terminal e N-terminal, que exibem tamanhos similares (Hu e Lutkenhaus, 2000). Em 2001, foi resolvida a estrutura cristalográfica de MinC de *Thermotoga maritima*, revelando uma organização em dímeros e confirmando a presença de dois domínios separados por uma alça flexível (Cordell *et al.*, 2001) (Figura 3).

Figura 3. Estruturas tridimensionais de MinC. (A) Estrutura do N-terminal de MinC de *B. subtilis* (2M4I). (B) Dímero de MinC de *T. marítima* (1HF2). Parte N-terminal da proteína está representada em cinza, o domínio C-terminal está em azul claro e azul escuro. Em verde está mostrada a alça flexível de ligação entre os dois domínios (imagens manipuladas utilizando o software PyMol).

A ação do sistema Min tem uma restrição topológica, ou seja, atua apenas nos polos celulares. Isso resulta da distribuição subcelular do complexo MinCD, que exibe uma alta concentração no extremo das células e baixa concentração no meio da célula (Rothfield *et al.*, 2005). A localização polar de MinCD segue caminhos diferentes em *E. coli* e *B. subtilis*. A proteína de membrana DivIVA é apontada como a principal responsável por deter o complexo MinCD nos polos em *B. subtilis*. DivIVA é uma proteína que se acumula nos polos celulares. A afinidade de DivIVA pelos polos celulares está relacionada à curvatura negativa da membrana nessa região (Lenarcic *et al.*, 2009) (Ramamurthi e Losick, 2009). Todavia, a ligação entre MinCD e DivIVA é indireta e requer uma proteína chamada MinJ. MinJ é uma proteína integral de membrana e atua como uma ponte na interação entre o complexo MinCD e DivIVA (Patrick e Kearns, 2008) (Bramkamp *et al.*, 2008) (Figura 4).

Em *E. coli*, o sistema Min é compreendido por 3 proteínas: MinC, MinD e MinE. MinE não está presente em *B. subtilis*, sua função é auxiliar na regulação topológica de MinC e MinD, induzindo a oscilação do complexo MinCD de um polo

ao outro da célula (Raskin e de Boer, 1999) (Meinhardt e de Boer, 2001) (Figura 4). A oscilação das proteínas MinCD pode ser explicada a partir de suas propriedades bioquímicas. MinD forma complexos oligoméricos na membrana do polo celular. A interação de MinD com ele mesmo e com a membrana é dependente de ATP. O padrão oscilatório é resultado da interação com MinE, que estimula a atividade ATPásica de MinD e desloca-o da membrana (Lutkenhaus, 2007). MinD deslocado da membrana volta a se associar à membrana no polo oposto do qual foi deslocado após trocar seu ADP por ATP.

Figura 4. Controle espacial da citocinese. (A) Em *E. coli* a oscilação do sistema Min organiza o posicionamento do divisomo. (B) O complexo MinCD em *B. subtilis* é recrutado para os polos celulares e sítio de divisão pelo complexo DivIVA/MinJ. A dinâmica das proteínas está indicada por setas (figura retirada do sítio <http://www.bacteriology.bio.lmu.de>).

O posicionamento do anel Z é regido essencialmente pelos dois sistemas regulatórios negativos já mencionados, o sistema Min e a oclusão do nucleóide (NO), que inibem a formação do anel Z por toda a célula, com exceção da região medial. O sistema Min, por meio da ação de MinC, inibe a polimerização de FtsZ nos polos celulares. A oclusão do nucleóide, por sua vez, previne a montagem do anel Z

sobre o nucleóide. Dessa forma, o efeito observado nas células é de um gradiente de inibição, desde a região dos polos até o meio da célula (Figura 5).

Figura 5. O anel Z é posicionado pelo gradiente de moduladores negativos da polimerização de FtsZ. (a) Em *E. coli*, a posição do anel Z é coordenada pelos reguladores negativos, MinC, que é estabilizado na membrana por MinD e SlnA, que impede a formação do anel Z sobre o nucleóide. (b) Em *B. subtilis*, o gradiente de MinC é regulado por MinD e DivIVA, aumentando assim a concentração de MinC nos polos celulares. Já a inibição sobre o nucleóide é exercida pela proteína Noc. (Modificado de Lutkenhaus, 2007).

1.3.1. Ação de MinC na estabilidade do anel Z

Os efeitos de MinC na polimerização de FtsZ tem sido estudados com mais detalhes apenas em *E. coli* até esse momento. Os primeiros experimentos mostrando propriedades mecânicas revelaram que a função de MinC era dependente da atividade GTPásica de FtsZ (Hu *et al.*, 1999). Porém, já havia sido mostrado que a atividade enzimática de FtsZ não era alterada pela ação de MinC (Hu *et al.*, 1999). Sem inibição da atividade GTPásica, a inibição da formação de polímeros de FtsZ por sedimentação e espalhamento de luz, podem indicar que MinC causou uma perturbação na interação lateral dos polímeros (Hu *et al.*, 1999). Além disso, resultados obtidos por microscopia eletrônica e reologia sugeriram também que MinC previne interações laterais entre protofilamentos (Dajkovic *et al.*,

2008). Essa última sugestão vem da observação que MinC antagoniza a integridade mecânica de estruturas de FtsZ, perdendo assim a rigidez dos polímeros e havendo um possível encurtamento dos mesmos (Dajkovic *et al.*, 2008).

Ambos os domínios de MinC são importantes para a função do sistema Min, isso é evidenciado pela formação de mini-células quando cada domínio é inativado separadamente (Zhou e Lutkenhaus, 2005). O domínio C-terminal não tem efeito na sedimentação de FtsZ, mas possui atividade inibitória *in vivo*, quando superexpresso fusionado à MinD (Hu e Lutkenhaus, 2000) (Shiomi e Margolin, 2007). Experimentos de microscopia mostraram que o C-terminal de MinC é responsável pela interação com MinD, e consequentemente atribui especificidade topológica a proteína (Hu e Lutkenhaus, 2000). Além da interação com MinD, o domínio C-terminal é altamente conservado em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e é responsável pela dimerização da proteína (Szeto *et al.*, 2001) (Cordell e Löwe, 2001). O domínio N-terminal é altamente divergente e é capaz de prevenir a sedimentação de FtsZ *in vitro* (Hu e Lutkenhaus, 2000). Os dois domínios de MinC quando superexpressados são capazes de inibir a formação de anéis Z (Hu e Lutkenhaus, 2000) (Shen e Lutkenhaus, 2009) (Shiomi e Margolin, 2007). Experimentos genéticos revelaram que cada domínio de MinC reconhece diferentes regiões de FtsZ (Shen e Lutkenhaus, 2009) (Shen e Lutkenhaus, 2010). O N-terminal de MinC foi encontrado como tendo afinidade pela hélice H-10 do domínio globular C-terminal de FtsZ (Shen e Lutkenhaus, 2010). Já o C-terminal de MinC reconhece a região CTP de FtsZ (Shen e Lutkenhaus, 2009). O aminoácido identificado como importante na hélice H-10 de FtsZ, asparagina 280, está na interface de polimerização de FtsZ-FtsZ. Isso sugere que MinC quebre protofilamentos, ao invés de impedir interações laterais em *E. coli*. A ligação do C-terminal de MinC ao CTP de FtsZ contribuiria para aproximar

o N-terminal de MinC de seu alvo. Além disso, a ligação do C-terminal de MinC ao CTP de FtsZ poderia desestabilizar o anel Z *in vivo* ao impedir, ou até mesmo deslocar, a ligação de moduladores positivos com FtsA e ZipA, que também se ligam ao CTP de FtsZ (Ma e Margolin, 1999) (Haney *et al.*, 2001).

Apesar da existência de um modelo para o mecanismo de MinC em *E. coli*, este ainda não é necessariamente aplicável a outras bactérias. Além disso, ainda não há qualquer informação disponível sobre como é o sítio de ligação para FtsZ no domínio N-terminal de MinC.

Por meio de abordagens genética, bioquímica e estrutural, essa tese descreve a identificação e caracterização do sítio de interação em cada uma das duas proteínas envolvidas nesse estudo (FtsZ-MinC). A identificação desses sítios nos levou a propor uma forma de interação e o mecanismo de inibição de MinC em *B. subtilis*.

2. OBJETIVOS

Essa tese teve como objetivo caracterizar resíduos de aminoácidos presentes na interface e/ou envolvidos na interação entre FtsZ e MinC.

2.1. Objetivos específicos

- Identificação de mutantes de FtsZ insensíveis à ação de MinC;
- Caracterização *in vivo* e *in vitro* dos FtsZ mutantes selecionados;
- Mutagênese sítio dirigida de resíduos selecionados de MinC;
- Caracterização *in vivo* e *in vitro* dos MinC mutantes.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Cepas bacterianas e condições de crescimento

Todas as cepas de *B. subtilis* utilizadas para crescimento são derivadas da cepa selvagem PY79 previamente descrita (Youngman *et al.*, 1983). A cepa comercial *E. coli* DH5 α foi utilizada para a clonagem das proteínas de fusão. Tanto *B. subtilis* quanto *E. coli* foram crescidos em meio LB a 37°C, com agitação. Antibióticos, quando necessários, foram utilizados nas seguintes concentrações: espectinomicina, 100 $\mu\text{g/mL}$; tetraciclina, 10 $\mu\text{g/mL}$; ampicilina, 100 $\mu\text{g/mL}$; cloranfenicol 5 $\mu\text{g/mL}$; canamicina, 5 $\mu\text{g/mL}$. A concentração de indutores (IPTG) está indicada na legenda das figuras.

3.2. Manipulação de DNA

A manipulação de DNA e as clonagens foram feitas segundo métodos estabelecidos (Sambrook e Russel, 2001). Os plasmídios utilizados e os oligonucleotídeos estão descritos na tabela 1 e 2, respectivamente. Os sequenciamentos foram realizados pelo serviço de sequenciamento do IQ-USP (SSDNA-IQUSP), o preparo das amostras foi realizado segundo protocolo do kit Big Dye Terminator (Applied Biosystem) e a precipitação segundo Sambrook e Russel (2001).

Tabela 1. Oligonucleotídeos

Nome	Sequência
OL1315	5' AAGCTAGCGGCCGCGTGAAGACCAAAAAG 3'
OL1316	5' AAGGATCCGCCTCACCCAATTCAC 3'
oFG5	5' AAGCTAGCGGCCGCTTGTCTGACGGCAAA 3'
oFG16	5' AAGGATCCATCCTTTTCTTTAAGCTG 3'
oFG57	5' AAGCTAGCATGTTGGAGTTCGAAACAAAC 3'
oFG63	5' AAGGATCCTTAGCCGCGTTTATTACGGTT 3'
oFG69	5' AAAACACACCGATGCTTGA 3'
oFG70	5' ACCGATACCCATCAAAGCAG 3'
oFG85	5' GACGCAAAACGTGAGTAACCTCAGCAGCAGAAC 3'
oFG86	5' GTTCTGCTGCTGAGGTTACTCACGTTTTGCGTC 3'
oFG139	5' GAAAACTGGAGCGTCAGCTTAAA 3'
oFG178	5' GCTCTAGATTGGAGTTCGAAACAAAC 3'
oFG213	5' GGTCTCAGCAGGATCGAATTCCTGTTATAAAA 3'
oFG215	5' CGGTGATCAACACACAAATTA AAACTGGTCTGATCGCATTAGATCTTACTCCGAA 3'
oFG298	5' GGGCGGCGGAACAGGAGCAGGTGCCGCACCGGTTATCGC 3'
oFG299	5' GCGATAACCGGTGCGGCACCTGCTCCTGTTCCGCCGCC 3'
oFG300	5' GCAAAGAGCAGATTGAAGTAGCACTTAAAGGTGCTGACATGG 3'
oFG301	5' CCATGTCAGCACCTTTAAGTGCTACTTCAATCTGCTCTTTGC 3'
oFG302	5' GCAAAGCTGACTAGAAGATTGGGAGCAGGTGCGAATCCGG 3'
oFG303	5' CCGGATTGCGACCTGCTCCCAATCTTCTAGTCAGCTTTGC 3'
oFG308	5' CGCTTCGGCGTCTGTTCAAGACGTAACATGATTTTCGG 3'
oFG309	5' CCGAAATCATGTTTACGTCTTGAACAGACGCCGAAGCG 3'
oFG330	5' CGC GGC AGA GGC AGC AAA AAG AGC AAT TTC CAG CCC GCT TC 3'
oFG331	5' GAA GCG GGC TGG AAA TTG CTC TTT TTG CTG CCT CTG CCG CG 3'
oFG332	5' CTT CTT GAA GCG GCC ATT GTC GGT GCG CAA GGC GTC CTC 3'
oFG333	5' GAG GAC GCC TTG CGC ACC GAC AAT GGC CGC TTC AAG AAG 3'
oFG334	5' CTTGACATCCCGACATTCTTAACAAACCGTAATAAACGCGGC 3'
oFG335	5' GCCGCGTTTATTACGGTTTGTTAAGAAATGTCGGGATGTCAAG 3'
oFG353	5' ACTAGCTAGCGAAGTTATTACGATAGCCTCACCCA 3'
oFG354	5' ATATGTAACAATAAAAGACACAAAGAATGGACTAACATTG 3'
oFG355	5' CAATGTTAGTCCATTCTTTGTGCTTTTTATTGTTACATATTGC 3'
oFG405	5' CAATGGACCGATGGAAAAGGCCAGAAAATC 3'
oFG406	5' TCCATCGGTCCATTGTTCAATTGACAGCATATTCT 3'
oFG494	5' GCAGCAATATGTAACAATAGCAGGAACAAAGAATGGACTA 3'
oFG495	5' TAGTCCATTCTTTGTTCTGCTATTGTTACATATTGCTGC 3'
oFG496	5' TGTAACAATAAAAGGAACAGCGAATGGACTAACATTGCATC 3'
oFG497	5' GATGCAATGTTAGTCCATTGCTGTTCCCTTTTATTGTTACA 3'
oFG498	5' ATCAGCGTTCATGTTGCGCTGGGAAATCGCT 3'
oFG499	5' AGCGATTTCCAGCGCAACATGAACGCTGAT 3'
oFG500	5' TCATGTTAAGCTGGGAAATGCCTTTTTATATAAGGAGCAAG 3'
oFG501	5' CTTGCTCCTTATATAAAAAGGCATTTCCAGCTTAACATGA 3'
oFG502	5' CTG GGA AAT CGC TTT TGG TAT AAG GAG CAA GAG GA 3'
oFG503	5' TCCTCTTGCTCCTTATACCAAAAGCGATTTCCCGAG 3'
oFG504	5' GTTCTGGGCTCACTGGCAGGAATTGCGCATG 3'
oFG505	5' CATGCGCAATTCCTGCCAGTGAGCCCAGAAC 3'
oFG525	5' TAGACACAACATTGAAGATGGAAGCGTTCA 3'
oFG550	5' CAAAAAGCAGCAAGCAGTAACAATAAAAG 3'
oFG551	5' CTTTTATTGTTACTGCTTGCTGCTTTTTG 3'
oFG552	5' CAGAAAATCAGCGTTGCAGTTAAGCTGGGAAATC 3'
oFG553	5' GATTTCCAGCTTAACTGCAACGCTGATTTTCTG 3'
oFG554	5' GATTTGTTTGTTGCATCTATTGACAGTG 3'
oFG555	5' CACTGTCAATAGATGCAACAAACAAATC 3'

Tabela 2. Cepas

Cepa	Genótipo	Referência
PY79	<i>Prototroph</i>	Youngman <i>et al.</i> , 1983
FG247	<i>thrC::Pspac-hy-minD (erm)</i>	Gueiros-Filho, 2011
IS75	<i>metB5 hisAl leuA</i>	D. Dubnau
BD3196	<i>metB5 hisAl leuA roKΔ::kan</i>	Vaughan <i>et al.</i> , 2004
AB52	<i>metB5 hisAl leuA roKΔ::kan amyE::Pxyl-mciZ</i>	Essa tese
AB53	<i>metB5 hisAl leuA roKΔ::kan amyE::Pxyl-gfp-zapA-mts</i>	Essa tese
AB62	<i>metB5 hisAl leuA roKΔ::kan amyE::Pxyl-mciZ chrΩftsZT111A (tet)</i>	Essa tese
AB70	<i>thrC::Pspac-hy-minD (erm), chrΩftsZT111A (tet)</i>	Essa tese
AB83	<i>metB5 hisAl leuA roKΔ::kan amyE::Pxyl-gfp-zapA-mts chrΩftsZT111A (tet)</i>	Essa tese
AB164	<i>thrC::Pspac-hy-minD (erm) chrΩpAB10 (tet)</i>	Essa tese
AB165	<i>thrC::Pspac-hy-minD (erm) chrΩftsZL69S (tet)</i>	Essa tese
AB166	<i>thrC::Pspac-hy-minD (erm) chrΩftsZT111R (tet)</i>	Essa tese
AB167	<i>thrC::Pspac-hy-minD (erm) chrΩftsZT232I (tet)</i>	Essa tese
AB168	<i>thrC::Pspac-hy-minD (erm) chrΩftsZK243R (tet)</i>	Essa tese
AB169	<i>thrC::Pspac-hy-minD (erm) chrΩftsZI245F (tet)</i>	Essa tese
AB170	<i>thrC::Pspac-hy-minD (erm) chrΩftsZD255V (tet)</i>	Essa tese
AB171	<i>thrC::Pspac-hy-minD (erm) chrΩftsZV260A (tet)</i>	Essa tese
AB172	<i>thrC::Pspac-hy-minD (erm) chrΩftsZV282A (tet)</i>	Essa tese
AB173	<i>thrC::Pspac-hy-minD (erm) chrΩftsZA285T (tet)</i>	Essa tese
AB174	<i>thrC::Pspac-hy-minD (erm) chrΩftsZD287V (tet)</i>	Essa tese
AB175	<i>thrC::Pspac-hy-minD (erm) chrΩftsZI293T (tet)</i>	Essa tese
AB176	<i>thrC::Pspac-hy-minD (erm) chrΩftsZV310A (tet)</i>	Essa tese
AB177	<i>thrC::Pspac-hy-minD (erm) chrΩftsZR376T (tet)</i>	Essa tese
AB178	<i>metB5 hisAl leuA roKΔ::kan amyE::Pxyl-mciZ (cat) chrΩpAB10 (tet)</i>	Essa tese
AB179	<i>metB5 hisAl leuA roKΔ::kan amyE::Pxyl-mciZ (cat) chrΩftsZL69S (tet)</i>	Essa tese
AB180	<i>metB5 hisAl leuA roKΔ::kan amyE::Pxyl-mciZ (cat) chrΩftsZT111R (tet)</i>	Essa tese
AB181	<i>metB5 hisAl leuA roKΔ::kan amyE::Pxyl-mciZ (cat) chrΩftsZT232I (tet)</i>	Essa tese
AB182	<i>metB5 hisAl leuA roKΔ::kan amyE::Pxyl-mciZ (cat) chrΩftsZK243R (tet)</i>	Essa tese
AB183	<i>metB5 hisAl leuA roKΔ::kan amyE::Pxyl-mciZ (cat) chrΩftsZI245F (tet)</i>	Essa tese
AB184	<i>metB5 hisAl leuA roKΔ::kan amyE::Pxyl-mciZ (cat) chrΩftsZD255V (tet)</i>	Essa tese
AB185	<i>metB5 hisAl leuA roKΔ::kan amyE::Pxyl-mciZ (cat) chrΩftsZV260A (tet)</i>	Essa tese
AB186	<i>metB5 hisAl leuA roKΔ::kan amyE::Pxyl-mciZ (cat) chrΩftsZV282A (tet)</i>	Essa tese
AB187	<i>metB5 hisAl leuA roKΔ::kan amyE::Pxyl-mciZ (cat) chrΩftsZA285T (tet)</i>	Essa tese
AB188	<i>metB5 hisAl leuA roKΔ::kan amyE::Pxyl-mciZ (cat) chrΩftsZD287V (tet)</i>	Essa tese
AB189	<i>metB5 hisAl leuA roKΔ::kan amyE::Pxyl-mciZ (cat) chrΩftsZI293T (tet)</i>	Essa tese
AB190	<i>metB5 hisAl leuA roKΔ::kan amyE::Pxyl-mciZ (cat), chrΩftsZV310A (tet)</i>	Essa tese
AB191	<i>metB5 hisAl leuA roKΔ::kan amyE::Pxyl-mciZ (cat), chrΩftsZR376T (tet)</i>	Essa tese
AB192	<i>metB5 hisAl leuA roKΔ::kan amyE::Pxyl-gfp-zapA-mts (cat), chrΩpAB10 (tet)</i>	Essa tese
AB193	<i>metB5 hisAl leuA roKΔ::kan amyE::Pxyl-gfp-zapA-mts (cat), chrΩftsZL69S (tet)</i>	Essa tese
AB194	<i>metB5 hisAl leuA roKΔ::kan amyE::Pxyl-gfp-zapA-mts (cat), chrΩftsZT111R (tet)</i>	Essa tese
AB195	<i>metB5 hisAl leuA roKΔ::kan amyE::Pxyl-gfp-zapA-mts (cat), chrΩftsZT232I (tet)</i>	Essa tese
AB196	<i>metB5 hisAl leuA roKΔ::kan amyE::Pxyl-gfp-zapA-mts (cat), chrΩftsZK243R (tet)</i>	Essa tese
AB197	<i>metB5 hisAl leuA roKΔ::kan amyE::Pxyl-gfp-zapA-mts (cat), chrΩftsZI245F (tet)</i>	Essa tese
AB198	<i>metB5 hisAl leuA roKΔ::kan amyE::Pxyl-gfp-zapA-mts (cat), chrΩftsZD255V (tet)</i>	Essa tese
AB199	<i>metB5 hisAl leuA roKΔ::kan amyE::Pxyl-gfp-zapA-mts (cat), chrΩftsZV260A (tet)</i>	Essa tese
AB200	<i>metB5 hisAl leuA roKΔ::kan amyE::Pxyl-gfp-zapA-mts (cat), chrΩftsZV282A (tet)</i>	Essa tese
AB201	<i>metB5 hisAl leuA roKΔ::kan amyE::Pxyl-gfp-zapA-mts (cat), chrΩftsZA285T (tet)</i>	Essa tese
AB202	<i>metB5 hisAl leuA roKΔ::kan amyE::Pxyl-gfp-zapA-mts (cat), chrΩftsZD287V (tet)</i>	Essa tese
AB203	<i>metB5 hisAl leuA roKΔ::kan amyE::Pxyl-gfp-zapA-mts (cat), chrΩftsZI293T (tet)</i>	Essa tese
AB204	<i>metB5 hisAl leuA roKΔ::kan amyE::Pxyl-gfp-zapA-mts (cat), chrΩftsZV310A (tet)</i>	Essa tese
AB205	<i>metB5 hisAl leuA roKΔ::kan amyE::Pxyl-gfp-zapA-mts (cat), chrΩftsZR376T</i>	Essa tese
VB15	<i>minC K12A</i> cepa de expressão	pBLA1 em BL21 (DE3)-RIL
VB16	<i>ftsZ K243R D287V</i> cepa de expressão	pBLA9 em BL21 (DE3)-RIL
VB17	<i>minC K15A</i> cepa de expressão	pBLA2 em BL21 (DE3)-RIL
VB18	<i>minC K57A</i> cepa de expressão	pBLA3 em BL21 (DE3)-RIL
VB19	<i>minC K149A</i> cepa de expressão	pBLA5 em BL21 (DE3)-RIL
VB27	<i>spec::minCD</i>	Essa tese
VB28	<i>spec::minCD thrC::Pspac-hy-gfp-minCK12A-minD</i>	Essa tese
VB29	<i>spec::minCD thrC::Pspac-hy-gfp-minCK15A-minD</i>	Essa tese
VB30	<i>spec::minCD thrC::Pspac-hy-gfp-minCK57A-minD</i>	Essa tese
VB31	<i>spec::minCD thrC::Pspac-hy-gfp-minCR61A-minD</i>	Essa tese
VB32	<i>spec::minCD thrC::Pspac-hy-gfp-minCK149A-minD</i>	Essa tese
VB37	<i>minC Y8A</i> cepa de expressão	pBLA6 em BL21 (DE3)-RIL
VB38	<i>minC H55A</i> cepa de expressão	pBLA7 em BL21 (DE3)-RIL
VB39	<i>minC H84A</i> cepa de expressão	pBLA8 em BL21 (DE3)-RIL
VB45	<i>spec::minCD thrC::Pspac-hy-gfp-minCY8A-minD</i>	Essa tese
VB47	<i>spec::minCD thrC::Pspac-hy-gfp-minCH55A-minD</i>	Essa tese
VB49	<i>spec::minCD thrC::Pspac-hy-gfp-minCH84A-minD</i>	Essa tese

Tabela 3. Plasmídios

Plasmídios	Genótipo	Referência
pDG1515	<i>bla tet</i>	Bi e Lutkenhaus, 1991
pAH103	<i>amyE::Pxyl-mciZ (cat)</i> plasmídio de integração	Erickson <i>et al.</i> , 2010
pEA18	<i>amyE::Pxyl-gfp (cat)</i> plasmídio de integração	Gueiros-Filho, 2011
pFG28	<i>amyE::Pxyl-gfp-zapA (cat)</i> plasmídio de integração	Gueiros-Filho, 2011
pAB10	<i>ftsZ-ATG in pDG 1515 (bla, tet)</i> plasmídio de integração	Essa tese
pAB20	<i>ftsZ</i> em <i>pET28a (kan)</i>	Essa tese
pAB20-T111A	<i>ftsZT111A</i> em <i>pET28a (kan)</i>	Essa tese
pAB20-K243R	<i>ftsZK243R</i> em <i>pET28a (kan)</i>	Essa tese
pAB20-D287V	<i>ftsZD287V</i> em <i>pET28a (kan)</i>	Essa tese
pAB20-R376T	<i>ftsZR376T</i> em <i>pET28a (kan)</i>	Essa tese
pAB31	<i>minC</i> in <i>pET28a (kan)</i>	Essa tese
pAB31-G13D	<i>minCG13D</i> em <i>pET28a (kan)</i>	Essa tese
pAB30	<i>minC</i> in <i>pET24b (kan)</i>	Essa tese
pAB30-G13D	<i>minCG13D</i> em <i>pET24b (kan)</i>	Essa tese
pAB30-Y44W	<i>minCY44W</i> em <i>pET24b (kan)</i>	Essa tese
pMG01	<i>Ptac-ftsZΔC(1-349) (bla)</i>	Nosso Laboratório
pBLA1	<i>minC K12A</i> em <i>pET24b (kan)</i> plasmídio de expressão	Essa tese
pBLA2	<i>minC K15A</i> em <i>pET24b (kan)</i> plasmídio de expressão	Essa tese
pBLA3	<i>minC K57A</i> em <i>pET24b (kan)</i> plasmídio de expressão	Essa tese
pBLA4	<i>minC R61A</i> em <i>pET24b (kan)</i> plasmídio de expressão	Essa tese
pBLA5	<i>minC K149A</i> em <i>pET24b (kan)</i> plasmídio de expressão	Essa tese
pBLA6	<i>minC Y8A</i> em <i>pET24b (kan)</i> plasmídio de expressão	Essa tese
pBLA7	<i>minC H55A</i> em <i>pET24b (kan)</i> plasmídio de expressão	Essa tese
pBLA8	<i>minC H84A</i> em <i>pET24b (kan)</i> plasmídio de expressão	Essa tese
pBLA9	<i>ftsZ K243R D287V</i> em <i>pET28a (kan)</i> plasmídio de expressão	Essa tese
pBLA10	<i>minC K12A</i> em <i>pFG23</i> plasmídio de integração	Essa tese
pBLA11	<i>minC K15A</i> em <i>pFG23</i> plasmídio de integração	Essa tese
pBLA12	<i>minC K57A</i> em <i>pFG23</i> plasmídio de integração	Essa tese
pBLA13	<i>minC K149A</i> em <i>pFG23</i> plasmídio de integração	Essa tese
pBLA14	<i>minC Y8A</i> em <i>pFG23</i> plasmídio de integração	Essa tese
pBLA15	<i>minC H55A</i> em <i>pFG23</i> plasmídio de integração	Essa tese
pBLA16	<i>minC H84A</i> em <i>pFG24</i> plasmídio de integração	Essa tese

3.3. Purificação de MinC e FtsZ

Os genes de *ftsZ* e seus mutantes foram clonados em pET28a (Novagen), já os genes de *minC* mutantes foram clonados em pET24b (Novagen). Tanto MinC quanto FtsZ foram expressos na cepa de *E. coli* BL21(DE3), cepa esta proveniente da empresa STRATAGENE. As células foram crescidas a 37°C em 5 mL de LB líquido até atingir a DO₆₀₀ de 2. Essa cultura serviu de inóculo para 500 mL de meio de cultura, que foi crescido até a DO₆₀₀ estar entre 0,5 e 0,8. Neste estágio foram adicionados 100 mM de IPTG à cultura e incubados a 37° C sob agitação durante 3

horas. As células foram adicionadas de tampão TKEG+PMSF e lisadas por sonicação (Sonics VCX500, sonda SM0421) com 4 ciclos de 30 segundos com intervalos de 1min. O sobrenadante foi recolhido após centrifugação de 40 minutos a 100 000x g. MinC foi purificada usando cromatografia de afinidade a níquel em colunas HiTrap™ Chelating HP na presença do tampão A (TKG, 10 mM imidazol) e tampão B (TKG, 300 mM imidazol) para eluição. O tampão de eluição foi trocado por TKEG por meio de uma cromatografia de exclusão molecular (PD-10, GE Healthcare). Já a proteína FtsZ e seus mutantes foram purificadas por precipitação com 30% de sulfato de amônio saturado, seguida de outra precipitação dos polímeros, formados pela adição de GTP 1 mM e CaCl₂ 20 mM (Sigma-Aldrich). Esses polímeros foram ressuspensos em tampão TKEG. Todas as proteínas foram quantificadas utilizando o método BCA com o kit comercial da Pierce (Thermo Scientific), tendo BSA como padrão.

3.4. Mapeamento de resíduos nas estruturas 3D de FtsZ e MinC

O mapeamento dos resíduos encontrados na triagem em FtsZ, bem como as regiões importantes de MinC, foram manipuladas utilizando o software PyMOL (DeLano Scientific). As estruturas utilizadas foram obtidas por meio do banco de dados RCSB (www.rcsb.org/pdb/home/home.do) ou resolvidas pelo próprio grupo.

3.5. Espalhamento de luz

O espalhamento de luz dos polímeros de FtsZ foi medido usando um Hitachi F-4500. Os comprimentos de onda de excitação e emissão utilizados foi 350 nm, com aberturas de 3.5 nm, fotomultiplicador a 950 V e velocidade de triagem de 60 nm/s. As reações foram preparadas com as proteínas em um total de 150 µL de

tampão de polimerização (50 mM MES/NaOH pH 6.5, 133 mM KCl, 0.6 mg/mL DEAE, 10 mM $MgCl_2$) ou HMK (Hepes 50 mM pH 7.7, MgAc 5 mM e KAc 100 mM) a 30°C. Essa preparação foi colocada em uma cubeta de quartzo de 100 μ L e levada para um fluorímetro. A linha de base foi capturada por aproximadamente 25 s, foi adicionado 1 mM de GTP e a mudança no espalhamento foi medida durante aproximadamente 300 s. MinC foi adicionada as reações antes e depois da adição de GTP com resultados similares. Os efeitos do tampão foram removidos pela inclusão de tampão de estoque de MinC no mesmo volume do máximo de MinC adicionado as reações.

3.6. Fluorescência intrínseca do triptofano

Os ensaios de fluorescência foram realizados na presença de tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,5, $MgCl_2$ 1 mM e KCl 100 mM. As proteínas utilizadas nesse ensaio foram tratadas com $MgCl_2$ e incubadas nessa condição por 30 minutos, a fim de permitir a hidrólise de possíveis moléculas de GTP ligadas a FtsZ que se mantiveram dessa forma após a purificação. Desse modo, esperamos evitar a presença de polímeros de FtsZ em nossas preparações, evitando assim interferências em nossos espectros. Após tratadas com $MgCl_2$, as proteínas foram adicionadas de EDTA 5 mM, com o propósito de “quelar” todas os íons de magnésio. A amostra foi excitada com uma luz no comprimento de onda de 295 nm e captada a 90° a luz emitida pela amostra de 320 a 360 nm, coletando os pontos de emissões a cada 0,4 nm. O aparelho utilizado foi um Hitachi-4500, configurado com PMT 700 V, abertura da luz emitida e excitada de 5 nm e velocidade de 240 nm/min.

3.7. Espectrometria de massas

Uma alíquota de FtsZ purificada a partir da cepa de expressão BL21(DE3)-RIL, submetida a eletroforese e extraída a banda de aproximadamente 25 kDa (*spot*) do gel, com um bisturi, em segmentos de aproximadamente 1 mm³, colocadas em microtubos com fundo cônico de 1.5 mL e armazenados à 4° C. Os *spots* foram tratados e digeridos conforme Schevchenko *et al.*, 2006. Os espectros de massas da amostra foram obtidos com o aparelho Q-ToF Ultima (Waters) e analisados para a identificação protéica no programa MASCOT MS/MS Ions Search (www.matrixscience.com).

3.8. Microscopia de fluorescência

As microscopias de fluorescência de membrana e GFP foram realizadas em um microscópio Nikon Eclipse Ti, equipado com filtros GFP BrightLine e mCherry BrightLine (Semrock), objetiva Plan APO VC Nikon 100 x (NA= 1,4), SmartShutter de 25 mm e uma câmera Andor EMCCD i-Xon. O tempo de exposição das imagens variou de 0.3 a 1 s. As células bacterianas foram crescidas até a fase exponencial e incubadas em câmaras 1 % de agarose em LB, mantendo-as vivas durante todo o experimento. A membrana foi corada com FM5-95 (concentração final de 50 µg/mL, Molecular Probes) e 0.5 mM de IPTG foi adicionado ao meio de cultura LB solidificado. Todas as imagens foram capturadas usando o software NIS Elements versão 3.07 da Nikon e processadas com o ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

3.9. Microscopia eletrônica

Para visualização em coloração negativa, foi usado um total de 5 µL de uma reação de polimerização de FtsZ (5 µM). A reação continha um tampão de

polimerização (50 mM MES/NaOH pH 6.5, 100 mM KCl, 10 mM MgCl₂) e foi incubada por 5 min a 37° C após a adição de 2 mM de GTP. Os experimentos contendo FtsZ e MinC foram preparados com uma proporção de 1:3. As reações foram dispensadas em grades para microscopia eletrônica descarregada. Após 60 segundos, o excesso de líquido foi removido com um papel filtro e a grade foi corada com 5 µL acetato de uranila 2% por aproximadamente 10 segundos. As imagens foram feitas usando um defocus de a -3 µm e 60.000 x de magnificação com um microscópio Jeol JEM-2100 operando a 200 kV e equipado com uma câmera TVIPS F-416 CMOS. A microscopia foi realizada no Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano) pelos pesquisadores Rodrigo Portugal e Jefferson Bettini.

3.10. Mutagênese sítio dirigida

A primeira PCR foi realizada para inserir uma mutação no gene *minC*. Nela utilizamos oligonucleotídeos complementares com a mutação desejada. O preparo da reação de PCR foi feito em dois tubos, onde a única diferença entre eles foi que cada um foi preparado com apenas um oligonucleotídeo iniciador (montante ou jusante). A reação foi composta por 2 µL pET28a+MinC, 2 µL oligonucleotídeo iniciador, 0.5 µL dNTP (25mM), 5 µL tampão GC (Phusion), 2 µL MgCl₂, 0.5 µL Phusion, 13 µL Betaína (4 M), 25 µL água destilada. O programa no termociclador: 98° C por 1 minuto, 18 ciclos (98° C por 30 s, 55° C por 30 s, 72° C por 30 s/Kb de plasmídeo), 72° C por 5 minutos. Após o término da primeira reação foi realizada uma segunda reação de PCR onde misturamos 25 µL de cada reação do PCR anterior e adicionamos 0.5 µL de Phusion. Usamos o mesmo programa do termociclador. Após o término da segunda PCR, foi adicionado 1 µL de enzima de restrição DpnI (New England Biolabs), 5 µL de 10x NEBuffer 4 (500 mM acetato de potássio, 200 mM

tris-acetato, 100 mM acetato de magnésio, 10 mM ditiotreitól, pH 7.9) e a digestão foi incubada a 37° C por 3 horas. Por fim, o DNA foi purificado utilizando o “*GeneJET PCR Purification Kit*” da Fermentas e células de *E. coli* DH5α competentes foram transformadas por eletroporação. O DNA plasmidial dessas bactérias foi extraído e sequenciado para confirmação da mutação.

3.11. Western blotting

Todos os procedimentos padrão de *Western Blotting* foram realizados de acordo com Towbin *et al.*, 1979. Os lisados bacterianos foram resolvidos em gel de poliacrilamida (15 %) sob corrente contínua e posteriormente transferidos para a membrana de PVDF (Amersham Hybond™-P GE Healthcare). Foi utilizado tampão de transferência em 200 mA por 2 horas a 5° C para a transferência. O bloqueio da membrana foi de 2 horas e utilizamos PBS contendo Tween-20 % e 5 % de leite desnatado. Em seguida foi adicionado o anticorpo primário (anti-GFP) na proporção 1:3000 e incubado por 2 horas, lavados posteriormente com PBS+Tween por três vezes. Depois foi adicionado e incubado por 1 hora o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com HRP (Pierce) na proporção 1:10000. Após novas lavagens, a membrana foi revelada com o substrato para HRP (*ECL Prime Western Blotting Detection Reagent* – GE Healthcare) em *High Performance Chemiluminescence Film* (GE Healthcare).

3.12. Dicroísmo circular

Nos experimentos de dicroísmo circular, as leituras foram realizadas na região UV (193-260 nm). Os espectros foram adquiridos a 25° C em um espectropolarímetro Jasco J-810, com temperatura controlada por uma unidade

Peltier (*Jasco Corp. Tokyo, Japan*). As proteínas foram preparadas para uma concentração de 5 μ M em Tris-HCl 1 mM pH 8, KCl 1 mM, EDTA 0.02 mM e glicerol 0.2 %. Os espectros para a linha de base foram adquiridos com tampão. Todas as medidas foram realizadas em uma célula de quartzo de 1 mm, com velocidade de escaneamento de 100 nm/minuto e uma média de 10 leituras.

Para comparar diferentes proteínas, o número de ligações peptídicas e a concentração foram normalizados. O sinal de elipticidade foi convertido para elipticidade média por resíduo (*mean residue ellipticity* – MRE). A elipticidade molar foi calculada conforme a seguinte equação:

$$[\theta] = \frac{\theta_{obs}(\lambda)}{n_{pb} \cdot 10 \cdot l \cdot c}$$

Onde θ_{obs} é o sinal de elipticidade observado, n_{pb} é o número de ligações peptídicas (número de aminoácidos – 1), l é o caminho óptico e c é a concentração em M.

3.13. Ensaio de sedimentação

As reações foram preparadas em tubos de centrífuga de 1,5 mL contendo 7 μ M de FtsZ em tampão de polimerização (Mes/NaOH 50 mM, MgCl₂ 10 mM, KCl 133 mM, DEAE-dextran 0.6 mg/mL, pH 6.5) com 2 mM de GTP. As reações tinham um volume total de 100 μ L, incubadas a temperatura ambiente por 5 min e transferidas para tubos de ultra-centrífuga Beckman (8x34 mm). As amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 100.000 rpm usando rotor TLA 120.1. O precipitado (P) foi recolhido e ressuspendido com 100 μ L, tanto o precipitado como o sobrenadante foram aplicados em um gel de poliacrilamida de 15 %.

4. RESULTADOS

Parte I

4.1. Isolamento de mutantes FtsZ resistentes à MinC

O primeiro passo para obter informações sobre o modo de interação de MinC e FtsZ, foi triar uma biblioteca de mutantes de *ftsZ*. Essa triagem genética teve como objetivo identificar proteínas FtsZ que perderam a capacidade de interagir com MinC. A identidade dos aminoácidos alterados nestas proteínas indicaria a localização do sítio de ligação de MinC em FtsZ. Para tanto, utilizamos uma biblioteca pré-existente no laboratório, que foi construída em vetor capaz de integrar no cromossomo por recombinação simples. A região de reconhecimento para integração homóloga é o próprio *ftsZ*. A permuta intercorreu de modo que exclusivamente a versão mutante de FtsZ seria expressa na célula. Essa biblioteca foi construída por EPP (*Error Prone PCR*) e já foi utilizada para triagem de FtsZs resistentes à ação de outras proteínas envolvidas em divisão com sucesso (Bisson-Filho, 2009) (Wagner-Herman *et al.*, 2012).

É sabido que a superexpressão de MinD causa inibição da divisão (filamentação) e letalidade. Nesta situação, o sistema MinCD está impedindo a formação do anel Z por toda a célula e não apenas nos polos como acontece em condições normais (Gueiros-Filho e Losick, 2002). Assim, células de uma cepa que contém uma cópia extra de *minD* sob o controle do promotor indutível *Pspac* (FG249), quando cultivadas em meio de cultura contendo IPTG filamentam e morrem devido à ação desregulada do sistema Min (Figura 6).

Figura 6. Estratégia para triar FtsZ mutantes resistentes à ação do sistema MinCD. Na triagem usamos uma cepa com o gene *minD* sob o controle de promotor induzido por IPTG e uma biblioteca gerada por EPP.

A biblioteca de mutantes de *ftsZ* foi introduzida em células FG249 e foram selecionados os clones capazes de crescer em meio de cultura adicionado de IPTG, esperando que caso algum mutante não interagisse mais com MinC isto permitiria sua sobrevivência (Figura 6). É importante salientar que apesar da adição de IPTG causar a superexpressão de MinD, o efector da inibição da polimerização de FtsZ é MinC. A superexpressão de MinD em uma linhagem mutante para *minC* não tem nenhum efeito na divisão (Gueiros-Filho e Losick, 2002). Deste modo, a triagem seleciona os mutantes de FtsZ insensíveis/resistentes à MinC. Testamos uma biblioteca de aproximadamente 60 000 clones, sendo que apenas 51 colônias foram capazes de crescer com a superexpressão de MinD, uma frequência de colônias resistentes de aproximadamente 0,1 %.

A seguir, testamos se a insensibilidade à superexpressão de MinC dos 51 clones isolados inicialmente estava realmente ligada ao gene *ftsZ* mutado. Para tanto, o DNA cromossomal dos clones resistentes foi extraído e utilizado para transformar a mesma cepa utilizada na triagem dos mutantes (FG249), selecionando os transformantes para o marcador de seleção (*tet*) ligado ao alelo mutante de *ftsZ*. Como resultado, 44 dos 51 clones inicialmente isolados exibiram resistência à

superexpressão de *minD* quando seu DNA foi retransformado em FG249. Portanto, nestes clones a resistência à MinC deve ocorrer por causa da mutação em *ftsZ*.

4.2. Sequenciamento e classificação

O sequenciamento dos 44 clones resistentes originou a tabela 4, onde é possível observar a posição das 13 distintas mutações encontradas, bem como o tipo de substituição. Encontramos vários mutantes com a mesma mutação, o que nos levou a crer que estávamos perto da saturação da biblioteca. Além disso, foi elaborada uma classificação das mutações baseada na localização do aminoácido alterado na estrutura da proteína (Figura 7).

Tabela 4. Mutações encontradas no sequenciamento dos clones de FtsZ resistentes à ação de MinC. Em vermelho estão as mutações localizadas na interface de interação entre FtsZ-FtsZ. Em roxo, a mutação localizada na cauda C-terminal da proteína (CTP). Em preto são as mutações agrupadas em torno da hélice H-10.

Mutante	Aminoácido substituído
FtsZ 47	L69S
FtsZ 38	T111R
FtsZ 19	T232I
FtsZ 17	K243R
FtsZ 29	I245F
FtsZ 5	D255V
FtsZ 16	V260A
FtsZ 9	V282A
FtsZ 4	A285T
FtsZ 7	D287V
FtsZ 49	I293T
FtsZ 20	V310A
FtsZ 1	R376T

Figura 7. Estrutura de FtsZ com o mapeamento das mutações que conferem resistência a MinC. As mutações em vermelho representam as substituições encontradas em torno da hélice H-10. A esfera em amarelo representa o aminoácido catalítico 213. As esferas em verde são os resíduos na região de interação FtsZ-FtsZ, conhecidos por alterar a atividade GTPásica de FtsZ.

Categorizamos os mutantes em classes a partir de sua posição na estrutura.

A primeira classe é composta pelas mutações localizadas na região de interação entre duas moléculas de FtsZ (L69S e T111R, destacadas em verde na Figura 7). A segunda classe possui os mutantes com substituições presentes na cauda C-terminal da proteína (CTP), nesta classe está presente apenas a mutação R376T (ausente da Figura 7, pois o CTP de FtsZ não é visível na estrutura cristalográfica). A terceira classe é composta por todas as outras mutações encontradas nos clones resistentes à superexpressão de MinD. Essas mutações encontram-se agrupadas em torno da hélice H-10, quando observadas na estrutura tridimensional de FtsZ. As esferas vermelhas da Figura 7 representam a cadeia lateral dos aminoácidos mutados da terceira classe. As mutações encontradas nesse grupo são: T232I; K243R; I245F; D255V; V260A; V282A; D287V; I293T; V310A.

A face da proteína onde localizamos quase a totalidade dos aminoácidos encontrados na triagem parece indicar a região onde se encontra o sítio de ligação para MinC.

4.3. Especificidade dos mutantes FtsZ

Trabalhos anteriores já mostraram mutações em FtsZ que são capazes de promover resistência a inibidores, mesmo não estando posicionadas na região de ligação entre FtsZ e o inibidor. Essas mutações revelam uma alteração na atividade GTPásica de FtsZ e são consideradas promíscuas, por conferirem resistência a vários inibidores. Um exemplo disso são alguns mutantes isolados como resistentes à ação de Sula em *E. coli*, mas que também são resistentes à ação de MinC (Dai *et al.*, 1994) (Dajkovic *et al.*, 2008).

Diante disso, investigamos quais mutações encontradas em nossa triagem alteravam o comportamento de FtsZ e o tornavam resistente apenas à ação de MinC (específicas) ou também a outros moduladores (promíscuas). Os resultados obtidos com o teste de especificidade nos ajudaram a determinar quais mutações não estão localizadas no sítio de interação.

A especificidade dos mutantes foi revelada testando a resistência cruzada a outros inibidores. MciZ e Zap-MTS foram escolhidos pela capacidade letal quando superexpressas em *B. subtilis*. MciZ é um peptídeo inibidor que atua impossibilitando a formação de anéis Z em regiões inapropriadas na esporulação (Handler *et al.*, 2008). Já a superexpressão de ZapA não é letal para a célula, mas ZapA fundido a uma sequência de associação à membrana (MTS) irá concentrar ZapA na membrana da célula, potencializando o seu efeito e tornando sua ação letal (Bisson-Filho, 2009). Deste modo, os mutantes de FtsZ foram testados nas cepas AB52 (*amyE::Pxyl-mciZ*) e AB53 (*amyE::Pxyl-gfp-zapA-mts*) devidamente induzidas (Figura 8). O resultado dos testes está organizado na Tabela 5, que mostra o perfil de resistência de cada mutante. As proteínas FtsZ que foram específicas, provavelmente perderam a capacidade de interagir com MinC, pois não sentem mais apenas a sua ação.

Figura 8. Resistência cruzada das cepas contendo FtsZ mutantes. Os mutantes foram submetidos a três situações letais diferentes, superexpressão de MinD, ZapA-MTS e MciZ. O ensaio foi executado em placa, as cepas contendo cada mutante de FtsZ foram inoculadas e crescidas por aproximadamente 18 horas a 37° C na presença ou na ausência de indutor.

Tabela 5. Resistência cruzada dos mutantes de FtsZ a inibidores de divisão. Os mutantes resistentes à superexpressão de MinD foram testados na superexpressão de MciZ e Zap-MTS. As mutações que foram marcadas com um “x” sobrevivem à superexpressão do modulador indicado.

Mutante	Super-expressão		
	MciZ	Zap-MTS	Min
L69S	x	x	x
T111R			x
T232I		x	x
K243R			x
I245F			x
D255V			x
V260A			x
V282A			x
A285T			x
D287V			x
I293T	x		x
V310A			x
R376T			x

Três das treze mutações identificadas como resistentes na triagem genética tornaram FtsZ resistente à ação de outros inibidores que não MinC. A mutação L69S é um exemplo, esse mutante já havia sido encontrado em triagens de outros projetos executados no nosso laboratório, confirmando assim sua promiscuidade. Essa mutação, localizada na superfície de interação entre duas moléculas de FtsZ, afeta um aminoácido que faz parte da ligação entre monômeros de FtsZ durante a formação dos polímeros. Mutações neste local parecem modificar a estrutura e/ou a afinidade dos polímeros, tornando-os por consequência, mais estáveis e mais resistentes à ação de inibidores. Essa estabilidade é correlacionada com a diminuição da atividade GTPásica, já que concomitante à hidrólise de GTP há uma instabilidade da ligação FtsZ-FtsZ nos polímeros e uma troca com subunidades citoplasmáticas, teoricamente facilitando a ação de inibidores.

4.4. Caracterização de mutações específicas selecionadas

A identificação dos mutantes específicos serviu como base para escolha das mutações mais promissoras. Escolhemos duas substituições mais expostas (K243R e D287V), devido à exposição ser considerada uma característica importante para um sítio de interação. O candidato R376T também foi incluído na caracterização, por ser uma mutação específica e única identificada no CTP de FtsZ. A importância dessa região para interação com moduladores é indiscutível, tendo em vista interações já caracterizadas, como os exemplos já citados, EzrA, FtsA, SepF e MinC de *E. coli*. Por fim, a mutação T111A, uma mutação promíscua, foi incluída na caracterização a título de comparação com as outras mutações escolhidas.

4.5. Microscopia de fluorescência

A caracterização microscópica nos forneceu informações de tamanho das células, bem como a posição dos septos de divisão dos mutantes T111A, K243R, D287V e R376T (Figura 9). Mutantes que se tornaram resistentes à MinC devem apresentar características semelhantes à deleção de *minCD*, como por exemplo, alta incidência de mini-células e alteração no comprimento total das bactérias.

Figura 9. Fenótipo da divisão celular dos mutantes FtsZ. Cepas contendo *minD* induzível por IPTG (*thrC:P_{spac-hy}-minD*, *erm*) além de FtsZ selvagem (WT) ou diferentes alelos de *ftsZ* resistente à MinC. As cepas foram cultivadas em câmaras de LB com e sem 1 mM de IPTG durante 2 horas. As células foram coradas com FM 5-95 e visualizadas em microscópio de fluorescência com objetiva de 100x. As pontas de seta mostram mini-células típicas (vermelho) e mini-células com tamanhos anormais (amarelo). A barra de escala corresponde a 5 μ m.

Calculamos a porcentagem de mini-células em relação ao número total de células em aproximadamente 1000 células por mutante analisado. Como as cepas continham *minD* induzível por IPTG (*thrC:P_{spac-hy}-minD*, *erm*), analisamos também o efeito da superexpressão de MinD na presença dos FtsZs mutantes. As medidas de comprimento foram realizadas em aproximadamente 100 células por mutante analisado (Tabela 6).

Tabela 6. Comprimento médio total das células (μm) e frequência de mini-células (%)

	Tamanho médio (μm)			Mini-células (%)	
	- IPTG	+ IPTG		- IPTG	+ IPTG
WT	4,4	17,1		0	0
ΔminCD	8,1	-		16,5	-
T111A	5,9	9,8		16	14
K243R	5,1	7,9		2,5	17
D287V	4,7	6,2		3,5	5
R376T	9,6	13,6		8	8,5

A superexpressão de MinD aumentou em torno de 4 x o tamanho médio das células selvagens, de 4,4 μm para 17,1 μm . Como esperado, o mesmo tratamento nas células carregando FtsZs mutantes apresentou um aumento menor no tamanho médio das bactérias. Como por exemplo, o mutante K243R, que o comprimento médio das células aumentou de 5,1 μm para 7,5 μm , não atingindo nem 1 x de aumento. Assim, temos FtsZs mutantes que são menos sensíveis a ação do sistema Min. Isso indica que o sistema Min não inibiu a formação de anéis Z nesses mutantes de FtsZ.

Os mutantes, K243R e D287V mostraram uma frequência de minicélulas perto de 3 % (Tabela 6). As mini-células encontradas nesses mutantes tiveram tamanho e aparência de mini-células típicas (Figura 9). A frequência de mini-células igual a 3 % é menor do que a frequência de 16,5 % observada no mutante MinCD

(Levin *et al.*, 1998). Mas significativamente maior que o resultado observado na cepa selvagem (0 %). Isso concorda com as medidas de tamanho de células onde os mutantes K243R e D287V são parcialmente insensíveis à ação de MinC (Tabela 6). Uma situação similar foi reportada para *E. coli*, onde mutantes selecionados por serem resistentes a MinC foram caracterizados como sendo resistentes parciais (Shen e Lutkenhaus, 2010). Quando comparamos o comprimento das bactérias portadoras dos FtsZs mutantes na superexpressão de MinD (por exemplo, K243R = 7,9 μm), com a cepa deletada de MinD portando FtsZ^{WT} (8,1 μm), podemos observar que os valores são próximos. O tamanho também reporta uma perda parcial da ação do sistema Min sobre os mutantes caracterizados.

Um dos fenótipos mais contrastantes foi apresentado pelo mutante FtsZ^{R376T}, que revelou células mais alongadas (Figura 9). Essa mutação está localizada no CTP de FtsZ, local onde já foi caracterizada a interação com alguns moduladores de polimerização. Se essa mutação interferiu com a interação de FtsZ e outros moduladores, além de MinC, isso explica o fenótipo observado. As imagens microscópicas revelam também uma incidência exagerada de mini-células com aparência atípica no mutante T111A (pontas de seta na Figura 9). Isso sugere uma propriedade alterada de FtsZ que vai além da interação com Min, como também o fato desse mutante ser resistente a diversos outros moduladores de FtsZ.

Nossos experimentos mostraram que a indução de MinD, na presença de FtsZ^{K243R} e FtsZ^{D287V}, levam a um aumento na frequência de mini-células (Figura 9). Isso pode indicar que a divisão nas regiões polares tornou-se favorecida quando MinCD está presente por toda a célula. Situação similar foi encontrada na literatura no caso do mutante *divIVA* (Cha, 1997) (Edwards, 1997). Todos esses indícios reforçam a ideia de que os mutantes K243R, D287V e R376T, desenvolveram uma

resistência parcial à ação de MinC, por inibirem a divisão medial. Apesar de aumentar a formação de mini-células, os mutantes D287V e o R376T não atingiram os mesmos níveis do mutante D243R e Δ MinCD (Tabela 6). Assim, permanecem ainda parcialmente sensíveis à MinC, por ter uma porcentagem mais baixa de mini-células que a cepa deletada de MinCD.

4.6. Caracterização in vitro dos mutantes de FtsZ insensíveis a MinC

4.6.1. Monitoramento da polimerização dos FtsZs mutantes por espalhamento elástico de luz

A capacidade de polimerização e o comportamento de FtsZ na presença de MinC foi reportada por sedimentação e espalhamento de luz. Tanto MinC, como FtsZ e seus mutantes foram construídos fusionados a uma cauda de histidina. Isto permitiu que os mutantes fossem purificados por cromatografia de afinidade por níquel seguida de sedimentação por polimerização. Assim, conseguimos selecionar as proteínas ativas, que polimerizam, durante o processo de purificação. Além dos mutantes, purificamos FtsZ selvagem, MinC selvagem e MinC^{G13D}, essa última proteína é a equivalente em *B. subtilis* do mutante não funcional MinC19 de *E. coli* (Hu *et al.*, 1999). MinC19 foi utilizado como um controle para comparação com a MinC selvagem. As proteínas MinC foram purificadas apenas usando cromatografia de afinidade à níquel. A análise da estrutura secundária de todas as FtsZs mutantes por meio do dicroísmo circular confirmaram o correto enovelamento das proteínas (Figura 10).

Figura 10. Dicroísmo circular de FtsZ selvagem e suas versões mutantes. Todas as proteínas testadas possuem o mesmo perfil, não houve nenhuma mudança estrutural provocada pela substituição de aminoácidos nos mutantes.

Inicialmente testamos o comportamento de todos os mutantes por sedimentação (Figura 11). Esse resultado mostrou que a capacidade de polimerização da proteína selvagem e dos mutantes de FtsZ, medida pela massa de polímeros sedimentados, é essencialmente a mesma.

Figura 11. Ensaio de sedimentação de FtsZ^{WT} e mutantes. Reações contendo 7 μ M de FtsZ em tampão de polimerização (Mes/NaOH 50 mM, MgCl₂ 10 mM, KCl 133 mM, DEAE-dextran 0,6 mg/mL, pH 6,5) com 2 mM de GTP. Após centrifugação, os precipitados (P) foram ressuspensos no mesmo volume do sobrenadante (S) e resolvidos por SDS-PAGE.

A seguir, o ensaio de espalhamento elástico de luz foi executado para investigar o efeito de MinC na polimerização de FtsZ. A inibição por MinC foi clara

utilizando uma proporção 1:3 de FtsZ:MinC, quando observou-se uma redução de aproximadamente 80 % no sinal de espalhamento de luz (Figura 12). Esses resultados concordam com dados prévios que relatam a atividade de MinC apenas quando este está em excesso molar em relação à FtsZ (Scheffers, 2008). Além disso, confirmamos que a inibição vista em nossos ensaios é específica, uma vez que a mesma proporção de MinC19 não é capaz de inibir a polimerização de FtsZ (Figura 12A). Em contraste com o resultado obtido com FtsZ^{WT}, todos os mutantes exibiram uma menor sensibilidade à ação de MinC, polimerizando cerca de 80-90 % em relação à polimerização de FtsZ na ausência de MinC (Figura 12B). O mutante que apresentou maior sensibilidade à MinC dentre todos analisados foi R376T, atingindo aproximadamente 70 % de polimerização (Figura 12B). Mesmo assim, a resistência exibida pelos FtsZs mutantes é significativa quando ensaiados *in vitro* e confirma que estas mutações conferem resistência à ação de MinC de maneira direta.

Figura 12. Polimerização dos FtsZs mutantes *in vitro*. A. Traçados representativos do espalhamento de luz proveniente do FtsZ^{WT} na presença e ausência de MinC ou MinC19. As reações continham 7 μ M de FtsZ e 20 μ M de MinC ou MinC19 (Mes/NaOH 50 mM, MgCl₂ 10 mM, KCl 133 mM, DEAE-dextran 0,6 mg/mL, pH 6,5). B. Gráfico de barras que representa a polimerização de cada FtsZ na presença de MinC, tendo como referência (100 %) a polimerização de FtsZ na ausência de MinC.

4.6.2 Monitoramento da polimerização de FtsZs mutantes por microscopia eletrônica

Por meio de uma parceria com os pesquisadores Jefferson Bettini e Rodrigo Portugal, do Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano), realizamos os experimentos de microscopia eletrônica de transmissão. Os mesmos foram conduzidos na ausência de DEAE-dextran, situação próxima à fisiológica. O objetivo era determinar o efeito de MinC na formação de feixes de FtsZ polimérico e avaliar se FtsZs mutantes polimerizavam de maneira semelhante à FtsZ^{WT}.

Experimentos realizados com FtsZ^{WT} exibiram protofilamentos individuais e em feixes nas situações testadas (Figura 13). Testamos as mutantes de FtsZ (T111A, K243R, D255V, D287V e R376T) e todas formaram feixes de protofilamentos semelhantes aos formados pela proteína selvagem (Figura 13). Nos ensaios na presença de MinC as mutantes confirmaram a insensibilidade à ação do inibidor, pois continuaram formando feixes de protofilamentos na presença de MinC (Figura 13, segunda linha). Entretanto, os feixes formados por FtsZs mutantes na presença de MinC são menos regulares que a reação controle, na ausência de MinC. Uma possível explicação para esse fenômeno é uma interação residual de MinC com esses mutantes.

Figura 13. Microscopia eletrônica de transmissão dos polímeros formados na presença e ausência de MinC. 5 μ M de FtsZ^{WT} e das mutantes T111A, K243R, D255V, D287V e R376T em um reação de polimerização (Mes/NaOH 50 mM, MgCl₂ 10 mM, KCl 133 mM, pH 6,5). MinC estava presente nas reações indicadas na concentração de 20 μ M. Barra de escala de 200 nm.

4.6.3. Medida da interação entre FtsZ e MinC por experimentos de fluorescência

A medida de interação direta entre MinC e FtsZ não parece ser uma tarefa fácil, tendo em vista que existem poucos experimentos relatados na literatura mostrando essa interação *in vitro* (Hu *et al.*, 1999) (Shen e Lutkenhaus, 2009) (Shen e Lutkenhaus, 2010). Executamos exaustivas buscas por um ensaio que mostrasse claramente uma interação direta entre FtsZ e MinC. Essa busca incluiu experimentos de SPR (ressonância plasmônica de superfície), co-sedimentação, “pull-down”, “far-western blot”, dentre outras tentativas sem sucesso. Obtivemos sucesso apenas quando medimos a fluorescência intrínseca de aminoácidos triptofano.

FtsZ e MinC não possuem triptofano em sua estrutura naturalmente. Para reportar uma interação direta por fluorescência, entre FtsZ e MinC, inserimos um triptofano em duas regiões diferentes de MinC por mutação sítio-dirigida.

4.6.3.1. Mutação sítio-dirigida para triptofano em MinC

A escolha para substituição não poderia alterar o enovelamento da proteína e era imprescindível que a mesma mantivesse sua atividade. Tendo em vista que a proteína MinC de *B. subtilis* não possuía estrutura resolvida até esse momento, fizemos uma predição de estrutura utilizando a plataforma SWISS-MODEL (Figura 14). A estrutura de MinC de *B. subtilis* foi predita por homologia de sequência com MinC de *Thermotoga maritima* que já possuía sua estrutura resolvida (Cordell *et al.*, 2001).

As posições escolhidas foram a tirosina 44 e a fenilalanina 62 (Figura 14). A escolha dessas posições teve como base o tipo e o posicionamento da cadeia lateral dos aminoácidos: o ideal era estar exposta ao solvente e o substituinte ter cadeia lateral aromática. Estes critérios deveriam minimizar as chances de que a mutação pudesse afetar a função da proteína. Além disso, o aminoácido escolhido deveria estar posicionado no domínio N-terminal da proteína. Sendo que este domínio é a provável porção envolvida na interação com FtsZ. Uma mutação no N-terminal evitaria também uma intervenção na interação com MinD, sendo que em *E.coli* mutações pontuais no domínio C-terminal de MinC afetaram a interação com MinD (Zhou e Lutkenhaus, 2005).

Figura 14. Estrutura de MinC de *B. subtilis* predita pelo software MODELER (Swiss-model). A estrutura de MinC em “cartoon” enfatiza a localização da tirosina 44 e da fenilalanina 62 representadas em esferas laranja e azul, respectivamente. Os dois aminoácidos foram substituídos por um triptofano para reportar a interação com FtsZ por fluorescência.

Para confirmar a estabilidade e funcionalidade de MinC^{Y44W} e MinC^{F62W}, testamos a capacidade das proteínas mutantes de inibir a polimerização de FtsZ *in vitro*, por espalhamento de luz. Apenas a mutante MinC^{Y44W} manteve a habilidade de inibir a formação de polímeros de FtsZ (Figura 15). O efeito de MinC^{Y44W} é comparável ao efeito exibido por MinC^{WT} (aproximadamente 80 % de inibição). Já a mutante MinC^{F62W} quase não inibiu a polimerização de FtsZ, sugerindo que a mutação na posição 62 alterou o sítio de interação com FtsZ, direta ou indiretamente.

Figura 15. Avaliação da atividade dos mutantes contendo triptofano de MinC por espalhamento de luz. O traçado em preto representa a polimerização de 7 μM FtsZ e em cinza a polimerização de 7 μM FtsZ na presença de 20 μM MinC^{Y44W} (A) ou 20 μM MinC^{F62W} (B). Cada reação continha 150 μL de volume total com temperatura controlada de 30° C, foi utilizado o tampão de polimerização (MES/NaOH 50 mM pH 6,5, adicionado de MgCl₂ 10 mM, DEAE-dextran 0,6 mg/mL e KCl 133 mM) e GTP 1 mM.

4.6.3.2. Interação direta entre MinC e FtsZ

Ambas as proteínas (MinC^{Y44W} e MinC^{F62W}) apresentaram um espectro de emissão satisfatório em solução, com pico de emissão em 335 nm, que representa o perfil característico do triptofano. A adição de FtsZ foi capaz de afetar a intensidade do pico de fluorescência de MinC^{Y44W}. Os espectros mostram que a intensidade de fluorescência na curva MinC^{Y44W} na presença de FtsZ foi maior em comparação com o espectro da proteína MinC^{Y44W} sozinha (Figura 16A). Isto indica uma interação

entre as proteínas, que acarreta numa mudança de ambiente químico do triptofano do MinC^{Y44W} na presença de FtsZ. Como controle, realizamos medidas do espectro de emissão de MinC^{F62W} na presença de FtsZ. O resultado foi praticamente o mesmo de MinC^{F62W} sozinho, sugerindo que as proteínas não estão interagindo. Isso corrobora os resultados obtidos nos experimentos de espalhamento de luz, confirmando que a proteína MinC^{F62W} não é funcional (Figura 16). Sendo interpretado como um controle negativo, esse experimento reforça a ideia de que o aumento de sinal do MinC^{Y44W} na presença de FtsZ é um efeito específico que indica uma interação direta com FtsZ.

Figura 16. Fluorescência intrínseca do triptofano de MinC^{Y44W} (A) e MinC^{F62W} (B) na presença (cinza) ou não (preta) de FtsZ. Os ensaios foram feitos em tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,5 adicionado de MgCl₂ 1 mM e 100 mM de KCl. As amostras foram excitadas com uma luz no comprimento de onda de 295 nm. A luz emitida pela amostra foi captada a 90° entre os comprimentos de onda de 320 nm a 360 nm.

Para examinar a interação e medir a afinidade entre FtsZ e MinC, foram realizados testes com concentrações crescentes de FtsZ (0,5; 1; 1,5 e 2 μM) tituladas contra 1 μM de MinC^{Y44W}. Houve um aumento na emissão de fluorescência de MinC^{Y44W} respeitando a titulação de FtsZ (Figura 17) atingindo a saturação com aproximadamente 1-1,5 μM de FtsZ. Utilizamos ensaios com uma concentração maior de KCl (1 M) para avaliar se a interação era afetada pela presença de sal.

Neste experimento vimos que a interação é afetada na presença de 1 M de KCl, indicando que a interação pode ser influenciada por carga (Figura 18).

Figura 17. Espectros de fluorescência de MinC^{Y44W} (1 µM) na presença de FtsZ em diferentes concentrações (0; 0,5; 1; 1,5; 2 µM). Os ensaios foram feitos em tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,5, MgCl₂ 1 mM e KCl 100 mM. As amostras foram excitadas a 295 nm e a emissão captada entre os comprimentos de onda de 320 nm a 360 nm.

Figura 18. Experimento de fluorescência mostrando o efeito do sal na interação MinC-FtsZ. FtsZ^{WT} (2 µM) foi incubado com 1 µM de MinC^{Y44W} em tampão Tris/HCl 20 mM pH 7,5, EDTA 5 mM na presença de 100 mM e 1 M de KCl. O espectro de emissão foi capturado de 320 a 360 nm.

A seguir, utilizamos o ensaio de fluorescência para verificar se houve perda ou diminuição na afinidade das mutantes de FtsZ por MinC. Estabelecemos o

aumento na magnitude da emissão de fluorescência de MinC^{Y44W} promovido por FtsZ^{WT} como 100% e expressamos a mudança na intensidade de fluorescência das mutantes de FtsZ em função desta referência. Os ensaios foram executados com FtsZ^{WT} e as mutantes: T111A, K243R, D287V e R376T. Entretanto, os espectros exibidos pelas FtsZs mutantes não eram significativamente diferentes dos apresentados pela sua versão selvagem (dados não mostrados). Uma possível explicação para o comportamento semelhante entre FtsZ selvagem e mutantes nos ensaios de fluorescência foi que a redução na afinidade dos mutantes por MinC não pôde ser detectada neste ensaio. Somente uma substituição seria suficiente para promover resistência *in vivo*, mas não produziria uma redução de afinidade detectável em nosso ensaio de fluorescência nas condições que o experimento foi conduzido. Uma perda de afinidade parcial concordaria com os resultados apresentados *in vivo*, que mostraram que os FtsZs mutantes não foram totalmente resistentes. Essa hipótese foi colocada a prova pela construção de uma proteína FtsZ duplo-mutante. Partindo do princípio que cada mutação provavelmente causou apenas perda parcial da afinidade de FtsZ por MinC, agrupando duas mutações na mesma proteína teríamos um efeito sinérgico e a perda da afinidade seria maior. Os resíduos de aminoácidos escolhidos para construção da FtsZ duplo mutante foram: K243R e D287V.

Os experimentos de fluorescência foram realizados com o duplo mutante FtsZ^{K243R/D287V} e mostraram que a fluorescência emitida pelo triptofano de MinC^{Y44W} não sofre mudança na presença de FtsZ^{K243R/D287V}, indicando uma perda significativa de interação entre as proteínas (Figura 19).

Figura 19. Interação entre MinC e FtsZ duplo mutante visualizada pela medida da fluorescência intrínseca do triptofano (MinC^{Y44W}). **A.** Espectros de fluorescência do triptofano de MinC, MinC na presença de FtsZ^{WT} e FtsZ duplo mutante (K243R; D287V). **B.** Gráfico de barras contendo a média e o desvio padrão da triplicata experimental.

Esses resultados sugerem que, como proposto, apenas uma substituição em FtsZ não reduziu drasticamente a afinidade por MinC e portanto não foi suficiente para mostrar com clareza a perda de interação por fluorescência. A observação que os aminoácidos expostos na região da hélice H-10 estão envolvidos na interação com MinC confirma que este é o sítio de interação de FtsZ para MinC.

Parte II

A segunda parte dos resultados obtidos na tese traz o mapeamento do sítio de MinC envolvido na interação com FtsZ.

4.7. Estratégia adotada para construção de MinC mutantes

MinC é dividida espacialmente em dois domínios funcionais de diferentes tamanhos, N e C-terminal (Hu e Lutkenhaus, 2000). Se observarmos a estrutura de MinC de *T. maritima*, percebemos que boa parte do domínio C-terminal está envolvido na dimerização da própria proteína. Por outro lado, ligado por uma alça flexível, o domínio N-terminal está livre (Cordell, 2001) (Figura 20). Além disso, há

evidências da participação do N-terminal de MinC na ligação com FtsZ e o C-terminal com MinD e FtsZ também. O N-terminal de MinC é capaz de inibir sozinho a polimerização de FtsZ *in vivo* e *in vitro*, sugerindo assim que essa porção pode estar envolvida na interação (Shen e Lutkenhaus, 2009). Quando esse mesmo domínio é mutado (MinC19), ele perde a capacidade de inibição (Hu *et al.*, 1999). Como passo prioritário para escolha de resíduos potencialmente envolvidos na interação, analisamos os resíduos conservados no domínio N-terminal. Porém, apenas em espécies bacterianas Gram-positivas, já que estamos investigando MinC de *B. subtilis* (Figura 21).

Figura 20. Estrutura cristalográfica de MinC de *T. marítima* (PDB 1HF2). Domínio N-terminal em cinza, C-terminal em verde e a alça flexível entre os dois domínios em vermelho. O destaque dos domínios enfatiza o C-terminal envolvido na dimerização da proteína e o N-terminal livre.

Figura 21. Alinhamento do domínio N-terminal de MinC de espécies Gram-positivas. Os resíduos marcados com pontas de seta vermelhas foram mutagenizados.

Dentre os conservados, os resíduos expostos e carregados positivamente podem ser potenciais pontos de interação, visto que a região de FtsZ para ligação de MinC exibe resíduos carregados negativamente. Durante a caracterização dos mutantes de FtsZ foi observado, nos experimentos de fluorescência, que a interação de FtsZ-MinC parecia ser susceptível a presença de sal (Figura 18). Portanto, a hipótese era que essa interação tenha uma significativa contribuição eletrostática. Para verificar quais resíduos carregados positivamente estão realmente expostos e sua vizinhança, usamos o modelo estrutural de MinC de *B. subtilis* (Figura 22). Além disso, usamos a informação do mutante MinC19, presumindo que este mutante encontra-se em uma região importante para interação com FtsZ (Hu *et al.*, 1999). Assim consideramos a região da mutação equivalente em *B. subtilis* (G13D) como alvo para a mutagênese.

Figura 22. Estruturas de MinC geradas pelo MODELLER do SWISS MODEL. A letra A indica a estrutura em *cartoon* com os resíduos substituídos em vermelho. O item B evidencia uma região altamente positiva (azul) na qual se encontram resíduos de aminoácidos conservados que foram escolhidos como alvo para a mutagênese (setas pretas e amarelas).

Com base nos critérios apresentados, escolhemos os resíduos K12, K15, K57, R61 para substituição. Criamos também uma substituição na lisina 149, que

está localizada no domínio C-terminal de MinC, que em *E. coli* mostrou-se importante para a interação com a extremidade C-terminal desestruturada de FtsZ (CTP) (Shen e Lutkenhaus, 2009). A construção dos mutantes foi feita substituindo os resíduos escolhidos por uma alanina.

Os genes para as versões mutantes de MinC foram clonados em pET24b, superexpressados, purificados e testados para correto enovelamento e ação *in vitro*. Todas as proteínas foram purificadas utilizando apenas cromatografia de afinidade em colunas de níquel, com exceção do mutante R61A, que não apresentou solubilidade e foi descartado.

Comparando os espectros de dicroísmo circular destas proteínas, pudemos confirmar que as mutantes estão estruturadas de forma semelhante à proteína selvagem (Figura 23).

Figura 23. Dicroísmo circular de MinC^{WT} e seus mutantes. Espectros representando as proteínas MinC: WT; Y8A; K12A; K15A; H55A; K57A; H84A; K149A. Todas as versões de MinC possuem um perfil semelhante e não apresentam sinais de desenovelamento.

4.8. Estrutura de MinCN de *B. subtilis*

Em paralelo aos experimentos aqui mostrados, nosso laboratório estabeleceu uma colaboração com a Dra. Ana Zeri (LNBio, Campinas) e a pós-doutoranda Patrícia Castellen, para aplicar biologia estrutural para investigar a interação entre FtsZ e seus moduladores. Para complementar a busca por informações sobre a interação FtsZ-MinC, a pós-doutoranda Patrícia Castellen resolveu a estrutura tridimensional do domínio N-terminal de MinC de *B. subtilis* (MinCN) por RMN (Figura 24) (Castellen *et al.*, 2014).

O assinalamento da estrutura de MinCN permitiu o uso de RMN para investigar a interação entre MinCN e FtsZ. A interação MinC-FtsZ foi investigada por meio de experimentos ^{15}N -HSQC de titulação de ^{15}N MinCN diante de concentrações crescentes de FtsZ. A Figura 25 mostra um mapeamento na estrutura de MinCN dos resíduos encontrados como mais sensíveis à presença de FtsZ. Esses resíduos provavelmente estão envolvidos na interação, pois tem sua ressonância alterada pela presença de FtsZ.

Figura 24. Estrutura tridimensional de MinCN, resolvida por RMN (PDB 2M4I) (Castellen *et al.*, 2014). A imagem mostra um conjunto de 13 confôrmeros de MinCN. Regiões desenoveladas e *loops* estão representados em verde, folhas- β em amarelo e α -hélices em vermelho. As estruturas foram manipuladas utilizando o software PyMOL.

Figura 25. Resíduos de MinC (2M4I) cuja ressonância é mais afetada por FtsZ. Os resíduos representados em vermelho e amarelo mostraram mudanças de ressonância. Em vermelho estão os resíduos de alta afinidade e em amarelo de baixa.

Os resíduos que foram identificados no experimento de RMN estavam localizados na mesma face e voltados para a mesma direção dos resíduos escolhidos para mutagênese anteriormente (Figura 26). Sendo assim, as duas abordagens distintas (conservação e RMN) apontam para a folha β do domínio N-terminal de MinC como sendo o provável ponto de contato com FtsZ. Para aumentar nossas chances de triar uma mutação que abolisse a interação com FtsZ, construímos e incluímos os mutantes MinC^{Y8A}, MinC^{H55A} e MinC^{H84A} (Resíduos vermelhos na Figura 25) em nossos experimentos subsequentes.

Figura 26. Resíduos de MinCN (2M4I) apontados por RMN (vermelho) e os escolhidos prioritariamente pela conservação (verde). A estrutura de MinCN com os resíduos identificados por RMN e escolhidos pela conservação estão localizados na mesma folha β e voltados para mesma face.

4.9. Caracterização *in vitro* dos mutantes MinC

Avaliamos a capacidade dos mutantes de inibirem a polimerização de FtsZ por espalhamento de luz. Dentre os mutantes submetidos ao espalhamento de luz, os mutantes MinC^{K12A} e MinC^{K15A} foram os que menos inibiram a polimerização de FtsZ (Figura 27). Esses dois mutantes permitiram que FtsZ polimerizasse cerca de 20% a mais que na presença de MinC^{WT}. Porém, não atingiu níveis próximos a polimerização de FtsZ na ausência de MinC. Assim, podemos concluir que os resíduos carregados positivamente nas posições 12 e 15 de MinC, quando substituídos por alanina, diminuem a capacidade de inibição da polimerização de FtsZ, sugerindo que as mutações podem ter prejudicado a interação entre MinC e FtsZ.

Os mutantes MinC^{H55A} e MinC^{H84A}, apesar dos resultados da titulação ¹⁵N-HSQC indicarem uma possível participação deles na interação MinC-FtsZ, não exibiram nenhuma alteração em sua atividade quando submetidos ao espalhamento de luz. Portanto, os mutante MinC^{H55A} e MinC^{H84A} parecem ter uma contribuição menor para interação com FtsZ.

Já o mutante MinC^{Y8A}, indicado pelo ¹⁵N-HSQC como candidato a compor o sítio de interação, exibiu um perfil intermediário, a polimerização de FtsZ na presença desse mutante ficou entre os mutantes mais afetados pela mutação e MinC^{WT}. Essa mutação em MinC teve menos efeito que as substituições K12A, K15A e K149A, interferindo menos na atividade de MinC.

Figura 27. Polimerização relativa de FtsZ na presença dos mutantes de MinC. Polimerização de 6,5 μ M de FtsZ e 19 μ M de cada MinC mutante, obtida com o valor de espalhamento de luz de 170 a 250 segundos em três experimentos independentes, parte do gráfico onde a curva está estabilizada. As amostras foram preparadas em tampão HMK (Hepes 50 mM pH 7,7, MgAc 5 mM, KAc 100 mM) e os mutantes testados estão descritos nos rótulos de dados das barras. *FtsZ na ausência de MinC.

4.10. O mutante MinC^{K57A}

Durante a escolha dos aminoácidos que iríamos substituir em MinC para caracterizar a interação com FtsZ, um dos selecionados foi o MinC^{K57A}. Essa mutação foi a única a conferir um aumento inesperado na capacidade inibitória de MinC. Quando submetido ao espalhamento de luz, nas condições testadas, esse mutante inibe a polimerização de forma sensivelmente menor que MinC^{WT} (Figura 28). É importante ressaltar que essa diferença não é significativa. Entretanto, quando a cepa VB30 é crescida em meio LB adicionado de 1 mM de IPTG, situação no qual temos a superexpressão de MinC^{K57A}, esse mutante forma colônias muito menos eficientemente do que o controle (Figura 29).

Figura 28. Polimerização relativa de FtsZ na presença de MinC^{WT} e MinC^{K57A}. Polimerização de 5 μ M de FtsZ e 20 μ M de cada MinC mutante, obtida com o valor de espalhamento de luz de 170 a 250 segundos em três experimentos independentes. As amostras foram preparadas em tampão HMK (Hepes 50 mM pH 7,7, MgAc 5 mM, KAc 100 mM) e os mutantes testados estão descritos nos rótulos de dados. Tampão = FtsZ na ausência de MinC.

Figura 29. Teste de sobrevivência em placa do mutante MinC^{K57A}. As cepas contendo MinC^{WT} e MinC^{K57A} sob o controle do promotor Pspac, foram crescidas em meio LB adicionado de 1 mM IPTG por 18 horas a 37°C para comparação de crescimento.

Para confirmar os resultados observados em placa, as células foram cultivadas na presença de 0,2 - 0,8 mM de IPTG e analisadas por microscopia óptica (Figura 30). As células carregando MinC^{K57A} quando tratadas com 0,8 mM de IPTG atingiram cerca de 19 μ m de comprimento contra cerca de 7 μ m da célula

carregando MinC^{WT} (Tabela 7). Mesmo quando a cepa VB30 era crescida em concentrações menores de IPTG (aproximadamente 0,2 mM), as células filamentavam mais que a cepa contendo MinC^{WT}, sob o controle do mesmo promotor (Tabela 7). Sendo assim, podemos concluir que o efeito letal observado do mutante MinC^{K57A} é devido a um aumento na atividade de MinC.

Figura 30. Microscopia óptica de *B. subtilis* contendo MinC^{WT} e MinC^{K57A} sob controle de promotor pSPAC. As bactérias foram submetidas a concentrações crescentes de IPTG (0,2; 0,4; 0,8 mM). Barra de escala representa 5 μ m.

Tabela 7. Valores das médias de tamanho total das células. Os dados representam aproximadamente 100 células por proteína e concentração de IPTG.

	Tamanho médio (μ m)		
IPTG	0,2 mM	0,4 mM	0,8 mM
MinC-WT	5,48	6,26	7,12
MinC-K57A	7,49	16,15	19,02

Para verificar se a mutação rendeu uma maior afinidade por FtsZ, executamos um experimento de co-purificação, já que não é possível reportar a interação entre FtsZ-MinC^{WT} neste experimento. Entretanto, não obtivemos sucesso

no experimento. Talvez o mutante tenha um aumento de afinidade, mas não o suficiente para podermos confirmar isso pela co-purificação com FtsZ.

4.11. Caracterização *in vivo* dos mutantes de MinC

Para confirmar os dados revelados pelo espalhamento de luz, que sugerem uma perda de atividade nos MinC mutantes, testamos se os mutantes MinC^{Y8A}, MinC^{K12A}, MinC^{K15A}, MinC^{H55A}, MinC^{K57A}, MinC^{H84A} e MinC^{K149A} eram capazes de complementar a deleção de MinC^{WT}, usando como critério o tamanho das células e o número de mini-células.

No ensaio com a cepa contendo MinC^{WT} não induzida, temos o aparecimento de mini-células (16,1 %) e, por consequência, um aumento no tamanho das bactérias (Figura 31). Quando induzimos MinC^{WT} com 0,2 mM IPTG, alcançamos uma condição bem próxima da fisiológica, as células medindo 4,75 µm de comprimento, em média, e o aparecimento de apenas 1 % de mini-células (Tabela 8).

O tamanho das células carregando MinC mutante, em geral, não foi muito alterado, atingindo valores próximos a 6 µm. Entretanto, a porcentagem de aparecimento de mini-células foi aumentada. O mutante MinC^{K15A} se destacou chegando a formar quase 8 % de mini-células e a menor incidência foi de 2,9 % do mutante MinC^{H84A}. Portanto, os mutantes não são completamente ativos, concordando assim com os dados obtidos por espalhamento de luz.

Figura 31. Fenótipo da divisão celular dos mutantes MinC. Cepas contendo um alelo induzível por IPTG (P_{spac}), tanto os mutantes de MinC, como o tipo selvagem. As cepas foram cultivadas em *pads* de LB com 0,2 mM de IPTG durante 3 horas. As células foram preparadas com corante FM 5-95. Barra de escala 5 μm . (*sem IPTG).

Tabela 8. Medidas de tamanho e porcentagem de mini-células

MinC	WT*	0,2 mM IPTG						
		WT	Y8H	K12A	K15A	H55A	H84A	K149A
Tamanho médio (μm)	6,88	4,75	4,81	6,02	5,49	5,88	5,6	5,07
Mini-células (%)	16,1	1,0	5,1	4,6	7,8	3,7	2,9	6,0

Apesar das mutações estarem localizadas no N-terminal de MinC, exceto a K149A, e essa região aparentemente não está envolvida na interação MinC-MinD, examinamos a localização dos MinC mutantes fusionados a GFP. Com a microscopia de fluorescência desses mutantes pudemos avaliar se as mutações em MinC afetaram de alguma forma sua interação com MinD. Isto serviria como evidência que a perda de atividade dos mutantes não se deve a uma alteração generalizada da proteína. Testamos as cepas contendo MinC^{WT} , MinC^{Y8A} , $\text{MinC}^{\text{K12A}}$, $\text{MinC}^{\text{K15A}}$, $\text{MinC}^{\text{H55A}}$, $\text{MinC}^{\text{K57A}}$, $\text{MinC}^{\text{H84A}}$ e $\text{MinC}^{\text{K149}}$ quanto a localização. Por meio

de fusões dos mutantes com GFP, acompanhamos a localização das proteínas mutantes por microscopia de fluorescência. Em todas as cepas testadas a localização de MinC foi mantida como esperado, nos polos e nos septos (Figura 32). Esse resultado confirma que as mutações não afetaram a afinidade de MinC por MinD e consequentemente o recrutamento para a membrana. Sendo assim, a mutação causa apenas a perda de atividade inibitória, confirmando assim que as substituições devem ser específicas para a interação com FtsZ. Além disso, experimentos de *Western Blot* mostraram que as mutações não causaram reduções na concentração intracelular de MinC (Figura 33). Isso confirma que a menor atividade apresentada pelos MinC mutantes não é um artefato da expressão reduzida dos mesmos.

Figura 32. Localização subcelular dos MinC mutantes. As células foram induzidas com 0,2 mM de IPTG e crescidas até a fase exponencial. Cerca de 6 μ L de cada cultura foi inoculado em LB + 1 % agarose em lâminas para microscópio. As microscopias foram realizadas em um microscópio Nikon Eclipse Ti, as imagens foram capturadas usando o software NIS versão 3.07 (Nikon) e processadas com o software ImageJ. Barra de escala representa 5 μ m.

Figura 33. *Western blotting* com os mutantes de MinC fusionados a GFP. O lisado de cada construção foi induzido com 1 mM de IPTG por 1,5 horas. As amostras foram incubadas com anti-GFP e reveladas.

4.12. Modelagem do complexo FtsZ:MinC

Os dados experimentais alcançados com o mapeamento das regiões de interação entre MinC e FtsZ, foram utilizados como restrição para montagem do complexo FtsZ:MinC por *docking molecular*. Essa simulação foi realizada em colaboração com o Dr. Paulo Sérgio Lopes de Oliveira e seu aluno de doutorado Rodrigo Vargas Honorato, que pertencem ao LNBio. A modelagem foi realizada inicialmente com um monômero de FtsZ (PDB 2VAM) e a estrutura do domínio N-terminal de MinC (PDB 2M4I) (Figura 33A). Como resultado, tivemos apenas um complexo de maior pontuação. Esse complexo foi submetido a uma dinâmica molecular de 10 nanosegundos, validando assim a estabilidade do complexo. Esse complexo gerado mostrou que a região de contato mais favorável entre as duas proteínas utiliza a face lateral de FtsZ onde localiza-se a hélice H-10. Essa conformação do complexo, aparentemente, pode permitir a formação de polímeros de FtsZ.

A segunda etapa da análise foi verificar o comportamento da interação entre FtsZ e MinC no contexto de um protofilamento de FtsZ. O filamento foi reconstruído utilizando a estrutura de FtsZ de *B. subtilis* mas baseado no modelo de FtsZ de *Staphylococcus aureus* (PDB 3VOA), a primeira estrutura cristalográfica que capturou FtsZ em estado de protofilamento. Assim, o modelo gerado com o

monômero de FtsZ interagindo com MinCN foi rearranjado com base no filamento de FtsZ de *S. aureus* (Figura 33).

O modelo de interação tendo o filamento de FtsZ (PDB 3VOA) como referência, confirmou que não há interferência de MinC na região de contato FtsZ-FtsZ. Sendo assim, temos apenas a região em torno da hélice H-10 na lateral dos protofilamentos como ponto de contato com MinC. Assim, podemos sugerir que MinC em *B. subtilis* atua inibindo a formação de interações laterais entre protofilamentos de FtsZ, impedindo assim a formação de anéis Z funcionais.

Figura 33. *Docking molecular* do complexo FtsZ – MinC. FtsZ (PDB 2VAM) está representado em cinza e MinCN (PDB 2M4I) em vermelho. A) Complexo de interação de FtsZ monomérico e MinCN. B) Complexo mostrado no item A da figura com FtsZ polimérico, por meio de interações cabeça cauda.

Buscamos também saber qual é a contribuição energética de cada resíduo para esse complexo. Essa análise foi feita ao longo de uma dinâmica molecular, onde a cada passo de simulação (intervalos de 0.025 nanosegundos) calculava-se a energia de interação do complexo e de cada um dos resíduos da interface. Os resíduos da interface foram substituídos por alanina e foi calculado novamente sua

energia de interação. Subtraindo a energia antes e depois de cada uma das substituições, tem-se a contribuição energética de cada resíduo, tanto de MinC, como de FtsZ (Figura 34). Os resíduos que tiveram alterada sua contribuição energética para interação, estão próximos ou são exatamente os resíduos identificados experimentalmente (Figura 34).

Figura 34. Cálculo da contribuição energética residual para a interação molecular entre FtsZ e MinC (*alanine scanning virtual*).

5. DISCUSSÃO

O sítio de ligação de MinC em FtsZ

A primeira parte da tese trouxe informações alcançadas utilizando abordagens genética e bioquímica para identificar o sítio de ligação para MinC em FtsZ de *B. subtilis*. Por meio de uma triagem genética de mutantes gerados por EPP, selecionamos substituições que conferiram resistência específica a MinC. A maioria dos resíduos identificados estavam localizados em torno das hélices H9 e H10 no domínio C-terminal de FtsZ. Além destas substituições, encontramos uma substituição no CTP, região já descrita como alvo para ligação de moduladores de FtsZ (Singh *et al.*, 2007; Singh *et al.*, 2008; Ma e Margolin, 1999; Shen e Lutkenhaus, 2009). Alguns trabalhos anteriores já haviam sugerido que alguns dos resíduos mutados em FtsZ encontrados nessa tese eram importantes para a interação com MinC. Como é o caso da triagem realizado por Feucht e Errington, 2005, que inicialmente isolou mutantes de FtsZ viáveis, a partir de uma biblioteca randômica gerada por *E. coli* XL1 *red*. O fenótipo observado nas bactérias carregando essas FtsZs mutantes foi um aumento na formação de mini-células, assim foi sugerida uma insensibilidade à ação de MinC (Feucht e Errington, 2005). Quando comparamos os mutantes resistentes encontrados nesta tese com os desse grupo, três deles se repetem (*ftsZ4*-A285T, *ftsZ3*-V260A, *ftsZ24*-I245F). Subsequentemente, outro trabalho selecionou mutantes resistentes a superexpressão de GFP-MinC-MinD (de Oliveira *et al.*, 2010). Os mutantes encontrados foram: S219L, A285T e L302P, dentre estes, apenas a alanina 285 foi encontrada em nossa triagem, mas o mutante não foi caracterizado. Porém, esses mutantes eram defeituosos na sua capacidade de polimerização *in vitro*, não sendo

possível estabelecer uma explicação conclusiva sobre como as mutações causaram resistência a MinC (de Oliveira *et al.*, 2010).

Nossos dados trazem uma extensa caracterização bioquímica de um grupo de mutações presentes nas hélices H9 e H10 de FtsZ, que indicam que esse é o sítio de interação com MinC em *B. subtilis*. Além disso, mostramos uma primeira evidência da participação do CTP na interação com MinC em *B. subtilis*. Isso nos leva a crer que a interação se dá, tanto pelas hélices H9-H10, como pelo CTP de FtsZ. Isso foi provado com mutações nessas regiões que conferiram resistência específica a MinC. Como as propriedades de polimerização dos mutantes são basicamente iguais às da proteína selvagem, esses resultados indicam que as mutações prejudicaram apenas a capacidade de interação com MinC. Ao invés de uma mutação que alterasse as propriedades de polimerização de FtsZ. Como a substituição I293T, que foi encontrada em nossa triagem, mas não foi caracterizada por apresentar resistência a outros moduladores. Isso levaria a proteína mutante exibir um fenótipo inconclusivo sobre a resistência a MinC.

Alguns outros resíduos identificados, mas não caracterizados, na triagem também se encontravam enterrados na estrutura de FtsZ (V260 e V310). Esses resíduos de aminoácidos estão localizados na folha β que está em contato com as hélices H9 e H10 e quando substituídos devem alterar o sítio de interação com MinC. Uma alteração estrutural nessa folha β pode promover uma mudança por completo das duas hélices. Essas mutações podem ter gerado a resistência observada de forma indireta na nossa triagem e de outros grupos, como é o caso do mutante V260A (de Oliveira *et al.*, 2010) (Feucht e Errington, 2005).

Outro fato importante é que a região onde estão posicionadas as hélices H9 e H10 possui um potencial eletrostático de superfície negativo na proteína (Figura 35

B). Com esta informação sugerimos que a interação entre essas duas proteínas possivelmente depende de um componente eletrostático. Scheffers e colaboradores (2008), já haviam mostrado uma sensibilidade da interação entre MinC-FtsZ a variações no pH. Confirmamos essa hipótese observada pela superfície eletrostática de FtsZ realizando experimentos de espectroscopia de fluorescência com concentrações mais altas de sal, do que a comumente utilizada, e vimos uma perda de afinidade entre MinC-FtsZ *in vitro* (Figura 18). Em *E. coli*, isso também já foi investigado e a interação é severamente reduzida na presença de 500 mM de KCl (Hernández-Rocamora *et al.*, 2013). Em conclusão, é possível que as cargas exerçam um papel importante para a interação MinC-FtsZ em *E. coli* (Hernández-Rocamora *et al.*, 2013), bem como em *B. subtilis*.

Figura 35. Estrutura de FtsZ (2VAM) com os resíduos de ligação para MinC em *B. subtilis* e *E. coli*. **A.** Mutações que conferem resistência em *B. subtilis* (esferas vermelhas) e *E. coli* (esferas azuis). Resíduo catalítico D213 está em amarelo. O ponto onde emerge o CTP (F315) é mostrado em laranja. **B.** Superfície eletrostática de FtsZ obtida com a ferramenta “protein contact potencial” do PyMol.

A localização das mutações identificadas nessa tese como sítio de interação com MinC, coincide com o ponto de onde emerge o CTP (localização da mutação R376T) na estrutura de FtsZ (esfera laranja, Figura 35). Consequentemente,

sugerimos que essas duas regiões, hélices H9/H10 e CTP, podem interagir com MinC simultaneamente devido a essa proximidade espacial. O resíduo mutado no CTP (R376T) que confere resistência tanto *in vitro*, como *in vivo* em *B. subtilis*, é conservado em *E. coli*. Nesta última espécie citada, há mutações em quatro resíduos no CTP que causam resistência à superexpressão do domínio N-terminal de MinC (D373E, I374V, L378V, K380M) (Shen e Lutkenhaus, 2009). Entretanto, o aminoácido R379, equivalente ao R376 em *B. subtilis*, não foi encontrado nesta triagem. No entanto, esse mesmo resíduo que é importante para interação com MinC, também é parte do contato com FtsA e SepF (Szwedziak *et al.*, 2012) (Król *et al.*, 2012). Isso sugere que existam diferenças no mecanismo pelo qual MinC age nessas espécies. FtsA promove a montagem do anel Z ancorando-o a membrana e SepF está envolvida na organização dos polímeros de FtsZ, de modo a estabilizá-los (Pichoff e Lutkenhaus, 2005) (Gundogdu *et al.*, 2011). Como o resíduo na posição 376 faz parte da interação com estas proteínas, MinC pode impedir e/ou até deslocar FtsA e SepF do CTP de FtsZ, tornando mais susceptível a desmontagem.

É digno de nota termos identificado apenas uma mutação no CTP enquanto a triagem em *E. coli* identificou várias. Isto pode ter relação com o fato de que os dois trabalhos de Shen e Lutkenhaus (2009 e 2010), triaram mutantes de FtsZ resistentes à superexpressão do N- e C-terminal de MinC independentemente, identificando dois sítios de interação em FtsZ para MinC, um deles localizado no CTP de FtsZ, e outro sítio localizado na região de interação FtsZ-FtsZ. A estratégia de triagem pode explicar o porquê tivemos a grande maioria das mutações localizadas nas hélices H9-H10. Nossa triagem foi realizada utilizando a MinC completa, por consequência nossa seleção de mutantes pode ter favorecido os mutantes na hélice H9/H10. Tendo em vista que o mutante FtsZ^{R376T} tem um fenótipo de divisão alterado e o

CTP é alvo para outros moduladores, mutações nessa região tendem a afetar o funcionamento normal da divisão, como já citado anteriormente.

Foram identificadas também mutações em resíduos localizados na interface de polimerização de FtsZ (L69 e T111). Essas mutações são conhecidas por alterarem a atividade GTPásica de FtsZ, e consequentemente, a dinâmica de polimerização (Redick *et al.*, 2005). A leucina 68, equivalente a L69 em *B. subtilis*, quando mutada em *E. coli* mostrou atividade GTPásica reduzida, 2-30 vezes, dependendo da substituição (Redick *et al.*, 2005). Já a mutação na treonina 111 causa uma atividade GTPásica reduzida (10x), mas não afeta a concentração crítica da proteína (Bisson-Filho, 2014). Este fato é esperado, já que a treonina 111 não participa da interação longitudinal de FtsZ. Dentre as mutações encontradas, temos ainda a I293T que está localizada próxima à alça T7, onde existem resíduos essenciais para hidrólise de GTP. Mutações em resíduos próximos à isoleucina 293 (W319Y em *M. jannaschii*, I294W em *E. coli*) possuem uma redução na atividade GTPásica (Oliva *et al.*, 2003) (Diaz-Espinoza *et al.*, 2007). Por último, identificamos a mutação T232I, localizada fora da interface de interação FtsZ-FtsZ. Essa mutação não tornou FtsZ resistente especificamente à MinC, pois apresentou resistência cruzada com ZapA-MTS (Tabela 5). Apesar disto sugerir uma alteração na atividade GTPásica, não temos a medida da mesma. Desta maneira, uma melhor caracterização dessa mutação seria necessária para explicar sua resistência inespecífica à MinC.

A identificação dos aminoácidos de FtsZ importantes para interação com MinC contribui para o entendimento e sugestão do mecanismo de ação de MinC. Vimos que em *E. coli*, o CTP e a hélice H10 de FtsZ interagem com MinC. A interação entre o domínio C-terminal de MinC com o CTP de FtsZ, ancora MinC ao

anel Z e a interação com o N-terminal tem o efeito inibitório. Esse efeito inibitório é baseado na desestabilização dos protofilamentos, já que os resíduos identificados em *E. coli* fazem parte da interface de interação FtsZ-FtsZ (Shen e Lutkenhaus, 2010).

Regiões importantes de MinC para interação com FtsZ

Na segunda parte da tese, nós abordamos a identificação e caracterização dos aminoácidos de MinC envolvidos na interação com FtsZ. Para tanto, utilizamos métodos de mutação sítio dirigida, microscopia de fluorescência, RMN e espalhamento de luz, combinados para produzir e caracterizar os mutantes MinC. Os resíduos caracterizados foram inicialmente sugeridos com base no sítio identificado em FtsZ, que estão em uma superfície altamente negativa (Figura 35). Mostramos também que a presença de sal interfere na interação MinC-FtsZ (Figura 24) e recentemente foi mostrado que o efeito de MinC é dependente da força iônica (Hernández-Rocamora *et al.*, 2013). Em síntese, os resíduos expostos, conservados e carregados positivamente, serviram como guia para introduzir mutações pontuais em MinC.

Apesar da importância do sistema Min, pouco é conhecido sobre mutantes de MinC. Em *E. coli* temos a informação do mutante MinC 19, cuja substituição correspondente em *B. subtilis* é G13D (Hu *et al.*, 1999). Essa mutante exibiu nos resultados desta tese o mesmo comportamento observado nos experimentos *in vitro* realizados em *E. coli*. Por ser uma mutação que não altera a capacidade de interação com MinD, nem sua afinidade por ela mesma, presumimos ser uma deficiência específica. O resíduo mutado é vizinho das lisinas 12 e 15 em MinC, caracterizadas como importantes na interação com FtsZ.

A superfície onde estão localizados os resíduos K12 e K15 teve sua participação na interação com FtsZ confirmada por RMN. No experimento ^{15}N -HSQC, titulações de FtsZ mostraram resíduos envolvidos na interação MinCN e FtsZC. Os principais resíduos identificados de alta afinidade (Y8, H55 e H84) estão localizados na mesma folha β onde se encontram K12 e K15. A confirmação da participação desses resíduos na interação com FtsZ foi obtida com os resultados de espalhamento de luz e os dados de microscopia (Figuras: 27 e 31; Tabela 8).

Assim, nossos resultados confirmaram a sugestão que a região das fitas betas do domínio N-terminal de MinC é a região mais provável para interação com FtsZ. Conjuntamente estendemos o conhecimento sobre a região de interação com FtsZ mapeando onde é a localização exata do sítio nesse domínio de interação. Além das evidências experimentais dessa tese, é sabido que outras espécies usam o domínio C-terminal para dimerizar e o N-terminal é livre. O dímero de MinC de *T. marítima* é um exemplo, mantido quase que exclusivamente pela interação dos domínios C-terminais de MinC. Já a orientação do N-terminal é variável, devido a um link flexível entre os dois domínios (Cordell *et al.*, 2001). Em *E. coli*, o domínio C-terminal de MinC está envolvido na interação com MinD e com MinE (Wu *et al.*, 2011). Consequentemente, o domínio C-terminal de MinC está próximo à membrana e pode competir com FtsA e ZipA pela interação com o CTP de FtsZ (Dajkovic *et al.*, 2008) (Shen e Lutkenhaus, 2009) (Wu *et al.*, 2011). Baseado nesses dados, o N-terminal de MinC se estende para longe do contato com a membrana e essa pode ser a superfície envolvida na interação com as subunidades de FtsZ no filamento (Shen e Lutkenhaus, 2010). Entretanto, Shen e Lutkenhaus (2009 e 2010), mostraram a importância dos dois domínios para interação com FtsZ. Assim, a distância da membrana não parece ser um fator tão relevante para interação entre

as duas proteínas. Dessa forma, esses dados sugerem que o domínio N-terminal é o alvo mais provável para o contato com FtsZ.

Por outro lado, uma estrutura cristalográfica resolvida recentemente de MinC N-terminal de *E. coli* apresenta dímeros. Esses dímeros estão estabilizados por um “*domain swapping*”, no qual duas fitas β , uma de cada domínio N-terminal de MinC, interagem entre si (An *et al.*, 2013). Essa não é a primeira estrutura dimérica do domínio N-terminal de MinC. Em *Salmonella typhimurium*, a estrutura cristalográfica mostra uma interação entre os domínios N-terminais (3GHF), porém os dados dessa estrutura não foram publicados. Há a possibilidade de que essas estruturas diméricas de *E. coli* e *S. typhimurium* possam ser artefatos cristalográficos. Essa hipótese é levantada devido a estrutura de *T. marítima*, não utilizar o N-terminal para dimerizar. Além dos dados estruturais de MinC inteira, temos dados de cromatografia de exclusão molecular e RMN, onde a construção com apenas o N-terminal de MinC em *B. subtilis* comporta-se como um monômero (Patrícia Castellen, dados não publicados). Sabe-se também que o domínio C-terminal de MinC de *B. subtilis* é altamente conservado, uma provável interface de dimerização. Quando localizamos os resíduos caracterizados nesta tese na estrutura de MinC, foi possível observar que não fazem parte das interações hidrofóbicas, nem dos aminoácidos importantes para manter o dímero de *E. coli*. Podendo assim, formarem, mesmo que dimerizados, uma superfície de interação por meio dos aminoácidos expostos no “*domain swapping*”. Isso sugere que o N-terminal de MinC de *B. subtilis* poderia fazer parte da dimerização, mas isso não foi visto nas diversas argumentações supracitadas.

Sob o ponto de vista mecanístico a despolimerização de FtsZ por MinC é um processo pouco compreendido. A maior parte das informações sobre a interação

dessas proteínas tem como modelo *E. coli*. Em *E. coli* existe um modelo proposto, como já citado, dos autores Shen e Lutkenhaus (2010) que preveem que MinC interage com FtsZ primeiramente usando seu C-terminal para ancorar ao CTP de FtsZ. Depois disso, o domínio N-terminal de MinC interage com a hélice H10, numa região de interação FtsZ-FtsZ, e causa uma ruptura na estrutura longitudinal do protofilamento.

A interface de interação com MinC indicada por Shen e Lutkenhaus não é exposta ao solvente quando FtsZ está polimerizado, mas os autores discutem que a exposição acontece com a hidrólise de GTP. Arumugam e colaboradores, 2014 utilizaram o modelo de Shen e Lutkenhaus para propor mais detalhes ao mecanismo de atividade de MinC. Esses autores sugeriram que MinC explora a atividade GTPásica de FtsZ para agir na desmontagem dos protofilamentos. Isso explicaria o fato de a mutação em MinC, e também em ZapA e EzrA, terem apenas um modesto efeito sobre o comportamento dinâmico de FtsZ *in vivo* (Anderson *et al.*, 2004). Dessa forma, parece que a inibição em *E. coli* é acoplada a atividade de troca de FtsZ do protofilamento com as subunidades citoplasmáticas. Assim, MinC ocupa os protofilamentos randomicamente, no espaço deixado pela saída da subunidade de FtsZ e impede a adição de novas subunidades (Arumugam *et al.*, 2014).

Nossos dados indicam que MinC de *B. subtilis* também pode interagir com FtsZ via os dois domínios. Tendo em vista que identificamos a região em torno da hélice H-10 e a mutação R376T, presente no CTP, como importantes para FtsZ interagir com MinC. E MinC, por sua vez, mostrou a face de folha β no domínio N-terminal essencial para ação da proteína, representado nos resultados pelas mutantes Y8A, K12H e K15H. Além do domínio N-terminal de MinC, caracterizamos uma mutação no C-terminal, K149A, que interfere na capacidade de MinC inibir a

polimerização de FtsZ. Mutações esta que é correspondente à mutação R172A que inativa o domínio C-terminal de *E. coli* (Zhou e Lutkenhaus, 2005).

Dentro desse contexto, todos os resultados experimentais até o momento indicam que MinC em *B. subtilis* impede a interação lateral entre protofilamentos, dificultando, ou até mesmo impedindo, seu agrupamento em feixes, evento necessário para formação do anel Z. Sem participação na desmontagem ou impedimento da interação cabeça cauda de FtsZ. Por fim, submetemos MinC e FtsZ a um *docking molecular*. O complexo com mais alta pontuação mostrou que a interação se dá apenas na interface lateral dos protofilamentos (Figura 33). Esta é uma importante contribuição porque não há nenhuma tentativa com sucesso de cristalizar o complexo FtsZ-MinC, devido a afinidade entre os parceiros não parecer ser muito alta. Além de assistir a definição do mecanismo de ação de MinC, só existe na literatura atualmente um complexo FtsZ-modulador publicado (SulA) (Cordell *et al.*, 2003) e outro submetido (MciZ). A título de validação dos aminoácidos envolvidos na interação, investigamos também qual a contribuição energética de cada resíduo, de FtsZ e MinCN, para o complexo por *alanine scanning* virtual. Resíduos de FtsZ, como o K243 e o D287 apareceram no experimento como importante para energética da interação. Em MinCN, o resíduo 15 e a vizinha dos resíduos H55 e H84, quando mutados para alanina *in silico*, alteram a energia de interação também. Confirmando assim, a caracterização e o complexo gerado pelo *docking molecular*.

Alguns experimentos preliminares realizados por Patrícia Castellen e Alexandre Bisson, membros do nosso laboratório, validam especificamente o modelo de complexo sugerido pelo *docking molecular*. Para tanto, o experimento utilizou o mutante de FtsZ (L69W), sua mutação está localizada na interface longitudinal de

interação FtsZ-FtsZ e por fluorescência monitoramos a polimerização de FtsZ (dados não publicados). Vimos que MinC não altera a fluorescência emitida por FtsZ^{L69W} polimerizado, isso indica que MinC não impede e/ou desfaz polímeros individuais, confirmando o modelo do complexo *in silico*.

Por fim, concluímos que nossos mutantes de FtsZ indicaram uma face de interação em FtsZ significativamente diferente da encontrada para *E. coli* e os resíduos identificados não tem participação na interação longitudinal FtsZ-FtsZ. Essa diferença mostra que o mecanismo de ação de MinC deve ser realmente diferente entre essas espécies (Figura 36). Características da nossa triagem de FtsZs resistentes à ação de MinC revelaram que chegamos próximo à saturação, isso descarta a possibilidade dos resíduos de FtsZ encontrados em *E. coli* não terem sido encontrados nessa tese. O N-terminal de MinC possui uma baixa similaridade (17% de identidade) quando a comparação é entre Gram-positivas e Gram-negativas. Isso é refletido no comportamento diferente das proteínas MinC em *E. coli* e *B. subtilis*. Em *E. coli*, MinC possui um comportamento oscilatório de um polo ao outro, promovido por MinD e MinE, mas independente de FtsZ (Raskin e de Boer, 1999). Já em *B. subtilis*, esse comportamento não é observado, sugerindo que os mecanismos de inibição possam ter caminhos diferentes. Além do comportamento de MinC, FtsZ tem propriedades distintas em *E. coli*, quando comparado a *B. subtilis* (Buske e Levin, 2012). O comportamento está atrelado a interação lateral entre protofilamentos de FtsZ, que foi sugerida como dependente das forças eletrostáticas dos resíduos no extremo C-terminal em *B. subtilis*. Mutações nessa região são capazes de abolir a interação lateral *in vitro* e diminuir a frequência de anéis Z *in vivo* (Buske e Levin, 2012). Como resultado foi observado que FtsZ de *B. subtilis* tem uma tendência maior que a mesma proteína em *E. coli* para formação de feixes de

protofilamentos (Buske e Levin, 2012). Dessa forma, vimos que diversos aspectos evidenciam que as proteínas em *E. coli* e *B. subtilis* são diferentes, não é surpreendente que os mecanismos tenham se mostrado diferentes.

Em síntese, obtivemos um complexo MinC-FtsZ baseado na identificação experimental de resíduos importantes para interação e esse complexo foi a base para propormos o mecanismo do inibidor MinC (Figura 36). Esta tese é mais um exemplo da importância de desvendar processos gerais em bactérias modelo diferentes. Já que muitas vezes modelos desvendados em *E. coli* não se aplicam a outras espécies.

Figura 36. Modelo de interação FtsZ-MinC. O modelo para *B. subtilis* foi baseado nos dados dessa tese e para *E. coli* modificado do modelo proposto por Arumugam e colaboradores, 2014. FtsZ (azul), MinC de *B. subtilis* (cinza) e de *E. coli* (vermelho), FtsZ+GDP (verde).

6. REFERÊNCIAS

- An, J. Y., Kim, T. G., Park, K. R., Lee, J., Youn, H., Lee, Y., Kang, J. Y., Kang, G. B., Eom, S. H. (2013). Crystal structure of the N-terminal domain of MinC dimerized *via* domain swapping. **Journal of Synchrotron Radiation**, v. 20, p. 984-988.
- Adam, D. W. e Errington, J. (2009). Bacterial cell division: assembly, maintenance and disassembly of the Z-ring. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, p. 642-653.
- Adler, H. I., Fisher, W. D., Cohen, A., Hardigree, A. A. (1967). Miniature *Escherichia coli* cells deficient in DNA. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 57, p. 321-326.
- Anderson, D. E., Gueiros-Filho, F. J., Erickson, H. P. (2004). Assembly dynamics of FtsZ rings in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* and effects of FtsZ-regulating proteins. **Journal of Bacteriology**, v. 186, p. 5775-5781.
- Arumugam, S., Chwastek, G., Fischer-Friedrich, E., Ehrig, C., Mönch, I., Schwille, P. (2012). Surface topology engineering of membranes for the mechanical investigation of the tubulina homologue FtsZ. **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.** v. 51, p. 11858-11862.
- Arumugam, S., Petrasek, Z., Schwille, P. (2014). MinCDE exploits the dynamics nature of FtsZ filaments for its spatial regulation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 111, p. 1192-1200.
- Bernhardt, T. G. e de Boer, P. A. (2005). SlmA, a nucleoid-associated, FtsZ binding protein required for blocking septal ring assembly over chromosomes in *E. coli*. **Molecular Cell**, v. 18, p. 555-564.
- Bi, E. F., Lutkenhaus, J. (1993). Cell division inhibitors Sula and MinCD prevent formation of the FtsZ ring. **Journal of Bacteriology**, v. 175, p. 1118-1125.
- Bi, E. F., Lutkenhaus, J. (1991). FtsZ ring structure associated with division in *Escherichia coli*. **Nature**, v. 354, p. 161-164.
- Bisson-Filho, A. W. (2009). Estudo genético da interação entre FtsZ e o modulador de divisão ZapA em *Bacillus subtilis*. **Dissertação de mestrado**. http://www.dominiopublico.gov.br/pesquisa/DetalheObraForm.do?select_action=&co_obra=142278.
- Bisson-Filho, A. W. (2014). Estrutura e mecanismos de MciZ, um capeador da extremidade menos de FtsZ em *Bacillus subtilis*. **Tese de doutorado**.
- Bramhill, D. e Thompson, C. M. (1994). GTP-dependent polymerization of *Escherichia coli* FtsZ protein to form tubules. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 91, p. 5813-5817.
- Bramkamp, M., Emmins, R., Weston, L., Donovan, C., Daniel, R. A., Errington, J. (2008). A novel component of the division-site selection system of *Bacillus subtilis* and a new mode of action for the division inhibitor MinCD. **Molecular Microbiology**, v. 70, p. 1556-1569.

Buske, P. J. e Levin, P. A. (2012). Extreme C terminus of bacterial cytoskeletal protein FtsZ plays fundamental role in assembly independent of modulatory proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, p.10945-10957.

Castellen, P., Sforça, M. L., Gueiros-Filho, F. J., de Mattos Zeri, A. C. (2014). Backbone and side chain NMR assignments for the N-terminal domain of the cell division regulator MinC from *Bacillus subtilis*. **Biomolecular NMR Assignments**, [Epub ahead of print]

Chen, Y., Milam, S. L., Erickson, H. (2012). SulA inhibits assembly of FtsZ by a simple sequestration mechanism. **Biochemistry**, v. 51, p. 3100-3109.

Cho, H., McManus, H. R., Dove, S. L., Bernhardt, T. G. (2011). Nucleoid occlusion factor SlmA is a DNA-activated FtsZ polymerization antagonist. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 108, p. 3773-3778.

Chung, K., Hsu, H., Yi, H., Chang, B. (2007). Mechanism of regulation of prokaryotic tubulin-like GTPase FtsZ by membrane protein EzrA. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, p. 14891-14897.

Cordell, S. C., Anderson, R. E., Lowe, J. (2001). Crystal structure of the bacterial cell division inhibitor MinC. **The EMBO Journal**, v. 20, p. 2454-2461.

Cordell, S. C., Lowe, J. (2001). Crystal structure of the bacterial cell division regulator MinD. **The FEBS Letters**, v. 492, p. 160-165.

Cordell, S. C., Robinson, E. J. H., Lowe, J. (2003). Crystal structure of the SOS cell division inhibitor SulA and in complex with FtsZ. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 100, p. 7889-7894.

Dai, K., Mukherjee, A., Xu, Y., Lutkenhaus, J. (1994). Mutations in *ftsZ* that confer resistance to SulA affect the interaction of FtsZ with GTP. **Journal of Bacteriology**, v. 176, p. 130-136.

Dajkovic, A., Lan, G., Sun, S. X., Wirtz, D., Lutkenhaus, J. (2008). MinC spatially controls bacterial cytokinesis by antagonizing the scaffolding function of FtsZ. **Current Biology**, v. 18, p. 235-244.

Dajkovic, A., Mukherjee, A., Lutkenhaus, J. (2008). Investigation of regulation of FtsZ assembly by SulA and development of a model for FtsZ polymerization. **Journal of Bacteriology**, v. 190, p. 2513-2526.

Dajkovic, A., Pichoff, S., Lutkenhaus, J., Wirtz, D. (2010). Cross-linking FtsZ polymers into coherent Z rings. **Molecular Microbiology**, v. 78, p. 651-668.

de Oliveira, I. F., de Sousa Borges, A., Kooij, V., Bartosiak-Jentys, J., Luirink, J., Scheffers, D. J. (2010). Characterization of *ftsZ* mutations that render *Bacillus subtilis* resistant to MinC. **PLOS one**, v. 5, p. 1-10.

Díaz-Espinoza, R., Garcés, A. P., Arbildua, J. J., Montecinos, F., Brunet, J. E., Lagos, R., Monasterio, O. (2007). Domain folding and flexibility of *Escherichia coli* FtsZ determined by tryptophan site-directed mutagenesis. **Protein Science**, v. 16, p. 1543-1556.

- Duman, R., Ishikawa, S., Celik, I., Strahl, H., Ogasawara, N., Troc, P., Lowe, J., Hamoen, L. W. (2013). Structural and genetic analyses reveal the protein SepF as a new membrane anchor for the Z ring. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 48, p. 4601-4610.
- Durand-Heredia, J., Rivkin, E., Fan, G., Morales, J., Janakiraman, A. (2011). Identification and characterization of ZapC, a stabilizer of the FtsZ ring in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 193, p. 1405-1413.
- Durand-Heredia, J., Rivkin, E., Fan, G., Morales, J., Janakiraman, A. (2012). Identification of ZapD as a cell division factor that promotes the assembly of FtsZ in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 194, p. 3189-3198.
- Erickson, H. P. (1997). FtsZ, a tubulin homolog, in prokaryote cell division. **Trends Cell Biology**, v. 7, p. 362-367.
- Erickson, H. P., Anderson, D. E., Osawa, M. (2010). FtsZ in bacterial cytokinesis: cytoskeleton and force generator all in one. **Microbiology Molecular Biology Review**, v. 74, p. 504-528.
- Erickson, H. P., Taylor, D. W., Taylor, K. A., Bramhill, D. (1996). Bacterial cell division protein FtsZ assembles into protofilament sheets and minirings, structural homologs of tubulin polymers. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 93, p. 519-523.
- Feucht, A. e Errington, J. (2005). ftsZ mutations affecting cell division frequency, placement and morphology in *Bacillus subtilis*. **Microbiology**, v. 151, p. 2053-2064.
- Galli, E. e Gerdes, K. (2010). Spatial resolution of two bacterial cell division proteins: ZapA recruits ZapB to the inner face of the Z-ring. **Molecular Microbiology**, v. 76, p. 1514-1526.
- Galli, E. e Gerdes, K. (2012). FtsZ-ZapA-ZapB interactome of *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 194, p. 292-302.
- Goley, E. D., Dye, N. A., Werner, J. N., Gitai, Z., Shapiro, L. (2010). Imaging-based identification of a critical regulator of FtsZ protofilament curvature in *Caulobacter*. **Cell**, v. 39, p. 975-987.
- Gueiros-Filho, F. J. (2012). In: Graumann, P. I. ed *Bacillus: Cellular and Molecular Biology*, 2nd Ed, p. 85-122, **Caister Academic Press**, Norfolk.
- Gueiros-Filho, F. J. and Losick, R. (2002). A widely conserved bacterial cell division protein that promotes assembly of the tubulin-like protein FtsZ. **Genes Development**, v. 16, p. 2544-2556.
- Gundogdu, M. E., Kawai, Y., Pavlendova, N., Ogasawara, N., Errington, J., Scheffers, D. J., Hamoen, L. W. (2011). Large ring polymers align FtsZ polymers for normal septum formation. **EMBO Journal**, v. 30, p. 617-626.
- Haeusser, D. P., Schwartz, R. L., Smith, A. M., Oates, M. E., Levin, P. A. (2004). EzrA prevents aberrant cell division by modulating assembly of the cytoskeletal protein FtsZ. **Molecular Microbiology**, v. 52, p. 801-814.

Hale, C. A. e de Boer, P. A. J. (1997). Direct Binding of FtsZ to ZipA, an Essential Component of the Septal Ring Structure That Mediates Cell Division in *E. coli*. **Cell**, v. 88, p. 175-185.

Hale, C. A., Shiomi, D., Liu, B., Bernhardt, T. G., Margolin, W., Niki, H., de Boer, P. A. J. (2011). Identification of *Escherichia coli* ZapC (YcbW) as a component of the division apparatus that binds and bundles FtsZ polymers. **Journal of Bacteriology**, v. 193, p. 1393-1404.

Hamoen, L.W., Meile, J., Jong, W., Noirot, P., Errington, J. (2006). SepF, a novel FtsZ-interacting protein required for a late step in cell division. **Molecular Microbiology**, v. 59, p. 989-999.

Handler, A. A., Lim, J. E., Losick, R. (2008). Peptide inhibitor of cytokinesis during sporulation in *Bacillus subtilis*. **Molecular Microbiology**, v.68, p. 588-599.

Haney, S. A., Glasfeld, E., Hale, C., Keeney, D., He, Z., de Boer, P. (2001). Characterization of FtsZ residues essential for the interaction with ZipA and with FtsA. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 11980-11987.

Hérmendez-Rocamora, V. M., García-Montañés, C., Reija, B., Monterroso, B., Margolin, W., Alfonso, C., Zorrilla, S., Rivas, G. (2013). MinC shortens FtsZ protofilaments by preferentially interacting with GDP-bound subunits. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, p. 24625-24635.

Hérmendez-Rocamora, V. M., Reija, B., García-Montañés, C., Natale, P., Monterroso, B., Alfonso, C., Minton, A. P., Zorrilla, S., Rivas, G., Vicente, M. (2012). Dynamic interaction of the *Escherichia coli* cell division ZipA and FtsZ proteins evidenced in nanodiscs. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, p. 30097-30104.

Hirota, Y., Ryter, A., Jacob, F. (1968). Thermosensitive mutants of *E. coli* affected in the process of DNA synthesis and cellular division. **Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.**, v. 33, p. 677-693.

Hu, Z., Lutkenhaus, J. (2000). Analysis of MinC reveals two independent domains involved in interaction with MinD and FtsZ. **Journal of Bacteriology**, v. 182, p. 3965-3971.

Hu, Z, Mukherjee, A., Pichoff, S., Lutkenhaus, J. (1999). The MinC component of the division site selection system in *Escherichia coli* interacts with FtsZ to prevent polymerization. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 96, p. 14819-14824.

Jensen, S. O., Thompson, L. S., Harry, E. J. (2005). Cell division in *Bacillus subtilis*: FtsZ and FtsA association is Z-ring independent, and FtsA is required for efficient midcell Z-ring assembly. **Journal of Bacteriology**, v. 187, p. 6536-6544.

Król, E., Kessel, A. P., Bezouwen, L. S., Kumar, N., Boekema E. J., Scheffers, D. J. (2012). *Bacillus subtilis* SepF binds to the C-Terminus of FtsZ. **Plos ONE**, v. 7, p. 1-9.

Lakowicz, J. R. (1983). Principles of Fluorescence Spectroscopy. **Plenum Press**, New York.

- Lenarcic, R., Halbedel, S., Visser, L., Shaw, M., Wu, L. J., Errington, J., Marenduzzo, D., Hamoen, L. W. (2009). Localisation of DivIVA by targeting to negatively curved membranes. **The EMBO Journal**, v. 28, p. 2272-2281.
- Leslie, A. G. W. (1990). Refined crystal structure of type III chloramphenicol acetyltransferase at 1.75 Å resolution. **Journal of Molecular Biology**, v. 213, p. 167-186.
- Levin, P. A., Margolis, P. S., Setlow, P., Losick, R., Sun, D. (1992). Identification of *Bacillus subtilis* genes for septum placement and shape determination. **Journal of Bacteriology**, v. 174 p. 6717-6728.
- Levin, P. A., Kurtser, I. G., Grossman, A. D. (1999). Identification and characterization of a negative regulator of FtsZ ring formation in *Bacillus subtilis*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 96, p. 9642-9647.
- Levin, P. A., Shim, J. J., Grossman, A. D. (1998). Effect of *minCD* on FtsZ ring position and polar septation in *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, v. 180, p. 6048-6051.
- Li, Z., Trimble, M. J., Brun, Y. V., Jensen, G. J. (2007). The structure of FtsZ filaments *in vivo* suggests a force-generating role in cell division. **The EMBO Journal**, v. 26, p. 4694-4708.
- Loose, M., Mitchison, T. J. (2014). The bacterial cell division proteins FtsA and FtsZ self-organize into dynamic cytoskeletal patterns. **Nature Cell Biology**, v. 16, p. 38-46.
- Low, H. H., Moncrieffe, M. C., Lowe, J. (2004) The crystal structure of ZapA and its modulation of FtsZ polymerisation. **Journal of Molecular Biology**, V.341, p. 839-852.
- Lowe, J., Amos, L. (1998). Crystal structure of the bacterial cell-division protein FtsZ. **Nature**, v. 391, p. 203-206.
- Lutkenhaus, J. (2007). Assembly dynamics of bacterial division-site placement. **Annual Review of Biochemistry**, v. 76, p. 539-542.
- Lutkenhaus, J. e Addinall, S. G. (1997). Bacterial cell division and the Z ring. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 66, p. 93-116.
- Ma, X., and Margolin, W. (1999). Genetic and functional analyses of the conserved C-terminal core domain of *Escherichia coli* FtsZ. **Journal of Bacteriology**, v. 181, p. 7531-7544.
- Marston, A. L. e Errington, J. (1999). Selection of the cell division site in *Bacillus subtilis* through MinD-dependent polar localization and activation of MinC. v. 33, p. 84-96.
- Meier, E. I. e Goley, E. D. (2014). Form and function of the bacterial cytokinetic ring. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 26, p. 19-27.

Meinhardt, H e de Boer, P. A. J. (2001). Pattern formation in *Escherichia coli*: A model for the pole-to-pole oscillations of Min proteins and the localization of the division site. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 98, p. 14202-14207.

Mohammadi, T., Ploeger, G.E.J., Verheul, J., Comvalius, A.D., Martos, A., Alfonso, C., Marle, J., Rivas, G., Blaauwem, T. (2009). The GTPase activity of *Escherichia coli* FtsZ determines the magnitude of the FtsZ polymer bundling by ZapA *in vitro*. **Biochemistry**, v. 48, p. 11056-11066.

Monahan, L. G., Liew, A. T. F., Bottomley, A. L., Harry, E. J. (2014). Division site positioning in bacteria: one size not fit all. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 1-7.

Mosyaki, L., Zhang, Y., Glasfeld, E., Haney, S., Stahl, M., Seehra, J., Somers, W. S. (2000). The bacterial cell-division protein ZipA and its interaction with an FtsZ fragment revealed by X-ray crystallography. **The EMBO Journal**, v. 19, p. 3179-3191.

Mukherjee, A. e Lutkenhaus, J. (1994). Guanine nucleotide-dependent assembly of FtsZ into filaments. **Journal of Bacteriology**, v. 176, p. 2754-2758.

Mukherjee, A., Cao, C., Lutkenhaus, J. (1998). Inhibition of FtsZ polymerization by SulA, na inhibitor of septation in *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 95, p. 2885-2890.

Oliva, M. A., Cordell, S. C., Lowe, J. (2004). Structural insights into FtsZ protofilament formation. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 11, p. 1243-1250.

Oliva, , M. A., Huecas, S., Palacios, J. M., Martin-Benito, J., Valpuesta, J. M., Andreu, J. M. (2003). Assembly of archaeal cell division protein FtsZ and a GTPase-inactive mutant into double-stranded filaments. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 33562-33570.

Osawa, M. e Erickson, H. P. (2011). Inside-out Z rings – constriction with and without GTP hydrolysis. **Molecular Microbiology**, v. 81, p. 571-579.

Osawa, M. e Erickson, H. P. (2013). Liposome division by a simple bacterial division machinery. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 110, p. 11000-11004.

Patrick, J. E., Kearns, D. B. (2008). MinJ (YvjD) is a topological determinant of cell division in *Bacillus subtilis*, **Molecular Microbiology**, v. 70, p. 1166-1179.

Pazos, M., Natale, P., Vicente, M. (2013). A specific role for the ZipA protein in cell division: stabilization of the FtsZ protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, p. 3219-3226.

Pichoff, S., Lutkenhaus, J. (2002). Unique and overlapping roles for ZipA and FtsA in septal ring assembly in *Escherichia coli*. **The EMBO Journal**, v. 21, p. 685-693.

Pichoff, S., Lutkenhaus, J. (2005). Tethering the Z-ring to the membrane through a conserved membrane targeting sequence in FtsA. **Molecular Microbiol**, v. 55, p. 1722-1734.

- Popham, D. L. e Young, K. D. (2003). Role of penicillin-binding proteins in bacterial cell morphogenesis. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, p. 594-599.
- Ramamurthi, K. S., Losick, R. (2009). Negative membrane curvature as a cue for subcellular localization of a bacterial protein. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 106, p. 13541-13545.
- Raskin, D. M. e de Boer, P. A. J. (1999). Rapid pole-to-pole oscillation of a protein required for directing division to the of *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 96, p. 4971-4976.
- Redick, S. D., Stricker, J., Briscoe, G., Erickson, H. P. (2005). Mutants of FtsZ targeting the protofilament interface: effects on cell division and GTPase activity. **Journal of Bacteriology**, v. 187, p. 2727-2736.
- Rothfield, L., Taghbalout, A., Shih, Y. (2005). Spatial control of bacterial division-site placement. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p. 959:968.
- Sambrook, J., and Russel, D.W. (2001) Molecular cloning. A laboratory manual. **Cold Spring Harbor**, NY.
- Schwille, P. (2014). Bacterial Cell Division: A swirling ring to rule them all? **Current Biology**, v. 24, p.157-159.
- Scheffers, D. (2008). The effect of MinC on FtsZ polymerization is pH dependent and can be counteracted by ZapA. **FEBS Letters**, v. 582, p. 2601-2608.
- Shen, B. e Lutkenhaus, J. (2009). The conserved C-terminal tail of FtsZ is required for the septal localization and division inhibitory activity of MinC^C/MinD. **Molecular Microbiology**, v. 72, p. 410-424.
- Shen, B. e Lutkenhaus, J. (2010). Examination of the interaction between FtsZ and MinC^N in *E. coli* suggests how MinC disrupts Z rings. **Molecular Microbiology**, v. 75, p. 1285-1298.
- Shiomi, D. e Margolin, W. (2007). The C-terminal domain of MinC inhibits assembly of the Z ring in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 189, p. 236-246.
- Si, F., Busiek, K., Margolin, W., Sun, S. X. (2013). Organization of FtsZ filaments in the bacterial ring measured from polarized fluorescence microscopy. **Biophysical Journal**, v. 105, p. 1976-1986.
- Singh, J. K., Makde, R. D., Kumar, V., and Panda, D. (2007). A Membrane Protein, EzrA, Regulates Assembly Dynamics of FtsZ by Interacting with the C-Terminal Tail of FtsZ. **Biochemistry**, v. 46, p. 11013-11022.
- Singh, J. K., Makde, R. D., Kumar, V., and Panda, D. (2008). SepF Increases the Assembly and Bundling of FtsZ Polymers and Stabilizes FtsZ Protofilaments by Binding along Its Length. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, p. 31116–31124.
- Small, E., Marrington, R., Rodger, A., Scott, D. J., Sloan, K., Roper, D., Dafforn, T. R. and Addinall, S. G. (2007). FtsZ polymer-bundling by the *Escherichia coli* ZapA

orthologue, YgfE, involves a conformational change in bound GTP. **Journal of Molecular Biology**, v. 369, p. 210-221.

Strauss, M. P., Liew, A. T. F., Turnbull, L., Whitchurch, C. B., Monahan, L. G., Harry, E. J. (2012). 3D-SIM super resolution microscopy reveals a bead-like arrangement for FtsZ and the division machinery: Implications for triggering cytokinesis. **PLOS biology**, v. 10, p. 1-17.

Szeto, T. H., Rowland, S. L., King, G. F. (2001). The dimerization function of MinC resides in a structurally autonomous C-terminal domain. **Journal of Bacteriology**, v. 183, p. 6684-6687.

Szwedziak, P., Wang, Q., Freund, S. M. V., Löwe, J. (2012). FtsA forms actin-like protofilamentous. **The EMBO Journal**, v. 31, p. 2249-2260.

Reeve, J. N., Mendelson, N.H., Coyne, S. I., Hallock, L. L., Cole, R. M. (1972). **Journal of Bacteriology**, v. 114, p. 860-873.

Tonthat, N. K., Arold, S. T., Pickering, B. F., Dyke, M. W. V., Liang, S., Lu, Y., Beuria, T. K., Margolin W., Schumacher, M. A. (2011). Molecular mechanism by which the nucleoid occlusion factor, SlmA, keeps cytokinesis in check. **The EMBO Journal**, v. 30, p. 154-164.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 76, p. 4350-4354.

Trusca, D., Scott, S., Thompson, C., Bramhill, D. (1998). Bacterial SOS checkpoint protein SulA inhibits polymerization of purified FtsZ cell division protein. **Journal of Bacteriology**, v. 180, p. 3946-3953.

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

Youngman PJ, Perkins JB, Losick R. (1983). Genetic transposition and insertional mutagenesis in *Bacillus subtilis* with *Streptococcus faecalis* transposon Tn917. **Proc Natl Acad Sci USA**. v. 80, p. 2305-9.

Wagner-Herman, J. K., Bernard, R., Dunne, R., Bisson-Filho, A. W., Kumar, K., Nguyen T., Mulcahy, L., Koullias, J., Gueiros-Filho, F. J., Rudner, D. Z. (2012). RefZ facilitates the switch from medial to polar division during spore formation in *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, v. 194, p. 4608-4618.

Woldringh, C. L., Mulder, E., Huls, P. G., Vischer, N. (1991). Toporegulation of bacterial division according to the nucleoid occlusion model. **Research in Microbiology**, v. 142, p. 309-320.

Wu, I. J., Ishikawa, S., Kawai, Y., Oshima, T., Ogasawara, N., Errington, J. (2009). Noc protein binds to specific DNA sequences to coordinate cell division with chromosome segregation. **The EMBO Journal**, v. 28, p. 1940-1952.

Wu, L. J. e Errington, J. (2004). Coordination of cell division and chromosome segregation by a nucleoid occlusion protein in *Bacillus subtilis*. **Cell**, v.117, v. 915-925.

Wu, L. J. e Errington, J. (2012). Nucleoid occlusion and bacterial cell division. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, p. 8-12.

Wu, W., Park, K., Holyoak, T., Lutkenhaus, J. (2011). Determination of structure of the MinD-ATP complex reveals the orientation of MinD on the membrane and the relative location of binding sites for MinE and MinC. **Molecular Microbiology**, v. 79, p. 1515-1528.

Zhou, H., Lutkenhaus, J. (2005). MinC mutants deficient in MinD- and DicB-mediated cell division inhibition due to loss of interaction with MinD, DicB, or a septal component. **Journal of Bacteriology**, v. 187, p. 2846-2857.

LISTA DE ANEXOS

A – Cloranfenicol acetil-transferase (CAT) é um potencial contaminante na purificação de proteínas recombinantes

B – Artigo científico

ANEXO A

Cloranfenicol acetil-transferase (CAT) é um potencial contaminante na purificação de proteínas recombinantes.

Antes do iniciarmos os experimentos de fluorescência para provar a interação direta entre FtsZ e MinC estudamos a emissão de FtsZ e MinC selvagens. Realizamos testes com preparações de cada uma das duas proteínas purificadas e os dados obtidos mostraram que MinC possui emissão quase nula na faixa de 300 a 400 nm quando excitada com luz no comprimento de onda de 295 nm. Nesse comprimento de onda a absorção é primariamente do triptofano. Porém, a proteína FtsZ quando submetida a esse mesmo experimento apresentava um pico significativo de emissão, algo inesperado para uma proteína que não possui triptofano em sua sequência primária de aminoácidos. Apesar de já ter sido reportada a possibilidade de excitação de tirosinas nesse mesmo comprimento de onda, isso acontece apenas em situações muito especiais (Lakowicz, 1983). FtsZ até poderia ser incluída nesse caso, já que ela possui em sua sequência duas tirosinas. Outra possibilidade levantada é que FtsZ estaria contaminada com alguma proteína ou peptídeo que possuísse resíduos de triptofano em sua composição. Tendo em vista que o sinal de emissão de FtsZ estava interferindo e podendo até mascarar as medidas de interação, resolvemos investigar essa fluorescência indesejada.

1.1. Purificação de FtsZ na cepa BL21 DE3

Foi realizada uma análise cuidadosa de FtsZ purificada em um SDS-PAGE. Quando o gel era preparado com 15% de poliacrilamida conseguíamos detectar claramente uma banda de aproximadamente 45 kDa, que representa FtsZ.

Entretanto, com uma massa molecular de 25 kDa tínhamos uma banda com intensidade bem menor, mas possível de ser detectada quando aplicávamos uma grande quantidade de FtsZ no gel. Ela poderia constituir uma contaminação significativa nas purificações de FtsZ ou até mesmo um produto de degradação do mesmo. Para saber o que essa banda inespecífica representava, submetemos a banda à identificação por meio de espectrometria de massas.

A banda foi extraída do gel, tratada e digerida conforme Schevchenko *et al.*, 2006 e os espectros foram obtidos no aparelho Q-ToF Ultima (Waters). O resultado gerado pelo programa *MASCOT MS/MS Ions Search* revelou um total de 38 peptídeos correspondentes à enzima cloranfenicol acetiltransferase (*cat*). A fonte de dados de sequências utilizadas foi o NCBI 2011 (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/). A pontuação estabelecida pelo programa foi de 170, sendo que pontuações maiores que 54 indicam identidade ou extensa homologia. Sendo assim, nossas purificações de FtsZ estavam carregando cloranfenicol acetiltransferase (CAT) inespecificamente. Esta enzima confere resistência ao antibiótico cloranfenicol e provavelmente está estabelecendo algum tipo de interação inespecífica com FtsZ.

A cepa utilizada para expressão da FtsZ, para os experimentos de fluorescência foi a BL21-CodonPlus (DE3) RIL e a mesma possui o gene *cat*, associada a resistência da cepa ao antibiótico. A proteína codificada por esse gene (cloranfenicol acetiltransferase) é um trímero que possui subunidades de 25 kDa e cinco triptofanos em sua sequência (Leslie, 1990).

Esse resultado sugere que a origem da emissão inesperada das preparações de FtsZ, quando testadas em experimentos de fluorescência intrínseca do triptofano. Para confirmar que o contaminante era mesmo CAT derivado da cepa RIL, transformamos o plasmídio pET28A-FtsZ em uma cepa de expressão que não

possui o gene *cat* e purificamos a FtsZ dessa cepa. Resolvemos por SDS-PAGE tanto uma FtsZ preparada a partir de uma cepa que possuía o gene *cat*, quanto uma cepa sem *cat* (Figura 36). Como resultado, vimos que a origem da banda contaminante é de fato CAT.

Figura 35. SDS-PAGE com 15% de poliacrilamida. Foram aplicados 10 μ L de duas purificações de FtsZ, uma em cada raia. Na raia (1) a proteína foi purificada a partir de uma cepa sem cloranfenicol acetiltransferase (CAT) e na raia (2) a purificação foi executada a partir de uma expressão em uma cepa resistente a cloranfenicol. O círculo vermelho indica a contaminação na purificação com CAT.

1.2. Ensaio de fluorescência com FtsZ sem CAT

Com a proteína purificada sem CAT, foi realizado um ensaio de fluorescência para comparação de FtsZ na presença e na ausência de CAT. O espectro da FtsZ sem CAT é evidenciado com um pico de emissão muito menor que a proteína com a contaminação (Figura 36), sendo que a diferença de emissão entre as duas preparações da FtsZ representa uma diferença de aproximadamente 55 %. Isso torna a emissão de FtsZ (sem CAT) extremamente baixa e condizente com uma proteína que não contém triptofano. Concluímos assim que a contaminação com CAT era a responsável pela emissão de fluorescência observada nas preparações de FtsZ.

Figura 36. Experimento de fluorescência intrínseca do triptofano. Espectros de emissão de 10 μ M de FtsZ purificado a partir de uma cepa com cloranfenicol acetiltransferase (CAT) e sem CAT. As amostras foram excitadas a 295 nm e triamos a emissão de 320-360 nm.

Dessa forma, os experimentos contidos nessa tese foram executados com FtsZ purificado a partir da cepa de expressão BL21-(DE)3. Assim pudemos detectar diferenças mais sutis na emissão de MinC^{Y44W}, comparando ensaios na presença de FtsZ^{WT} e FtsZ^{K243R, D287V}. Os experimentos realizados dessa forma, não necessitam de uma correção matemática dos resultados brutos, com intuito de subtrair a fluorescência de FtsZ.

Em conclusão, estes experimentos controle nos ajudaram a obter resultados melhores e pode ajudar outros pesquisadores que tenham se deparado com problemas semelhantes, alertando-os sobre o potencial de CAT representar um contaminante comum de proteínas recombinantes. A presença de CAT pode ser inócua para certas análises (não temos evidência que influencie a polimerização de FtsZ, por exemplo) mas em outros casos pode ser importante, como sua interferência nos experimentos de fluorescência intrínseca do triptofano.

ANEXO B

Genetic and Biochemical Characterization of the MinC-FtsZ Interaction in *Bacillus subtilis*

Valdir Blasios¹*, Alexandre W. Bisson-Filho¹*, Patricia Castellen^{1,2}, Maria Luiza C. Nogueira², Jefferson Bettini³, Rodrigo V. Portugal³, Ana Carolina M. Zeri², Frederico J. Gueiros-Filho^{1*}

1 Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, **2** Brazilian Biosciences National Laboratory (LNBio), Centro Nacional de Pesquisas em Energia e Materiais (CNPEM), Campinas, Brasil, **3** Nanotechnology National Laboratory (LNNano), Centro Nacional de Pesquisas em Energia e Materiais (CNPEM), Campinas, Brasil

Abstract

Cell division in bacteria is regulated by proteins that interact with FtsZ and modulate its ability to polymerize into the Z ring structure. The best studied of these regulators is MinC, an inhibitor of FtsZ polymerization that plays a crucial role in the spatial control of Z ring formation. Recent work established that *E. coli* MinC interacts with two regions of FtsZ, the bottom face of the H10 helix and the extreme C-terminal peptide (CTP). Here we determined the binding site for MinC on *Bacillus subtilis* FtsZ. Selection of a library of FtsZ mutants for survival in the presence of Min overexpression resulted in the isolation of 13 Min-resistant mutants. Most of the substitutions that gave rise to Min resistance clustered around the H9 and H10 helices in the C-terminal domain of FtsZ. In addition, a mutation in the CTP of *B. subtilis* FtsZ also produced MinC resistance. Biochemical characterization of some of the mutant proteins showed that they exhibited normal polymerization properties but reduced interaction with MinC, as expected for binding site mutations. Thus, our study shows that the overall architecture of the MinC-FtsZ interaction is conserved in *E. coli* and *B. subtilis*. Nevertheless, there was a clear difference in the mutations that conferred Min resistance, with those in *B. subtilis* FtsZ pointing to the side of the molecule rather than to its polymerization interface. This observation suggests that the mechanism of Z ring inhibition by MinC differs in both species.

Citation: Blasios V, Bisson-Filho AW, Castellen P, Nogueira MLC, Bettini J, et al. (2013) Genetic and Biochemical Characterization of the MinC-FtsZ Interaction in *Bacillus subtilis*. PLoS ONE 8(4): e60690. doi:10.1371/journal.pone.0060690

Editor: Ivo G. Boneca, Institut Pasteur Paris, France

Received: November 14, 2012; **Accepted:** March 1, 2013; **Published:** April 5, 2013

Copyright: © 2013 Blasios et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by grants 08/58821-1 and 10/51866-0 (Smolnet 2.0) from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and 478019/2009-2, from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). V.B.J. and A.W.B.F. were recipients of doctoral fellowships from FAPESP, P.C. was a recipient of a postdoctoral fellowship by FAPESP. M.L.C.N. was a recipient of a CAPES doctoral fellowship. F.J.G.F. was a recipient of a PQ-2 fellowship of CNPq. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: fgueiros@iq.usp.br

† These authors contributed equally to this work.

Introduction

Cell division in bacteria is executed by a contractile protein apparatus that contains about twenty different components and which is commonly known as the divisome [1–3]. The divisome is an elaborate molecular machine that promotes the coordinated invagination of the bacterial cytoplasmic membrane and cell wall (plus the outer membrane, in the case of Gram-negative bacteria) to create the division septum. Assembly of the divisome from its isolated parts is orchestrated by FtsZ, the ubiquitous tubulin-like protein of bacteria [4]. FtsZ is a cytoskeletal protein that self-associates into a supramolecular structure with the shape of a ring [5,6]. Once formed, this FtsZ (or Z) ring is capable of recruiting the other components of the divisome to the future division site. Thus, the Z ring functions as a seed and structural organizer of the divisome.

A remarkable feature of bacterial division is that it occurs with great spatial precision and in perfect coordination with DNA replication and segregation. Controlling where and when the divisome will assemble occurs primarily at the level of Z ring formation. There are several proteins that interact directly with FtsZ and either help or inhibit its self-assembly into the Z ring [7].

These proteins, which are often referred to as “FtsZ modulators”, are key players in the regulation of division.

The best studied modulator of Z ring formation is the Min system [8,9]. The Min system represents a site-specific inhibitor of FtsZ polymerization that prevents re-initiation of division immediately after a round of division has finished [10,11]. In the absence of a functional Min system bacteria will frequently divide close to one of the cell poles and generate the so-called minicells, small DNA-less cells that are incapable of further reproduction [12,13]. The remarkable spatiotemporal fidelity of bacterial division, which is always symmetrical and in sync with DNA replication, can be explained by the joint action of the Min system and that of the nucleoid occlusion proteins, such as Noc in *B. subtilis* and SlmA in *E. coli*, which prevent FtsZ assembly over unreplicated nucleoids [14,15].

The core of the Min system is comprised of the proteins MinC and MinD, which are widely distributed among bacteria. MinC is a cytoplasmic protein that has the ability to inhibit FtsZ polymerization in vitro and, thus, represents the ultimate effector of Min function [16,17]. MinD, on the other hand, is a membrane associated ATPase of the ParA family that forms a complex with

MinC and helps recruit it to the membrane [18–21]. The Min system exhibits site selectivity because the MinCD complex is itself localized to the cell poles. Localization occurs by alternative mechanisms and requires different partner proteins in different bacteria. In *B. subtilis*, localization of MinCD requires DivIVA, a pole-marking protein conserved in Gram-positive bacteria [22–26]. DivIVA associates with the bacterial cell poles probably because the protein has affinity for negatively curved membranes [27,28]. Once at the cell pole, DivIVA functions as a landmark that guides the recruitment of several other proteins that need to be at the cell poles to exert their function. Polar recruitment of proteins by DivIVA can involve direct or indirect interactions. In the case of MinCD, the recruitment is indirect and requires MinJ, an integral membrane protein that serves as a bridge between MinCD and DivIVA [29,30]. In contrast, in *E. coli*, polar localization depends on the protein MinE and is achieved dynamically, by the oscillation of the MinCD complex from one extreme of the cell to the other with a period of a minute [31]. This oscillation is an example of a spontaneous pattern formation process that involves the ATP-dependent interaction of MinD with itself and with the cytoplasmic membrane, and is set in motion by MinE, which interacts with MinD and stimulates its ATPase activity and favors its dissociation from the membrane [9,32].

How MinC interacts with FtsZ and affects its polymerization has been studied in more detail in *E. coli*. Initial biochemical experiments revealed that MinC (in the form of a MalE-MinC fusion) inhibited the sedimentation of FtsZ polymers but did not inhibit FtsZs GTPase activity [16]. This indicated that MinC does not inhibit the head-to-tail polymerization of FtsZ subunits into its basic (proto)filaments, but, instead, prevents the assembly of FtsZ into higher order structures, such as bundles of filaments. Indeed, EM and rheology measurements showed that FtsZ polymers formed in the presence of MinC are less bundled, and have fewer lateral contacts and interconnections [33]. In addition, FtsZ filaments became shorter and more curved, suggesting that MinC is also capable of destabilizing FtsZ filaments to some extent [33]. Similar results were obtained for MinC of *B. subtilis* [17]; thus, the overall mode of action of MinC is evolutionarily conserved. Concomitantly, in vivo experiments demonstrated that inhibition of Z ring formation requires the synergistic action of the two domains of MinC. MinC can be divided into N-terminal and C-terminal domains of similar sizes but different functions [34,35]. The C-terminal domain (MinC_C) is conserved among Gram negative and Gram positive bacteria and is the portion of the protein involved in the interaction with MinD [34]. The N-terminal domain (MinC_N), on the other hand, is highly divergent, to the point that the Pfam entry describing it (MinC_N, accession PF05209) does not recognize MinC from Gram-positive bacteria. Mutations in either domain render MinC nonfunctional and lead to minicell formation [36]. Nevertheless, each domain by itself still retains the ability to inhibit Z ring formation when overexpressed [34,37,38]. Recent genetic experiments shed light on this behavior by showing that each MinC domain binds to a different portion of FtsZ [38,39]. The structure of FtsZ strongly resembles that of tubulin, and is composed of two globular domains (the N and C terminal domains) followed by an unstructured tail containing a conserved 15 to 17 aminoacid peptide at its very C-terminus (the “C-Terminal Peptide” or CTP) [40,41]. The CTP does not play a role in polymerization, but is essential for the division process notably as the binding site for FtsZ modulators such as FtsA, ZipA, EzrA and SepF [7]. MinC_N was shown to interact with the H10 helix at the globular C-terminal subdomain of FtsZ [39], whereas MinC_C recognizes a conserved 15 residue patch in the CTP tail of FtsZ [38]. Because helix H10 lies on the FtsZ-FtsZ polymerization

interface, this could explain why binding of MinC, and, more specifically, MinC_N, would promote weakening of FtsZ filaments and disrupt Z ring formation. The binding site of MinC_C can also be rationalized to explain the inhibitory effect of this domain. Because FtsZs CTP is also the binding site for FtsA and ZipA, two key organizers of the Z ring in *E. coli* [42], competition with these modulators could explain why MinC_C inhibits Z ring formation when overexpressed. However, at physiological levels, the most likely role of the interaction between MinC_C and the CTP of FtsZ is to target MinC_N to FtsZ polymers. Thus, the mechanism of Z ring inhibition by MinC involves two simultaneous interactions of MinC with FtsZ, with MinC_N binding to a region of FtsZ that is important for polymer assembly and MinC_C contributing to the targeting of MinC to FtsZ.

Here we describe genetic and biochemical experiments that allowed the identification of the binding site(s) of MinC on *B. subtilis* FtsZ. These experiments suggest that the MinC binding site in *B. subtilis* FtsZ has the same bipartite layout as in *E. coli* FtsZ, involving residues in the vicinity of helix H10 and in the proteins CTP. Significantly, however, the residues important for MinC binding in the H10 helix region of *B. subtilis* FtsZ were not the same as those in *E. coli* FtsZ. Whereas in *E. coli* these residues were located on the bottom surface of H10 and faced the FtsZ-FtsZ binding interface, in *B. subtilis* these residues were on the “side” of the molecule and next to the point where the unfolded CTP emerges from the FtsZ structure. This suggests that the mechanism of MinC inhibition of FtsZ polymerization differs in *B. subtilis* and *E. coli*.

Methods

General Methods

Strains and plasmids are described in Table S1 and their construction is detailed in the supplemental material. All strains were grown in LB medium at 37°C and supplemented with the following concentrations of antibiotics when necessary: 5 µg/mL for chloramphenicol, MLS (1 µg/mL of erythromycin plus 25 µg/mL of lincomycin); 100 µg/mL of spectinomycin; 10 µg/mL of kanamycin; and 10 µg/mL of tetracycline. Concentrations of inducers isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) and xylose, when used are reported in figure legends.

DNA Methods

Mutations in pAB20, pAB30 and pAB31 were constructed using site-directed mutagenesis (QuikChange; Stratagene) with Phusion DNA polymerase (NEB). Oligonucleotide primers were purchased from IDT (Coralville, IA) and are listed in Table S2. Sequencing was carried out using the Big Dye terminator cycle sequencing kit (Applied Biosystems) by the sequencing service of the Departamento de Bioquímica, IQ-USP.

ftsZ Mutant Library

The *ftsZ* mutant library was constructed by Error-Prone PCR. The reaction conditions were as follows: 100 ng gDNA, 75 mM Tris-HCl (pH 8.8 at 25°C), 0.1% Tween 20, 20 mM (NH₄)₂SO₄ (Taq Buffer Fermentas), 0.5 µM of each primer (OFG63 and OFG178), 7 mM MgCl₂, 0.5 mM MnCl₂, 1.5 mM dTTP, 1 mM dCTP, 0.2 mM dGTP, 0.6 mM dATP and 2U of Taq polymerase, in a final volume of 50 µl. Cycling parameters were: 1 cycle of 93°C for 3 min; 30 cycles of 93°C for 1 min, 55°C for 1 min, 72°C for 5 min; 1 cycle of 72°C for 10 min. The 1149 bp mutagenized DNA fragment containing the *B. subtilis* *ftsZ* gene without the ATG start codon was ligated into plasmid pDG1515 and transformed into *E. coli* giving rise to approximately 10⁵

colonies. Colonies were pooled and their plasmids were extracted to create a library.

Fluorescence Microscopy

Microscopy was performed on a Nikon Eclipse Ti microscope, equipped with GFP BrightLine® and mCherry BrightLine® Filter Sets (Semrock), a Plan APO VC Nikon 100X objective (NA = 1.4), a 25 mm SmartShutter and a Andor EMCCD i-Xon camera. Exposure times varied from 0.3 to 1 s. Cells were grown to exponential phase and incubated in chambers with LB plus 1% agarose. Membrane stain FM5-95 (final concentration of 50 µg/mL; Molecular Probes) and 0.5 mM IPTG were added to the solidified LB, where indicated. All images were captured using NIS software version 3.07 (Nikon) and processed with ImageJ software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

Purification of His₆-FtsZ, His₆-MinC and MinC-His₆

The *ftsZ* gene and its mutants were cloned into the expression vector pET28a (Novagen) and transformed into BL21(DE3)-RIL cells and the His-FtsZ proteins were purified by two-step ammonium sulfate and GTP+Ca²⁺ precipitation [43]. The *minC* gene and its mutants were cloned into the expression vectors pET28a and pET24b (Novagen) and transformed into BL21(DE3)-RIL cells. Cell extracts were made in TKEG buffer and subjected to a 100,000 × g spin and His-MinC and MinC-His were purified from the soluble fraction by Ni⁺⁺-affinity chromatography. His-MinC and MinC-His were eluted from the column applying an imidazole gradient (100 mM to 1 M) in TKEG buffer. Imidazole was subsequently removed by desalting columns and the proteins were stored in TKEG. All proteins were quantified by the bicinchoninic acid (BCA) method, using bovine serum albumine (BSA) as the standard.

GTPase Activity and Critical Concentration

GTPase activity was determined using the malachite green assay in 96-well plates. Proteins were tested from 0.5 µM to 10 µM in MMKE buffer (50 mM MES pH 6.5, 5 mM MgCl₂, 50 mM KCl and 1 mM EDTA). The reaction was started by adding GTP (1 mM) at 37°C and stopped in intervals of 2.5 min by adding the color reagent (0.035% malachite green, 8.5% ammonium molybdate, 1 M HCl, filtered through a 0.45 µm filter). After 10 min, the A₆₅₀ was measured using a Synergy™ HT plate reader (Bio-Tek). Using a KH₂PO₄ standard curve, a graph of phosphate release over time was plotted and the slope of the linear region was used to determine the hydrolysis rate. The hydrolysis rate at different protein concentrations was used to determine the critical concentration (Cc) of the different mutants.

Light Scattering

Light scattered by FtsZ polymers was measured using in a Hitachi F-4500 fluorimeter. Excitation and emission wavelengths were set to 350 nm, with slit widths of 3.5 nm, and the photomultiplier tube at 950V with a scan rate of 60 nm/s. Protein was incubated in 150 µL of polymerization buffer (50 mM MES/NaOH pH 6.5, 133 mM KCl, 0.6 mg/mL DEAE and 10 mM MgCl₂) at 30°C until baseline stabilization. After the baseline stabilized, GTP was added to 2 mM and the change in scattering was followed for the next 30 minutes. MinC was added to reactions either before or after the addition of GTP with similar results. Buffer effects were excluded by inclusion of MinC storage buffer to a similar volume as the maximum amount of MinC added.

Transmission Electron Microscopy

For visualization in negative stain, FtsZ samples at a concentration of 5 µM were incubated in polymerization buffer (50 mM MES/NaOH pH 6.5, 100 mM KCl, and 10 mM MgCl₂) for 5 min at 37°C after addition of 2 mM GTP. FtsZ-MinC samples were prepared in a molar ratio of 1:3 and incubated for 3 min in the polymerization buffer, before adding GTP. Holey carbon coated electron microscope grids (with the holey carbon on its bottom face and a thin continuous carbon film on its top surface) were glow discharged. A 3 µl droplet of the sample was deposited onto a grid for 30 sec and blotted. A 3 µl of 2% uranyl acetate was added, blotted and air-dried. Images were recorded at −3 µm defocus and 60,000× magnification with a Jeol JEM-2100 operating at 200 kV and equipped with a TVIPS F-416 CMOS camera.

Trp Fluorescence Measurements

Intrinsic fluorescence of tryptophan mutant MinC Y44W was monitored in the presence of wild-type and mutant FtsZ in Tris/HCl 20 mM, KCl 100 mM, EDTA 5 mM, pH 7.5. The tryptophan fluorescence was measured using a Hitachi F-4500 fluorescence spectrophotometer. The excitation wavelength was 295 nm, and the emission data were collected between 320 and 360 nm. All measurements were recorded in triplicate. The net MinC fluorescence intensity in the presence of FtsZ was determined using the following equation: $(F_{MZ} - F_Z) \cdot V_{total}$, where F_{MZ} is the fluorescence of the MinC+FtsZ mixture, F_Z is the fluorescence of the same amount of FtsZ in the absence of MinC, and V is the volume of the reaction. Thus, all MinC fluorescence spectra were corrected for background fluorescence from FtsZ and buffer components, and for volume changes.

Results

A Genetic Screen for Min Resistant FtsZ Mutants

To determine the binding site for MinC on *B. subtilis* FtsZ we carried out a genetic screen to identify FtsZ mutants that made cells resistant to MinD overexpression, a condition that causes filamentation and lethality in *B. subtilis* [43]. Because lethality produced by MinD overexpression is strictly dependent on, and promoted by, MinC [43] we reasoned that resistance to MinD overexpression should select for mutations that disrupt the interaction between FtsZ and MinC. A library of approximately sixty thousand independent FtsZ mutants generated by error prone PCR (see methods for details) was introduced into a strain containing an IPTG inducible copy of MinD (FG249) and selected in the presence of 250 µM IPTG, a condition that ordinarily kills all cells bearing wild-type FtsZ. We recovered 51 colonies out of 6×10^4 transformants, a frequency of Min resistance of about 0.1%. We performed backcross experiments to confirm that resistance was linked to FtsZ and sequenced the *ftsZ* allele in all of those mutants that were linked. Sequencing revealed a total of 13 single substitutions (Table 1). Because several of these were isolated multiple times, we believe our screen reached near saturation. We have also included in our dataset one mutant (T111A) that was originally isolated in a screen against a different FtsZ modulator (ZapA - Alexandre Bisson-Filho, Frederico Gueiros-Filho, unpublished results) but that was found to also confer resistance to Min.

There are reports in the literature that FtsZ mutations that promote resistance to its inhibitors do not always disrupt the binding between FtsZ and the inhibitor. These mutations usually affect the GTPase activity of FtsZ and are “promiscuous”, because they will also confer resistance to other unrelated inhibitors. One example are certain mutations in *E. coli* FtsZ that were selected for

Table 1. Resistance of FtsZ mutants.

	MinCD	MciZ	ZapA-MTS
WT	–	–	–
L69S	+	+	+
T111R	+	–	–
T111A	+	+	+
T232I	+	–	+
K243R	+	–	–
I245F	+	–	–
D255V	+	–	–
V260A	+	–	–
V282A	+	–	–
A285T	+	–	–
D287V	+	–	–
I293T	+	+	–
V310A	+	–	–
R376T	+	–	–

doi:10.1371/journal.pone.0060690.t001

resistance to SulA but that also make the cell resistant to MinC [44,45]. Because of this precedent, we subjected our mutants to a first filter to sort them between those that were promiscuous and those that were specific to Min. This was done by testing if our mutations conferred cross-resistance to two unrelated FtsZ inhibitors, the peptide MciZ [46], and an altered version of ZapA (ZapA-MTS). ZapA is normally a positive modulator of FtsZ. However, we found that appending a membrane targeting sequence to the C-terminus of ZapA turned the protein into a potent inhibitor of cell division (Alexandre Bisson-Filho and Frederico Gueiros-Filho, unpublished results). FtsZ mutations were transferred to strains capable of overexpressing either MciZ (AB52) or ZapA-MTS (AB53) and resistance was tested in plating experiments that are summarized in Table 1 (see also Figure S1 for the original data). Nine out of the thirteen mutants analyzed were specific to Min. Among the non-specific mutants, one (L69S) was resistant to all three inhibitors, whereas the other two showed cross resistance to either MciZ (I293T) or ZapA-MTS (T232I). One curious case was residue T111: substitution of this threonine with arginine (T111R) resulted in a protein that seemed specifically resistant to Min, whereas substitution to alanine (T111A) led to a protein that was cross-resistant to all three modulators.

Mapping the mutations onto the FtsZ crystal structure revealed that most substitutions were located in the globular C-terminal subdomain of FtsZ (Figure 1), where they clustered around the H9 and H10 helices, the same region that has been identified as one of the two regions of FtsZ bound by *E. coli* MinC [39] (see an alignment in Figure S2 for the location of the mutations relative to the secondary structure of *B. subtilis* FtsZ). In addition, three mutations (L69S, T111A and T111R) mapped to the N-terminal subdomain and one (R376T) mapped to FtsZs CTP and, thus, does not appear in the crystal structure. Interestingly, there was a striking correlation between the type of mutation (specific versus promiscuous) and where they localized. With the exception of T232I, all other promiscuous mutations localized to the surfaces of FtsZ involved in GTP binding and formation of the FtsZ-FtsZ longitudinal bond (here we treated the T111 position as promiscuous because there is at least one substitution in this position that produces resistance to multiple modulators). This

suggests that these mutations affect the GTPase activity and/or affinity of FtsZ for itself. Indeed, substitution of *E. coli* residue L68 (equivalent to *B. subtilis* L69— see also the alignment in Figure S2) to tryptophan causes an increase in the affinity between FtsZ monomers and a 10 fold decrease in the critical concentration for polymerization [47,48]. In contrast, the Min specific mutations were found exclusively in the neighborhood of helices H9 and H10. In addition, the isolation of a mutation in the CTD of *B. subtilis* FtsZ suggests that, like in *E. coli*, the interaction between FtsZ and MinC may involve two contact sites between the proteins. We chose to further characterize two of the most surface exposed of the Min-specific mutations (K243R, D287V) in the vicinity of the H10 helix, as well as the R376T mutation in the CTP because they seemed like the best candidates for being part of the MinC binding site(s). For the sake of comparison, we also characterized a mutation that was promiscuous and located in the N-terminal subdomain of FtsZ, T111A, and thus unlikely to be part of the MinC binding site.

Microscopic Characterization of Min Resistant Mutants

We examined mutants T111A, K243R, D287V and R376T by fluorescence microscopy to assess how these substitutions affected division both in the absence and in the presence of MinD overexpression.

In the absence of MinD overexpression (Fig. 2, Table 2, -IPTG column), most mutants had an average cell size that was close to that of the wild-type, suggesting that these alterations in FtsZ did not significantly disrupt the proteins normal function. The exception was R376T, which was clearly impaired for division, with cells that were about 2 fold longer than the wild type (9.6 versus 4.4 μ m) and prone to lysis as judged by their non-homogenous membrane staining. R376T has a substitution in one of the conserved residues of the CTP that are important for binding of proteins such as FtsA, SepF and EzrA (and ZipA in *E. coli*) [49–52] that promote Z ring formation in vivo and this may explain its impaired division.

Induction of MinD overexpression for two hours (Fig. 2, Table 2, +IPTG column) led to a five fold increase in the length of wild-type cells. As expected, the same treatment had a much less severe effect in the Min resistant mutants. Importantly, however, most Min resistant mutants were not completely insensitive to

Figure 1. Mapping of the mutations conferring MinC resistance onto the structure of FtsZ. The structure of *B. subtilis* FtsZ was obtained from the Protein Data Bank (2VAM) [75]. Residues marked in red represent those altered in MinC-specific mutants, whereas residues in green are altered in promiscuous mutants. Polymerization occurs by interaction between the top and bottom surfaces of the molecule, following an imaginary vertical axis defined by catalytic residue D213, marked in yellow.

doi:10.1371/journal.pone.0060690.g001

Figure 2. Cell division phenotype of FtsZ mutants. Strains containing an IPTG inducible allele of *minD* (*thrC::P_{spac-hy}-minD, erm*) plus either wild-type or Min-resistant *ftsZ* alleles were grown on LB-agar chambers with or without 1 mM IPTG for 2 hours and imaged by microscopy. Membranes were stained with FM 5–95. Arrowheads point to a typical minicell (yellow) and an abnormally sized minicell (red). Strain numbers: FtsZ wild-type (AB164), T111A (AB70), K243R (AB168), D287V (AB174), R376T (AB177). The scale bar corresponds to 5 μ m. doi:10.1371/journal.pone.0060690.g002

MinD overexpression, since their average length increased by 32% to 66%.

Another piece of information extracted from the microscopy data was how similar the FtsZ mutants were to a Min null mutant (in this case a MinCD deletion). FtsZ mutants that become completely insensitive to Min should phenocopy the MinCD deletion mutant. Focusing on the frequency of minicelling, T111A is the mutant that is most similar to the MinCD deletion. Closer inspection of the images, however, revealed that most minicells in the T111A mutants are significantly larger than the typical minicells produced in a Min mutant (see arrowheads in Fig. 2). This suggests that they derive from altered properties of FtsZ that go beyond the interaction with Min, as also suggested by the fact that this mutant is cross-resistant to several other FtsZ modulators. Among the remaining mutants, K243R and D287V showed a frequency of minicelling in the range of 3%. Importantly, the minicells in these mutants had the size and appearance of typical minicells. The 3% frequency of minicelling is lower than the 16.5% observed for the MinCD mutant, nevertheless, it is significantly higher than the wild type situation. This is in line with the idea that K243R and D287V are partially insensitive to MinCD. A similar situation was reported for *E. coli*, where mutants selected for resistance to MinC were also only partially resistant [39]. We have also noticed that induction of MinD led to an increase in minicell frequency in the case of the K243R mutant, and perhaps in the case of the D287V mutant as well. This may

indicate that division becomes favored in the polar sites when MinCD is present all over the cell, a situation similar to a *divIVA* mutant [53,54], and reinforces the idea that the K243R mutant, in particular, is still somewhat sensitive to MinC.

FtsZ Mutants are Insensitive to MinC *in vitro*

To investigate their biochemical properties, the T111A, K243R, D287V and R376T proteins were overexpressed in *E. coli* and purified. We also included in our *in vitro* experiments a truncated version of FtsZ, lacking the entire CTP (FtsZ Δ CTP). This mutant, which does not support division *in vivo* and could not have been recovered in our screen, was chosen to corroborate the role of the CTP in the FtsZ-MinC interaction. Even though the proteins had N-terminal histidine tags we opted to purify them by GTP induced polymerization followed by sedimentation (see Methods) because this method selects for active protein and in our hands produced FtsZ preparations that polymerized much more robustly than when the same protein was purified by metal affinity chromatography. Comparison between untagged and his-tagged versions of wild-type FtsZ showed no noticeable difference in polymerization behavior and MinC sensitivity (data not shown). We have also overexpressed and purified wild-type MinC and the mutant MinC19 (MinC G13D), the *B. subtilis* equivalent of the well characterized nonfunctional MinC19 mutant of *E. coli* [16]. Both MinC proteins have C-terminal histidine tags and were purified by metal affinity chromatography. All purified proteins were correctly folded as assessed by CD spectroscopy (Figure S3). The minor difference in the CD spectrum of the FtsZ Δ CTP mutant can be explained because this protein is missing a fragment of its C-terminus.

We used light scattering to measure FtsZ polymerization *in vitro* in a buffer containing 50 mM MES/NaOH pH 6.5, 133 mM KCl, 0.6 mg/mL DEAE-dextran and 10 mM MgCl₂. We chose this condition because it favors bundle formation by FtsZ, a situation that has been shown to facilitate visualization of MinC inhibition of FtsZ assembly [17]. Initial experiments showed that all mutant FtsZ proteins were capable of polymerizing when assayed at 5–7 μ M (Figure S4). This was expected because most of the mutants exhibited robust division *in vivo* (Figure 2, Table 2). Interestingly, even the R376T protein polymerized well *in vitro*, supporting the idea that the division defect of this mutant is due to problems interacting with FtsZ modulators. Nevertheless, the light

Table 2. FtsZ mutant measurements.

	Average Size (μ m)		% Minicells	
	– IPTG	+ IPTG	– IPTG	+ IPTG
WT	4.4	17.1	0	0
Δ minCD	8.1	–	16.5	–
T111A	5.9	9.8	16.0	14.0
K243R	5.1	7.9	2.5	17.0
D287V	4.7	6.2	3.5	5.0
R376T	9.6	13.6	8.0	8.5

doi:10.1371/journal.pone.0060690.t002

scattering signal tended to be lower for the mutant proteins when compared with the wild-type (Figure S4). Because the light scattering signal is sensitive to both mass and size of the polymers being monitored, we also evaluated the polymerization of all mutants by sedimentation. This showed that the total mass of polymerized FtsZ was essentially the same for mutant and wild-type FtsZ (Figure S5). This result, and the measurements of critical concentrations of polymerization shown below (Table 3), indicate that the mutant FtsZ are generally as prone to polymerization as the wild-type protein. We cannot rule out, however, that the mutations conferring resistance to MinC have affected to some extent the architecture of the polymers formed.

Next, we used the light scattering assay to investigate the effect of MinC on FtsZ polymerization. Polymerization of wild-type FtsZ was inhibited by MinC in a dose dependent manner, with a 3 fold molar excess of MinC (21 μ M) resulting in 80–90% inhibition (Figure 3A). This is similar to previous data that showed that MinC has maximal activity when in molar excess [16,17]. Importantly, inhibition by MinC in our assay was specific because the same amount of the MinC19 mutant protein did not inhibit FtsZ polymerization (Figure 3A). In contrast to the effect of MinC on wild-type FtsZ, adding MinC to polymerization reactions containing the different FtsZ mutants had little effect. Most mutants polymerized to 80–90% of the levels achieved in the absence of MinC. R376T showed the highest residual inhibition, achieving only 70% of the light scattering signal in the absence of MinC (Figure 3B and S4).

We have also used EM to investigate the effect of MinC on the polymerization of mutant FtsZ. EM was carried out in the absence of DEAE-dextran, a more physiological condition, and showed that wild type FtsZ polymerized into a mixture of individual protofilaments and large protofilament bundles (Figure 4). Similarly to the wild-type protein, mutant FtsZ also formed individual protofilaments and large protofilament bundles upon polymerization. Addition of MinC to the reaction abolished bundle formation by the wild-type protein (Figure 4, +MinC row). In contrast, bundle formation by mutant FtsZ was basically insensitive to MinC (Figure 4, +MinC row), although the bundles formed in the presence of MinC were somewhat less regular than those in control reactions, perhaps because of residual MinC binding to the mutant FtsZ. Thus, based on two independent *in vitro* assays, we conclude that every one of our FtsZ mutants is resistant to the biochemical activity of MinC.

Determination of the GTPase Activity and Critical Concentration of FtsZ Mutant

Resistance to MinC could arise because a mutation disrupted contact between FtsZ and MinC, or indirectly, if the mutation alters the polymerization properties of FtsZ. Indirect resistance is

often associated with a significant decrease in the GTPase activity of FtsZ [44,45]. Thus, to try to distinguish the biochemical mechanism behind resistance in our mutants we measured their GTPase activity using a malachite green assay. This showed that the T111A mutant had tenfold lower GTPase activity (Table 3, Figure S6), consistent with other data suggesting that it is an indirect mutant. All other mutants had essentially normal GTPase activity, varying from 80 to 140% of the activity displayed by the wild-type protein (Table 3, Figure S6).

We also measured the critical concentration of polymerization of the FtsZ mutants by assaying their GTPase activity over a range of FtsZ concentrations. These experiments showed that the critical concentration of mutant proteins was not significantly altered (Table 3, Figure S7), ranging from two fold lower than the wild-type, in the case of FtsZ Δ CTP, to two fold higher than the wild-type, in the case of T111A. Most of the mutants, however, had critical concentrations very similar to the wild-type, implying that alterations in the affinity of the FtsZ-FtsZ interaction cannot explain their resistance to MinC.

Mutants on the H10 Helix and CTP of FtsZ Exhibit Reduced Binding to MinC

We have exhaustively attempted to measure binding between FtsZ and MinC by co-sedimentation, pull-down and far-Western assays but failed (data not shown). These assays were successful in demonstrating a direct interaction between FtsZ and MinC in the case of the *E. coli* proteins [16,33,39] but previous *in vitro* work with *B. subtilis* FtsZ and MinC also failed to reproduce the *E. coli* results [55]. The discrepancy between the behavior of the *E. coli* and *B. subtilis* proteins may reflect real differences in their biochemical properties, or may be related to the different tags used to purify MinC. The MalE tag used with *E. coli* MinC has been shown to exhibit non-specific binding to *B. subtilis* FtsZ [17] and, thus, it is conceivable that this tag may stabilize the FtsZ-MinC interaction in the *E. coli* studies.

We have succeeded in using intrinsic tryptophan fluorescence to monitor the interaction between *B. subtilis* FtsZ and MinC. Trp fluorescence is a widely accepted way to demonstrate protein-protein interactions and has the advantage of being a homogenous solution assay. Because *B. subtilis* MinC lacks tryptophan we employed site-directed mutagenesis to introduce tryptophan residues in two positions in the N-terminal domain of MinC (Y44 and F62). These positions were chosen because they are surface exposed on a model of *B. subtilis* MinC structure, and originally contained aromatic amino acids suggesting that a substitution to tryptophan would be tolerated. Testing of these Trp mutants revealed that only Y44W remained functional, as determined by the inhibition of FtsZ polymerization in light scattering assays (Figure S8). Mixing of MinC Y44W with FtsZ led to a 50% increase in Trp emission intensity. This suggests that the tryptophan at position 44 is becoming less solvent exposed in the presence of FtsZ and could indicate that this residue participates in the contact between MinC and FtsZ. The increase in tryptophan fluorescence of MinC Y44W was saturable (Figure S9), as expected if it were reporting the binding interaction between MinC and FtsZ. The low signal to noise ratio of our assay prevented us from determining a precise K_d from titrations like the one in Figure S9, but the tendency to saturation over 1 μ M FtsZ implies that the K_d for the interaction between FtsZ and MinC in *B. subtilis* will be around 1 μ M. This is not very different from the value (6 μ M) measured by Shen and Lutkenhaus [39] for *E. coli* using SPR. Next, we used the Trp fluorescence of MinC Y44W as a readout to measure binding between MinC and the FtsZ mutants. Experiments with single mutants showed a tendency

Table 3. GTPase activity and Cc of FtsZ mutants.

	GTPase FtsZ ⁻¹ min ⁻¹	Cc (μ M)
WT	2.6 $\pm$ 0.2 (100 $\pm$ 8%)	1.6
T111A	0.3 $\pm$ 0.01 (13 $\pm$ 3%)	3.3
K243R	2.1 $\pm$ 0.1 (81 $\pm$ 5%)	2.1
D287V	4.3 $\pm$ 0.2 (165 $\pm$ 5%)	1.9
R376T	2.4 $\pm$ 0.1 (89 $\pm$ 4%)	1.5
Δ CTP	2.3 $\pm$ 0.1 (88 $\pm$ 4%)	0.8

doi:10.1371/journal.pone.0060690.t003

Figure 3. Polymerization of FtsZ mutants in vitro is not affected by MinC. A. Representative light scattering trace of an experiment performed with wild-type FtsZ in the absence of inhibitor and in the presence of MinC or MinC19. Reactions contained 7 μ M of FtsZ and 20 μ M of MinC or MinC19 in Mes/NaOH 50 mM, MgCl₂ 10 mM, KCl 133 mM, DEAE-dextran 0.6 mg/mL, pH 6.5. B. Experiments similar to A were performed and the inhibition of the polymerization of each FtsZ mutant by MinC was quantified relative to the maximum light scattering signal in the absence of MinC. The original light scattering traces corresponding to this graph can be found in Fig. S4. Measurements were repeated at least three times for each FtsZ mutant with similar results.
doi:10.1371/journal.pone.0060690.g003

towards loss of binding (data not shown) but the results were too variable to be conclusive, probably because our assay lacks sensitivity to detect moderate changes in binding affinity. To circumvent this problem, we constructed a double mutant, FtsZ K243R,D287V, combining two of the substitutions postulated to affect MinC-FtsZ contacts. Assaying this mutant at three protein concentrations (1, 2, and 3 μ M) that approach or are above the saturating concentration for wild-type FtsZ showed essentially no change in MinC Y44W fluorescence (see Figure 5 for a

representative experiment and Figure S10 for the average of all concentrations tested). This is consistent with the hypothesis that the Min-specific mutations we identified in our screen do indeed alter binding site residues in FtsZ.

Discussion

We have used combined genetic and biochemical approaches to identify the binding site for MinC in *B. subtilis* FtsZ. By screening a

Figure 4. Electron microscopy of FtsZ polymers formed in the presence or absence of MinC. Purified wild-type and mutant FtsZ were polymerized in reactions containing 5 μ M of FtsZ, Mes/NaOH 50 mM, $MgCl_2$ 10 mM, KCl 133 mM, pH 6.5, and either no (top row) or 20 μ M MinC (bottom row). Polymerization reactions were spotted on carbon coated 400 mesh copper grids and stained with uranyl acetate for transmission electron microscopy. Scale bars equal 200 nm.
doi:10.1371/journal.pone.0060690.g004

comprehensive library of FtsZ mutants for substitutions that conferred resistance to MinC we identified a series of residues in the vicinity of helices H9 and H10 in the C-terminal subdomain of FtsZ. We also found that a substitution on the CTP of *B. subtilis* FtsZ was capable of generating MinC resistance. Previous work from the Errington lab [56] had already identified three of the same mutations found in our screen (*ftsZ4*–A285T; *ftsZ3*–V260A; *ftsZ24*–I245F) as likely insensitive to MinC based on the observation that they caused cells to resemble a Min mutant and produce minicells. More recently, the Scheffers group confirmed this suspicion by reisolating some of the mutations described in the Errington paper in a screen for MinCD resistance [55]. However, biochemical characterization of these proteins failed to provide a conclusive molecular explanation for their MinCD resistance [55]. Here we have confirmed and extended this work, by providing a thorough biochemical characterization of a group of Min resistant mutants that strongly implicate the H9–H10 helix region as part of the binding site for MinC in *B. subtilis* FtsZ. In addition, we have provided evidence for the first time that the CTP of FtsZ is involved in the interaction with MinC in *B. subtilis*.

Our data is consistent with a model in which the residues in the vicinity of helices H9–H10 and in the CTP of *B. subtilis* FtsZ are the contact sites for MinC. This conclusion is supported by the following evidence: First, mutations in these regions are associated with specific resistance to MinC and do not show cross-resistance to other FtsZ inhibitors (Table 1). Secondly, the GTPase activity and polymerization properties of these mutants are very similar to the wild-type (Figures 3, 4, S5, Table 3). This implies that their resistance is due to the loss of a MinC-FtsZ protein-protein contact, instead of being an indirect consequence of altered dynamics of FtsZ polymerization. Thirdly, mutants with alterations in these regions showed reduced interaction with MinC *in vitro*, as inferred from tryptophan fluorescence experiments (Figure 5).

Most of the mutations conferring MinC resistance identified in this study are located in surface residues that cluster at the C-terminal ends of helices H9 and H10 and the intervening loops between them. We also found two buried residues (V260 and V310) in this region that conferred MinC resistance. These residues are part of the beta sheet that lies underneath helices H9

and H10, and may affect the putative binding site for MinC by perturbing the overall topology of these helices. Importantly, the patch of mutated residues in helices H9 and H10 corresponds to a highly negative region of the FtsZ surface (Figure 6B), suggesting that the interaction between FtsZ and MinC has an important electrostatic component. Consistent with this, Scheffers [17] demonstrated that the *B. subtilis* FtsZ–MinC interaction is pH sensitive, being weaker at lower pH, and we found that the FtsZ–MinC interaction detected in our fluorescence experiments was inhibited by salt (Figure S11). Another interesting observation about the binding site for MinC in *B. subtilis* FtsZ is that the patch of negative residues on helices H9–H10 is located next to the region where the unstructured CTP emerges from the FtsZ molecule (residue F315, marked in orange in Figure 6A). Thus, the two regions of FtsZ recognized by MinC are close in space and may in fact need to come together to generate the MinC binding surface in FtsZ.

Our screen also identified a mutation in the CTP of *B. subtilis* FtsZ (R376T) as sufficient to confer resistance to MinC. Analogous mutations in *E. coli* also produce resistance to moderate overexpression of MinCD, even though they are still sensitive to overexpression of the N-terminal domain of MinC [38,39]. The *in vitro* resistance of R376T to MinC (Fig. 3) mirrors its *in vivo* resistance, but the fact that this protein is the least resistant mutant *in vitro* may reflect that it should still retain contacts with the N-terminal domain of MinC. Residue R376T is part of the conserved core of the CTP motif of FtsZ. This arginine has recently been shown by X-ray crystallography to be part of the contacts between the CTP and FtsA in *Thermotoga maritima* [57] and to be critical for the interaction with SepF in *Bacillus subtilis* [58]. Thus, this may explain why mutation of this residue causes a significant impairment in *B. subtilis* division *in vivo*, even though the mutant protein polymerizes normally *in vitro* (see Tables 2 and 3). In *E. coli*, four CTP residues were found to confer MinC resistance (D373, I374, L378, K380) but R379 (the equivalent of R376 in *B. subtilis*) was not one of them. The lack of overlap between the CTP mutations is likely due to the superficiality of our sampling. Our screen was done against full length MinC, a situation that probably favors retrieval of mutations in the H9–H10 region since

Figure 5. Trp fluorescence measurements of MinC binding to mutant FtsZ. Wild-type or double-mutant (K243R,D287V) FtsZ (2 μ M) were mixed with 1 μ M MinC Y44W in buffer Tris/HCl 20 mM, KCl 100 mM, EDTA 5 mM, pH 7.5 and fluorescence emission at 320–360 nm was recorded. A. Representative trace of one experiment. B. Averaged quantitation of 3 experiments, with standard deviations. doi:10.1371/journal.pone.0060690.g005

these do not seem to perturb the normal function of FtsZ, in contrast with the mutations in the CTP.

We also identified mutations that promoted MinC resistance because they altered the GTPase activity and, consequently, the dynamics of FtsZ polymerization. The two mutations that had demonstrated reductions in GTPase activity were T111A and L69S (Table 3 and data not shown). Mutations in residue L68 of *E. coli* FtsZ (equivalent to L69 in *B. subtilis*) had been shown before to lower GTPase activity 2 to 30 fold, depending on the substitution [59]. In contrast, the T111A mutation had never been reported before. Residue T111 is the second threonine in the conserved “tubulin signature motif” of FtsZ. It is located at the end of the T4 loop and may engage in interactions with the beta phosphate of GTP (in fact, the side chain hydroxyl of T111 seems to make a hydrogen bond to a water molecule that, in turn, makes an H bond to the beta phosphate in structure 2RHL of *B. subtilis* FtsZ [60]). The substitution of T111 for alanine lowers GTPase activity 10 fold and does not affect the critical concentration of the protein, as expected from the fact that this residue does not participate in the FtsZ longitudinal bond. Mutations in other

canonical tubulin signature motif residues, such as G105S (the ζ 84 *E. coli* allele) and T108A (the ζ 3 *E. coli* allele), have been shown to also cause marked reduction in GTPase activity [61–63]. Among the mutations whose GTPase was not tested, I293T is located on the bottom surface of FtsZ, very close to loop T7, which contains critical residues for GTP hydrolysis. Mutations in residues next to I293 (W319Y of *Methanococcus jannaschii*, I294W of *E. coli*) showed 10 to 100 fold reduced GTPase [64,65] and it is likely that I293T will have the same effect. Lastly, T232I is on a lateral surface of FtsZ, away from residues involved in GTP binding and hydrolysis. The only evidence suggesting it may affect GTPase activity is cross-resistance to another FtsZ modulator (ZapA-MTS). Better characterization of this mutant will be necessary before we can explain why it becomes resistant to MinC.

GTPase down mutations have been known for some time to cause resistance to FtsZ inhibitors [44,66]. The requirement for a dynamic polymer is easier to rationalize for inhibitors such as SulA that bind to the polymerization interface of FtsZ [67]. In this case, a more stable FtsZ-FtsZ interaction should outcompete binding of the inhibitor. However, we postulate that a more stable FtsZ-FtsZ interaction may also lead to resistance to inhibitors that affect the higher order assembly of FtsZ polymers, such as MinC, by increasing the likelihood that FtsZ filaments will assemble into bundles or other multifilament structures. Bundling of filaments depends on weak lateral interactions between individual FtsZ subunits in the filaments. Because slowing down GTP hydrolysis leads to longer FtsZ filaments [68], this should facilitate bundle formation. In line with this idea, low GTPase mutants of FtsZ tend to assemble in vitro into larger and more regular structures than the wild-type protein (see for example the sheets produced by ζ 84 [63]).

The identification of the MinC binding site in *B. subtilis* FtsZ should contribute to further the understanding of the mechanism of this inhibitor. In *E. coli*, MinC binds simultaneously to the CTP and the H10 helix of FtsZ. The interaction between the C-terminal domain of MinC and the CTP was proposed to target MinC to the Z ring, whereas the interaction of the N-terminal domain of MinC with the H10 helix of FtsZ would exert the inhibitory effect of MinC on FtsZ assembly. Because the residue conferring resistance to MinCs N-terminal domain is part of the FtsZ-FtsZ interface and seems to contribute to polymer stability, inhibition by MinC in *E. coli* has been proposed to involve weakening of the bonds that form the protofilament [39]. Our findings establish that the overall architecture of the MinC-FtsZ interaction is similar in *B. subtilis*, involving the same two regions of FtsZ identified in *E. coli*. However, closer inspection of the H9–H10 mutations that confer MinC resistance in each species suggests that there are significant differences in the details of how MinC interacts with FtsZ. Whereas H10 mutations in *E. coli* affect residues involved in FtsZ-FtsZ contacts, in *B. subtilis* the residues affected will be surface exposed when the protein is polymerized (see Figure 6A for this comparison). Even though our screen was close to saturation, we cannot rule out that it missed mutations in the FtsZ-FtsZ interface similar to the ones described by Shen and Lutkenhaus [39]. Nevertheless, we find it more likely that our data reflects a real difference in the mechanism of MinC in *B. subtilis* and *E. coli*. There are several important differences in the biology of the Min system in *B. subtilis* and *E. coli*, including the topological specificity factors and the mechanism of polar localization of the Min proteins. In addition, recent work by the Levin lab demonstrated that there is significant variation in the polymerization properties of FtsZ of *B. subtilis* and *E. coli*, with the protein from *B. subtilis* being naturally more prone to bundling [69]. Furthermore, the N-terminal domain of MinC, which is the portion of the protein that binds to the H9–H10 region of FtsZ, is

Figure 6. The binding site for MinC differs in *B. subtilis* and *E. coli* FtsZ. A. Comparison between mutations that promote MinC resistance in *B. subtilis* (red residues) and *E. coli* (blue residues) mapped onto the 2VAM FtsZ structure [75]. *E. coli* residue N280 corresponds to *B. subtilis* D280; E276 corresponds to Q276; R271 corresponds to S271. Two other important landmarks are highlighted in the structure: catalytic residue D213, shown in yellow, defines the center of the FtsZ-FtsZ interface (the polymerization axis follows a vertical line through this residue); and the point where the CTP should emerge from the structure (residue F315) is shown in orange. B. Surface electrostatic potential of *B. subtilis* FtsZ (2VAM) obtained with the “protein contact potential” tool of PyMOL. Note that the MinC binding site corresponds to a highly negative region of the FtsZ molecule. doi:10.1371/journal.pone.0060690.g006

quite dissimilar between Gram-negative and Gram-positive bacteria (17% identity over 107 aminoacids), suggesting that the proteins evolved in response to different functional constraints, such as the ones just mentioned. Thus, we propose that Z ring inhibition in *B. subtilis* is a consequence of MinC preventing FtsZ filament bundling and does not involve the perturbation of longitudinal FtsZ-FtsZ contacts.

The proposed anti-bundling mechanism for *B. subtilis* MinC makes sense in light of the current models of Z ring formation. A key step in Z ring maturation is the compaction of FtsZ helices into a tight ring [70,71], which is facilitated by proteins such as ZapA that bundle FtsZ filaments [72,73]. Given the known antagonistic activities of ZapA and MinC detected in genetic and biochemical experiments [17,33,43], it seems reasonable to assume that preventing bundling should be sufficient to inhibit Z ring formation. Further support for the idea that bundling is crucial for Z ring formation comes from the observation that mutations in the lateral surfaces of FtsZ often generated proteins incapable of supporting Z ring formation *in vivo* [63,74], and, more recently, that removing the positive residues on the CTP that facilitate bundling of *B. subtilis* FtsZ is sufficient to impair Z ring formation and division [69]. Even the proposed filament-breaking activity of *E. coli* MinC may in fact perturb Z ring formation by reducing the likelihood that the smaller filaments will form bundles. In this regard, it is noteworthy that *E. coli* seems to be more sensitive than *B. subtilis* to the absence of the bundling activity provided by ZapA [73].

In summary, we have identified the binding sites for MinC in *B. subtilis* FtsZ and found that they differ significantly from that in *E. coli*. This led us to propose that the mechanism of MinC action differs in both species, being primarily at the level of inhibiting FtsZ filament bundle formation in *B. subtilis*. In addition to advancing our understanding of the MinC protein of *B. subtilis*, our work highlights the variation that may exist in the biochemistry underlying the function of even conserved components of the divisome.

Supporting Information

Figure S1 Cross-resistance of FtsZ mutants. Mutants were evaluated in three different strain backgrounds, each capable

of overexpressing a different FtsZ modulator (top: MinD; middle: ZapA-MTS; bottom: MciZ). Strains were streaked onto a control plate or a plate containing inducer to promote overexpression of MinD, ZapA-MTS or MciZ. Growth was scored after overnight incubation at 37°C.

(TIF)

Figure S2 Amino acid sequence alignment of FtsZ proteins, from *B. subtilis* (P17865), *E. coli* (P0A9A6) and *M. jannaschii* (Q57816) using ClustalW2. Secondary structure prediction using Sequence Annotated by Structure-SAS (7) for *B. subtilis* FtsZ is shown above the alignment. The residues affected in the Min-resistant mutations we characterized are indicated by red asterisks (L69S; T111R/A; T232I; K243R; I245F; D255V; V260A; A285T; D287V; I293T; V310A; R376T). The *E. coli* residues that confer MinC resistance are indicated by blue asterisks (R271; E276; N280; D373; I374; L378; K380).

(TIF)

Figure S3 CD spectroscopy of purified FtsZ proteins.

Circular dichroism spectra in the far-UV region (193–260 nm) were measured on a Jasco J-810 spectropolarimeter with a Peltier temperature control unit (Jasco Corp. Tokyo, Japan). Wild type FtsZ and mutants were measured at 5 μM in 1 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM KCl, 0.02 mM EDTA and 0.2% glycerol in a 1 mm path length quartz cell at a scanning speed of 100 nm/min and by the averaging of 10 scans.

(TIF)

Figure S4 Light scattering traces of MinC inhibition of individual FtsZ mutants. Light scattering traces of polymerization reactions with 7 μM FtsZ and 20 μM MinC in buffer (Mes/NaOH 50 mM, MgCl₂ 10 mM, KCl 133 mM, DEAE-dextran 0.6 mg/mL, pH 6.5), polymerized with 1 mM GTP.

(TIF)

Figure S5 Sedimentation assay of FtsZ^{WT} and mutants visualized by SDS-PAGE. Reactions contained 7 μM of FtsZ in polymerization buffer (Mes/NaOH 50 mM, MgCl₂ 10 mM, KCl 133 mM, DEAE-dextran 0.6 mg/mL, pH 6.5) with GTP 2 mM were assembled at room temperature and spun down at 100,000 rpm for 15 min using a TLA 120.1 rotor. The pellet (P)

was resuspended in the same volume as the supernatant (S) and applied in a 15% polyacrylamide gel.
(TIF)

Figure S6 Kinetics of GTP hydrolysis by mutant FtsZ. 10 μ M of purified His6-FtsZ mutants were assayed as described in Material and Methods and the concentration of inorganic phosphate measured every 2 minutes for 14 minutes. The activity was determined by calculating the slope of the resulting line.
(TIF)

Figure S7 Determination of critical concentration of polymerization of FtsZ mutants. Purified His6-FtsZ mutants were assayed and their enzymatic activity were determined as described in Material and Methods. The critical concentration (Cc) of each mutant FtsZ was calculated by plotting the GTPase activity in different protein concentrations and finding the intersection between the resulting line and the x axis.
(TIF)

Figure S8 Evaluation of MinC tryptophan mutants. A, B) Light scattering traces of polymerization reactions with 7 μ M FtsZ and 20 μ M MinC Y44W or F62W in Mes/NaOH 50 mM, MgCl₂ 10 mM, KCl 133 mM, DEAE-dextran 0.6 mg/mL, pH 6,5 followed for 300s. Black line, polymerization in the absence of MinC, red line, polymerization in the presence of MinC. C, D) Fluorescence emission spectra of MinC Y44W (C) and F62W (D) in the absence (black lines) or presence (red lines) of FtsZ. MinC was at 1 μ M, FtsZ at 2 μ M in Tris/HCl 20 mM, KCl 100 mM, EDTA 5 mM, pH 7.5. Excitation 295 nm/emmission 320–360 nm.
(TIF)

Figure S9 Titration of MinC Y44W with wild-type FtsZ. Fluorescence emission spectra of 1 μ M MinC Y44W in the presence of 0.5; 1; 1.5 and 2 μ M FtsZ in Tris/HCl 20 mM, KCl 100 mM, EDTA 5 mM, pH 7.5.
(TIF)

References

- Nanninga N (1991) Cell division and peptidoglycan assembly in *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. 5: 791–795.
- Goehring NW, Beckwith J (2005) Diverse paths to midcell: assembly of the bacterial cell division machinery. Curr. Biol. 15: R514–526.
- Gueiros-Filho F (2011) In: Graumann, P. L., ed. *Bacillus: Cellular and Molecular Biology*, 2nd Ed., 85–122, Caister Academic Press, Norfolk.
- Vaughan S, Wickstead B, Gull K, Addinall SG (2004) Molecular evolution of FtsZ protein sequences encoded within the genomes of archaea, bacteria, and eukaryota. J. Mol. Evol. 58: 19–29.
- Bi EF, Lutkenhaus J (1991) FtsZ ring structure associated with division in *Escherichia coli*. Nature 354: 161–164.
- Erickson HP, Anderson DE, Osawa M (2010) FtsZ in bacterial cytokinesis: cytoskeleton and force generator all in one. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 74: 504–528.
- Adams DW, Errington J (2009) Bacterial cell division: assembly, maintenance and disassembly of the Z ring. Nat. Rev. Microbiol. 7: 642–653.
- Rothfield L, Taghbalout A, Shih YL (2005) Spatial control of bacterial division-site placement. Nat. Rev. Microbiol. 3: 959–968.
- Lutkenhaus J (2007) Assembly dynamics of the bacterial MinCDE system and spatial regulation of the Z ring. Annu. Rev. Biochem. 76: 539–562.
- de Boer PA, Crossley RE, Rothfield LI (1989) A division inhibitor and a topological specificity factor coded for by the minicell locus determine proper placement of the division septum in *E. coli*. Cell 56: 641–649.
- Gregory JA, Becker EC, Pogliano K (2008) *Bacillus subtilis* MinC destabilizes FtsZ-rings at new cell poles and contributes to the timing of cell division. Genes Dev. 22: 3475–3488.
- Adler HI, Fisher WD, Cohen A, Hardigree AA (1967) Miniature *Escherichia coli* cells deficient in DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 57: 321–326.
- Reeve JN, Mendelson NH, Coyne SI, Hallock LL, Cole RM (1973) Minicells of *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 114: 860–873.
- Wu IJ, Errington J (2004) Coordination of cell division and chromosome segregation by a nucleoid occlusion protein in *Bacillus subtilis*. Cell 117: 915–925.
- Bernhardt TG, de Boer PA (2005) SlnA, a nucleoid-associated, FtsZ binding protein required for blocking septal ring assembly over Chromosomes in *E. coli*. Mol. Cell 18: 555–564.
- Hu Z, Mukherjee A, Pichoff S, Lutkenhaus J (1999) The MinC component of the division site selection system in *Escherichia coli* interacts with FtsZ to prevent polymerization. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 96: 14819–14824.
- Scheffers DJ (2008) The effect of MinC on FtsZ polymerization is pH dependent and can be counteracted by ZapA. FEBS Lett. 582: 2601–2608.
- Huang J, Cao C, Lutkenhaus J (1996) Interaction between FtsZ and inhibitors of cell division. J. Bacteriol. 178: 5080–5085.
- Szeto TH, Rowland SL, Rothfield LI, King GF (2002) Membrane localization of MinD is mediated by a C-terminal motif that is conserved across eubacteria, archaea, and chloroplasts. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 99: 15693–15698.
- Hu Z, Lutkenhaus J (2003) A conserved sequence at the C-terminus of MinD is required for binding to the membrane and targeting MinC to the septum. Mol. Microbiol. 47: 345–355.
- Lackner LL, Raskin DM, de Boer PA (2003) ATP-dependent interactions between *Escherichia coli* Min proteins and the phospholipid membrane in vitro. J. Bacteriol. 185: 735–749.
- Marston AL, Thomaidis HB, Edwards DH, Sharpe ME, Errington J (1998) Polar localization of the MinD protein of *Bacillus subtilis* and its role in selection of the mid-cell division site. Genes Dev. 12: 3419–3430.
- Fadda D, Pischedda C, Caldara F, Whalen MB, Anderluzzi D, et al. (2003) Characterization of *divIVA* and other genes located in the chromosomal region downstream of the *dcw* cluster in *Streptococcus pneumoniae*. J. Bacteriol. 185: 6209–6214.
- Flardh K (2003) Essential role of DivIVA in polar growth and morphogenesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2). Mol. Microbiol. 49: 1523–1536.
- Ramirez-Arcos S, Liao M, Marthaler S, Rigden M, Dillon JA (2005) *Enterococcus faecalis* *divIVA*: an essential gene involved in cell division, cell growth and chromosome segregation. Microbiology 151: 1381–1393.
- Nguyen L, Scherr N, Gatfield J, Walburger A, Pieters J, et al. (2007) Antigen 84, an effector of pleiomorphism in *Mycobacterium smegmatis*. J. Bacteriol. 189: 7896–7910. Epub 2007 Aug 7831.

Figure S10 Effect of wild-type and K243R D287V double mutant FtsZ on MinC Y44W fluorescence. The graph represents the mean and standard deviations of three independent experiments in which we compared the effect of 1, 2 and 3 μ M FtsZ (wild-type or K243R, D287V) in the fluorescence of MinC Y44W.
(TIF)

Figure S11 Trp fluorescence experiment showing the effect of salt on MinC-FtsZ interaction. Wild-type FtsZ (2 μ M) was mixed with 1 μ M MinC Y44W in buffer Tris/HCl 20 mM, EDTA 5 mM, pH 7,5, in the presence of either 100 mM or 1 M KCl. Fluorescence emission at 320–360 nm was recorded.
(TIF)

Table S1 Strain and plasmid list.
(PDF)

Table S2 Oligonucleotide list.
(PDF)

Text S1 Description of plasmid and strain construction, and supporting information references.
(PDF)

Acknowledgments

We thank Harold Erickson for suggestions, Andrea Dessen for critical reading of the manuscript, David Dubnau for strains, and Wanius Garcia, Diorge de Souza and Chuck Farah for advice on biophysical measurements. We also thank Márcio Gato Gonçalves for the construction of plasmid pMG01. We thank LNBio– Brazilian Biosciences National Laboratory, in Campinas for access to their facilities.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: VB ABF JB RP AZ FGF. Performed the experiments: VB ABF PC MN JB RP. Analyzed the data: VB ABF PC MN JB RP AZ FGF. Wrote the paper: VB ABF FGF.

27. Lenarcic R, Halbedel S, Visser L, Shaw M, Wu LJ, et al. (2009) Localisation of DivIVA by targeting to negatively curved membranes. *EMBO J.* 28: 2272–2282.
28. Ramamurthi KS, Losick R (2009) Negative membrane curvature as a cue for subcellular localization of a bacterial protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 106: 13541–13545.
29. Bramkamp M, Emmins R, Weston L, Donovan C, Daniel RA, et al. (2008) A novel component of the division site selection system of *Bacillus subtilis* and a new mode of action for the division inhibitor MinCD. *Mol. Microbiol.* 70: 1556–1569.
30. Patrick JE, Kearns DB (2008) MinJ (YvjD) is a topological determinant of cell division in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 70: 1166–1179.
31. Raskin DM, de Boer PA (1999) Rapid pole-to-pole oscillation of a protein required for directing division to the middle of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 96: 4971–4976.
32. Kruse K, Howard M, Margolin W (2007) An experimentalist's guide to computational modelling of the Min system. *Mol. Microbiol.* 63: 1279–1284.
33. Dajkovic A, Lan G, Sun SX, Wirtz D, Lutkenhaus J (2008) MinC spatially controls bacterial cytokinesis by antagonizing the scaffolding function of FtsZ. *Curr. Biol.* 18: 235–244.
34. Hu Z, Lutkenhaus J (2000) Analysis of MinC reveals two independent domains involved in interaction with MinD and FtsZ. *J. Bacteriol.* 182: 3965–3971.
35. Cordell SC, Anderson RE, Lowe J (2001) Crystal structure of the bacterial cell division inhibitor MinC. *EMBO J.* 20: 2454–2461.
36. Zhou H, Lutkenhaus J (2005) MinC mutants deficient in MinD- and DivB-mediated cell division inhibition due to loss of interaction with MinD, DivB, or a septal component. *J. Bacteriol.* 187: 2846–2857.
37. Shiomi D, Margolin W (2007) The C-terminal domain of MinC inhibits assembly of the Z ring in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 189: 236–243. Epub 2006 Nov 2003.
38. Shen B, Lutkenhaus J (2009) The conserved C-terminal tail of FtsZ is required for the septal localization and division inhibitory activity of MinC(C)/MinD. *Mol. Microbiol.* 72: 410–424.
39. Shen B, Lutkenhaus J (2010) Examination of the interaction between FtsZ and MinCN in *E. coli* suggests how MinC disrupts Z rings. *Mol. Microbiol.* 75: 1285–1298.
40. Lowe J, Amos LA (1998) Crystal structure of the bacterial cell-division protein FtsZ. *Nature* 391: 203–206.
41. Erickson HP (2001) The FtsZ protofilament and attachment of ZipA—structural constraints on the FtsZ power stroke. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 13: 55–60.
42. Pichoff S, Lutkenhaus J (2002) Unique and overlapping roles for ZipA and FtsA in septal ring assembly in *Escherichia coli*. *EMBO J.* 21: 685–693.
43. Gueiros-Filho FJ, Losick R (2002) A widely conserved bacterial cell division protein that promotes assembly of the tubulin-like protein FtsZ. *Genes Dev.* 16: 2544–2556.
44. Dai K, Mukherjee A, Xu Y, Lutkenhaus J (1994) Mutations in *ftsZ* that confer resistance to SulA affect the interaction of FtsZ with GTP. *J. Bacteriol.* 176: 130–136.
45. Dajkovic A, Mukherjee A, Lutkenhaus J (2008) Investigation of regulation of FtsZ assembly by SulA and development of a model for FtsZ polymerization. *J. Bacteriol.* 190: 2513–2526.
46. Handler AA, Lim JE, Losick R (2008) Peptide inhibitor of cytokinesis during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 68: 588–599.
47. Chen Y, Bjornson K, Redick SD, Erickson HP (2005) A rapid fluorescence assay for FtsZ assembly indicates cooperative assembly with a dimer nucleus. *Biophys. J.* 88: 505–514.
48. Chen Y, Erickson HP (2011) Conformational changes of FtsZ reported by tryptophan mutants. *Biochemistry* 50: 4675–4684.
49. Hale CA, Rhee AC, de Boer PA (2000) ZipA-induced bundling of FtsZ polymers mediated by an interaction between C-terminal domains. *J. Bacteriol.* 182: 5153–5166.
50. Haney SA, Glasfeld E, Hale C, Keeney D, He Z, et al. (2001) Genetic analysis of the *Escherichia coli* FtsZ/ZipA interaction in the yeast two-hybrid system. Characterization of FtsZ residues essential for the interactions with ZipA and with FtsA. *J. Biol. Chem.* 276: 11980–11987.
51. Singh JK, Makde RD, Kumar V, Panda D (2007) A membrane protein, EzrA, regulates assembly dynamics of FtsZ by interacting with the C-terminal tail of FtsZ. *Biochemistry* 46: 11013–11022.
52. Singh JK, Makde RD, Kumar V, Panda D (2008) SepF increases the assembly and bundling of FtsZ polymers and stabilizes FtsZ protofilaments by binding along its length. *J. Biol. Chem.* 283: 31116–31124.
53. Cha JH, Stewart GC (1997) The divIVA minicell locus of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 179: 1671–1683.
54. Edwards DH, Errington J (1997) The *Bacillus subtilis* DivIVA protein targets to the division septum and controls the site specificity of cell division. *Mol. Microbiol.* 24: 905–915.
55. de Oliveira IF, de Sousa Borges A, Kooij V, Bartosiak-Jentys J, Luirink J, et al. (2010) Characterization of *ftsZ* mutations that render *Bacillus subtilis* resistant to MinC. *PLoS One* 5: e12048.
56. Feucht A, Errington J (2005) *ftsZ* mutations affecting cell division frequency, placement and morphology in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* 151: 2053–2064.
57. Szwedziak P, Wang Q, Freund SM, Lowe J (2012) FtsA forms actin-like protofilaments. *EMBO J.* 31: 2249–2260.
58. Krol E, van Kessel SP, van Bezouwen LS, Kumar N, Boekema EJ, et al. (2012) *Bacillus subtilis* SepF binds to the C-terminus of FtsZ. *PLoS One* 7: e43293.
59. Redick SD, Stricker J, Briscoe G, Erickson HP (2005) Mutants of FtsZ targeting the protofilament interface: effects on cell division and GTPase activity. *J. Bacteriol.* 187: 2727–2736.
60. Raymond A, Lovell S, Lorimer D, Walchli J, Mixon M, et al. (2009) Combined protein construct and synthetic gene engineering for heterologous protein expression and crystallization using Gene Composer. *BMC Biotechnol.* 9: 37.
61. RayChaudhuri D, Park JT (1992) *Escherichia coli* cell-division gene *ftsZ* encodes a novel GTP-binding protein. *Nature* 359: 251–254.
62. de Boer P, Crossley R., Rothfield L (1992) The essential bacterial cell-division protein FtsZ is a GTPase. *Nature* 359: 254–256.
63. Lu C, Stricker J, Erickson HP (2001) Site-specific mutations of FtsZ - effects on GTPase and in vitro assembly. *BMC Microbiol.* 1: 7.
64. Oliva MA, Huecas S, Palacios JM, Martin-Benito J, Valpuesta JM, et al. (2003) Assembly of archaeal cell division protein FtsZ and a GTPase-inactive mutant into double-stranded filaments. *J. Biol. Chem.* 278: 33562–33570.
65. Diaz-Espinoza R, Garces AP, Arbildua JJ, Montecinos F, Brunet JE, et al. (2007) Domain folding and flexibility of *Escherichia coli* FtsZ determined by tryptophan site-directed mutagenesis. *Protein Sci.* 16: 1543–1556.
66. Radhakrishnan SK, Pritchard S, Viollier PH (2010) Coupling prokaryotic cell fate and division control with a bifunctional and oscillating oxidoreductase homolog. *Dev. Cell* 18: 90–101.
67. Cordell SC, Robinson EJ, Lowe J (2003) Crystal structure of the SOS cell division inhibitor SulA and in complex with FtsZ. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 100: 7889–7894.
68. Romberg L, Simon M, Erickson HP (2001) Polymerization of FtsZ, a bacterial homolog of tubulin. is assembly cooperative? *J. Biol. Chem.* 276: 11743–11753.
69. Buske PJ, Levin PA (2012) Extreme C terminus of bacterial cytoskeletal protein FtsZ plays fundamental role in assembly independent of modulatory proteins. *J. Biol. Chem.* 287: 10945–10957.
70. Thanedar S, Margolin W (2004) FtsZ exhibits rapid movement and oscillation waves in helix-like patterns in *Escherichia coli*. *Curr. Biol.* 14: 1167–1173.
71. Peters PC, Migocki MD, Thoni C, Harry EJ (2007) A new assembly pathway for the cytokinetic Z ring from a dynamic helical structure in vegetatively growing cells of *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 64: 487–499.
72. Monahan LG, Robinson A, Harry EJ (2009) Lateral FtsZ association and the assembly of the cytokinetic Z ring in bacteria. *Mol. Microbiol.* 74: 1004–1017.
73. Dajkovic A, Pichoff S, Lutkenhaus J, Wirtz D (2010) Cross-linking FtsZ polymers into coherent Z rings. *Mol. Microbiol.* 78: 651–668.
74. Stricker J, Erickson HP (2003) In vivo characterization of *Escherichia coli ftsZ* mutants: effects on Z-ring structure and function. *J. Bacteriol.* 185: 4796–4805.
75. Oliva MA, Trambaiolo D, Lowe J (2007) Structural insights into the conformational variability of FtsZ. *J. Mol. Biol.* 373: 1229–1242.