**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas
(Bioquímica)**

Alexandre Wilson Bisson Filho

**Estudo Genético da Interação entre FtsZ e o
Modulador de Divisão ZapA em *Bacillus subtilis***

São Paulo

Data do Depósito na SPG:
04/03/2009

Alexandre Wilson Bisson Filho

**Estudo Genético da Interação entre FtsZ e o
Modulador de Divisão ZapA em *Bacillus subtilis***

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

Orientador: Prof. Dr. Frederico José Gueiros Filho

São Paulo
2009

Alexandre Wilson Bisson Filho

Estudo Genético da Interação entre FtsZ e o Modulador de Divisão ZapA em
Bacillus subtilis

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

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Em memória de meu avô, João Biral.

Agradecimentos

Foram tantas pessoas que passaram pelo caminho e contribuíram direta e indiretamente para que eu conseguisse realizar esse trabalho, começado muito antes do que há dois anos. A todas elas deixo aqui minha eterna gratidão.

Aos meus pais, Alexandre e Cássia, e ao meu irmão Gustavo: nunca poderei retribuir de volta todo amor e compreensão que me carregaram até este momento. À minha família, tanto da parte Bisson como Biral, agradeço o apoio nas viagens a Piracicaba.

Ao Fredy, que me recebeu em seu laboratório com toda sua paciência. Seu amor pela ciência me foi exemplo de Cientista em todos os instantes. Aos meus colegas de laboratório, que dividiram os fardos e as alegrias de todos os dias: Alê-X (nossa eterna rainha bacillar), Camila (a terapeuta do bloco zero), Gui (o senhor dos chambers), Hosana (que sempre ficará me devendo uma cerveja), JR (wild horse from the jungle), Robson (que me ensinou o segredo do morcego), Theopi (que me ensinou o valor dos eppendorfs psicodélicos), Valdir (meu parceiro de bancada, e também um suquinho de lichia), Valquíria (que teve de pagar terapeuta após me conhecer) e Vivi (a quem o Fredy prometeu um laboratório rosa!). Um forte abraço aos professores Dr. Walter Colli e Dra. Maria Júlia e os membros de seus laboratórios, que além de nos acolher durante 6 meses do meu mestrado, sempre estiveram de braços abertos. Agradeço a colaboração do laboratório do Dr. Aaron Straight (principalmente a Ben Moore) que receberam o Fredy, juntamente com minhas amostras, e colocaram toda infra-estrutura do laboratório a nossa disposição.

Antes mesmo de começar meu mestrado, eu já havia criado uma forte ligação ao IQ-USP. Gostaria de agradecer aos meus colegas da turma ingressante de 2002, que fizeram dos 4 anos integrais de graduação mais leves e descontraídos do que poderia imaginar. Um abraço ao Zé Otávio, pelas nossas discussões sobre pontes de hidrogênio e clara de ovos, e também pelas referências sobre história da ciência que tanto me inspiraram na escrita desse trabalho. Gostaria também de derramar minha gratidão ao

bandeijão e seus brindes, que com suas tentativas de delícia me ajudaram a lembrar sempre a felicidade que era estar vivo no dia seguinte. Agradeço também à Dona Ivete (com seus “qualquer coisa” de calabresa) e ao Sr. Moranguinho Malandro (com seus quitutes).

Gostaria de agradecer aos meus amigos Caiô, Camila, Déa (minha personal designer neste trabalho), Ê, Ise, Maicon e Rick, que sempre estiveram prontos para uma conversa nos momentos em que os obstáculos eram grandes demais. Também não poderia deixar de agradecer aos amigos espalhados pela USP, que sempre me fizeram rir e aprender com as diferenças: Lucy (sempre meiga), Sal (meu personal music consultant), Dennis (do gueto), (beautiful) Van, Cabral, Marc, André, Hudson, Débora (Débys), Maíra (Maireta), Pantoja e Maripê (que me ensinou na prática o significado da palavra reprimar). Meus agradecimentos à Wilma (oncinha), que com sua sinceridade sempre me fez decidir acreditar nas pessoas mais uma vez.

Existem aqueles que se fizeram presentes durante esse processo, porém há também outros que por conta dele estiveram distantes. Aos meus amigos da Pró-Vida, a quem eu dividi minha infância, adolescência, fase adulta e desde então um propósito maior, vocês estiveram comigo desde o começo e foram um pensamento constante a cada passo.

Por fim, agradeço a FAPESP, CNPq, IQ-USP e CAPES pelo suporte financeiro em forma de bolsa, equipamentos, reagentes e participações em congressos.

“The problem with the gene pool is that there’s no life guard”

RESUMO

Bisson-Filho, A.W. Estudo Genético da Interação entre FtsZ e o Modulador de Divisão ZapA em *Bacillus subtilis*. 2009. 116 p. Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A citocinese bacteriana é controlada por diversas proteínas que se agrupam em um complexo chamado divisomo. O cerne do divisomo é constituído por FtsZ, uma proteína homóloga à tubulina eucariótica, que se auto-associa formando uma estrutura chamada anel Z. O anel Z serve como arcabouço e recruta diversas outras proteínas componentes do divisomo para o sítio onde o septo será sintetizado na célula. A formação do anel Z é modulada por proteínas que se ligam diretamente a FtsZ e regulam a sua auto-associação, tanto induzindo como inibindo a sua polimerização. Apesar de muitos destes moduladores de FtsZ já serem conhecidos, muito pouco se sabe sobre o mecanismo pelo qual eles controlam a estruturação do anel Z *in vivo*. O objetivo do presente trabalho foi estudar a interação entre FtsZ e um modulador de divisão, a proteína ZapA, da bactéria gram-positiva *Bacillus subtilis*. Para isso construímos uma biblioteca de mutantes de *ftsZ* por “Error Prone PCR”, com aproximadamente 1 substituição por cópia de *ftsZ* e contendo um total de 1×10^5 clones. A partir dessa biblioteca, utilizamos duas triagens genéticas para identificar mutantes incapazes de interagir com ZapA. Na primeira estratégia, selecionamos 12 mutantes de FtsZ resistentes à superexpressão de uma forma tóxica de ZapA, que bloqueia a divisão, causando filamentação e morte das células. Surpreendentemente, apesar destes mutantes serem insensíveis ao efeito de ZapA, ensaios citológicos mostraram que nenhum deles perdeu a interação com ZapA.

Como as mutações foram mapeadas nas vizinhanças do sítio catalítico e de polimerização de FtsZ, e como a maioria delas confere resistência cruzada aos efeitos de outros moduladores de FtsZ, suspeitamos que elas afetassem a estabilidade do polímero de FtsZ e, conseqüentemente, o comportamento do anel Z. Essas suspeitas foram confirmadas em ensaios de FRAP e cálculos de proporção de FtsZ no anel Z, indicando que os mutantes formam um anel Z mais estável que o normal. Como não obtivemos mutantes que perderam a interação com ZapA na primeira triagem, aplicamos a biblioteca em uma segunda estratégia de triagem genética, procurando um mutante de FtsZ que voltasse a interagir com um mutante de ZapA que não se liga mais a FtsZ (ZapA^{N62A}). Esta estratégia de ganho de função identificou um candidato, FtsZ^{E91V}, que, tanto por critérios genéticos como citológicos, voltou a interagir com ZapA^{N62A}. Apesar do mutante FtsZ^{E91V} mostrar-se capaz de restaurar a interação com ZapA^{N62A}, ele não afetou a interação com ZapA selvagem, segundo nossos ensaios de microscopia de fluorescência e viabilidade. O mutante FtsZ^{E91V}, mapeia na hélice H3 de FtsZ. Esta hélice está exposta na superfície de FtsZ (compõe um dos lados da molécula de FtsZ) de uma maneira compatível com a idéia de que ela seria importante para interações laterais entre polímeros de FtsZ. Nossos resultados apontam, portanto, que a hélice H3 deve ser o sítio de interação para ZapA em FtsZ.

Palavras-chave: Anel Z, *Bacillus subtilis*, Divisomo, FtsZ, Moduladores, ZapA.

ABSTRACT

Bisson-Filho, A.W. Genetic Study of the interaction between FtsZ and the division modulator ZapA in *Bacillus subtilis*. 2009. 116 p. Masters Thesis – Graduation Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The bacterial cytokinesis is ruled by a number of proteins that constitute the divisome complex. FtsZ, a homologue of eukaryotic tubulin, is the main component of the divisome and self-associates in a structure named Z ring. The Z ring works as a scaffold and recruits the other components of divisome, establishing itself where the septum will be synthesized in the cell. Some of these proteins interact directly with FtsZ and control self-association, promoting polymerization or preventing it. Although there have been discovered many of FtsZ modulators, little is known about the mechanisms that control the formation of the Z ring *in vivo*. The aim of this work was study de interaction between FtsZ e one of its division modulators, ZapA protein, on *Bacillus subtilis* gram-positive bacteria. We created a mutagenized *ftsZ* plasmid library by error prone PCR, which contained $1,0 \times 10^5$ transformants and exhibited a mutation rate of one substitution per *ftsZ* copy. The library was transformed into a modified *Bacillus subtilis* strain and we performed two genetic screenings to select cells with FtsZ mutants incapable of interacting with ZapA. In first strategy, we selected 12 resistant *ftsZ* mutants for a toxic ZapA overexpression, that blocked division and caused filamentation and cell death. Surprisingly, although these mutants were insensitive to ZapA effect, cytological assays showed that none of them lost interaction with ZapA. As the substitutions were mapped around the catalytic and interaction site of FtsZ structure and showed resistance to other

modulators, we suspected that the mutations were affecting the polymer stability of FtsZ and, consequently, the behavior of Z ring. This hypothesis was confirmed by FRAP experiments and by calculations of FtsZ proportions in Z ring, pointing out that the mutants form more stable Z rings. As we didn't find mutants that lost their ZapA's interaction, we applied our library in a second genetic screen, looking for mutants that return to interact with a ZapA mutant (ZapA^{N62A}) that doesn't bind to FtsZ anymore. This gain of function strategy identified one candidate, FtsZ^{E91V}, which returns to interact with ZapA^{N62A} in our genetic and cytological assays. Although the mutant FtsZE91V showed itself capable to interact with ZapAN62A, that didn't affect the interaction with wild type ZapA by our fluorescent microscopy and viability assays. The substitution E91V was mapped on H3 helix of FtsZ structure. This helix is exposed on FtsZ surfaces (on FtsZ's lateral side), being compatible with the idea that lateral interaction is important in FtsZ polymers. So, we concluded that helix H3 is the binding site of ZapA in FtsZ.

Keywords: Z ring, *Bacillus subtilis*, Divisome, FtsZ, Modulators, ZapA.

Abreviaturas

ATPase	Adenosina 5'-trifosfatase
CTP	Peptídio C-terminal
DNA	Ácido dexsoxiribonucleico
dATP	desoxiriboadenosina trifosfatada
dCTP	desoxiribocitidina trifosfatada
dGTP	desoxiriboguanosina trifosfatada
dNTP	desoxiribonucleotídio trifosfatado
dTTP	desoxiribotimidina trifosfatada
EPP	Error-prone PCR
FRAP	Recuperação da fluorescência após a "queima"
GFP	Proteína fluorescente verde
GDP	Guanosina 5'-difosfato
GMPCPP	α,β-metil-guanosina-5'-trifosfato
GTP	Guanosina 5'-trifosfato
GTPase	Guanosina 5'-trifosfatase
IPTG	Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídico
MTS	Sequência de alvo à membrana
LB	Meio lisogênico
PCR	Reação de polimerase em cadeia
PBS	Salina tamponada
RBS	Sequência de ligação do ribossomo
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
YFP	Proteína fluorescente amarela

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1. A divisão celular.....	13
1.2. O divisomo e seus componentes.....	14
1.3. A citocinese.....	18
1.4. FtsZ e o controle da formação do anel Z.....	20
1.5. Proteínas moduladoras de FtsZ.....	25
2. OBJETIVOS.....	34
3. RESULTADOS.....	35
3.1. Bibliotecas de mutantes de <i>ftsZ</i>	35
3.1.1. Estratégia para mutagênese de <i>ftsZ</i>	35
3.1.2. Construção das bibliotecas de mutantes <i>ftsZ</i>	36
3.1.3. Taxa de mutação nas bibliotecas B0, B1, B2 e B3.....	38
3.1.4. Distribuição das mutações na biblioteca B3.....	40
3.2. Triagem genética e caracterização dos mutantes <i>ftsZ</i>	42
3.2.1. Estratégia para seleção de mutantes <i>ftsZ</i>	42
3.2.2. Obtenção e identificação dos mutantes <i>ftsZ</i>	47
3.2.3. Medidas de comprimento das células nos mutantes <i>ftsZ</i>	50
3.2.4. Localização de GFP-ZapA nos mutantes <i>ftsZ</i>	52
3.2.5. Mapeamento dos resíduos mutados na estrutura de FtsZ.....	54
3.2.6. Sensibilidade dos FtsZ mutantes a outros moduladores.....	58
3.2.7. Medição da dinâmica do anel Z por FRAP.....	60
3.2.8. Medição da proporção relativa de FtsZ no anel Z.....	68
3.2.9. Uma estratégia alternativa (ganho de função) para seleção de mutantes <i>ftsZ</i>	70
3.2.10. Obtenção e identificação dos novos mutantes <i>ftsZ</i>	72
3.2.11. Mapeamento do resíduo E91 na estrutura de FtsZ.....	74
3.2.12. Caracterização fenotípica do mutante FtsZ ^{E91V}	75
4. DISCUSSÃO.....	77
4.1. Uma biblioteca culpada até que se prove o contrário.....	77
4.2. Os mutantes de primeira triagem.....	79
4.3. Procura-se um sítio para ZapA.....	84
4.4. Perspectivas: Em busca do complexo FtsZ-ZapA.....	89
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	92
6. REFERÊNCIAS.....	105

1 - INTRODUÇÃO

1.1 – A Divisão Celular

A divisão celular é um fenômeno importante no ciclo de vida de todos os organismos vivos e apesar das primeiras observações terem sido feitas no século XVII (com o advento dos primeiros microscópios e dos primeiros estudos de Antonie van Leeuwenhoek), apenas nas últimas décadas a divisão começou a ser compreendida a nível molecular.

Em termos gerais, o ciclo celular segue três fases principais: duplicação do material genético e de outros componentes subcelulares, segregação dos cromossomos e finalmente a separação da célula em dois compartimentos, divididos por uma parede transversal, que em bactérias é chamada de septo de divisão, formando as duas células filhas. A figura 1-1 ilustra esse processo:

Figura 1-1: O ciclo celular de uma bactéria. Primeiro existe a fase de síntese e segregação do nucleóide, ao mesmo tempo em que observa-se o crescimento da parede lateral. Em determinado momento a célula sintetiza o septo de divisão, dividindo a bactéria em duas idênticas à primeira.

Células eucarióticas, tendo uma organização subcelular mais complexa, antes de se dividirem em duas células filhas, devem multiplicar suas organelas, múltiplos cromossomos e suas estruturas citoesqueléticas. Comparativamente, os organismos procarióticos recebem uma tarefa bem mais simples. As bactérias não possuem organelas que precisem ser segregadas e, por não existir compartimentalização em um núcleo, a segregação de seu único cromossomo é facilitada.

Contudo, os mecanismos moleculares que regem a divisão em procariotos mostram-se tão complexos como em eucariotos. Diversas proteínas necessárias para divisão nas bactérias Gram-negativa *Escherichia coli* e Gram-positiva *Bacillus subtilis* vêm sendo caracterizadas através de estratégias de genética clássica e molecular, bioquímica e microscopia. Todas estas proteínas estão relacionadas direta ou indiretamente com a síntese do septo de divisão, e fazem parte de um grande complexo macromolecular chamado divisomo (Goehring e Beckwith, 2005) (Barák e Wilkinson, 2007). O divisomo é uma grande fábrica molecular preparada não só para sintetizar o septo, separando as duas células filhas, mas também equipada com um sistema para reconhecer o momento e o local mais propício aonde o futuro septo de divisão deverá ser montado dentro da célula (Margolin, 2001).

1.2 – O Divisomo e seus Componentes

Os primeiros genes envolvidos em divisão bacteriana foram obtidos a partir de triagens genéticas em *E. coli* que isolaram mutantes termossensíveis que não se dividiam em temperaturas elevadas (Hirota, Ryter *et al.*, 1968) (Rothfield, Justice *et al.*, 1999). Como esses mutantes não eram capazes de se dividir, porém continuavam a crescer, eles

formavam longos filamentos e os genes responsáveis por esse fenótipo foram denotados com as iniciais *fts* (“filamentous temperature sensitive”).

O divisomo pode ser dividido em três principais sub-complexos: O primeiro é formado por proteínas responsáveis pela estrutura que servirá como arcabouço para o recrutamento do segundo e terceiro sub-complexos. O segundo sub-complexo é feito de proteínas que funcionam como ponte entre o primeiro sub-complexo e o terceiro. O terceiro sub-complexo, que completa a formação do divisomo, é composto das proteínas responsáveis pela síntese do septo de divisão. Em *B. subtilis*, os componentes do divisomo parecem ser incorporados simultânea e/ou cooperativamente, ou seja, com a maioria dos componentes dependendo de vários outros para a localização no septo (Gueiros-Filho, 2007). A figura 1-2 ilustra o divisomo e seus componentes, apontando cada um dos sub-complexos envolvidos na sua formação:

Figura 1-2: O divisomo é formado por 3 sub-complexos, ilustrados no corte transversal de uma célula de *B. subtilis* ao lado. O primeiro sub-complexo, citoplasmático, conta com FtsZ (Z), ZapA, EzrA (E), SepF (S) e FtsA (A). O segundo sub-complexo está representado pelas proteínas DiviB (IB), FtsL (L) e DiviC (IC). O terceiro e último sub-complexo, a fábrica de peptidoglicano, possui 3 componentes: FtsW (W), PBP1 e PBP-2B. Em cinza está representada a parede de peptidoglicano (P).

O arcabouço montado pelo primeiro sub-complexo é constituído pela proteína FtsZ, que se auto-associa em uma estrutura polimérica chamada anel Z, circundando toda a face interna da membrana citoplasmática (Pogliano, 2008). FtsZ é uma proteína

citoplasmática de 40kDa, homóloga à tubulina eucariótica. Seu gene é essencial para a sobrevivência em todos os organismos em que foi estudado, e em *Bacillus subtilis* localiza-se a 134° no cromossomo, logo abaixo de *ftsA* e acima do gene da protease *bpr*.

Apesar de *ftsZ* ter sido identificado primeiramente em *E. coli* (Lutkenhaus, Donachie *et al.*, 1980), sua presença é constante em quase todas as bactérias e arqueas conhecidas, além de ser encontrado em organelas como cloroplastos (Osteryoung e Vierling, 1995) e mitocôndrias protistas (Beech e McFadden *et al.*, 2000). Essa ampla distribuição indica que FtsZ deve ser o componente primário do maquinário de divisão. Outra evidência que sustenta essa idéia é a dependência em relação à FtsZ de todas as outras proteínas conhecidas do divisomo para localizarem no sítio de divisão (Addinall e Lutkenhaus *et al.*, 1996) (Errington, Scheffers *et al.*, 2003).

A manutenção e a estabilidade do anel Z dependem de várias proteínas auxiliares que promovem a polimerização de FtsZ ou inibem a formação do anel Z em determinadas regiões da célula. Essas proteínas, comumente chamadas de moduladores da polimerização de FtsZ, são os outros componentes do primeiro sub-complexo do divisomo e serão descritas no tópico 1.5.

Em *B. subtilis*, as proteínas que formam o segundo sub-complexo constituem o que é chamado de ponte periplasmática (Vicente e Rico, 2006). Este grupo de proteínas se liga ao anel Z através da proteína FtsA (ver tópico 1.5). A ponte periplasmática é supostamente responsável pela conexão do anel Z (primeiro sub-complexo) com a fábrica de peptídeoglicano (terceiro sub-complexo), e conta com as proteínas DivIB, DivIC e FtsL. DivIB, DivIC e FtsL são proteínas bitópicas com uma região curta exposta ao citoplasma, um único segmento transmembrana e um domínio periplasmático grande.

Essas três proteínas formam um complexo ternário, pois a localização de uma delas no divisoma depende da localização das outras (Buddelmeijer e Beckwith, 2004). Estudos genéticos com FtsL mostraram que mutações distribuídas pela sua estrutura pouco afetam o seu funcionamento, indicando que provavelmente se trata de uma proteína estrutural (Sievers e Errington, 2000). Tanto FtsL como DivIC possuem regiões “coiled coil” em suas porções periplasmáticas que são importantes para sua interação. (Daniel, Harry *et al.*, 1998) (Beall e Lutkenhaus, 1989).

A fábrica de peptidoglicano é o sub-complexo responsável pela síntese da nova parede que irá dividir as células-filhas. Dentre as proteínas que compõe a fábrica de peptidoglicano, PBP-2B pertence a uma classe das proteínas ligadoras de penicilina que possui atividade de transpeptidação dos precursores de peptidoglicano, e atua especificamente no septo (Margolin, 2000). Juntamente com a proteína PBP-1 (responsável pela atividade transglicosilase), codificada pelo gene *ponA*, PBP-2B atua na mudança de direção na síntese de peptidoglicanos no momento da divisão celular (Goffin e Ghuysen, 1998) (Pedersen e Angert *et al.*, 1999).

A atividade de PBP-2B também está associada à atividade de FtsW, uma proteína da família SEDS (“Shape, Elongation, Division and Sporulation”) que possui dez domínios transmembrana (Gerard, Vernet *et al.*, 2002). A função mais provável de FtsW, seria atuar na translocação dos substratos de PBP-2B (“lipídio II”) do citoplasma através da membrana celular (Höltje, 1998).

1.3 – A Citocinese

A montagem e funcionamento do divisomo é sempre observada em determinado momento ao longo do ciclo celular, o “período D” (Hausser e Levin, 2008), e é um processo dinâmico. Esse processo se inicia com a escolha do sítio de divisão, geralmente a parte central da célula (entre os dois nucleóides segregados), onde o anel Z será formado. Quando a célula adquire certo tamanho e já possui seu nucleóide duplicado, o anel Z, com a ajuda de diversas proteínas moduladoras, é formado no sítio adequado e recruta os diversos componentes do divisomo, como descrito no tópico anterior. Com o divisomo completamente montado, é estabelecida então uma conexão entre o anel Z (citoplasmático) e o envelope celular. Em algum momento durante o processo (o exato momento ainda não é claro), o divisomo começa a contrair-se, ao passo que a síntese de peptídeoglicano vai criando um novo septo de divisão, separando a antiga célula mãe em duas células filhas. A figura 1-3 ilustra de forma sucinta a dinâmica do anel Z e do divisomo durante a citocinese:

Figura 1-3: Esquema representando a citocinese bacteriana. No estágio inicial o divisomo está desmontado e seus componentes distribuídos entre o citoplasma e membrana. Quando a célula se prepara para dividir-se, o anel Z é formado na parte central da membrana. Os outros componentes e sub-complexos vão se ligando ao anel Z, e quando o divisomo é finalmente montado existe a síntese do septo de divisão. Conforme a contração do divisomo vai acontecendo, as subunidades do anel Z vão se dissociando e voltando ao citoplasma. Quando a síntese do septo se encerra, a célula está pronta para um novo ciclo celular (Figura obtida de Gueiros-Filho, 2007).

Ainda não se sabe qual o mecanismo molecular que induz o divisomo a se contrair. A hipótese de que FtsZ seria responsável pela força que gera a constrição do divisomo e do septo de divisão é embasada em observações, como a constatação de que existem bactérias como as *Mycoplasma*, que não possuem parede celular e a maioria dos componentes do maquinário de divisão, e são capazes de se dividir usando apenas FtsZ (Vaughan, Wickstead *et al.*, 2004). Outra forte evidência que aponta para FtsZ como componente responsável pela constrição do divisomo são os recentes experimentos *in vitro* onde FtsZ consegue gerar a invaginação de lipossomos sem a ajuda de nenhuma outra proteína (Osawa, Erickson *et al.*, 2008).

Ao passo que vai sendo finalizada a constrição e a separação das células filhas, o divisomo é desmontado e FtsZ volta a ficar disperso pelo citoplasma até o momento em que a célula estiver pronta para dividir-se novamente (Sun e Margolin, 1998) (Den Blaauwen, Buddelmeijer *et al.*, 1999). Importantes avanços sobre o comportamento do anel Z ao longo da citocinese vêm sendo alcançados através do desenvolvimento de técnicas derivadas da microscopia de fluorescência, fazendo uso de proteínas marcadas com GFP, que permite acompanhar a dinâmica de uma proteína de interesse dentro de uma célula viva. A observação de fusões de FtsZ com proteínas fluorescentes e as acompanhando em uma sequência temporal, concluiu-se que a associação e dissociação do anel Z é um processo rápido, acontecendo em um intervalo de poucos minutos (Sun, Margolin *et al.*, 1998). Uma forma mais refinada para se estudar a dinâmica dessas proteínas através de suas fusões GFP é FRAP (**F**luorescence **R**ecovery **A**fter **P**hotobleaching). Em experimentos de FRAP, moléculas fluorescentes são irreversivelmente “queimadas” em uma pequena área da célula por um pulso de um

potente laser. A partir da queima dessa área observa-se o retorno da fluorescência, podendo obter dados cinéticos, como a velocidade em que determinada estrutura protéica recicla seus componentes (Reits e Neefjes, 2001). Através de FRAP pode-se demonstrar a diferença entre a dinâmica de anéis Z formados por mutantes de FtsZ (Stricker, Erickson *et al.*, 2002).

1.4 – FtsZ e o Controle da Formação do Anel Z

Como FtsZ foi identificada como uma espécie de citoesqueleto bacteriano, sugeriu-se que ela seria um homólogo de tubulina (Bi e Lutkenhaus, 1991). Apesar da pouca semelhança na sequência de aminoácidos entre FtsZ e tubulina (figura 1-4), existiam indícios de que tratava-se de proteínas homólogas. A primeira evidência surgiu a partir da comparação de uma pequena sequência de aminoácidos de FtsZ (GGGTGTG), que é virtualmente idêntica ao motivo responsável pela hidrólise de GTP (G/AGGTGSG), encontrada em todas as espécies de tubulinas, sendo portanto ambas GTPases (de Boer, Rothfield *et al.*, 1992) (Mukherjee e Lutkenhaus *et al.*, 1993). Essa homologia sugeriu que FtsZ e as tubulinas deveriam ter um ancestral em comum, porém não diz se essa homologia reflete alguma semelhança funcional. Os primeiros indícios de que FtsZ também possui função citoesquelética foram obtidos por ensaios *in vitro*, onde FtsZ se auto-associa e forma filamentos e anéis, assim como a tubulina (Erickson e Stoffler, 1996). Durante anos intensificaram-se os esforços para se obter as estruturas das proteínas para assim confirmar a sua relação e entender como elas funcionam a nível molecular. Ao final da década de 90 dois grupos diferentes alcançaram o objetivo e finalmente demonstraram que tubulina e FtsZ realmente são ortólogos, já que suas

Figura 1-4: Alinhamento entre as sequências de aminoácidos de tubulinas (Bt=Beta; At=Alfa, Gt=Gama) de porco (p), levedura (y), *Arabidopsis* (A), humana (H), *Drosophila* (D) e *Emericella* (*Aspergillus*) *nidulans* (E) e FtsZ de *E. coli* (Ec), *B. subtilis* (Bs) e *M. jannaschii* (Mj). As marcações em preto mostram os resíduos conservados em pelo menos 9 das 12 sequências. Os sítios importantes envolvidos na atividade GTPásica de FtsZ em *M. jannaschii* foram assinalados embaixo da sequência com uma barra preta. As setas apontam mutações que alteram a atividade GTPásica de FtsZ em *E. coli* (Figura retirada de Erickson, 1998).

estruturas são praticamente idênticas (Erickson, 1998). Filamentos de alfa-beta tubulina foram resolvidos por microscopia eletrônica a uma resolução de 3,7 Å (Nogales, Downing *et al.*, 1998), enquanto FtsZ da arqueobactéria *Methanococcus jannaschii* (Löwe e Amos, 1998) foi cristalizado e resolvido por raio-X a uma resolução de 2,8 Å.

As estruturas de FtsZ e tubulina podem ambas ser divididas em dois domínios principais: N-terminal e C-terminal. Apesar das estruturas secundárias dos domínios N-terminais serem praticamente idênticas, vê-se uma leve diferença estrutural entre os domínios C-terminais. Uma propriedade importante de FtsZ é que ele se auto-associa através da interação entre o domínio C-terminal de uma subunidade com o domínio N-terminal da subunidade adjacente (Oliva, Lowe *et al.*, 2004) (figura 1-5):

Figura 1-5: Comparação das estruturas dos dímeros de α-tubulina:β-tubulina (esquerda) e FtsZ (direita). Alfa-Hélices em vermelho; Folhas-Beta em amarelo; Alças em verde; GTP em azul; GDP em laranja. Estruturas obtidas de Nogales *et al.*, 1998 (tubulina, PDB 1tub) e Oliva *et al.*, 2004 (FtsZ, PDB 1w5b).

Uma sequência de subunidades associadas desta maneira (longitudinalmente, ou “cabeça-cauda”) forma um polímero linear chamado protofilamento. Além dos protofilamentos, FtsZ também pode formar outras estruturas, como feixes através da interação lateral de protofilamentos (Romberg e Levin, 2003).

A auto-associação entre subunidades de FtsZ é modulada por GTP e GDP, que se ligam em uma bolsa carregada positivamente no domínio N-terminal de FtsZ, bem próxima ao sítio de interação entre as duas subunidades (Sossong, Pearce *et al.*, 1999). Quando GTP se liga a FtsZ, a auto-associação entre as subunidades é favorecida ($K_D = 10$ nM), induzindo a polimerização de FtsZ, ao passo que quando GDP se liga a FtsZ a auto-associação torna-se desfavorecida ($K_D = 30$ μ M), desestabilizando a polimerização de FtsZ (Rivas, Andreu *et al.*, 2000).

Como mencionado acima, além de ligar GTP, FtsZ é capaz de hidrolisá-lo. Como a atividade GTPásica de FtsZ é observada apenas em concentrações acima da concentração crítica de associação, concluiu-se que a hidrólise de GTP por FtsZ é dependente da interação entre dois monômeros (Mukherjee e Lutkenhaus, 1994) (Scheffers, Driessen *et al.*, 2002). Essa dependência é devida ao fato que o alça T7, presente na região C-terminal de FtsZ, possui resíduos importantes para a quebra da ligação do fosfato γ (Sossong, Pearce *et al.*, 1999). Assim, o sítio catalítico só é formado com a interação da porção N-terminal (onde se liga GTP) de uma subunidade com a porção C-terminal (onde está a alça T7) de outra subunidade de FtsZ. Assim como para a tubulina, a atividade GTPásica de FtsZ tem importante papel na regulação da sua polimerização. Ao passo que a conversão de GTP para GDP vai acontecendo, a

proporção de subunidades ligadas a GDP aumenta, desestabilizando a interação entre os monômeros de FtsZ no polímero.

Evidências do efeito da atividade GTPásica sobre a polimerização de FtsZ são os experimentos *in vitro*, usando nucleotídeos que se ligam a FtsZ, porém são hidrolisados mais lentamente que GTP, como é o caso do GMPCPP (α,β -metil-guanosina-5'-trifosfato). Usando esses derivados de guanina em ensaios de polimerização mostrou-se que tanto a massa quanto a quantidade de interações laterais no polímero de Z aumenta consideravelmente, indicando que o polímero estaria mais estável (Romberg, Erickson *et al.*, 2001) (Huecas e Andreu, 2003). Atualmente se acredita que a instabilidade dinâmica, gerada pela atividade GTPásica de FtsZ, deve ser importante para a constrição do anel Z *in vivo* (Stricker, Erickson *et al.*, 2002).

Apesar das informações retiradas diretamente da estrutura, bem como dos ensaios *in vitro* sobre a polimerização e a atividade catalítica de FtsZ, muito pouco ainda se sabe sobre a estrutura do anel Z *in vivo*. Isto é devido às limitações das técnicas de microscopia eletrônica, que não conseguem resolver as diversas estruturas presentes no citoplasma bacteriano. Na ausência de imagens de anéis Z, os estudos sobre a organização do polímero de FtsZ *in vitro* representam as melhores evidências para o entendimento da estrutura do polímero de FtsZ *in vivo*. Sabe-se que o anel Z deve estar organizado em um aglomerado de três a doze protofilamentos, agrupados lado a lado (Erickson, Bramhill *et al.*, 1996). Este modelo deriva de observações feitas sobre a organização de polímeros de FtsZ *in vitro* e estimativas feitas de medidas do número de moléculas de FtsZ *in vivo* (cerca de 5000 a 20000 moléculas por célula), gerando o

cálculo de quantas moléculas seriam necessárias para se formar um filamento que percorresse o diâmetro da célula.

1.5 – Proteínas Moduladoras de FtsZ

Além de ser influenciado pela sua atividade GTPásica, o anel Z sofre a ação de diversas proteínas que interagem diretamente com FtsZ e modulam seu estado de polimerização. Tais fatores podem inibir ou induzir a polimerização de FtsZ e em conjunto controlam o momento e a posição ótimos para que o anel Z seja formado de maneira que a célula se divida normalmente, gerando dois descendentes geneticamente idênticos (Lutkenhaus, 2007). Em *Bacillus* e em *E. coli* foram identificados e caracterizados diversos moduladores, dentre os quais se destacam dois sistemas que, integrados, controlam onde o anel Z será formado: o sistema MinCD e o sistema Noc/SlmA.

O sistema Min é composto por duas proteínas principais, MinC e MinD. Ambas interagem entre si e formam um heterocomplexo associado à membrana que inibe a formação do anel Z nos pólos da célula (Margolin, 2000). Células deletadas de *minC* ou *minD* exibem formação de anéis Z na região polar, resultando em divisão assimétrica e aparecimento de minicélulas (células desprovidas de nucleóide) (Cha e Stewart, 1997) (Levin, Grossman *et al.*, 1998). Já a superexpressão do par MinCD acaba por inibir a formação de anéis Z em qualquer parte da célula, levando a célula à filamentação e morte (de Boer, Rothfield *et al.*, 1990) (Marston e Errington, 1999) (Pichoff e Lutkenhaus, 2001). Essa inibição é exercida tanto pelo domínio C-terminal como pelo N-terminal de

MinC, sendo apenas o domínio C-terminal responsável pela interação com MinD (Shiomi e Margolin, 2007) (Dajkovic, Lutkenhaus *et al.*, 2008).

MinD é membro da superfamília de ATPases que inclui ParA (envolvida em segregação de cromossomos) e proteínas relacionadas e se associa à membrana através de uma hélice anfipática localizada em sua extremidade C-terminal (Szeto, King *et al.*, 2002) (Hu e Lutkenhaus, 2003). Em *B. subtilis* o complexo MinCD é sequestrado nos pólos pela interação com a proteína DivIVA (Rothfield, Taghbalout *et al.*, 2005), delimitando a área onde MinC poderá interagir com FtsZ (Figura 1-6A).

Observações de que, sob condições normais, o anel Z não se forma em regiões da célula ocupadas pelo cromossomo levaram à proposição de que um mecanismo adicional, a oclusão pelo nucleóide, impediria a formação do anel nessas regiões (Woldringh, Mulder *et al.*, 1991). Por muito tempo os agentes que atuariam na oclusão do nucleóide permaneceram desconhecidos, até a descoberta de proteínas em *E. coli* (SlmA) e em *B. subtilis* (Noc), que interagem com o DNA e inibem a polimerização do anel Z (Wu e Errington, 2004) (Bernhardt e De Boer, 2005), como representado através da figura 1-6B. SlmA e Noc possuem domínios de interação inespecífica com o DNA, e são capazes de interagir com FtsZ aparentemente sem o auxílio de outras proteínas.

Através da integração dos dois modelos apresentados, já observamos um sistema de controle da formação do anel Z. Com o sistema MinCD inibindo a formação de anéis Z nos pólos da célula, e Noc/SlmA “proibindo” o anel Z de ser formado enquanto os cromossomos estão sendo segregados para a periferia da célula, temos apenas uma pequena região livre da ação desses dois inibidores, que é justamente a faixa central da célula (figura 1-6C):

Figura 1-6: Modelo de ação do sistema Min e da proteína Noc, em *B. subtilis*. **(A)** DivIVA (círculos pretos) recruta MinD (cinza) para os pólos. MinD se liga a MinC (polígonos azuis), que por sua vez inibe a formação do anel Z (circunferência verde) na região. **(B)** Noc (círculos marrons) se liga ao longo do cromossomo (fitas pretas) e inibe a formação do anel Z (circunferência verde) no espaço ocupado pelo nucleóide. **(C)** Integração dos dois sistemas (Min e Noc), direcionando a formação do anel Z para a região medial da célula

EzrA é outro modulador que inibe a polimerização de FtsZ e foi identificado como um supressor extragênico de um alelo de FtsZ termossensível (Levin, Grossman *et al.*, 1999). EzrA é uma proteína que contém em sua região N-terminal um pequeno segmento transmembrana e no restante da proteína regiões “coiled coil” citoplasmáticas. EzrA encontra-se disperso por toda a membrana, porém possui alta afinidade pelo anel Z quando este é formado. EzrA possui sete resíduos em seu C-terminal que são importantes para sua interação com FtsZ (Haeusser, Levin *et al.*, 2007). Cepas deletadas de *ezrA* apresentam múltiplos anéis ao longo da célula (Levin, Grossman *et al.*, 1999), indicando que EzrA deve atuar como um desestabilizador de FtsZ, e sua ausência tornaria o anel Z mais resistente à ação de inibidores como MinC e Noc.

Um possível mecanismo de atuação de EzrA na citocinese é que ele seria uma importante peça para limitar a formação do anel Z apenas na região medial da célula, impedindo que ele se forme ao longo de toda membrana citoplasmática. Como EzrA não desestabiliza polímeros de FtsZ pré-formados, ele liga-se ao divisomo sem provocar nenhum tipo de desestabilização (Hausser, Levin *et al.*, 2004). EzrA aparentemente também trabalha sinergisticamente com outros moduladores, sendo que sua deleção produz um efeito letal sintético em cepas deletadas de *zapA* (Gueiros-Filho e Losick, 2002), ao mesmo tempo que suprime a superexpressão de MinCD (Levin, Grossman *et al.*, 2001).

Dentre os moduladores positivos do anel Z, o mais bem estudado é FtsA, que é uma proteína solúvel da família da actina, que se liga a FtsZ e apresenta atividade ATPásica. FtsA possui uma hélice anfipática em seu C-terminal capaz de promover sua associação com a membrana. Isto permite que FtsA recrute FtsZ para a membrana (Pichoff e Lutkenhaus, 2005). Além disso, FtsA é de suma importância para recrutar as proteínas mais tardias do divisomo (ponte periplasmática e a fábrica de peptídeoglicano) ao anel Z (Rico, Garcia-Ovalle *et al.*, 2004)

A função estabilizadora de FtsA faz com que cepas mutantes para *ftsA* formem menos anéis Z *in vivo* (Jensen, Thompson *et al.*, 2005). Outra evidência da função estabilizadora de FtsA é que sua superexpressão restitui a frequência de divisão em células com superexpressão de MinD (Justice, Rothfield *et al.*, 1999) (Pancetti e Gueiros-Filho, dados não publicados). A capacidade de FtsA estabilizar o anel Z pode estar ligada à sua função de associar FtsZ à membrana, já que mutações pontuais em sua hélice

anfipática tornam FtsA impossibilitada de se dimerizar e sua interação com FtsZ diminuiu sensivelmente (Shiomi e Margolin, 2008).

Um outro modulador positivo (SepF) foi recentemente descoberto em *B. subtilis*, cuja deleção provoca diminuição na frequência de divisão e sua combinação com a deleção de *ftsA* causa um efeito letal à célula. Somado ao fato de que a sua superexpressão consegue suprimir o efeito da deleção de *ftsA*, acredita-se que SepF deve ter uma função complementar à de FtsA (Hamoen, Errington *et al.*, 2006) (Ishikawa, Ogasawara *et al.*, 2006).

Com o objetivo de procurar novos moduladores positivos da formação do anel Z, foi descoberta em uma triagem para genes que pudessem contrapor a inibição da divisão causada por excesso de MinD uma proteína, ZapA, que interage diretamente com FtsZ (Gueiros-Filho e Losick, 2002). ZapA é uma proteína citoplasmática de aproximadamente 10kDa, bem distribuída entre espécies de bactérias, cuja interação com FtsZ, promove a formação de feixes de filamentos *in vitro* (Gueiros-Filho e Losick, 2002) (Small, Addinall *et al.*, 2007).

Há pouco tempo, a estrutura cristalina de ZapA de *Pseudomonas aeruginosa* foi publicada, mostrando que a proteína é composta basicamente de uma cabeça globular conservada na região N-terminal e duas longas hélices formando um domínio “coiled-coil”, pouco conservado, na região C-terminal (Low, Lowe *et al.*, 2004). O cristal também mostrou que ZapA se apresenta na forma de dímero e tetrâmero, porém é mais provável que a forma mais relevante fisiologicamente seja a dimérica. O modelo atual que sugere como ZapA promove a polimerização de FtsZ é que, por ser uma proteína dimérica, ZapA funciona como uma ponte de ligação entre protofilamentos de FtsZ,

estabilizando assim a interação lateral e a formação de aglomerados de feixes de FtsZ no anel Z (figura 1-7):

Figura 1-7: Modelo de atuação de ZapA na formação e estabilização de feixes de FtsZ. ZapA (vermelho) dimeriza-se e cada monômero liga-se a uma molécula de FtsZ (verde). Como FtsZ forma cadeias longitudinais, ZapA acaba por servir de ponte para estabilizar a ligação entre estas cadeias no polímero (Figura obtida de Gueiros-Filho *et al.*, 2002).

Além dos moduladores descritos acima, existem também moduladores de FtsZ que atuam especificamente no processo de esporulação. *B. subtilis* e outras espécies de bactérias, quando expostos a condições drásticas como falta de nutrientes no ambiente, ativam uma via que leva à formação de uma forma latente de vida no ciclo bacteriano: o esporo. O evento inicial da esporulação é a mudança de localização do anel Z da região central da célula para os pólos (Levin e Losick, 1996), culminando em uma divisão assimétrica que forma uma célula mãe maior, que morre em seguida, e uma célula menor que se tornará o esporo propriamente dito. Apesar de célula apresentar dois pólos disponíveis para a divisão assimétrica, apenas um é usado para a formação do septo na esporulação. Recentemente foi descrito na literatura mais um modulador negativo do anel

Z, um peptídeo de quarenta aminoácidos chamado MciZ (**M**other **C**ell **I**nhibitor of **F**ts**Z**), que é expresso somente na célula mãe, após a formação do esporo. (Handler, Losick *et al.*, 2008). MciZ se liga diretamente em FtsZ e inibe sua polimerização e conseqüentemente sua atividade GTPásica, assim impedindo que um divisomo se forme na célula mãe (Handler, Losick *et al.*, 2008).

Somando a atividade de todos esses moduladores descritos, outros não citados nesse texto (e possivelmente mais alguns outros não descobertos), constatamos que FtsZ é alvo de diversas proteínas que o direcionam a exercer sua função de modo que a célula divida-se apropriadamente (figura 1-8):

Figura 1-8: A formação do anel Z em *B. subtilis* é modulada por diversas proteínas que promovem (em azul: FtsA, SepF, SpoIIIE e ZapA) e inibem (em vermelho: MinCD, EzrA, Noc, UgtP, YneA, ClpX, MciZ) a polimerização de FtsZ (em verde)..

Entretanto, muito pouco ainda se sabe sobre o mecanismo molecular pelo qual esses moduladores alteram o comportamento de FtsZ. Estudos sobre a interação entre FtsZ e seus moduladores constataram que a sua cauda C-terminal possui determinados aminoácidos, chamados de CTP (“C-terminal peptide”) que são alvo da maioria dos moduladores de divisão até agora caracterizados. É o caso de FtsA (Yan, Payne *et al.*, 2000), ZipA (Hale, de Boer *et al.*, 2000) (Mosyak, Somers *et al.*, 2000), SepF (Singh, Panda *et al.*, 2008) e EzrA (Singh, Panda *et al.*, 2007).

Porém a região C-terminal não é o único alvo em FtsZ para a interação com moduladores. Estudos em *E. coli* envolvendo mutantes FtsZ resistentes ao inibidor de divisão SulA (Huang, Lutkenhaus *et al.*, 1996), e mais tarde, a resolução do co-cristal de SulA:FtsZ, determinaram que SulA interage com FtsZ através da alça T7 (Cordell, Löwe *et al.*, 2004). A alça T7 se situa na porção C-terminal de FtsZ, na região de contato entre as subunidades do protofilamento. O mais interessante neste caso é que a posição do alvo em FtsZ possibilitou inferir o mecanismo de inibição provocado por SulA. SulA previne a polimerização de FtsZ, sequestrando monômeros aptos para serem incorporados no anel Z (Dajkovic, Lutkenhaus *et al.*, 2008).

Nosso laboratório tem interesse direto em entender o funcionamento de ZapA em *B. subtilis*, e para isso possui projetos relacionados em andamento. Dados obtidos (Tavares, Gueiros-Filho, dados não publicados) mostraram que ZapA ainda é capaz de promover a polimerização de FtsZ deletado de sua porção CTP, em ensaios de polimerização *in vitro*. Isso indica que o CTP não deve ser a região alvo de ZapA em FtsZ. Essa evidência torna ZapA a primeira proteína de divisão em *B. subtilis* que se liga a FtsZ fora da região CTP. Com certeza, ZapA deve promover a polimerização e a

formação de associações laterais de FtsZ através de um mecanismo diferente de FtsA e SepF, que se ligam à região CTP, por exemplo.

Com o objetivo de compreender melhor como ZapA promove a estabilização do anel Z, decidimos adotar uma abordagem genética para estudar a interação entre FtsZ e ZapA, investigando através de mutantes quais resíduos de FtsZ são importantes para a interação com ZapA.

2 – OBJETIVOS

- Criar uma biblioteca de mutantes *ftsZ* para triagens genéticas em *Bacillus subtilis*;
- Usar a biblioteca de mutantes para investigar as regiões de FtsZ importantes para a interação com ZapA.

3 – RESULTADOS

3.1 – Bibliotecas de mutantes de *ftsZ*

3.1.1 – Estratégia para mutagênese de *ftsZ*

Uma das maneiras de se produzir mutantes para estudar a interação FtsZ-ZapA seria mapear na estrutura de FtsZ (Oliva, Lowe *et al.*, 2007) resíduos candidatos a interagir com ZapA levando em conta sua exposição ao meio externo e substituí-los por alaninas através de mutações sítio-dirigidas. Tal estratégia tem um ponto fraco de que é extremamente trabalhoso produzir tantos mutantes, especialmente no caso de FtsZ que é uma proteína relativamente grande (382aa).

Outra maneira de gerar mutantes de FtsZ seria construir uma biblioteca de mutantes randômicos, ou seja, uma população de clones de *ftsZ*, cada um contendo uma ou mais mutações aleatórias ao longo do gene. Essa opção apresenta uma série de vantagens. Uma delas é que em uma biblioteca bem representativa, todos os aminoácidos da proteína estarão sendo investigados. Além disso, em uma biblioteca randômica, um certo aminoácido pode ser substituído não só por alanina mas também por outros aminoácidos. Isto é vantajoso pois, dependendo da situação, uma modificação para alanina pode não ser suficiente para gerar uma proteína mutante com o fenótipo desejado.

Atualmente existem diversos métodos de mutagênese que permitem que uma região estruturalmente e/ou funcionalmente importante possa ser randomizada a partir de um clone. Dentre esses métodos pode-se destacar a propagação em bactérias mutadoras

(em geral *E. coli* mutantes em genes de reparo de DNA) (Cox, 1976), incorporação de sequências randômicas através de oligonucleotídeos sintéticos (Hermes, Knowles *et al.*, 1989) e uso de polimerases com baixa fidelidade (Fromant, Plateau *et al.*, 1995).

Entre estas opções, escolhemos usar bactérias deficientes em reparo e PCR com polimerase com baixa fidelidade. Essa escolha foi feita por ser o método pelo qual podemos controlar exatamente quanto e como uma região vai ser alterada através dos parâmetros dos experimentos. Como nosso objetivo foi criar uma biblioteca na qual o gene inteiro de *ftsZ* fosse mutagenizado, o uso de oligonucleotídeos modificados tornou-se inviável pois essa estratégia é aplicável apenas a mutagênese de pequenos fragmentos.

3.1.2 – Construção das bibliotecas de mutantes *ftsZ*

Foram testadas uma condição para a mutagênese utilizando *E. coli* XL1-Red (Stratagene), gerando a biblioteca zero (B0), e três condições usando EPP (“Error Prone PCR”), gerando as bibliotecas de 1 a 3 (B1 a B3). A biblioteca B0 foi construída a partir da transformação do plasmídeo pAB10, contendo uma cópia de *ftsZ*, em células XL1-Red competentes e o crescimento em cultura LB por 5 dias, mantendo sempre as células em fase de crescimento exponencial através de sucessivos repiques em meio fresco, resultando em aproximadamente 200 gerações. Já as bibliotecas B1 a B3 foram construídas ligando-se o gene *ftsZ* amplificado por EPP no vetor pDG1515, seguido de transformação em células *E. coli* DH5α eletrocompetentes. As reações de amplificação das bibliotecas B1 a B3 foram feitas usando quantidades desbalanceadas de nucleotídeos, aumento da concentração final de MgCl₂ e adição de 0,5 mM de MnCl₂ (exceto na reação da B1). Ao se transformar os produtos da reação de EPP ligados a pDG1515, obteve-se

em torno de 5×10^4 clones na biblioteca B1 e cerca de 10^5 clones nas bibliotecas B2 e B3. A maioria dos clones, nas bibliotecas, possuíam uma cópia de *ftsZ* clonado. Os detalhes experimentais da construção de cada uma dessas bibliotecas estão descritos na sessão 5.4 de Materiais e Métodos.

Essas bibliotecas, após o processo de clonagem e extração de DNA, foram usadas para transformação de células competentes de *B. subtilis*, onde o alelo mutante de *ftsZ* (sem o códon de iniciação ATG) substitui a cópia selvagem no genoma por recombinação simples. A integração do plasmídeo resulta em duas cópias de *ftsZ* no genoma, uma endógena selvagem e outra carregando as mutações da biblioteca, mas somente a cópia integrada irá ser traduzida, por ser a única com os sinais necessários, como RBS e códon de iniciação ATG, como mostra o esquema da figura 3-1:

Figura 3-1: Esquema da substituição da cópia selvagem de *ftsZ* por um mutante. A cópia sem o códon de iniciação de tradução de *ftsZ* da biblioteca (*ftsZ**) foi transformada em *B. subtilis* e é integrada por recombinação simples (tipo “Campbell”) no locus selvagem de *ftsZ*. A recombinação, irá substituir a cópia endógena pela cópia da biblioteca. A cópia endógena, como perderá o códon de iniciação de tradução no processo e, assim, não será expressa em forma de FtsZ.

3.1.3 – Taxa de mutação nas bibliotecas B0, B1, B2 e B3

Para se averiguar se as bibliotecas estavam adequadas para serem usadas nas triagens genéticas foi necessário saber se elas realmente carregam mutações ao longo de *ftsZ*. Para isso, foram sequenciados clones de todas as bibliotecas, e alinhados à sequência de *ftsZ* selvagem para procurar substituições.

A tabela 3.1 mostra os dados obtidos das bibliotecas:

Biblioteca	Nucleotídios Sequenciados	Taxa Mutação	<u>Transições</u> <u>Transversões</u>
B0 (Red)	6.355	0	–
B1	5.427	0	–
B2	7.305	16,2	0,61
B3	12.182	0,85	1,25

Tabela 3-1: Características das quatro bibliotecas construídas neste estudo. Taxa de mutação refere-se à média aritmética das substituições encontradas pelo número de clones sequenciados. As razões entre o número de transições e transversões foram corrigidas para a proporção entre elas (2:4) e normalizadas para a composição de bases de *ftsZ*.

Observa-se que tanto na B0 como na B1 não foram encontradas mutações. No caso da biblioteca B0, especula-se que talvez o clone da cepa XL1-Red usada no ensaio tenha perdido o fenótipo mutador, algo já relatado em seu protocolo experimental (Stratagene, # catálogo 200129). Essa explicação faz sentido, tendo em vista que outros grupos conseguiram obter mutantes de *ftsZ* utilizando essa técnica (Feucht, Errington, 2005).

Tendo em vista que a *Taq* polimerase usada nas reações das bibliotecas B1 a B3 não é uma enzima com alta fidelidade, não sabíamos se apenas o desbalanceio dos nucleotídeos seria suficiente para gerar mutações ao longo da sequência de *ftsZ*. Como a biblioteca B2 foi construída nas mesmas condições da B1, porém com a adição de 0,5 mM de $MnCl_2$ na reação de PCR, atribuímos a ausência de mutações da B1 ao fato de que a amplificação de *ftsZ* ter sido feita sem a adição de $MnCl_2$, o que aumenta sensivelmente a fidelidade da *Taq* polimerase (Tindall, Kunkel, 1988).

Em relação à biblioteca B2, observamos uma média de mutações de aproximadamente 14,1 substituições a cada 1kb de bases sequenciadas. Essa taxa é realmente muito alta, pois podemos prever uma média de 16,2 substituições por clone de *ftsZ*, já que este gene tem 1,2 kb. Essa média de mutações torna uma triagem inviável, pois as chances de inativação de FtsZ são altas. Além disso, mesmo que a triagem fornecesse mutantes funcionais, discriminar qual ou quais dessas muitas mutações seriam realmente relacionadas ao fenótipo observado dificultaria o uso da B2.

Já no caso da biblioteca B3, vimos que a mesma concentração de $MnCl_2$ e uma proporção de nucleotídeos diferente em relação à B2 resultou em uma taxa de mutação bem menor, de 0,74 substituições a cada 1kb de bases sequenciadas, ou 0,85 substituições por clone de *ftsZ*. Esta frequência de mutação está perto do nível ideal de 1 substituição por clone de *ftsZ*. Essa diferença entre B2 e B3 se deve provavelmente à diferença entre as concentrações de dNTPs usadas em cada caso, já que a fidelidade da polimerase diminui ao passo que a razão dGTP/dATP aumenta (Sinha, Haimes, 1981). A razão para a B2 é 1,0, enquanto para a B3 é 0,35 (quase 3 vezes menor).

Para certificarmos se existe uma tendência na espécie de substituições que encontramos nas bibliotecas B2 e B3, calculamos a proporção entre o número de transições ($A \leftrightarrow G + T \leftrightarrow C$) frente o número de transversões ($A \leftrightarrow T + A \leftrightarrow C + G \leftrightarrow T + G \leftrightarrow C$) nas duas bibliotecas. Esse dado é importante para garantir que conseguimos obter bibliotecas com uma certa diversidade. Na tabela 3-1 podemos ver que a B2 apresenta um número de transversões maior do que transições (aproximadamente 60 e 40%, respectivamente), ao contrário da B3, que possui menor número de transversões que transições (aproximadamente 45 e 55%, respectivamente). Mesmo com as proporções entre as bibliotecas sendo diferentes, ambas possuem tanto transições como transversões em proporções próximas, indicando que a variedade de mutações deve ser alta, não se limitando apenas a um tipo de substituição.

3.1.4 – Distribuição das mutações na biblioteca B3

Para termos uma estimativa de quantos clones possuem certa quantidade de mutações na biblioteca B3, analisamos a distribuição das substituições através de curvas de Poisson. A distribuição de Poisson é uma distribuição de probabilidade discreta, e é comumente usada para descrever como mutações em uma biblioteca gerada por EPP vão se acumulando ao longo de cada clone (Cadwell, Joyce, 1992). A distribuição de Poisson é uma maneira de estimar a composição de uma biblioteca, ou seja, estimar quantos clones nas bibliotecas teriam nenhuma substituição, quantos teriam uma substituição, quantos teriam duas substituições, etc...

Na figura 3-2A, vemos uma curva de Poisson construída a partir da média de mutações encontrada na B3 (0,85 subst./clone). A partir da curva, vemos que cerca de

43% dos clones não apresentam substituição, 36% possuem uma substituição, 15% possuem duas substituições, 6% possuem três ou mais substituições. Na prática, isso quer dizer que devemos ter na biblioteca B3 mais da metade dos clones (57%) com uma ou mais substituições. Portanto, podemos esperar, segundo a distribuição de Poisson, cerca de $5,7 \times 10^4$ clones ($10^5 \times 57\%$) com pelo menos uma mutação ao longo da sequência.

Figura 3-2: Distribuições das mutações na biblioteca B3. **(A)** Distribuição de Poisson mostrando a estimativa do número de clones com n substituições ao longo da biblioteca. A curva foi calculada com base na média de 0,85 subst./clone. **(B)** Diagrama em escala ilustrando a posição em *ftsZ* de cada substituição encontrada nos clones sequenciados da B3. Em cinza claro temos a região coberta pelos sequenciamentos.

Como a mutagênese é um processo aleatório, seria esperado que as mutações presentes em nossa biblioteca estivessem bem distribuídas ao longo do gene. Para certificar que as mutações encontradas na B3 estejam bem distribuídas não só na população de clones, mas também dentro de cada clone sequenciado, nós construímos um mapa das substituições em *ftsZ* (figura 3-2B). Sinalizadas com flechas ao longo do mapa

estão as 9 substituições encontradas ao longo dos 16 clones, indicando que as mutações estão bem distribuídas (a região dos clones da B3 que foi seqüenciada está destacada em cinza claro). Na extremidade da região 5' do gene, vemos que não há nenhuma substituição, o que pode ser devido à quantidade relativamente pequena de mutações analisadas nessa amostragem.

Feitas as análises acima, concluímos que a B3 era a biblioteca mais adequada para ser usada em nosso trabalho, pois exibe bom tamanho, boa densidade e distribuição de mutações e baixa redundância (em nenhum dos clones seqüenciados com mutações encontramos substituições no mesmo códon).

3.2 – Triagem genética e caracterização dos mutantes *ftsZ*

3.2.1 - Estratégia para seleção de mutantes *ftsZ*

Para encontrar mutantes *ftsZ* que não interagissem mais com ZapA seria útil encontrarmos uma situação em que a interação entre FtsZ e ZapA provocasse alguma espécie de dano às células. Portanto, nessas condições, os mutantes de FtsZ que perdessem a interação com ZapA teriam vantagens e se sobressairiam sobre aqueles que continuariam a interagir com ZapA.

Como descrito na introdução, ZapA é uma proteína que se liga em FtsZ e ajuda a estabilizar a formação do anel Z *in vivo* (Gueiros-Filho, Losick, 2002). Portanto, normalmente ZapA facilita a divisão, e não o contrário. No entanto, dados sobre superexpressão de ZapA à partir de plasmídeos múlticópia em *B. subtilis* mostram que ZapA em elevadas quantidades pode causar filamentação (Gueiros-Filho, dados não

publicados). Porém a filamentação causada pela superexpressão de ZapA não mostrou-se suficiente para se estabelecer um ensaio eficiente de seleção entre colônias saudáveis e filamentosas.

Dessa forma, investimos nossos esforços na criação de uma versão de ZapA cuja superexpressão fosse mais tóxica, causando filamentação de maneira mais eficiente que ZapA selvagem. Para isso construímos uma proteína híbrida resultante da fusão do gene de ZapA e uma cauda MTS. A cauda MTS (“Membrane Targeting Sequence”) é uma α -hélice anfipática presente em diversas proteínas e medeia a associação delas à membrana, sendo comum em algumas proteínas participantes do processo de divisão como FtsA (Pichoff e Lutkenhaus, 2005) e MinD (Szeto, King *et al.*, 2002). Ao fusionar ZapA ao MTS de MinD, teremos um aumento da concentração de ZapA na membrana. Como o anel Z também é anexado à membrana, devemos observar um aumento da concentração de ZapA sobre o anel Z. Assim, o efeito da super-expressão de ZapA sobre a divisão também seria amplificado. A figura 3.3 ilustra esse efeito sobre a proporção entre ZapA e FtsZ no anel Z.

Além da região MTS, decidimos também fusionar GFP a ZapA, através da extremidade N-terminal, sendo que a adição de GFP não afeta a função e a localização de ZapA nas células (Gueiros-Filho e Losick, 2002). A fusão com GFP torna-se útil para se observar a localização de ZapA-MTS na célula por ensaios de microscopia de fluorescência, para nos certificarmos se ZapA continua sendo recrutada por FtsZ ao divisomo mesmo após ser fusionado ao MTS. A fusão *gfp-zapA-mts* foi obtida como

Figura 3-3: A fusão da cauda MTS aumenta a concentração de ZapA no anel Z. As ilustrações mostram cortes longitudinais (A e C) e transversais (B e D) de células expressando ZapA (A e B) e ZapA-MTS (C e D). Círculos pretos totalmente preenchidos (A e C) e vazados (B e D) representam FtsZ. Os círculos cinzas (A e C) e a tonalidade de concha (B e D) representam ZapA.

descrito em materiais e métodos (sessão 5.6), clonada em um vetor indutível por xilose e integrada no genoma por recombinação dupla, rompendo o locus de *amyE*.

Observou-se em placas LB-ágar que a indução de GFP-ZapA-MTS com 1% de xilose é letal (figura 3-4A). Em culturas líquidas também se observou queda na curva de crescimento causada pela morte das células em diferentes concentrações de xilose (dados não mostrados). A taxa de morte em placa causada pela indução por 1% de xilose foi bastante alta: constatou-se o crescimento de apenas uma colônia a cada 300 mil plaqueadas. Isto possibilita a triagem de milhares de colônias por placa.

Ao microscópio, pudemos ver que a indução de GFP-ZapA-MTS por 1% de xilose por noventa minutos causa severa filamentação, já que quase não se pode observar septos formados ao longo das células (figura 3-4B). Localização de GFP-ZapA-MTS mostrou que a fusão apresenta um padrão em forma de bandas ao longo dos filamentos, após duas horas de indução (figura 3-4C, flechas brancas). Esse padrão apresenta uma maior irregularidade e a morfologia do anel Z parece alterada quando comparados com células que não superexpressam ZapA-MTS. Isso indica que, apesar das células ainda formarem anéis Z, estes parecem ser aberrantes e fazem com que o divisomo não seja mais funcional, pois não observamos a síntese de septos. No momento temos hipóteses sobre o mecanismo pelo qual ZapA-MTS está inibindo o funcionamento do anel Z, que serão apresentadas na Discussão.

Como a sequência de MTS usada para construir a fusão GFP-ZapA-MTS foi amplificada de *minD*, que é um componente de um sistema inibidor da polimerização de FtsZ, nós consideramos a possibilidade de que a filamentação e morte das células não estava sendo causada pela interação de ZapA com FtsZ e sim por um efeito indireto da

Figura 3-4: Superexpressão de ZapA-MTS causa filamentação e morte em *B. subtilis*. **(A)** Efeito da indução de ZapA-MTS por 1% de xilose em placas LB. **(B)** Monitoramento por microscopia de fluorescência (membrana) das células induzidas com 1% de xilose ao longo do tempo. **(C)** Localização da fusão GFP-ZapA-MTS na célula.

expressão de Zap-MTS no funcionamento do sistema Min. Para descartar esta possibilidade, deletamos os genes *minC* e *minD* e observamos que a expressão de GFP-ZapA-MTS continua causando o mesmo efeito letal nas células (figura 3-4A). Isso mostra que o efeito ZapA-MTS nessas células é independente do sistema MinCD. Esse resultado está de acordo com o descrito na literatura, onde ensaios *in vitro* apontam que a região MTS de MinD não interage com MinC e nem inibe a polimerização de FtsZ (Dajkovic, Lutkenhaus *et al.*, 2008).

Outro controle que nos deu maior confiança de que o efeito letal de ZapA-MTS se devia de fato a interação entre ZapA e FtsZ foi o uso de um mutante ZapA (ZapA^{N62A}) que não interage mais com FtsZ em nossos ensaios. (Handler, Gueiros-Filho, dados não publicados). Foi construída uma fusão GFP-ZapA^{N62A}-MTS e, como mostrado na figura 3-4A, a expressão desta fusão não causou letalidade às células, indicando que o efeito letal causado pela superexpressão de ZapA-MTS é consequência direta da interação entre FtsZ e ZapA. Sendo assim, decidimos por utilizar essa estratégia para selecionar mutantes de FtsZ que não interagem mais com ZapA.

3.2.2 – Obtenção e identificação dos mutantes *ftsZ*

Para a triagem de mutantes que não interagem com ZapA foram transformadas com a biblioteca B3 células competentes de *B. subtilis* contendo a cópia integrada no cromossomo de *Pxil-gfp-zapA-mts* (cepa AB41), resultando em aproximadamente $3,5 \times 10^6$ colônias, distribuídas em 50 placas com 1% de xilose para seleção.

Observamos o crescimento de 1225 colônias resistentes a ZapA-MTS, das quais 623 foram estriadas em placas frescas para confirmar a resistência. Dessas estrias foi

constatado que apenas 140 colônias continuaram a crescer na presença de ZapA-MTS. Esse alto número de falsos positivos pode ser explicado pelo excesso de transformantes por placa (cerca de 70 mil), deixando a seleção menos eficiente, possibilitando que colônias não resistentes crescessem. A figura 3-5 mostra o procedimento aqui descrito através de um fluxograma.

Considerando-se apenas os verdadeiros positivos, a frequência de mutantes resistentes foi de 1 a cada 12500 transformantes (280 resistentes em $3,5 \times 10^6$ transformantes). Os mutantes resistentes foram sequenciados, e determinados os aminoácidos que foram alterados. Como vemos na figura 3-5, foram sequenciados 43 dos 140 mutantes, e encontramos 12 combinações diferentes de mutações, quase todas na porção N-terminal de FtsZ. Porém, como alguns desses mutantes possuem mais de uma substituição, e em alguns casos uma dessas substituições é igual à encontrada em outros mutantes com apenas uma substituição, combinamos os mutantes em 8 grupos.

Grupo 1	T111A (23) e T111A, A126T (1)
Grupo 2	L69S (6) e L69S, H360L (2)
Grupo 3	G68R (1) e G68E, R184H, P248S (2)
Grupo 4	A81V (3) e A81V, A278T (1)
Grupo 5	F201I (1)
Grupo 6	T133I, R143K (1)
Grupo 7	N28I, A113V, M226I (1)
Grupo 8	N25Y, I162T(1)

Figura 3-5: Fluxograma do procedimento realizado para a triagem de mutantes *ftsZ*. Os candidatos foram sequenciados e classificados em oito grupos conforme suas substituições. O número entre parênteses indica o número de vezes que um determinado mutante foi encontrado.

3.2.3 – Medidas de comprimento das células nos mutantes *ftsZ*

Para entender como as mutações selecionadas podem levar a resistência a ZapA-MTS, o primeiro passo foi caracterizar em mais detalhe suas consequências fenotípicas para a célula. Isto foi feito com cada um dos mutantes que apresentava apenas uma substituição em FtsZ (FtsZ^{T111A}, FtsZ^{A81V}, FtsZ^{G68R}, FtsZ^{L69S} e FtsZ^{I201F}). Em primeiro lugar, queríamos determinar se estes mutantes se dividem normalmente na ausência de ZapA-MTS. Isto indica se as mutações que causam resistência a ZapA-MTS afetam o funcionamento normal de FtsZ. Além disso, também queríamos determinar qual o grau de resistência dos FtsZ mutantes à superexpressão de ZapA-MTS. Uma resistência parcial a ZapA-MTS não pode ser distinguida de resistência total no ensaio em placas, pois células moderadamente filamentosas ainda são capazes de formar colônias saudáveis em placas. Para isso nós medimos o tamanho das células de cada mutante com e sem indução de ZapA-MTS.

A figura 3-6 mostra histogramas de medidas de tamanho das células dos mutantes. A análise dos histogramas nos mostra que não existe praticamente nenhuma diferença entre o tamanho das células selvagens e as mutantes sem indução de ZapA-MTS, indicando que as células mutantes estão se dividindo na mesma frequência que as selvagens. Isso prova que as mutações não perturbaram a função de FtsZ, já que a célula consegue formar septos normalmente. Uma exceção é o mutante FtsZ^{L69S}, onde é nítido que o tamanho das células na população com essa mutação é totalmente anormal, havendo células com tamanhos bem menores e bem maiores que a média de uma população com o alelo selvagem de *ftsZ*. Isso implica que esse mutante possui um FtsZ que não é totalmente funcional. Além disso, observamos que existe pouca diferença entre

Figura 3-6: Histogramas com as comparações das distribuições de medidas de comprimento de células. Em todos os gráficos vê-se as medidas das células com *ftsZ* selvagem (azul). (A) *ftsZ*^{G69R} sem (roxo) e com (vinho) indução de ZapA-MTS. (B) *ftsZ*^{L69S} sem (laranja) e com (ciano) indução de ZapA-MTS. (C) *ftsZ*^{I201F} sem (cinza) e com indução (amarelo) de ZapA-MTS. (D) *ftsZ*^{A81V} sem (rosa) e com (verde) indução de ZapA-MTS. (E) *ftsZ*^{T111A} sem (preto) e com (vermelho) indução de ZapA-MTS. O eixo X indica tamanho das células medidas (x10μm) e eixo Y indica o número de células medidas. As células foram induzidas por 2 horas em LB com 1% de xilose.

os tamanhos das células dos mutantes sem e com indução de ZapA-MTS. Isso mostra que as mutações encontradas em FtsZ estão conferindo total resistência à ação de ZapA-MTS, como seria esperado em mutantes que perdessem a interação com ZapA.

3.2.4 – Localização de GFP-ZapA nos mutantes *ftsZ*

A seguir, investigamos se essas mutações aboliram a interação de ZapA com FtsZ, como esperado. Para isso usamos de um ensaio indireto para checar a interação entre as duas proteínas. Através da microscopia de fluorescência, observamos os padrões de localização da fusão GFP-ZapA nas cepas mutantes. Se a mutação em questão interferisse na capacidade de ZapA ligar-se em FtsZ, iríamos observar o sinal da fluorescência de GFP-ZapA totalmente ou parcialmente disperso no citoplasma (dependendo do quanto a interação foi prejudicada). Surpreendentemente, todos os mutantes testados ainda localizam GFP-ZapA, indicando que ZapA ainda deve interagir com FtsZ. Na figura 3-7 vemos a localização de GFP-ZapA nos diferentes mutantes listados, em comparação com a localização normal de GFP-ZapA (em cepa contendo o alelo selvagem de FtsZ). Podemos perceber que em alguns casos, como nos mutantes FtsZ^{T111A} e FtsZ^{T133I,R143K}, a localização de GFP-ZapA parece ser um pouco anormal (formação de anéis duplos) se comparado com o FtsZ selvagem, porém é claro que ZapA continua localizando predominantemente junto ao divisomo.

Esse resultado é um forte indício de que essas mutações não aboliram a interação entre FtsZ e ZapA, porém não se pode ter certeza se esses mutantes não perderam parcialmente a capacidade de ligar ZapA até ser feito um ensaio que forneça medições diretas e mais quantitativas de interação entre as duas proteínas.

Figura 3-7: Localização de GFP-ZapA nos mutantes *ftsZ*. A primeira coluna mostra as fotos tiradas de GFP-ZapA. A segunda coluna mostra a marcação da membrana com o corante fluorescente FM4-64. A terceira coluna mostra a sobreposição de GFP-ZapA e membrana. As flechas com 1 cabeça indicam uma localização de GFP-ZapA na região medial da célula (entre os dois pólos). As flechas com duas cabeças indicam a formação de um padrão aberrante de GFP-ZapA com 2 bandas ao invés de 1. As flechas sem corpo mostram quando existe co-localização entre as bandas de GFP-ZapA e os pólos formados recentemente nas cadeias de *B. subtilis*.

3.2.5 – Mapeamento dos resíduos mutados na estrutura de FtsZ

Para buscar uma hipótese de como encontramos mutantes resistentes ao efeito de ZapA-MTS e ainda interagiriam com ZapA, resolvemos mapear a posição dos resíduos mutados na estrutura de FtsZ. A figura 3-8 mostra os resíduos que foram encontrados na triagem, marcados em vermelho na estrutura de FtsZ.

A primeira impressão ao observar a posição dos resíduos assinalados é de que todos estão ao redor do sítio de ligação de GTP (marcado em azul), com exceção do resíduo Ile201. Como a estrutura disponível para *B. subtilis* foi obtida a partir da cristalização de um monômero sem a presença de GTP (Oliva, Löwe *et al.*, 2007), usamos como molde a estrutura de FtsZ de *M. jannaschii* (Oliva, Löwe *et al.*, 2004), que foi cristalizado como um dímero com GTP, o que possui a vantagem de se observar a disposição dos resíduos na conformação que eles devem se apresentar no protofilamento e evidencia os resíduos importantes para a polimerização.

Usando esta estrutura, fica claro que Thr111, Ala113, Arg143, Thr133, Ile162, Asn25 e Asn28 são resíduos que estão em contato, direta ou indiretamente, com o sítio catalítico de FtsZ. Na literatura encontramos dados que comprovam a participação dos resíduos Arg143 e Asn25 na hidrólise de GTP em FtsZ (Redick, Erickson *et al.*, 2005). Já os resíduos Ala81, Gly68 e Leu69, além de estarem nas vizinhanças do sítio de ligação de GTP, são resíduos que também são importantes para a interação entre duas moléculas de FtsZ. O resíduo Ala81 está na hélice H3 de FtsZ, que é ligada à alça T3, onde estão os resíduos Gly68 e Leu69. Durante a interação entre dois FtsZ, a alça T3 da subunidade inferior interage diretamente com a hélice H8 da subunidade superior (Oliva, Löwe *et al.*, 2004), além de haver indícios da hélice T3 sofrer mudanças conformacionais, diminuindo

Referências	Mutantes

Figura 3-8: Mapeamento dos resíduos mutados na estrutura do dímero de FtsZ de *M. jannaschii* (Oliveira, Löwe et al., 2004). Nas interfaces dos dímeros estão indicadas as moléculas de GTP (azul). Os resíduos mutados estão indicados com esferas vermelhas. Cada linha mostra um ângulo diferente de FtsZ, para melhor visualização das substituições.

a interação com H8 (Diaz, Andreu *et al.*, 2001). Uma mudança conformacional causada por uma mutação na hélice H3 (A81V, por exemplo) poderia causar um efeito semelhante na alça T3, alterando a afinidade de ligação de uma subunidade com a outra.

O resíduo Ile201 é o único resíduo que aparece na região C-terminal de FtsZ e não está na vizinhança do sítio de ligação de GTP. O resíduo Ile201 está posicionado na hélice H5, apontado diretamente para a alça T7 e para a hélice H8. Tanto a alça T7 como a hélice H8 contém resíduos de importância para a interação com a região N-terminal da subunidade inferior de FtsZ no polímero (com a hélice H2 e a alça T3, respectivamente) (Oliva, Löwe *et al.*, 2004). Esses resíduos estão em destaque, marcados em verde na figura 3-9. Assim, a mutação I201F poderia estar afetando a afinidade entre as duas subunidades de FtsZ induzindo uma mudança na conformação na alça T7 e na hélice H8.

Figura 3-9: Especulação sobre o efeito da mutação I201F sobre a alça T7 e a hélice H8, na região C-terminal de FtsZ. Na subunidade superior (amarelo) do dímero de FtsZ de *M. jannaschii* (Oliva, Löwe *et al.*, 2004), estão assinalados os resíduos importantes (verde) para a interação com a subunidade inferior (cinza). O resíduo I201 está assinalado com esferas vermelhas.

3.2.6 – Sensibilidade dos FtsZ mutantes a outros moduladores

Se, como sugerido pelos resultados das seções anteriores, as mutações encontradas conferiram resistência à super-expressão de ZapA-MTS não por abolir a interação entre FtsZ e ZapA, mas por deixar os protofilamentos de FtsZ mais estáveis, estes mutantes poderiam ficar resistentes também à superexpressão de outros moduladores negativos. Para testar esta possibilidade, nós aplicamos um ensaio de viabilidade das células contendo os alelos FtsZ mutantes frente à superexpressão de MinD (figura 3-10A). MinD, como descrito na introdução, é um componente do sistema Min e sua superexpressão causa filamentação e morte às células por inibir a formação do anel Z *in vivo* (Dajkovic, Lutkenhaus *et al.*, 2008).

No experimento controle, a indução de MinD com 250µM de IPTG matou todas as células carregando o alelo FtsZ selvagem. Os mutantes, ao contrário, mostraram-se resistentes à super-expressão de MinD (exceto o mutante FtsZ^{A81V}). Esse resultado é uma evidência de que as mutações podem estar deixando o anel Z mais estável que o normal. O mutante FtsZ^{A81V} foi o único que se mostrou, assim como o selvagem, totalmente sensível à superexpressão de MinD. Para checarmos se o mutante FtsZ^{A81V}, além de sensível a MinD, seria suscetível ao efeito de supressão de ZapA sobre MinD (Gueiros-Filho e Losick, 2002), super-expressamos ao mesmo tempo MinD e ZapA em células com esse alelo mutante e no alelo selvagem. A superexpressão de ZapA não foi capaz de resgatar a viabilidade das células, ao contrário das selvagens, nas quais a indução de ZapA com 2% de xilose suprimiu o efeito letal de MinD e permitiu que 76% das células sobrevivessem, indicando que o anel Z nesse caso deve estar menos estável que o normal.

A **B**

Figura 3-10: Ensaio de susceptibilidade à inibidores de polimerização de FtsZ em *B. subtilis*. **(A)** Comparação do número de colônias viáveis sem indução (colunas cinza), com indução de MinD à partir de 250µM de IPTG (colunas pretas) e indução de MinD e ZapA, ao mesmo tempo, à partir de 250µM de IPTG e 2% de xilose (colunas listradas). **(B)** Comparação do número de colônias viáveis sem indução (colunas cinza), com indução de MciZ a partir de 1% de xilose (colunas pretas).

Além do ensaio com superexpressão de MinD, foi feito também um experimento semelhante de resistência à super-expressão de MciZ (figura 3-10B). MciZ, como descrito na introdução, é um peptídeo de 40 aminoácidos e um potente inibidor de polimerização de FtsZ. Com a indução de MciZ, observamos que apenas os mutantes FtsZ^{T111A} e FtsZ^{G68R} são resistentes ao efeito inibitório, enquanto os outros mutantes mostraram-se sensíveis. Através da comparação entre os dois experimentos, observamos que existe uma diferença na sensibilidade dos mutantes frente aos dois inibidores de polimerização. Considerando que essa diferença possa ser devido à diferença entre os mecanismos de inibição destes dois moduladores, podemos inferir que os mutantes podem afetar de forma diferente as propriedades funcionais de FtsZ, além de apontar que os mutantes FtsZ^{T111A} e FtsZ^{G68R} são totalmente promíscuos.

3.2.7 – Medição da dinâmica do anel Z por FRAP

Como sugerido no ensaio de estabilidade frente aos moduladores do tópico anterior, mais as observações sobre a posição das mutações na estrutura de FtsZ, é provável que as mutações encontradas poderiam estar causando uma alteração na forma como FtsZ interage consigo mesmo no anel Z. FtsZ mutantes que tenham suas propriedades alteradas devem apresentar também diferentes velocidades de troca de subunidades entre o anel Z e o FtsZ citoplasmático, como já foi relatado no estudo do mutante *ftsZ84* (FtsZ^{G105S}) em *E. coli* (Stricker, Erickson *et al.*, 2002). Polímeros que formam um anel Z mais estável devem trocar suas subunidades mais lentamente que na situação onde temos um anel Z menos estável.

Decidimos estimar a velocidade de troca de subunidades no anel Z *in vivo* nos mutantes e comparar com a velocidade na cepa selvagem utilizando a técnica FRAP (“Fluorescence Recovery After Photobleaching”). Os experimentos de FRAP usam um pulso de laser de alta intensidade para “apagar” (bleach) a fluorescência de parte das moléculas de GFP (em nosso caso, YFP-FtsZ) que compõem a estrutura que desejamos estudar (em nosso caso, o anel Z). Se, como no caso do anel Z, houver uma troca de componentes na estrutura, moléculas com GFP intacto substituirão as moléculas “apagadas” e se observará um retorno no sinal de fluorescência da estrutura (figura 3-11). Caso contrário, se a estrutura se mantiver estável do começo ao fim do experimento, não haverá nenhuma recuperação da fluorescência. Através de experimentos de FRAP pode-se, inclusive, calcular o tempo que o anel Z demora para sofrer essa troca, e a partir disso obter dados cinéticos, como o tempo de meia vida ($t_{0,5}$). O tempo de meia vida é o tempo que o anel Z leva para trocar metade de suas subunidades. (Maddox, Salmon *et al.*, 2000).

Para realizar os experimentos de FRAP com nossos mutantes de FtsZ, contamos com a colaboração do Dr. Aaron Straight e seu laboratório, situado no Departamento de Bioquímica, Stanford University. Os dados foram coletados por Frederico Gueiros-Filho com auxílio do aluno de doutorado Ben Moore, e analisados por mim em nosso laboratório. As figuras 3-12A a 3-12D mostram sequências temporais que acompanham a queima e o retorno da fluorescência no anel Z do alelo selvagem e dos mutantes de FtsZ. Além das fotos, temos em cada figura as curvas de recuperação da fluorescência do alelo selvagem e dos FtsZ mutantes geradas a partir da quantificação da fluorescência das imagens das sequências temporais. Cada curva é um exemplo representativo de uma amostragem feita para se obter os tempos de meia vida de cada mutante. Foram

Figura 3-11: Esquema ilustrativo do experimento de FRAP feito para investigar a dinâmica do anel Z nos mutantes de FtsZ. Um laser é focado em uma área delimitada do anel Z (círculo azul) e um pulso “queima” a fluorescência da fusão YFP-FtsZ nesta área. Após certo tempo é observada uma recuperação de fluorescência, devido o intercâmbio de subunidades entre o citoplasma e o anel Z. A medida temporal desse fenômeno é um indicio de como o anel Z está estável na célula.

analisadas, em média, cerca de 10 filmes por amostra.

Como vemos nas figuras, a velocidade de troca dos mutantes testados é, em média, 65% mais lenta comparado à velocidade do selvagem ($t_{0,5}=15\pm 2s$). Todos os mutantes apresentaram, entre si, velocidades de troca bem próximas. O mutante $FtsZ^{T111A}$ teve um $t_{0,5}=26\pm 6s$, assim como o $FtsZ^{I201F}$ ($t_{0,5}=26\pm 5s$). Os mutantes $FtsZ^{G68R}$ e $FtsZ^{L69S}$ apresentaram velocidades um pouco mais altas ($t_{0,5}=23\pm 4s$ e $t_{0,5}=24\pm 4s$, respectivamente), porém a diferença está dentro do erro estatístico.

Figura 3-12A: Comparação da análise de FRAP entre células com *ftsZ* selvagem (preto) e com o alelo *ftsZ^{T111A}* (vermelho). As imagens mostram, em paralelo, a “queima” de YFP-FtsZ e o tempo de recuperação da fluorescência. O gráfico mostra a quantificação da fluorescência na área fotoativada ao longo do tempo do experimento.

Figura 3-12B: Comparação da análise de FRAP entre células com *ftsZ* selvagem (preto) e com o alelo *ftsZ^{I201F}* (azul). As imagens mostram, em paralelo, a “queima” de YFP-FtsZ e o tempo de recuperação da fluorescência. O gráfico mostra a quantificação da fluorescência na área fotoativada ao longo do tempo do experimento.

Figura 3-12C: Comparação da análise de FRAP entre células com *ftsZ* selvagem (preto) e com o alelo *ftsZ^{G68R}* (ciano). As imagens mostram, em paralelo, a “queima” de YFP-FtsZ e o tempo de recuperação da fluorescência. O gráfico mostra a quantificação da fluorescência na área fotoativada ao longo do tempo do experimento.

Figura 3-12D: Comparação da análise de FRAP entre células com *ftsZ* selvagem (preto) e com o alelo *ftsZ^{L69S}* (laranja). As imagens mostram, em paralelo, a "queima" de YFP-FtsZ e o tempo de recuperação da fluorescência. O gráfico mostra a quantificação da fluorescência na área fotoativada ao longo do tempo do experimento.

3.2.8 – Medição da proporção relativa de FtsZ no anel Z

Outra consequência esperada de uma estabilização do polímero de Z é que se os mutantes estariam gerando estruturas mais robustas, as proporções entre FtsZ no anel Z e no citoplasma seriam diferentes. Se as mutações tivessem causado um aumento na estabilidade dos polímeros no anel Z, seria esperado encontrarmos uma maior quantidade relativa de FtsZ no anel Z ao compararmos a uma situação normal (Stricker, Erickson *et al.*, 2002).

Utilizando imagens de células expressando YFP-FtsZ, calculamos a diferença entre a fluorescência da célula inteira (onde temos tanto FtsZ citoplasmático como associado no anel Z) e o sinal da fluorescência citoplasmática (que temos apenas FtsZ citoplasmático). O resultado dessa diferença representa a quantidade de FtsZ no anel Z, e a partir dela calculamos a proporção relativa de FtsZ no anel versus citoplasma.

A figura 3-13 mostra imagens dos anéis Z de células contendo FtsZ selvagem e os alelos mutantes, além de uma tabela com a estimativa da fração de FtsZ no anel Z em cada um deles. A célula com o mutante FtsZ^{T111A} possui aproximadamente o dobro de FtsZ no anel que a célula com o alelo selvagem (36±5% e 15±2%, respectivamente). O mesmo acontece com os mutantes FtsZ^{I201F}, FtsZ^{G68R} e FtsZ^{L69S} (28±5%, 29±4% e 30±6%, respectivamente), que apesar de ter uma média um pouco menor do que o mutante FtsZ^{T111A}, estão na mesma faixa de erro estatístico. Mesmo observando apenas as imagens, sem o apoio das medidas, podemos reparar que os anéis Z formados nas células mutantes são mais “grossos” que o anel Z na célula selvagem.

O fato de que o anel Z nos mutantes tenha uma maior quantidade de FtsZ do que o anel Z da cepa selvagem indica que o polímero deve se tornar mais robusto. Esses

	FtsZ ^{WT}	FtsZ ^{T111A}	FtsZ ^{I201F}	FtsZ ^{G68R}	FtsZ ^{L69S}
% Anel	15±4 (n=27)	36±5 (n=23)	28±5 (n=18)	29±4 (n=17)	30±6 (n=13)

Figura 3-13: Cálculo da proporção de FtsZ no anel Z. As imagens mostram o sinal de fluorescência tanto no anel Z como no citoplasma nas células com *ftsZ* selvagem e nos mutantes.

dados confirmam e complementam os ensaios de FRAP do tópico anterior, indicando que as mutações devem estar gerando uma estrutura mais estável. Como polímeros de FtsZ mais estáveis poderiam se tornar resistente ao efeito de ZapA-MTS será abordado na Discussão.

3.2.9 – Uma estratégia alternativa (ganho de função) para seleção de mutantes *ftsZ*

Como a estratégia para encontrar mutantes de FtsZ que tenham perdido a interação com ZapA identificou apenas mutantes que, apesar de resistentes, continuam interagindo com ZapA, resolvemos atacar o problema de uma outra perspectiva. Ao invés de procurar mutantes de FtsZ que não interajam mais com ZapA, decidimos procurar em nossa biblioteca mutantes de FtsZ que voltem a interagir com ZapA^{N62A}, um mutante ZapA caracterizado em nosso laboratório que não interage mais com FtsZ (Handler e Gueiros-Filho, dados não publicados). A figura 3-14A ilustra como esperávamos encontrar tais mutantes com essa estratégia.

A estratégia utilizada para buscar esses mutantes com ganho de função foi baseada no fato de que a superexpressão de ZapA é capaz de suprimir a inibição da divisão por MinD (como vimos no tópico 3.2.6). Como ZapA^{N62A} não se liga mais a FtsZ, ele não é capaz de reverter a superexpressão de MinD, como ZapA selvagem. A figura 3-14B mostra como a indução de MinD mata as células em placa, ao mesmo tempo que a indução de ZapA reverte esse quadro. Porém, quando temos a indução de ZapA^{N62A} ao invés do alelo selvagem, não vemos nenhuma recuperação. Nossa expectativa era que

A **B**

Figura 3-14: Nova estratégia para triagem genética de mutantes *ftsZ*. **(A)** A idéia da triagem baseia-se em um caso clássico de supressão. O sítio de ligação entre FtsZ e ZapA está ilustrado na figura (esquerda). Quando mutamos o resíduo Asn62 de ZapA (centro), a interação se desfaz. O objetivo da nova triagem é buscar um mutante de FtsZ que restaure essa interação (direita). **(B)** A estratégia escolhida foi superexpressar MinD, causando a morte das células (esquerda). Ao mesmo tempo, foi induzido ZapA^{N62A}, porém como esse alelo não interage com FtsZ, as células continuariam morrendo (abaixo). Uma possibilidade da célula suprimir o efeito de MinD seria se ZapA^{N62A} voltasse a interagir com FtsZ, como acontece nos alelos selvagens, ou com dois alelos mutantes (direita).

mutantes que promovam a volta da interação entre FtsZ e ZapA^{N62A} poderiam fazer com que ZapA^{N62A} passasse a suprimir a letalidade por MinD.

3.2.10 – Obtenção e identificação dos novos mutantes *ftsZ*

Para a triagem de mutantes que voltam a interagir com ZapA^{N62A} foram transformadas com a biblioteca B3 células competentes de *B. subtilis* contendo uma cópia de *Pspac-minD* e outra de *Pxil-gfp-zapA^{N62A}* integradas no cromossomo (cepa AB45), resultando em aproximadamente $6,0 \times 10^4$ colônias, distribuídas em 20 placas com 250µM de IPTG e 2% de xilose para seleção.

Observamos o crescimento de 51 colônias resistentes ao efeito de MinD, as quais foram estriadas em placas frescas e confirmaram tratar-se de verdadeiros positivos. Porém, não sabíamos se essas colônias estavam resistentes a MinD pelo efeito de um ganho de interação entre um FtsZ mutante e ZapA^{N62A} ou por conta de uma mutação em FtsZ capaz de torná-lo resistente ao sistema Min de maneira independente de ZapA^{N62A} (como já havíamos encontrado na primeira triagem). Para verificarmos isso, as colônias foram estriadas em placas com IPTG a 250µM, induzindo apenas MinD e verificamos quais candidatos seriam resistentes. Neste experimento, observamos que todos menos um candidato era resistente a superexpressão de MinD. O único candidato sensível foi testado e mostrou-se dependente da superexpressão de ZapA^{N62A} para reverter a inibição de MinD (figura 3-15B). Esse candidato foi sequenciado e um resíduo na região N-terminal de FtsZ foi encontrado mutado: E91V. A figura 3-15A mostra o procedimento aqui descrito através de um fluxograma.

A

B

Figura 3-15: Triagem genética para ganho de interação entre FtsZ e ZapA. (A) Fluxograma dos passos do procedimento realizado até a identificação do mutante *ftsZ^{E91V}*. (B) Ensaio de superexpressão de MinD e ZapA^{N62A} em placas LB mostrando a supressão causada pelo alelo *ftsZ^{E91V}* (esquerda).

3.2.11 – Mapeamento do resíduo E91 na estrutura de FtsZ

Assim como foi feito com os mutantes FtsZ da triagem anterior, nós marcamos em vermelho o resíduo Glu91 na estrutura de FtsZ. A figura 3-16 mostra um dímero de FtsZ, montado à partir da estrutura de *B. subtilis* (Oliva, Löwe *et al.*, 2007), utilizando como modelo o dímero de *M. jannaschii* (Oliva, Löwe *et al.*, 2004). O resíduo Glu91 fica na hélice H3, exposto em sua superfície, o que sustenta que ele deve ser um bom alvo para uma possível interação com ZapA. Além disso, observamos que ele está situado na região lateral, perpendicular ao sentido da formação do protofilamento, o que é interessante levando em conta que ZapA promove o aumento de interações laterais entre protofilamentos de FtsZ (Gueiros-Filho e Losick, 2002).

Figura 3-16: Mapeamento do resíduo Glu91 na estrutura de FtsZ de *B. subtilis* (Oliva, Löwe *et al.*, 2007). Na interface do dímero (montado a partir da estrutura monomérica de *Bacillus subtilis*, PDB 2vam) está indicado a molécula de GTP (azul). O resíduo Glu91 (esferas vermelhas) está assinalado na hélice H3 (amarelo), apontando para a lateral da cadeia longitudinal.

3.2.12 – Caracterização fenotípica do mutante $FtsZ^{E91V}$

Para confirmar que a supressão de MinD por ZapA^{N62A} se deveu a restauração da interação entre FtsZ e ZapA, verificamos o padrão de localização de GFP-ZapA^{N62A} tanto com FtsZ selvagem como com o mutante FtsZ^{E91V}.

A figura 3-17A mostra que a localização de GFP-ZapA^{N62A} na célula é totalmente diferente com FtsZ^{WT} (totalmente difusa no citoplasma) e com FtsZ^{E91V} (bandas com padrão semelhante das formadas com GFP-ZapA^{WT}). Essa é uma forte evidência de que ZapA^{N62A} realmente voltou a interagir com o anel Z formado pelo mutante FtsZ^{E91V}.

Apesar de GFP-ZapA^{N62A} ter voltado a localizar no anel Z formado por FtsZ^{E91V}, observamos que GFP-ZapA^{WT} continua localizando-se também no anel Z formado por FtsZ^{E91V}, indicando que é provável que FtsZ^{E91V} restaure a interação com ZapA^{N62A}, sem afetar sua interação com ZapA selvagem. Os resultados dos ensaios de viabilidade confirmam essa hipótese, já que tanto a superexpressão de ZapA^{WT}, como a de ZapA^{N62A}, são capazes de suprimir a superexpressão de MinD em células com o alelo FtsZ^{E91V} (figura 3-17B).

Figura 3-17: Caracterização fenotípica do mutante *ftsZ*^{E91V}. (A) Microscopia de fluorescência das células com alelos selvagens e mutantes de *ftsZ* e *zapA*. A primeira linha mostra a localização de GFP-ZapA em células com os alelos *ftsZ* e *zapA* selvagens. A segunda linha refere-se a localização de GFP-ZapA em células com os alelos *ftsZ* selvagem e *zapA*^{N62A}. A terceira indica a localização de GFP-ZapA em células com os alelos *ftsZ*^{E91V} e *zapA*^{N62A}. A última linha mostra células com os alelos *ftsZ*^{E91V} e *zapA* selvagem. (B) Ensaio de viabilidade das células frente à superexpressão de MinD (colunas listradas) e MinD + ZapA^{WT/N62A} (colunas pretas) em placas LB. A supressão causada pelo alelo *ftsZ*^{E91V} confirma os dados de localização.

4- DISCUSSÃO

Nas últimas décadas, com a busca cada vez maior pela função dos genes anotados nos genomas sequenciados, o número de novos moduladores de divisão descobertos só aumenta. Porém, para se entender melhor como esses moduladores funcionam a nível molecular, é importante investigar como esses moduladores interagem com seus alvos. Tais estudos, como o apresentado neste trabalho, podem ajudar a entender a divisão celular de forma mais mecânica.

Nesse contexto, tivemos como objetivo estudar a interação entre duas proteínas envolvidas em divisão em *B. subtilis*, FtsZ e ZapA. Para isso, decidimos abordar o problema através de uma estratégia genética, construindo uma biblioteca de mutantes de *ftsZ* e a utilizando em triagens em busca de mutantes que nos ajudassem a identificar quais resíduos de FtsZ seriam importantes para estabelecer uma interação com ZapA.

4.1 – Uma biblioteca culpada até que se prove o contrário

A biblioteca B3 foi construída e caracterizada, apresentando um número alto de clones com mutações ($5,7 \times 10^4$) (Figura 3-2A). Os mutantes obtidos nas triagens mostraram que B3 possui uma diversidade de mutações que propiciam mais de uma solução para o mesmo resíduo (como no caso das mutações G68R e G68E) (Figura 3-5). Além disso, a biblioteca foi aplicada com sucesso em uma triagem com ganho de função, o que demanda substituições mais específicas do que simplesmente abolir uma interação simples.

Existem poucos estudos de mutagênese de FtsZ. O grupo liderado pelo Dr. Harold Erickson produziu mutantes de FtsZ de *E. coli* por mutações sítio-dirigidas e os caracterizou in vivo (morfologia e funcionalidade do anel Z) e in vitro (atividade GTPásica) (Stricker e Erickson, 2003) (Lu, Erickson et al., 2004) (Redick, Erickson et al., 2005). Outro estudo empregou uma biblioteca de mutantes de *ftsZ* em *B. subtilis*, construída através da cepa mutadora XL1-Red (Invitrogen), e selecionou 9 mutantes de $3,0 \times 10^3$ transformantes (FtsZ^{V38A}, FtsZ^{D174N}, FtsZ^{I245F}, FtsZ^{V260A}, FtsZ^{E300K}, FtsZ^{L302P}, FtsZ^{S219L}, FtsZ^{S271R} e FtsZ^{A285T}) que ainda eram funcionais, mas que apresentavam um aumento ou diminuição na frequência de divisão, caracterizando-os in vivo por sua morfologia, e frequência de divisão (Feucht e Errington, 2005). Comparando a nossa biblioteca com essa, podemos dizer mesmo sem saber quantos clones ela possui, que a biblioteca B3 foi bem mais explorada, tendo em vista que triamos $3,5 \times 10^5$ transformantes na primeira triagem e $6,0 \times 10^4$ na segunda.

Uma razão que pesou na decisão de se investir na construção de uma biblioteca de mutantes de FtsZ, é que esta, além de ser a proteína central no processo de divisão bacteriana, interage com muitas outras proteínas moduladoras além de ZapA. Para algumas dessas proteínas já se tem o conhecimento da região em FtsZ responsável pela sua interação (FtsA, Ezra e SepF, por exemplo). No caso de outros moduladores, como MinC, MciZ e outros, nada se sabe sobre como interagem com FtsZ. Nossa biblioteca será muito útil ao laboratório para futuros estudos com estes moduladores e outros que venham a ser descobertos. Um exemplo de seu potencial é que, no momento, ela está sendo usada em nosso laboratório para identificar um possível sítio de ligação para MinC em FtsZ, e resultados preliminares apontam para uma região diferente da cauda CTP e da

hélice H3. Isto sugere a possibilidade de que moduladores que se liguem à FtsZ fora de sua cauda CTP não sejam exceções.

4.2- Os mutantes de primeira triagem

A biblioteca B3 foi usada nesse trabalho em duas triagens em busca de FtsZs mutantes. Na primeira triagem procuramos mutantes de FtsZ que perdessem a interação com ZapA, e para isso construímos a fusão ZapA-MTS, que quando superexpressa bloqueia totalmente a divisão em pouco tempo (Figura 3-4). Encontramos com essa estratégia 12 mutantes FtsZ resistentes a ZapA-MTS, divididos em 8 grupos (Figura 3-5).

Porém, ao caracterizar os mutantes, observamos que GFP-ZapA continua a localizar no anel Z em todos eles (Figura 3-7), sugerindo que ZapA deve estar ainda interagindo com FtsZ. Porém, como a microscopia é um ensaio indireto, existe a possibilidade de que ZapA possa estar localizando do anel Z através da interação com outros componentes do divisomo. Em apoio a esta possibilidade, ensaios de duplo-híbrido mostraram que tanto ZapA de *E. coli* como de *S. pneumoniae* interagem com diversas outras proteínas, como FtsA, FtsW e DivIC, além de FtsZ (Maggi, Ghelardini et al., 2008). Existem, no entanto, possíveis questionamentos a estes resultados. Um deles é que seria improvável que ZapA conseguisse interagir com tantas proteínas ao mesmo tempo, sendo ela uma proteína relativamente pequena (10 kDa). Outro ponto a ser levantado é que ensaios de duplo-híbrido geralmente apresentam uma boa incidência de falsos-positivos, principalmente envolvendo interação de proteínas associadas ou integrais a membrana, como as proteínas encontradas com ZapA. Outra evidência de que ZapA deve se ligar apenas em FtsZ para localizar-se no divisomo é o comportamento do

mutante ZapA^{N62A}, usado na nossa segunda triagem. Este mutante mostra-se totalmente delocalizado no citoplasma da célula. Se ZapA interagisse com outras proteínas além de FtsZ, dificilmente apenas uma mutação iria fazê-la deixar de interagir com o divisomo.

Uma outra razão para crer que ZapA ainda deve estar interagindo com os mutantes FtsZ é que os resíduos mutados foram mapeados no sítio catalítico de FtsZ (figura 3-8), indicando que a resistência à superexpressão de ZapA-MTS poderia ser um efeito independente da perda da interação entre as duas proteínas. Um trabalho recentemente publicado (Dajkovic, Lutkenhaus *et al.*, 2008) encontrou mutantes (e lista outros que foram encontrados anteriormente) de FtsZ em *E. coli* que, apesar de serem resistentes ao efeito de Sula (um modulador que desestabiliza os polímeros de FtsZ), continuam a interagir com o modulador. Coincidentemente, esses mutantes, assim como os presentes neste trabalho, possuem substituições em resíduos da interface entre as subunidades de FtsZ (FtsZ^{D212G} e FtsZ^{D209N}), e apresentaram uma diminuição na atividade GTPásica. Uma possível explicação para esse efeito é que as mutações estariam alterando as afinidades entre as subunidades do anel Z, gerando um efeito de estabilização dos polímeros. Assim, estes mutantes de FtsZ seriam capazes de ligar Sula e não seriam afetados.

Assumindo que ZapA continue ligando nos mutantes de FtsZ, uma questão que se levanta é como esses mutantes conferem resistência mesmo ligando ZapA-MTS? Para responder essa questão, seria necessário primeiro entender como a superexpressão de ZapA-MTS bloqueia a divisão. No momento temos duas hipóteses para explicar esse fenômeno. A primeira leva em consideração que o aumento da concentração de ZapA no anel Z, causada pela interação da região MTS com a membrana, iria estabilizá-lo de

forma a comprometer seu papel dinâmico na citocinese. A afinidade entre as subunidades de FtsZ no anel Z aumentaria de tal forma que inviabilizaria a constrição do divisomo.

A segunda hipótese leva em conta que a estequiometria entre FtsZ e ZapA é importante para o bom funcionamento do sistema FtsZ-ZapA na célula. Um exemplo análogo é o efeito da estequiometria na precipitação de antígenos por anticorpos (figura 4-1). No gráfico, vemos que a proporção entre anticorpos e antígenos é importante para a formação mais eficiente de um precipitado, sendo que quando a concentração de anticorpos é muito maior que a de antígenos, existe um efeito de desestabilização do precipitado. Levando essa comparação para o nosso modelo, se por conta da associação de ZapA-MTS à membrana acontece um aumento muito grande na concentração de ZapA no anel Z, então seria possível que ao invés de mediar mais interações laterais entre protofilamentos (estabilizando a interação entre eles), ZapA acabaria por induzir a formação de uma estrutura com uma conformação de polímeros mais instável.

Dentre as duas hipóteses levantadas, a segunda nos parece mais provável frente os resultados que obtivemos. Se ZapA-MTS estivesse causando uma hiperestabilização do anel Z, seria razoável esperar que os mutantes resistentes a esse efeito formassem um anel Z mais estável do que o normal, compensando assim a estabilização causada pelo ZapA-MTS. Ao contrário disso, encontramos mutantes de FtsZ que formam anéis Z mais resistentes ao efeito de moduladores que desestabilizam o anel Z (figura 3-10) e nossas medidas da dinâmica dos anéis Z por FRAP e da proporção de FtsZ no anel Z mostraram que o polímero deve estar mesmo mais estável que o normal (Figuras 3-12 e 3-13). Os dados da proporção de FtsZ nos anéis Z formados pelos mutantes, em particular, gera

Figura 4-1: Reação de precipitação de antígenos pela interação com anticorpos. O diagrama mostra como a proporção estequiométrica entre antígeno e anticorpo influencia na quantidade de antígeno precipitado. (Janeway e Travers, 1994).

uma maior sustentação para a segunda hipótese, pois um aumento na proporção de FtsZ no anel Z poderia balancear o efeito do aumento de concentração de ZapA (figura 2-13).

Outro questionamento relacionado à primeira triagem é o motivo de aparentemente não termos encontrado nenhum mutante de FtsZ que perdesse a interação com ZapA. Uma primeira possibilidade é o fato de não termos sequenciado a maior parte dos candidatos (foram seqüenciados 43 candidatos de 140). Isto poderia fazer com que deixássemos passar potenciais mutantes que tivessem perdido a interação com ZapA. Achamos esta possibilidade improvável, pois muitos dos mutantes encontrados apareceram repetidas vezes entre os mutantes sequenciados, evidenciando que a triagem poderia estar saturada.

A segunda possibilidade seria por conta da estratégia adotada ser desfavorável à integração de mutações presentes no N-terminal do gene. Quanto menor a distância entre a posição da extremidade 5' de *ftsZ* e a posição da mutação, menor a probabilidade desta mutação ser integrada na cópia que será expressa no cromossomo. Se o extremo N-terminal de FtsZ contivesse o sítio de interação com ZapA, nossa estratégia de integração estaria desfavorecendo encontrá-los. Mesmo assim, essa não deve ser a explicação mais plausível, pois conseguimos obter mutantes com substituições na região do extremo N-terminal de FtsZ (N25Y e N28I). Além disso, a identificação da hélice H3, que fica fora do extremo N-terminal da proteína, como sendo o possível sítio de ligação de ZapA em FtsZ eliminaria essa suposição.

Outra hipótese seria se o sítio de FtsZ para interação com ZapA fosse uma região essencial para a função de FtsZ, então a maior parte das substituições resultariam em uma proteína não funcional, causando a morte das células contendo esse alelo. Uma quarta

explicação seria se ZapA possuísse mais de um sítio de ligação em FtsZ, ou diversos resíduos que contribuiriam para a energia de ligação do complexo. Essa idéia é amparada pela analogia de FtsZ à tubulina, que também possui moduladores de polimerização, e alguns deles, como Clip-170, possuem diversos sítios de interação com a tubulina, sendo que eliminar apenas um dos sítios afeta apenas sutilmente sua interação com tubulina comparado com a perda simultânea deles (Gupta, Goodson et al., 2008). Nessa situação nunca acharíamos um mutante de FtsZ que perdesse a interação com ZapA com a biblioteca B3, pois a maioria de seus clones possuem apenas uma substituição, e a chance de termos nela um clone com três substituições que ao acaso modificassem mais de um aminoácido participante do sítio de ligação de ZapA seria pequena.

4.3 – Procura-se um sítio para ZapA

Apesar dos mutantes encontrados na primeira triagem serem interessantes para se estudar a estrutura e a função de FtsZ, eles supostamente continuam interagindo com ZapA. No entanto, como o objetivo do trabalho era identificar a região de FtsZ responsável pela interação com ZapA, decidimos realizar outra triagem, uma que envolvesse um ganho de interação. A estratégia de ganho de função foi levada adiante por termos em mãos um mutante de ZapA (ZapA^{N62A}), que com apenas uma substituição, acreditávamos não interagir mais com FtsZ por ensaios de microscopia de fluorescência e duplo-híbrido. Nossa aposta foi que, se não existisse na nossa biblioteca um mutante de FtsZ que com apenas uma substituição abolisse a interação com ZapA, talvez existisse um que restaurasse a interação com ZapA^{N62A}. Dessa forma, procurando supressores

capazes de restituir a interação de FtsZ com ZapA^{N62A}, encontramos o mutante FtsZ^{E91V}, situado na face exposta da hélice H3 na estrutura de FtsZ.

Analisando os resíduos da superfície da hélice H3 de FtsZ, vemos que ela é rica em lisinas (carregadas positivamente) e ácidos glutâmicos (carregados negativamente) expostos, sendo um ótimo alvo para proteínas que interagem com FtsZ por atração eletrostática, como parece ser o caso de ZapA (Small, Addinall et al., 2007) (figura 4-2A). Já na estrutura de ZapA vemos, bem próximo de Asn62 (o aminoácido mutado no mutante ZapA^{N62A}) três resíduos carregados (Arg30, His65 e Asp66) e outro neutro (Thr59), que poderiam estar participando desse sítio de ligação (figura 4-2B).

Uma possível explicação para a volta da interação entre FtsZ^{E91V} e ZapA^{N62A} seria a troca de um resíduo carregado negativamente (Glu) por um hidrofóbico (Val), dando à interação um caráter hidrofóbico (Val91-Ala62). Curiosamente, o mutante FtsZ^{E91V} continuou interagindo com ZapA^{WT}. Isso poderia ocorrer porque Asn62 continua presente em ZapA, estabilizando o sítio para que os outros resíduos participantes interajam (inclusive outros resíduos em FtsZ), e sendo Val91 um aminoácido relativamente pequeno e sem carga, não causaria nenhuma perturbação estérica ou eletrostática sobre o sítio de interação.

A descoberta de que a hélice H3 deve ser o alvo de ZapA para promover interações laterais entre protofilamentos de FtsZ é totalmente razoável, tendo em vista que a hélice H3 está disposta na face lateral de FtsZ. Outra evidência a favor desta possibilidade é que tanto α -tubulina como β -tubulina realizam interações laterais entre protofilamentos de um microtúbulo através da interação da “alça M” (resíduos 271-286), localizada na porção C-terminal de uma molécula, com a hélice H3, equivalente a hélice

Figura 4-2: Resíduos próximos a Glu91 (FtsZ) e Asn62 (ZapA) apontados como potenciais participantes do sítio de ligação entre FtsZ e ZapA. Os resíduos em vermelho indicam aminoácidos ácidos (carga negativa), os azuis indicam aminoácidos básicos (carga positiva) e os laranjas indicam aminoácidos com carga neutra.

H3 de FtsZ, de outra molécula (Nogales, Downing et al., 1999). O taxol, uma molécula descoberta há décadas e usada como uma droga para matar células tumorais, liga-se à tubulina através da alça M e por outros resíduos periféricos e induz uma estabilização dos polímeros, impedindo que os microtúbulos realizem o “encolhimento” característico (Amos e Löwe, 1999) (Nogales, 2000). Essa alta estabilização causada pelo taxol, enrijecendo a estrutura dos microtúbulos, é um mecanismo interessante para ser comparado com o nosso modelo de estudo, (figura 4-3). Segundo o modelo de atuação do taxol, este, ao se ligar na interface entre a alça M e a hélice H3, altera a conformação da alça T3 (importante para a ligação de GTP) e assim diminui a atividade GTPásica, deixando o polímero mais estável (Nogales, Downing et al., 1999). É interessante que ZapA, ao ligar-se em FtsZ, também induz uma diminuição na atividade GTPásica no polímero (Gueiros-Filho e Losick, 2002) (Small, Addinall et al., 2007).

Outro aspecto interessante dessa comparação entre FtsZ e tubulina é que ambas parecem usar as mesmas regiões para estabelecer interações laterais entre as cadeias. Experimentos *in vitro* de polimerização de FtsZ mostraram que Ca^{2+} induz a formação de folhas através da estabilização de interações laterais, que aconteceriam principalmente pela interação entre as folhas- β S3 de FtsZ (Lowe e Amos, 1999). A proximidade entre as estruturas secundárias S3 e H3 sustenta que a hélice H3 não só é importante para a interação lateral tanto em FtsZ como em tubulina, mas são um ponto de partida para entender melhor como ocorre essa interação lateral em FtsZ.

Apesar de FtsZ e tubulina provavelmente utilizarem as mesmas regiões para se associarem lateralmente, é importante notar que estas interações parecem ter características diferentes nas duas moléculas. Tubulina realiza interações laterais de

Figura 4-3: Interações laterais entre protofilamentos são mostradas de um docking feito a partir de imagens de microtúbulos. As estruturas secundárias envolvidas na interação lateral (Hélice H3 e M-Loop) e na ligação da molécula de Taxol estão em destaque (Figura retirada de Downing, 2000).

maneira constitutiva, ou seja, existe uma programação na própria molécula para que se forme interações laterais entre as subunidades do microtúbulo a todo momento, tendo em vista que protofilamentos de tubulina isolados são instáveis (Nogales, 2000). Já FtsZ mostra-se bem estável como protofilamento e talvez a necessidade de se estabelecer interações laterais venha somente no momento de se formar o anel Z na célula. Como FtsZ parece ser diferente da tubulina neste ponto, é razoável pensar que ao invés de uma alta afinidade entre suas cadeias laterais, FtsZ tenha evoluído para interagir com proteínas parceiras que pudessem estabelecer tais interações laterais nos momentos críticos do ciclo celular, como por exemplo ZapA.

4.4 – Perspectivas: Em busca do complexo FtsZ-ZapA

Nosso primeiro objetivo após a identificação e caracterização fenotípica dos mutantes de FtsZ apresentados neste trabalho será caracterizá-los bioquimicamente, realizando ensaios de afinidade com ZapA (continuam interagindo?), investigar suas propriedades de polimerização *in vitro* (formam polímeros mais estáveis? Existe uma diminuição na concentração crítica de polimerização?) e atividade GTPásica. Além disso, é de nosso interesse realizar também experimentos *in vitro* e *in vivo* (por exemplo FRAP) para solucionar como ZapA-MTS causa o bloqueio da função do anel Z.

Outro objetivo deste trabalho é utilizar as informações sobre a interação entre FtsZ e ZapA para compreender, a nível molecular, como ZapA promove a interação lateral e a estabilização entre as cadeias de FtsZ. No momento existe um modelo proposto para explicar o funcionamento de ZapA (Low, Lowe et al., 2004) (figura 4-4), porém a resolução desse modelo é muito baixa, e é nosso objetivo melhorá-lo. Como nossos

Figura 4-4: Modelo sugerido por Low *et al.* sobre como ZapA deve se ligar a FtsZ e estabiliza a interação entre os protofilamentos. “+” e “-” indicam o sentido de FtsZ em relação ao protofilamento. (A) O dímero de ZapA conecta-se a um par de protofilamentos paralelos. (B) O dímero de ZapA conecta-se a um par de protofilamentos anti-paralelos entre si (Figura retirada de Low *et al.*, 2004).

dados, apesar de identificarem uma região importante para a interação FtsZ-ZapA, não são suficientes para se deduzir mais detalhes, primeiramente iremos obter mais dados de mutagênese da hélice H3 para caracterizarmos melhor quais resíduos nessa região são importantes para a interação com ZapA.

Uma vez que tenhamos mais informações sobre estes resíduos, poderemos aplicar métodos teóricos de modelagem molecular para assim conseguirmos propor um modelo para o complexo FtsZ:ZapA. Entre estes métodos, o docking vem se mostrando cada vez mais acurado ao predizer a conformação de complexos moleculares (Chelliah, Fernández-Recio et al., 2006) (Zoete, Michielin et al., 2009). A maioria dos dockings tradicionais utilizam princípios semelhantes: cada possibilidade de interação entre duas proteínas é avaliada e medida conforme alguns critérios como complementariedade, interação eletrostática, repulsão de van der Waals, e etc.

Atualmente nós estamos desenvolvendo, em colaboração com o Dr. Roberto Kopke Salinas, um docking entre FtsZ e ZapA baseado em nossos dados experimentais e no software HADDOCK (Dominguez, Bonvin et al., 2003). O software HADDOCK oferece vantagens, como permitir que introduzamos restrições baseadas em nossos dados experimentais para assim reduzir o número de soluções possíveis, deixando o processo mais rápido e acurado. A partir da modelagem do complexo iremos finalmente entender como ZapA promove a formação de feixes. Apesar de ser um modelo simplificado, pois ignora a ação de diversas outras proteínas que atuam ao mesmo tempo no anel Z, estudando como ZapA organiza os protofilamentos de FtsZ, poderemos tentar chegar a um modelo mais detalhado de como é formado o anel Z.

5- MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 – Cepas bacterianas e condições de crescimento.

Todas as cepas utilizadas neste estudo estão listadas na tabela 5-1. As cepas de *B. subtilis* utilizadas foram derivadas das cepas selvagens PY79 (AB16) ou IS75 (AB39), previamente descritas (Okubo, Ohlsson-Wilhelm *et al.*, 1972). A cepa comercial *E. coli* DH5 α foi utilizada para as clonagens. Tanto *B. subtilis* quanto *E. coli* foram crescidos em 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 $\mu\text{g/mL}$.

5.2 – Manipulações de DNA e transformação.

As manipulações de DNA e as transformações em *E. coli* foram feitas seguindo os protocolos padrões (Sambrook e Russel, 2001). As extrações de DNA genômico de *B. subtilis* foram preparadas segundo protocolo descrito em Harwood e Cutting (1991). As transformações em *B. subtilis* foram feitas basicamente seguindo o método de um passo de Anagnostopoulos e Spizizen (1961) e o método de dois passos descrito em Harwood e Cutting (1991). Os plasmídeos utilizados estão descritos na tabela 5.2, e os oligonucleotídeos na tabela 5.3.

Os sequenciamentos de DNA foram feitos com o kit Big Dye Terminator (Applied Biosystem), utilizando seu próprio protocolo, seguido de purificação pelo procedimento padrão de precipitação (Sambrook e Russel, 2001).

Cepa	Descrição	Origem
DH5α	<i>supE44 lacU169 (f80 lacZDM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi1 relA1</i>	(Hanahan, 1983)
PY79	Prototrófica	(Youngman et al. 1983)
IS75	<i>hisA1 leuA8 metB5</i>	BD630
FG247	<i>thrC::Pspac-hy-minD</i> (erm)	(Gueiros-Filho e Losick, 2002)
AH93	<i>amyE::Pxyl-mciZ</i> (cat)	(Handler e Losick, 2008)
FG332	<i>thrC::Pspac-hy-minD</i> (erm), <i>amyE Pxil-gfp-zapA</i> (cat)	(Gueiros-Filho e Losick, 2002)
BD3196	<i>his leu met Δrok::kan</i>	(Albano, Dubnau et al., 2005)
FG491	<i>thrC::Phispac-yfp-fisZ</i> (erm)	Estoque Laboratório
AB41	<i>his leu met Δrok::kan, amyE Pxil-gfp-zapA-mts</i> (cat)	Trabalho Presente
AB43	<i>his leu met Δrok::kan, amyE Pxil-gfp-zapA-mts</i> (cat), <i>minCΔ::spc</i>	Trabalho Presente
AB44	<i>his leu met Δrok::kan, amyE Pxil-gfp-zapA^{N62A}-mts</i> (cat)	Trabalho Presente
AB45	<i>his leu met Δrok::kan, thrC::Pspac-hy-minD</i> (erm), <i>amyE Pxil-gfp-zapA^{N62A}</i> (cat)	Trabalho Presente
AB52	<i>his leu met Δrok::kan, amyE Pxil-gfp-zapA-mts</i> (cat), <i>fisZ::pAB10 fisZ^{T11A}</i> (tet)	Trabalho Presente
AB53	<i>his leu met Δrok::kan, amyE Pxil-gfp-zapA-mts</i> (cat), <i>fisZ::pAB10 fisZ^{T11A, A126T}</i> (tet)	Trabalho Presente
AB54	<i>his leu met Δrok::kan, amyE Pxil-gfp-zapA-mts</i> (cat), <i>fisZ::pAB10 fisZ^{D201F}</i> (tet)	Trabalho Presente
AB55	<i>his leu met Δrok::kan, amyE Pxil-gfp-zapA-mts</i> (cat), <i>fisZ::pAB10 fisZ^{L69S}</i> (tet)	Trabalho Presente
AB56	<i>his leu met Δrok::kan, amyE Pxil-gfp-zapA-mts</i> (cat), <i>fisZ::pAB10 fisZ^{L69S, H360L}</i> (tet)	Trabalho Presente
AB57	<i>his leu met Δrok::kan, amyE Pxil-gfp-zapA-mts</i> (cat), <i>fisZ::pAB10 fisZ^{G68R}</i> (tet)	Trabalho Presente
AB58	<i>his leu met Δrok::kan, amyE Pxil-gfp-zapA-mts</i> (cat), <i>fisZ::pAB10 fisZ^{G68R, R184H, P248S}</i> (tet)	Trabalho Presente
AB59	<i>his leu met Δrok::kan, amyE Pxil-gfp-zapA-mts</i> (cat), <i>fisZ::pAB10 fisZ^{Δ81V}</i> (tet)	Trabalho Presente
AB60	<i>his leu met Δrok::kan, amyE Pxil-gfp-zapA-mts</i> (cat), <i>fisZ::pAB10 fisZ^{Δ81V, A278T}</i> (tet)	Trabalho Presente
AB61	<i>his leu met Δrok::kan, amyE Pxil-gfp-zapA-mts</i> (cat), <i>fisZ::pAB10 fisZ^{T133L, R143K}</i> (tet)	Trabalho Presente
AB62	<i>his leu met Δrok::kan, amyE Pxil-gfp-zapA-mts</i> (cat), <i>fisZ::pAB10 fisZ^{R28L, A113V, M226I}</i> (tet)	Trabalho Presente
AB63	<i>his leu met Δrok::kan, amyE Pxil-gfp-zapA-mts</i> (cat), <i>fisZ::pAB10 fisZ^{N25Y, I162T}</i> (tet)	Trabalho Presente
AB64	<i>thrC::Phispac-yfp-fisZ</i> (erm), <i>fisZ::pAB10 fisZ^{D201F}</i> (tet)	Trabalho Presente
AB65	<i>thrC::Phispac-yfp-fisZ</i> (erm), <i>fisZ::pAB10 fisZ^{G68R}</i> (tet)	Trabalho Presente
AB66	<i>thrC::Phispac-yfp-fisZ</i> (erm), <i>fisZ::pAB10 fisZ^{L69S}</i> (tet)	Trabalho Presente
AB67	<i>thrC::Phispac-yfp-fisZ</i> (erm), <i>fisZ::pAB10 fisZ^{T11A}</i> (tet)	Trabalho Presente
AB68	<i>thrC::Pspac-hy-minD</i> (erm), <i>amyE Pxil-gfp-zapA</i> (cat), <i>fisZ::pAB10 fisZ^{T11A}</i> (tet)	Trabalho Presente
AB69	<i>thrC::Pspac-hy-minD</i> (erm), <i>amyE Pxil-gfp-zapA</i> (cat), <i>fisZ::pAB10 fisZ^{D201F}</i> (tet)	Trabalho Presente
AB70	<i>thrC::Pspac-hy-minD</i> (erm), <i>amyE Pxil-gfp-zapA</i> (cat), <i>fisZ::pAB10 fisZ^{L69S}</i> (tet)	Trabalho Presente
AB71	<i>thrC::Pspac-hy-minD</i> (erm), <i>amyE Pxil-gfp-zapA</i> (cat), <i>fisZ::pAB10 fisZ^{G68R}</i> (tet)	Trabalho Presente
AB72	<i>thrC::Pspac-hy-minD</i> (erm), <i>amyE Pxil-gfp-zapA</i> (cat), <i>fisZ::pAB10 fisZ^{Δ81V}</i> (tet)	Trabalho Presente
AB73	<i>thrC::Pspac-hy-minD</i> (erm), <i>amyE Pxil-gfp-zapA</i> (cat), <i>fisZ::pAB10 fisZ^{T133L, R143K}</i> (tet)	Trabalho Presente
AB74	<i>thrC::Pspac-hy-minD</i> (erm), <i>amyE Pxil-gfp-zapA</i> (cat), <i>fisZ::pAB10 fisZ^{R28L, A113V, M226I}</i> (tet)	Trabalho Presente
AB75	<i>thrC::Pspac-hy-minD</i> (erm), <i>amyE Pxil-gfp-zapA</i> (cat), <i>fisZ::pAB10 fisZ^{N25Y, I162T}</i> (tet)	Trabalho Presente
AB76	<i>amyE::Pxyl-mciZ</i> (cat), <i>fisZ::pAB10 fisZ^{T11A}</i> (tet)	Trabalho Presente
AB77	<i>amyE::Pxyl-mciZ</i> (cat), <i>fisZ::pAB10 fisZ^{D201F}</i> (tet)	Trabalho Presente
AB78	<i>amyE::Pxyl-mciZ</i> (cat), <i>fisZ::pAB10 fisZ^{L69S}</i> (tet)	Trabalho Presente
AB79	<i>amyE::Pxyl-mciZ</i> (cat), <i>fisZ::pAB10 fisZ^{G68R}</i> (tet)	Trabalho Presente
AB80	<i>amyE::Pxyl-mciZ</i> (cat), <i>fisZ::pAB10 fisZ^{Δ81V}</i> (tet)	Trabalho Presente
AB81	<i>thrC::Pspac-hy-minD</i> (erm), <i>amyE Pxil-gfp-zapA</i> (cat), <i>fisZ::pAB10 fisZ^{Δ81V}</i> (tet)	Trabalho Presente
AB82	<i>thrC::Pspac-hy-minD</i> (erm), <i>amyE Pxil-gfp-zapA^{N62A}</i> (cat), <i>fisZ::pAB10 fisZ^{Δ81V}</i> (tet)	Trabalho Presente

Tabela 5-1: Listagem das cepas utilizadas neste trabalho.

Nome	Descrição	Sequência 5' → 3'		Origem
oFG5	NotI--5' zapA	AAGCTAGCGGCCGCTTGCTGTGACGGCAAA		Estoque Laboratório
oFG16	BamHI--3' zapA (-stop codon)	AAGGATCCATCCCTTTCTTTAAGCTG		Estoque Laboratório
oFG63	BamHI--3' ftsZ	AAGGATCCTTAGCCGCGTTTATTACGGTT		Estoque Laboratório
oFG69	5' ftsZ (bases 524-543)	AAACACACCCGATGCTTGAA		Estoque Laboratório
oFG70	3' ftsZ (bases 687-668)	ACCGATACCCCATCAAAAGCAG		Estoque Laboratório
oFG139	3' zapA (- stop codon)--5' mts	GAAAAAACTGGAGCGTCAGCTTAAAGAAAAAGATGGATCCGGAGAGGGGTTGCTTTGAAGAGCAAAAC		Estoque Laboratório
oFG178	XbaI--5' ftsZ (-ATG)	GCTCTAGATTGGAGTTTCGAAACAAC		Estoque Laboratório
oFG215	BclI--3' mts	CGGTGATCAACACACAATAATAAAAACTGGTCTGATCGCATTTAAGATCTTACTCCGAA		Estoque Laboratório

Tabela 5-2: Listagem dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR neste trabalho.

Nome	Descrição	Origem
pDG1515	Vetor Integrativo, Amp ^r , Tet ^r	Estoque Laboratório
pAB10	pDG1515 carregando gene <i>ftsZ</i>	Trabalho Presente
pEA18	Vetor Integrativo <i>amyE::P_{xyI}-gfp</i> (cat)	Estoque Laboratório

Tabela 5-3: Listagem dos plasmídios utilizadas neste trabalho.

5.3 – Microscopia de Fluorescência

Para as imagens de GFP e membrana foi utilizado um microscópio invertido Nikon TE 300, equipado com filtros para GFP (set Endow GFP, 41018; Chroma Technology), FM4-64 e mCherry (set Texas Red Brightline, TXRED4040-B; Semrock). As imagens foram captadas com uma câmera Roper CoolSnap HQ, utilizando exposições entre 0,5 e 1 segundos.

Já para os experimentos de FRAP e cálculo da proporção de FtsZ no anel Z foi usado um microscópio invertido Nikon TE-2000E de 8 canais Neos AOTF e equipado com uma câmera Roper Scientific Cascade 512B EMCCD. As imagens foram obtidas através de um scanner confocal Yokogawa CSU-10 tipo “spinning disc”.

As imagens foram obtidas de células vivas, montadas em lâminas contendo uma camada sólida de meio de cultura com 1% de agarose em LB ou salina tamponada (PBS), para manter sua viabilidade durante o período de observação. Para a visualização da membrana foi utilizado 1µg/mL do corante FM4-64. Todas as imagens capturadas foram processadas utilizando-se os softwares Metamorph (Universal Imaging, Media, PA) e ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

5.4 – Bibliotecas de mutantes *ftsZ*

A biblioteca B0 foi construída a partir da transformação do plasmídeo pAB10, contendo uma cópia de *ftsZ*, em células XL1-Red competentes e o crescimento em cultura LB. As células eram observadas até chegar à D.O. 1,0 e então diluídas para uma D.O. aproximadamente 0,01, e esse procedimento foi repetido por 5 dias, resultando em

aproximadamente 200 gerações. A reação de PCR das bibliotecas B1 a B3 seguiram os protocolos descritos abaixo (Fromant, Plateau et al., 1994) (Dieffenbach e Dveksler, 2003):

Biblioteca B1

1µL DNA genômico PY79 (100ng)

1X Tampão *Taq* (Fermentas)

Primer oFG63 0,5µM

Primer oFG178 0,5µM

MgCl₂ 7mM

MnCl₂ 0mM

dTTP 1mM

dCTP 1mM

dGTP 0,2mM

dATP 0,2mM

1µL *Taq* (2,5 unidades)

Programa: 1 ciclo de 3' (93°C)

30 ciclos: 1' (93°C), 1' (55°C) e 5' (72°C)

1 ciclo de 10' (72°C)

patamar a 4°C.

Biblioteca B2

1µL DNA genômico PY79 (100ng)

1X Tampão *Taq* (Fermentas)

Primer oFG63 0,5µM

Primer oFG178 0,5µM

MgCl₂ 7mM
MnCl₂ 0,5mM
dTTP 1mM
dCTP 1mM
dGTP 0,2mM
dATP 0,2mM
1μL *Taq* (2,5 unidades)

Programa: 1 ciclo de 3' (93°C)
30 ciclos: 1' (93°C), 1' (55°C) e 5' (72°C)
1 ciclo de 10' (72°C)
patamar a 4°C.

Biblioteca B3

1μL DNA genômico PY79 (100ng)
1X Tampão *Taq* (Fermentas)
Primer oFG63 0,5μM
Primer oFG178 0,5μM
MgCl₂ 7mM
MnCl₂ 0,5mM
dTTP 1,5mM
dCTP 1mM
dGTP 0,2mM
dATP 0,6mM
1μL *Taq* (2,5 unidades)

Programa: 1 ciclo de 3' (93°C)
30 ciclos: 1' (93°C), 1' (55°C) e 5' (72°C)
1 ciclo de 10' (72°C)
patamar a 4°C.

Os produtos foram purificados, clivados pelas enzimas de restrição *BamHI/XbaI* (New England Biolabs) e ligados ao vetor pDG1515 (igualmente clivado) com *T4 DNA Ligase* (New England Biolabs). As ligações foram transformadas em células *E. coli* DH5 α eletrocompetentes. Das colônias transformadas, foram extraídas as bibliotecas em forma de DNA plasmidial.

5.5 – Construção da curva de Poisson

A curva de distribuição de Poisson para a biblioteca B3 foi construída no software Microsoft Excel e fez-se uso da fórmula:

$$f(k; \lambda) = \frac{e^{-\lambda} \lambda^k}{k!},$$

onde $f(k; \lambda)$ é a probabilidade de se encontrar uma mutação na biblioteca, k o número de mutações encontradas por clone e λ a média de mutações encontradas nos seqüenciamentos (0,85 subst./clone).

5.6 – Construção das fusões ZapA-MTS e ZapA^{N62A}-MTS

As fusões ZapA-MTS e ZapAN62A-MT foram construídas amplificando separadamente o gene de *zapA* (ou *zapA*^{N62A}) sem o códon de terminação e o segmento de aproximadamente 120pb referente ao MTS de MinD, com uma adição de 30pb da região

3' de *zapA* no oligonucleotídio usado na sua amplificação. Os dois produtos foram fusionados em uma terceira reação de PCR graças à homologia presente nos 30pb adicionados. O produto amplificado (*zapA-mts*) foi então clivado com o par de enzimas de restrição NotI/BclI (New England Biolabs) e ligado (kit T4 DNA *Ligase*, New England Biolabs) no vetor pEA18 clivado com NotI/BamHI, em fusão com GFP e abaixo do promotor *P_{xyl}*, indutível por xilose. Como o vetor pEA18 tem duas frações do gene *amyE* (*amyE5'* e *amyE3'*) flanqueando seu sítio de clonagem, ao ser transformado em células competentes de *B. subtilis*, a fusão *P_{xyl}-gfp-zapA-mts* é integrada por recombinação dupla, rompendo o locus de *amyE*. A integração foi verificada por sequenciamento, utilizando os dois primers internos de *zapA-mts* (oFG139 e oFG16). As reações de PCR estão detalhadas abaixo:

Amplificação *zapA* e *zapA*^{N62A}

1ng de pEA18 com *zapA* ou *zapA*^{N62A} clonados

1X Tampão *Taq* (Fermentas)

Primer oFG5 0,5μM

Primer oFG16 0,5μM

MgCl₂ 1mM

dNTP 0,5mM

1μL *Taq* (2,5 unidades)

Programa: 1 ciclo de 3' (93°C)

30 ciclos: 1' (93°C), 1' (50°C) e 1' (72°C)

1 ciclo de 5' (72°C)

patamar a 4°C.

Amplificação mts

1µL de DNA genômico de PY79 (100ng)

1X Tampão *Taq* (Fermentas)

Primer oFG139 0,5µM

Primer oFG215 0,5µM

MgCl₂ 1mM

dNTP 0,5mM

1µL *Taq* (2,5 unidades)

Programa: 1 ciclo de 3' (93°C)

30 ciclos: 1' (93°C), 1' (50°C) e 1' (72°C)

1 ciclo de 5' (72°C)

patamar a 4°C.

Amplificação Fusões *zapA-mts* e *zapAN62A-mts*

1µL de cada PCR purificado (1ng)

1X Tampão *Taq* (Fermentas)

Primer oFG5 0,5µM

Primer oFG215 0,5µM

MgCl₂ 1mM

dNTP 0,5mM

1µL *Taq* (2,5 unidades)

Programa: 1 ciclo de 3' (93°C)

30 ciclos: 1' (93°C), 1' (50°C) e 1' (72°C)

1 ciclo de 5' (72°C)

patamar a 4°C.

5.6 – Medidas de comprimento das células nos mutantes *ftsZ*

As células com os alelos *ftsZ* mutantes (e o cassete de superexpressão de ZapA-MTS) foram crescidas em LB até uma D.O. aproximadamente 1,0 e diluídas para D.O. aproximadamente 0,01. Esse procedimento foi repetido 2x e então as células foram ressuspensas a uma D.O. 0,3 em meio LB e xilose a 1% e cultivadas por 2 horas. As amostras foram levadas ao microscópio de fluorescência, marcadas com o corante FM4-64 e fotografadas. As medidas foram extraídas das imagens através do software ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) e analisadas pelo software Microcal Origin (OriginLab).

5.7 – Mapeamento de resíduos nas estruturas 3D de FtsZ

Todas as estruturas foram obtidas do banco de dados de proteínas RCSB (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>). Os mapeamentos e assinalamentos, assim como as figuras de todas as estruturas, foram feitos usando o software PyMOL (DeLano Scientific LLC).

5.8 – Ensaios de contagem de colônias viáveis

Os ensaios de viabilidade foram feitos crescendo cada cepa em LB até uma certa D.O. (geralmente por volta de 1,0) e em seguida espalhou-se diluições entre 10^{-5} e 10^{-6} de cada amostra em placas com e sem indutor (o indutor varia conforme o ensaio), em triplicata. As placas foram incubadas a 37°C por aproximadamente 20 horas e foram

contadas o número de colônias em cada placa. Calculamos a porcentagem de colônias viáveis a partir da razão entre o número de colônias das placas com e sem indutor.

5.9 – Medição da dinâmica do anel Z por FRAP

Os experimentos de FRAP foram feitos a partir de cepas contendo um dos alelos *ftsZ* mutantes e um cassete de superexpressão de YFP-FtsZ. As cepas foram crescidas durante a noite em meio LB, e diluídas pela manhã a uma baixa D.O. (em torno de 0,01), sendo feita outra diluição semelhante quando a cultura chegou a D.O. aproximada de 0,5. Nesta última diluição foi adicionada 100 μ M de IPTG (indução de YFP-FtsZ), e esperou-se a D.O. alcançar 0,5 novamente. As células foram levadas ao microscópio confocal em lâminas de agarose 1% em LB e seladas com Valap (Copyright © 2007, Cold Spring Harbor Laboratory Press). Para a fotoinativação, utilizou-se um pulso de 50 ms o laser Ar/Kr, regulado para a potência de 0,3 mW. O laser foi focado de maneira a atingir metade de um anel Z. As imagens de recuperação da fluorescência foram obtidas a intervalos de 2 segundos, por 2 minutos após a “queima”.

Para cada quadro das séries temporais obtidas, foram feitas 3 medidas: medida da média de intensidade de fluorescência na área do anel “queimado”, na área da célula “queimada” e de parte de uma área do “background”. A partir dessas medidas, foram calculadas as intensidades corrigidas para o “background” e para o “bleaching” e os valores foram normalizados para cada quadro, de acordo com o seguinte procedimento:

$$(I_{\text{anelN}} - I_{\text{background}}) = I_{\text{ABGN}} \quad (I_{\text{celN}} - I_{\text{background}}) = I_{\text{CBGN}}$$

$$I_{\text{ABG1}} + (I_{\text{CBG1}} - I_{\text{CBGN}}) = I_{\text{ABG1(final)}}$$

$$I_{\text{ABG2}} + (I_{\text{CBG1}} - I_{\text{CBG2}}) = I_{\text{ABG2(final)}}$$

$$I_{\text{ABGN}} + (I_{\text{CBG1}} - I_{\text{CBGN}}) = I_{\text{ABGN(final)}}$$

$$I_{\text{ABGN(final)}} / I_{\text{ABG1(final)}} = I_{\text{ABGN(norm)}}$$

Glossário

I_{anelN} → Intensidade média da Fluorescência no anel Z "queimado"
(no quadro número "N")

$I_{\text{background}}$ → Intensidade média da Fluorescência no "background"

I_{celN} → Intensidade média da Fluorescência na célula "queimada"
(no quadro número "N")

I_{ABGN} → Intensidade média da Fluorescência no anel Z "queimado"
corrigida do "background" (no quadro número "N")

I_{CBGN} → Intensidade média da Fluorescência da célula "queimada"
corrigida do "background" (no quadro número "N")

$I_{\text{ABGN(final)}}$ → Intensidade média da Fluorescência no anel Z "queimado"
corrigida do "background" e do "bleaching"
(no quadro número "N")

$I_{\text{ABGN(norm)}}$ → Intensidade média da Fluorescência no anel Z "queimado"
corrigida do "background", do "bleaching" e normalizada
(no quadro número "N")

Para o cálculo dos tempos de meia vida foram usados como referência os últimos 10 pontos de cada gráfico para construir uma reta, em que seu ponto $t=0s$ foi determinado como a intensidade máxima de fluorescência (patamar da recuperação da fluorescência). Foi atribuído o valor de $t_{0,5}$ o valor de tempo relacionado à metade dessa medida.

5.10 – Medição da proporção relativa de FtsZ no anel Z

Para estimarmos a proporção de FtsZ no anel Z, calculamos a diferença entre a fluorescência da célula inteira (onde temos tanto FtsZ citoplasmático como associado no

anel Z) e o sinal da fluorescência citoplasmática. Para estimar a fluorescência citoplasmática total de uma célula, estimamos a fluorescência média por área de uma região do citoplasma e multiplicamos este valor pela área total da célula. O resultado da diferença entre a fluorescência total de uma célula e a fluorescência citoplasmática da mesma célula representa a quantidade de FtsZ no anel Z, e a partir dela calculamos a proporção relativa de FtsZ no anel versus citoplasma:

$$\begin{aligned}
 I_{\text{cel}} - I_{\text{background}} &= I_{\text{CeB}} \\
 I_{\text{cit}} - I_{\text{background}} &= I_{\text{CB}} \\
 I_{\text{CB}} \times A_{\text{cel}} &= I_{\text{CB}(\text{total})} \\
 &\downarrow \\
 I_{\text{CeB}} - I_{\text{CB}(\text{total})} &= I_{\text{anel}} \\
 &\downarrow \\
 (I_{\text{anel}} / I_{\text{CeB}}) \times 100 &= P_{\text{Zanel}}
 \end{aligned}$$

Glossário

I_{cel} → Intensidade média da Fluorescência na célula

$I_{\text{background}}$ → Intensidade média da Fluorescência no "background"

I_{CeB} → Intensidade média da Fluorescência na célula corrigida do "background"

I_{cit} → Intensidade média da Fluorescência de uma área do citoplasma

I_{CB} → Intensidade média da Fluorescência de uma área do citoplasma corrigida do "background"

A_{cel} → Área da célula

$I_{\text{CB}(\text{total})}$ → Intensidade da Fluorescência total do citoplasma corrigida do "background"

I_{anel} → Intensidade da Fluorescência no anel Z

P_{Zanel} → Porcentagem de FtsZ no anel Z

6 - REFERÊNCIAS

- Addinall, S.G., Bi, E., e Lutkenhaus, J. (1996). FtsZ ring formation in *fts* mutants. **J. Bacteriol.**, v.178, p.3877-3884.
- Barák, I. e Wilkinson, A.J. (2007). Division site recognition in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. **FEMS Microbiol Rev.**, v.31, p.311–326.
- Beall, B. e Lutkenhaus, J. (1989). Nucleotide sequence and insertional inactivation of a *Bacillus subtilis* gene that affects cell division, sporulation, and temperature sensitivity. **J. Bacteriol.**, v.171, p.6821-6834.
- Beech, P.L., Nheu, T., Schultz, T., Herbert, S., Lithgow, T., Gilson, P.R., e McFadden, G.I. (2000). Mitochondrial FtsZ in a Chromophyte Alga. **Science**, v.287, n.5456, p.1276 – 1279.
- Bernhardt, T.G., and de Boer, P.A. (2005). SlmA, a nucleoid-associated, FtsZ binding protein required for blocking septal ring assembly over chromosomes in *E. coli*. **Mol. Cell** 18, 555-564.
- Bi, E.F., e Lutkenhaus, J. (1991). FtsZ ring structure associated with division in *Escherichia coli*. **Nature**, v.354, p.161-164.
- Bork, P., Sander, C. e Valencia A. (1992) An ATPase domain common to prokaryotic cell cycle proteins, sugar kinases, actin, and hsp70 heat shock proteins. **Proc Natl Acad Sci U.S.A.**, v.89, n.16, p.7290-4.
- Buddelmeijer, N., e Beckwith, J. (2004). A complex of the *Escherichia coli* cell division proteins FtsL, FtsB and FtsQ forms independently of its localization to the septal region. **Mol. Microbiol.**, v.52, p.1315-1327.

Cadwell, R. e Joyce, G. (1992). Randomization of genes by PCR mutagenesis. **Genome Res.**, v.2, p.28-33.

Chelliah, V., Blundell, T.L. e Fernández-Recio, J. (2006). Efficient Restraints for Protein–Protein Docking by Comparison of Observed Amino Acid Substitution Patterns with those Predicted from Local Environment. **J. of Molec. Biol.**, v.357, p.1669-1682.

Cox, J. (1976). Disodium Cromoglycate (Cromolyn Sodium) in Bronchial Ashma – Mechanisms and Therapeutics. Ed. Weiss, p.805-837.

Dajkovic, A., Mukherjee, A., e Lutkenhaus, J. (2008). Investigation of Regulation of FtsZ Assembly by SulA and Development of a Model for FtsZ Polymerization. **J. of Bacteriol.**, v.190, p.2513-2526.

Dajkovic, A., Lan, G., Sun, S., Wirtz, D. e Lutkenhaus, J. (2008). MinC Spatially Controls Bacterial Cytokinesis by Antagonizing the Scaffolding Function of FtsZ. **Current Biology**, v.18, p.235–244.

Daniel, R.A., Harry, E.J., Katis,V.L., Wake, R.G. e Errington, J. (1998) Characterization of the essential cell division gene *ftsL* (*ylID*) of *Bacillus subtilis* and its role in the assembly of the division apparatus. **Mol. Microbiol.**, v.29, p.593–604.

de Boer, P., Crossley, R. e Rothfield, L. (1990). Central role for the *Escherichia coli* minC gene product in two different cell division-inhibition systems. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.87, p.1129-1133.

de Boer, P., Crossley, R. e Rothfield, L. (1992). The essential bacterial cell-division protein FtsZ is a GTPase. **Nature**, v.359, p.254-6.

Den Blaauwen, T., Buddelmeijer, N., Aarsman, M.E., Hameete, C.M. e Nanninga, N. (1999). Timing of FtsZ assembly in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v.181, p.5167-5175.

Dieffenbach, C.W. e Dveksler, G.S. (2003). PCR Primer – A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Dominguez, C., Boelens, R. e Bonvin, A.M. (2003). HADDOCK: a protein-protein docking approach based on biochemical or biophysical information. **J. Am. Chem. Soc.**, v.125, p.1731-7.

Erickson, H.P., Taylor, D.W., Taylor, K.A., and Bramhill, D. (1996). Bacterial cell division protein FtsZ assembles into protofilament sheets and minirings, structural homologs of tubulin polymers. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A** 93, 519-523.

Erickson, H. e Stoffler, D. (1996). Tubulin rings are universal polymers of the tubulin Family- α/β , γ and FtsZ. **J. Cell Biol.**, v.135, p.5-8.

Erickson, H. (1998). Atomic Structures of Tubulin and FtsZ. **Trends in Cell Biol.**, v.8, p.133-137.

Errington, J., Daniel, R.A. e Scheffers, D.J. (2003). Cytokinesis in bacteria. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v.67, p.52-65.

Feucht, A., e Errington, J. (2005). ftsZ mutations affecting cell division frequency, placement and morphology in *Bacillus subtilis*. **Microbiol.**, v.151, p.2053-2064.

Feucht, A., Lucet, I., Yudkin, M.D. e Errington, J. (2001). Cytological and biochemical characterization of the FtsA cell division protein of *Bacillus subtilis*. **Mol. Microbiol.**, v.40, p.115-125.

Fromant M., Blanquet S. e Plateau P. (1995). Direct Random Mutagenesis of Gene-Sized DNA Fragments Using Polymerase Chain Reaction. **Analytical Biochem.**, v.224, p.347-353.

Gerard, P., Vernet, T., e Zapun, A. (2002). Membrane topology of the *Streptococcus pneumoniae* FtsW division protein. **J. Bacteriol.** v. 184, p.1925-1931.

Goehring, N.W. e Beckwith, J. (2005) Diverse paths to midcell: assembly of the bacterial cell division machinery. *Curr. Biol.*, v. 15, p.R514-526.

Goffin, C. e J. M. Ghuysen. (1998). Multimodular penicillin-binding proteins: an enigmatic family of orthologs and paralogs. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 62, p.1079–1093.

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 Dev.** 16, 2544-2556.

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 Dev.** v. 16, p.2544-2556.

Gueiros-Filho, F. Cell Division. In: P. Graumann (Ed.). *Bacillus : cellular and molecular biology*. (2007) Wymondham: Caister Academic Press, 454 p.

Gupta, K., Paulson, B., Folker, E., Charlebois, B., Hunt, A. e Goodson, H. (2008). The minimal plus-end tracking unit of the cytoplasmic linker protein CLIP-170. *J. Mol. Chem.*, e-pub ahead print.

Haeusser, D.P., Garza, A.C., Buscher, A.Z., Levin, P.A. (2007). The division inhibitor EzrA contains a seven-residue patch required for maintaining the dynamic nature of the medial FtsZ ring. **J. of Bacteriol.**, v. 189, n.24, p.9001-10.

Haeusser, D.P. e Levin, P.A. (2008). The great divide: coordinating cell cycle events during bacterial growth and division. **Current Opinion in Microbiology**, v. 11, p.94–9.

Haeusser, D.P., Schwartz, R.L., Smith, A.M., Oates, M.E., and Levin, P.A. (2004). EzrA prevents aberrant cell division by modulating assembly of the cytoskeletal protein FtsZ. **Mol. Microbiol.** 52, 801-814.

Hamoen, L.W., Meile, J., de Jong, W., Noirot, P., Errington, J. (2006). SepF, a novel FtsZ-interacting protein required for a late step in cell division. **Mol. Microbiol.**, v.59, n.3, p.989-999.

Handler, A., Lim, J.E., Losick, R. (2008). Peptide inhibitor of cytokinesis during sporulation in *Bacillus subtilis*. **Mol. Microbiol.**, v.68, n.3, p.588-599.

Harwood, C.R. e Cutting, S.M. (1990). Molecular biological methods for *Bacillus*. **Wiley Chichester**, UK.

Hermes, J., Parekh, S., Blacklow S., Köster H. e Knowles J. (1989). A reliable method for random mutagenesis: the generation of mutant libraries using spiked oligodeoxyribonucleotide primers. **Gene**. v.84, p.143-51.

Hirota Y, Ryter A e Jacob F. (1968). Thermosensitive mutants of *E. coli* affected in the processes of DNA synthesis and cellular division. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol.**, v.33, p. 677-93.

Holtje, J.V. (1998). Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v.62, p.181-203.

Hu, Z. e 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.**, v.47, n.2, p.345–355.

Huecas, S., and Andreu, J.M. (2003). Energetics of the cooperative assembly of cell division protein FtsZ and the nucleotide hydrolysis switch. **J. Biol. Chem.** 278, 46146-46154.

Ishikawa, S., Kawai, Y., Hiramatsu, K., Kuwano, M., and Ogasawara, N. (2006). A new FtsZ-interacting protein, YlmF, complements the activity of FtsA during progression of cell division in *Bacillus subtilis*. **Mol. Microbiol.** 60, 1364-1380.

Janeway, C.A. e Travers, P. (1994). Immunobiology: the Immune System in Health and Disease. Ed. Hardcover. 441p.

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

Levin, P.A., and Losick, R. (1996). Transcription factor Spo0A switches the localization of the cell division protein FtsZ from a medial to a bipolar pattern in *Bacillus subtilis*. **Genes Dev.** 10, 478-488.

Levin, P.A., Kurtser, I.G., and Grossman, A.D. (1999). Identification and characterization of a negative regulator of FtsZ ring formation in *Bacillus subtilis*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A** 96, 9642-9647.

Levin, P.A., Shim, J.J., and Grossman, A.D. (1998). Effect of *minCD* on FtsZ ring position and polar septation in *Bacillus subtilis*. **J. Bacteriol.** 180, 6048-6051.

Levin, P.A., Schwartz, R.L., and Grossman, A.D. (2001). Polymer stability plays an important role in the positional regulation of FtsZ. **J. Bacteriol.** 183, 5449-5452.

Low, H.H., Moncrieffe, M.C., and Lowe, J. (2004). The Crystal Structure of ZapA and its Modulation of FtsZ Polymerisation. **J. Mol. Biol.** 341, 839-852.

Lowe, J. e Amos, L. (1999). Tubulin-like protofilaments in Ca²⁺-induced FtsZ sheets. **EMBO J.**, v.18, p.2364-71.

Lu, C., Stricker, J., and Erickson, H.P. (1998). FtsZ from *Escherichia coli*, *Azotobacter vinelandii*, and *Thermotoga maritima*--quantitation, GTP hydrolysis, and assembly. **Cell Motil. Cytoskeleton**, v.40, p.71-86.

Lutkenhaus, J. (2007). Assembly Dynamics of the Bacterial MinCDE System and Spatial Regulation of the Z Ring. **Annual Rev. of Biochem.**, v.76, p.539-562.

Lutkenhaus, J.F., Wolf-Watz, H. e Donachie, W.D. (1980). Organization of genes in the ftsA-envA region of the Escherichia coli genetic map and identification of a new fts locus (ftsZ). **J Bacteriol.**, v.142, n.2, p.615-620.

Maddox, P., Bloom, K. e Salmon, E.D. (2000). The polarity and dynamics of microtubule assembly in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Nature Cell Biol.**, v.2, n.1, p.36-41.

Margolin, W. (2000) Themes and variations in prokaryotic cell division. **FEMS Microbiology. Reviews**, v.24, n.4, p.531-548.

Margolin, W. (2001). Spatial regulation of cytokinesis in bacteria. **Curr. Opin. Microbiol.**, v.4, p.647-652.

Marston, A. e Errington, J. (1999). Selection of the midcell division site in *Bacillus subtilis* through MinD-dependent polar localization and activation of MinC. **Molecular Microbiology**, v.33, n.1, p.84-96.

Mukherjee, A. e Lutkenhaus, J. (1993). Escherichia coli cell division protein FtsZ is a guanine nucleotide binding protein. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v.90, n.3, p.1053-1057.

Mukherjee, A. e Lutkenhaus, J. (1994). Guanine nucleotide-dependent assembly of FtsZ into filaments. **J Bacteriol.**, v.176, n.9, p.2754-2758.

Nogales, E. (2000). Structural Insights into Microtubule Function. **Annu. Rev. Biochem.**, v.69, p.277–302.

Nogales, E., Sharon, G., Downing, W.H. e Downing, K.H. (1998). Structure of the $\alpha\beta$ tubulin dimer by electron crystallography. **Nature**, v.391, p.199–203.

Nogales, E., Whittaker, M., Milligan, R. e Downing, K.H. (1999). High-Resolution Model of the Microtubule. **Cell**, v.96, p.79–88.

Okubo, S., T. Yanagida, D. J. Fujita, and B. M. Ohlsson-Wilhelm. (1972). The genetics of bacteriophage SPOI. **Biken J.**, v.15, p.81-97.

Oliva, A. e Löwe, J. (1998). Crystal structure of the bacterial cell-division protein FtsZ. **Nature**, v.391, n.6663, p.203-206.

Oliva, A., Cordell, S.C. e Löwe, J. (2004). Structural insights into FtsZ protofilament formation. **Nature Struct. & Mol. Biol.**, v.11, p.1243 – 1250.

Oliva, A., Trambaiolo, D. e Löwe, J. (2007). Structural Insights into the Conformational Variability of FtsZ. **J. of Mol. Biol.**, v.373, p.1229-1242.

Osawa, M., Anderson, D.E. e Erickson, H.P. (2008). Reconstitution of Contractile FtsZ Rings in Liposomes. **Science**, v.320, p.792-4.

Osteryoung, K.W. e Vierling, E. (1995). Conserved cell and organelle division. **Nature**, v.376, n.6540, p.473-4.

Pedersen, L.B., Angert, E.R. e Setlow, P. (1999). Septal localization of penicillin-binding protein 1 in *Bacillus subtilis*. **J. Bacteriol.**, v.181, p.3201-3211.

Pichoff, S. e Lutkenhaus, J. (2001). Escherichia coli Division Inhibitor MinCD Blocks Septation by Preventing Z-Ring Formation. **J. of Bacteriol.**, v.183, n.22, p.6630-6635.

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

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

Pogliano, J. (2008). The bacterial cytoskeleton. Curr. **Opinion in Cell Biology**, v.20, p.19–27.

Rico, A.I., Garcia-Ovalle, M., Mingorance, J., and Vicente, M. (2004). Role of two essential domains of *Escherichia coli* FtsA in localization and progression of the division ring. **Mol. Microbiol.** 53, 1359-1371.

Redick, S., Stricker, J., Briscoe, G. e Erickson, H.P. (2005). Mutants of FtsZ Targeting the Protofilament Interface: Effects on Cell Division and GTPase Activity. **J. of Bacteriol.**, v.187, p. 2727-2736.

Reits, E.A.J. e Neefjes, J.J. (2001). From fixed to FRAP: measuring protein mobility and activity in living cells. **Nature Cell Biol.**, v.3, p.145-7.

Rivas, G., López, A., Mingorance, J., Ferrándiz, M.J., Zorrilla, S., Minton, A.P., Vicente, M. e Andreu, J.M. (2000). Magnesium-induced Linear Self-association of the FtsZ Bacterial Cell Division Protein Monomer. **J. Biol. Chem.**, v.275, n.16, p.11740-11749.

Romberg, L. e Levin, P.A. (2003). Assembly dynamics of the bacterial cell division protein FtsZ: poised at the edge of stability. **Annu. Rev. Microbiol.**, v.57, p.125-154.

Romberg, L., Simon, M. e Erickson, H.P. (2001). Polymerization of FtsZ, a Bacterial Homolog of Tubulin. **J. Biol. Chem.**, v.276, n.15, p.11743-11753.

- Rothfield, L., Taghbalout, A., and Shih, Y.L. (2005). Spatial control of bacterial division-site placement. **Nat. Rev. Microbiol.**, v.3, p.959-968.
- Sambrook, J. e Russel, D.W. (2001). Molecular cloning. A laboratory manual. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, Cold Spring Harbor, NY.
- Scheffers, D., de Wit, J.G., den Blaauwen, T. e Driessen, A.M. (2002). GTP Hydrolysis of Cell Division Protein FtsZ: Evidence that the Active Site Is Formed by the Association of Monomers. **Biochemistry**, v.41, p.521-529.
- Shiomi, D. e Margolin, W. (2007). The C-Terminal Domain of MinC Inhibits Assembly of the Z Ring in Escherichia coli. **J. of Bacteriol.**, v.189, n.1, p.236-243.
- Shiomi, D. e Margolin, W. (2008). Compensation for the loss of the conserved membrane targeting sequence of FtsA provides new insights into its function. **Mol Microbiol.**, v.67, n.3, p.558-69.
- Small, E., Marrington, R., Rodger, A., Scott, D., Sloan, K., Roper, D., Dafforn, T. e Addinall, S. (2007). FtsZ Polymer-bundling by the Escherichia coli ZapA Orthologue, YgfE, Involves a Conformational Change in Bound GTP. **J. of Mol. Biol.**, v.369, n.1, p.210-221.
- Sievers, J. e Errington, J. (2000a). Analysis of the essential cell division gene *ftsL* of *Bacillus subtilis* by mutagenesis and heterologous complementation. **J. Bacteriol.**, v.182, p.5572-5579.
- Sievers, J. e Errington, J. (2000b). The *Bacillus subtilis* cell division protein FtsL localizes to sites of septation and interacts with DivIC. **Mol. Microbiol.**, v.36, p.846-855.
- Sinha, N. e Haimes, M. (1981). Molecular mechanisms of substitution mutagenesis. An experimental test of the Watson-Crick and topal-fresco models of base mispairings. **J. Biol. Chem.**, v.256, p.10671-10683.

Sossong, T.M., Bringham-Burke, M.R., Hensley, P. e Pearce, K.H. (1999). Self-Activation of Guanosine Triphosphatase Activity by Oligomerization of the Bacterial Cell Division Protein FtsZ. **Biochemistry**, v.38, n.45, p.14843–14850.

Stricker, J. e Erickson, H.P. (2003). *In Vivo* Characterization of Escherichia coli ftsZ Mutants: Effects on Z-Ring Structure and Function. **J. of Bacteriol.**, v.185, p.4796-4805.

Stricker, J., Maddox, P., Salmon, E.D., e Erickson, H.P. (2002). Rapid assembly dynamics of the *Escherichia coli* FtsZ-ring demonstrated by fluorescence recovery after photobleaching. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v.99, p.3171-3175.

Sun, Q., e Margolin, W. (1998). FtsZ dynamics during the division cycle of live *Escherichia coli* cells. **J. Bacteriol.**, v.180, p.2050-2056

Szeto, T., Rowland, S., Rothfield, L. e King, G. (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.**, v.99, n.24, p.15693–15698.

Tindall, K. e Kunkel, T. (1988). Fidelity of DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. **Biochemistry**, v.27, p.6008–6013.

Vaughan, S., Wickstead, B., Gull, K., e 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.

Vicente, M. e Rico, A.I. (2006). The order of the ring: assembly of Escherichia coli cell division components. **Mol Microbiol.**, v.61, n.1, p.5-8.

Wang, X., Huang, J., Mukherjee, A., Cao, C., e Lutkenhaus, J. (1997). Analysis of the interaction of FtsZ with itself, GTP, and FtsA. **J. Bacteriol.**, v.179, p.5551-5559.

Woldringh, C.L., Mulder, E., Huls, P.G., and Vischer, N. (1991). Toporegulation of bacterial division according to the nucleoid occlusion model. **Res. Microbiol.** 142, 309-320.

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

Youngman, P.J., Perkins, J.B., and Losick, R. 1983. Genetic transposition and insertional mutagenesis in *Bacillus subtilis* with *Streptococcus faecalis* transposon *Tn917*. **Proc.Natl. Acad. Sci.**, v.80, p.2305–2309.

Zoete, V., Grosdidier, A. e Michielin, O. (2009). Docking, virtual high throughput screening and in silico fragment-based drug design. **J Cell Mol Med.**, E-pub ahead of print.