UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas
(Bioquímica)

THEOPI ALEXANDRA VARVAKIS RADOS

Aplicação de Microscopia de Série Temporal para o Estudo da
Expressão Gênica e Montagem do Divisomo em *Bacillus subtilis*

Versão Original da Dissertação Defendida

São Paulo
2013

Data de depósito da dissertação:
01/03/2013

THEOPI ALEXANDRA VARVAKIS RADOS

Aplicação de Microscopia de Série Temporal para o
Estudo da Expressão Gênica e Montagem do Divisomo 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
2013

Para minha avó Theopi Varvakis, minha maior inspiração.

AGRADECIMENTOS

A todos os que me acompanharam durante o Mestrado.

Ao meu pai, pelo apoio incondicional.

Ao Fredy, pela paciência, apoio e orientação.

À Vanda, pelo puxão que faltava.

Aos membros e ex-membros do laboratório: JR, Gui, Felipe, Valdir, Max, Bisson, Rodrigo, Camila, Valquíria, Ivi e Luci.

Aos amigos do IQ, por todo o apoio e carinho: Marcela, Bisson, Rods, Val, Max e Camis.

Aos amigos de fora: Ygor, Doug, Toty, Marília, Prof. Márcia, Nelson, Hélio, Renie e Carol Mancini.

Ao Pedro e à Sarah, por compartilharem a vida comigo.

Ao Uras e à Lullis, pelo carinho ao acolherem uma sem-teto.

Às amigas-irmãs Lê e Paula, por serem quem são.

À minha família, especialmente à Tia Lili e ao Tio Selig, por todo o apoio e compreensão.

Aos meus irmãos Cauê, Sofia e Marina – e ao Ned – por existirem (e, com isso, tornarem o mundo um lugar melhor).

Ao pessoal da secretaria de pós-graduação, Maria Luiza T. Carmo da Biblioteca das Químicas e ao pessoal do TI do IQ, por toda ajuda.

Aos laboratórios dos professores Carla, Chuck, Marilis e Regina.

Ao CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro.

“The dream of every cell is to become two cells”
(François Jacob, 1971)

RESUMO

Rados, TAV. **Aplicação de Microscopia de Série Temporal para o Estudo da Expressão Gênica e Montagem do Divisomo em *Bacillus subtilis***. (2013). 103p. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A divisão celular nas bactérias requer a formação do divisomo, um complexo protéico que tem como a primeira etapa a polimerização da proteína FtsZ, seguida pela associação de 15 outras proteínas conhecidas. Os mecanismos envolvidos na regulação espacial do divisomo são bem caracterizados, mas o controle temporal da divisão celular em relação a outros eventos do ciclo, como a replicação do cromossomo, segue controversa. Neste trabalho, aplicamos a metodologia de microscopia de série temporal para estudar duas questões fundamentais do processo de divisão: a montagem do complexo que executa a divisão e a possibilidade da oscilação periódica na expressão de um ou mais genes envolvidos em divisão possa participar do controle temporal da montagem do divisomo. Para investigar se há oscilação da expressão gênica, construímos inicialmente variantes instáveis GFP através da adição de sequências peptídicas C-terminais que encaminham para a degradação em *B. subtilis* e utilizamos estes repórteres para criar fusões transcricionais sob o controle de promotores de genes centrais do processo de divisão. Depois de otimizar as condições de microscopia de série temporal com fusões transcricionais usando a variante instável GFP-AISV, observamos que a autofluorescência de *B. subtilis* interferia nas nossas quantificações. Como forma de contornar a autofluorescência, construímos então fusões transcricionais com duas variantes de YFP (proteína fluorescente amarela) e optamos por trabalhar com Ypet-AISV. A análise de filmes de células individuais, tanto com fusões a GFP-AISV como a Ypet-AISV, indicou que apenas o promotor do *operon ftsL-pbpB* apresentava um padrão de oscilação significativamente diferente de um promotor artificial usado como controle negativo. Esta hipótese, no entanto, não foi confirmada por medidas estáticas de populações de células nas quais correlacionamos intensidade de fluorescência com posição no ciclo celular. Portanto, nossos dados não foram capazes de evidenciar flutuações na expressão dos genes *ftsL-pbpB*, *minCD*, *ftsZ*, *ftsA* e *zapA* ao longo do ciclo celular. Para estudar a cinética de montagem do divisomo foram realizados experimentos de microscopia de série temporal de FtsZ-mCherry e Pbp2B-GFP, onde

observamos que a associação de Pbp2B ao divisomo ocorre 3 minutos após a formação do anel de FtsZ em meio rico e 4 minutos em meio mínimo. Também realizamos experimentos de microscopia de série temporal com uma cepa contendo FtsZ-YFP e DivIVA-CFP, determinando que DivIVA é incorporado ao divisomo 16 minutos após a formação do anel de FtsZ em meio rico e 20 minutos em meio mínimo. Estes dados confirmam que a montagem do divisomo ocorre em três etapas, e não duas, como anteriormente proposto.

Palavras-chave: *Bacillus subtilis*, Divisão celular, GFP, Expressão gênica, Time-lapse, Divisomo

ABSTRACT

Rados, TAV. **Applications of Time-lapse Microscopy to Study Gene Expression Throughout Cell Cycle and Divisome Assembly in *Bacillus subtilis***. 2013. 103p. Masters Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Cell division in bacteria requires the formation of the divisome, a protein complex that has as the first step polymerization of FtsZ, followed by the assembly of 15 other known proteins. The mechanisms that underlie spatial regulation of divisome assembly have been largely elucidated, but the temporal control that ties the timing of cell division to other cell cycle events, such as chromosomal replication, remains surrounded by controversy. In this work, we use time-lapse microscopy to address two issues in *B. subtilis* cell division: the timing of divisome assembly, and the possibility that a periodic oscillation in expression of one or more genes essential for divisome assembly may play a role in defining the timing of cell division. To study the possibility of oscillation in gene expression, we have first built unstable variants of GFP by adding to its C-terminus peptide sequences that target the protein for degradation and used those variants to build transcriptional fusions to access the promoter activity of core cell division genes. After optimizing time-lapse conditions with transcriptional fusions to cell division genes with the unstable GFP-AISV, we observed that *B. subtilis* autofluorescence was an issue to our quantifications. To improve our signal-to-noise ratio, we built transcriptional fusions with two variants of YFP (Yellow Fluorescent Protein), and decided to work with Ypet. In our single-cell analysis for GFP-AISV and for Ypet-AISV, only the *ftsL* operon promoter presented an oscillating pattern different from our negative control. This was not confirmed, however, when we attempted to correlate fluorescence signal with cell cycle position in static single-cell measurements. Thus, we conclude that there are no fluctuations in *ftsL*, *pbpB*, *minCD*, *ftsZ*, *ftsA* or *zapA* gene expression throughout the cell cycle. To study divisome assembly we performed time-lapse microscopy of FtsZ-mCherry and Pbp2B-GFP, and determined that the association of Pbp2B occurs 3 minutes after FtsZ polymerization in rich medium and 4 minutes in minimal medium. We also performed time-lapse microscopy with FtsZ-YFP and DivIVA-CFP, determining that DivIVA is incorporated to the divisome in 16 minutes after FtsZ polymerization in rich medium and 20 minutes in

minimal medium. This data confirms the assembly of the divisome in three steps rather than two, as previously proposed.

Keywords: *Bacillus subtilis*, Cell division, GFP, Gene expression, Time-lapse, Divisome

ABREVIATURAS

ATP	Adenosina Trifosfato
A.U.	Unidades Arbitrárias de Fluorescência
CFP	Proteína fluorescente Ciano
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxi-ribonucleotídeos
FP	Proteína Fluorescente
GFP	Proteína fluorescente verde
IPTG	Isopropil β -D-tiogalactopiranosídeo
Kb	Quilobase
LB	Meio Lisogênico
mCherry	Proteína Fluorescente Vermelha
OD	Densidade Óptica
ORF	<i>open reading frame</i>
OriC	Origem de Replicação
pb	Pares de Bases
PBS	Solução Salina Tamponada com Fosfato
PCR	Reação de Polimerase em Cadeia
RPM	Rotações por Minuto
TAE	Tampão contendo Tris, Acetato e EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tampão contendo Tris e EDTA
YFP	Proteína fluorescente Amarela

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1. A Divisão Celular em <i>Bacillus subtilis</i>.....	15
1.2. O Controle do Processo de Divisão.....	19
1.3. Estudos de Expressão Gênica.....	24
 2. OBJETIVOS.....	 26
 3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	 27
3.1. Cepas bacterianas, Meios e Condições de Crescimento.....	27
3.2. Métodos Gerais Utilizados na Construção das Cepas.....	27
3.2.1 Manipulação de DNA e Clonagens.....	27
3.2.1.1 Extração de DNA Plasmidial de <i>E. coli</i>	28
3.2.1.2 Purificação de DNA de Gel de Agarose.....	28
3.2.1.3 Amplificação de DNA por PCR.....	28
3.2.1.4 Testes de Restrição.....	28
3.2.1.5 Sequenciamento de Plasmídeos.....	28
3.2.1.6 Ligação de DNA.....	28
3.2.1.7 Transformação das Células Competentes de DH5 α	28
3.2.2 Transformação do DNA em <i>Bacillus subtilis</i>	29
3.3. Lista de Cepas, Oligonucleotídeos e Plasmídeos Utilizados.....	29
3.3.1 Plasmídeos.....	29
3.3.2 Oligonucleotídeos.....	30
3.3.3 Cepas.....	31
3.4. Construção das Cepas.....	33
3.5 Experimentos de Microscopia.....	35
3.5.1 Experimentos de Microscopia de Série Temporal (<i>time-lapse</i>).....	35
3.5.1.1. Cultura de células.....	35
3.5.1.2. Aquisição de imagens.....	36
3.5.2 Fotos estáticas.....	36
3.6. Análise dos Dados.....	37

3.6.1 Quantificações de Intensidade de Fluorescência em Microscopia de Série Temporal.....	37
3.6.2 Análise da Montagem do Divisomo.....	37
3.6.3 Medidas Semi-Automatizadas de Intensidade de Fluorescência em Fotos Estáticas.....	39
4. RESULTADOS.....	41
4.1. Estudo da Expressão Gênica de <i>operons</i> Relacionados à Divisão Bacteriana com o Uso de Fusões Transcrpcionais a GFP.....	41
4.1.1 Variantes Construídas de GFP e <i>operons</i> Estudados.....	41
4.1.2. Experimentos de Microscopia de Série Temporal das Fusões Transcrpcionais a GFP AISV.....	45
4.1.2.1 Operon <i>ftsL-pbpB</i>	45
4.2.2.1 Operon <i>minCD</i>	47
4.1.3 Experimentos de Microscopia de Série Temporal da Fusão do Promotor de <i>ftsL-pbpB</i> a GFP AISV em Plasmídeo Epissomal Multicópia.....	48
4.2. Estudo da Expressão Gênica de <i>operons</i> Relacionados à Divisão Bacteriana com o uso de Fusões Transcrpcionais a YFP.....	51
4.2.1 Escolha de YFP.....	51
4.2.2 Variantes de YFP e <i>operons</i> estudados.....	52
4.2.3 Experimentos de Microscopia de Série Temporal das Fusões a Ypet-AISV.....	55
4.2.3.1 Operon <i>ftsL-pbpB</i>	55
4.2.3.2 Controles.....	58
4.2.3.2.1 Promotor indutível P _{spank}	58
4.2.3.2.2 PY79.....	60
4.2.3.2.3 Operon <i>dnaAN</i>	62
4.3. Quantificação da Intensidade de Fluorescência de Células em Diferentes Estágios do Ciclo Celular.....	64
4.4. Estudo da Cinética de Montagem do Divisomo.....	68
4.4.1 FtsL.....	69
4.4.2 Pbp2B.....	69
4.2.3 DivIVA.....	74
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	78

5.1. Análise de Expressão Gênica com o Uso de Microscopia de Série Temporal...	78
5.2. Análise da Expressão dos Genes Envolvidos em Divisão ao Longo do Ciclo Celular de <i>B. subtilis</i>.....	80
5.3. Análise da Montagem do Divisomo.....	82
6. CONCLUSÕES.....	86
7. REFERÊNCIAS.....	87
8. APÊNDICES.....	95
9. LISTA DE ANEXOS.....	103

1. INTRODUÇÃO

1.1. A Divisão Celular em *Bacillus subtilis*

O típico ciclo celular em bactérias – que abrange a série de eventos que ocorrem do nascimento até a divisão subsequente – apresenta três fases distintas (Figura 1): período B, do nascimento até o início da replicação do DNA; o período C, quando ocorre a replicação do cromossomo; e o período D, onde acontece a divisão propriamente dita, ou citocinese.

Quando em meio rico, as células de algumas espécies (dentre elas *B. subtilis*) atingem taxas de crescimento que superam o tempo necessário para replicação e segregação do cromossomo, de modo que as células iniciam múltiplas rodadas de replicação simultaneamente (fenômeno denominado *multifork replication*), e o período B é inexistente (Cooper e Helmstetter, 1968).

No período C ocorre a replicação bidirecional do cromossomo circular bacteriano, iniciada na origem de replicação (*oriC*). A replicação do DNA é coordenada com o crescimento de modo que ao menos uma rodada de replicação seja terminada antes da divisão. A replicação é coordenada primariamente através da atividade da proteína DnaA, um proteína da família das ATPases AAA+. Além de se ligar à *oriC* e ser responsável pelo início da replicação, DnaA também é um fator de transcrição que controla tanto a sua própria expressão quanto a de diversos genes (Wang e Levin, 2009).

Figura 1. Ciclo celular bacteriano em crescimento lento (meio mínimo) O anel Z (assinalado em verde) forma-se no período D. O nucleóide está representado em vermelho e a origem de replicação (*oriC*) está representada pelos círculos laranjas.

O processo rápido de divisão está entre as maiores vantagens evolutivas das bactérias (Thanbichler & Shapiro, 2008). A divisão, que ocorre no período D, é uma das etapas mais importantes no ciclo celular, sendo através dela que – após a duplicação do material genético e um aumento no comprimento da célula – na maioria das espécies conhecidas uma única bactéria dá origem a duas células-filhas idênticas, geneticamente e morfologicamente (Angert, 2005).

O processo de divisão da maior parte das bactérias requer FtsZ, uma proteína globular de 40kDa capaz de ligar e hidrolisar GTP, bastante conservada em procariotos e encontrada também em algumas organelas eucarióticas, como mitocôndrias e cloroplastos (Miyagishima, 2003). Essa proteína, homóloga à tubulina eucariótica, se polimeriza formando uma estrutura conhecida como “anel Z” no exato local onde ocorrerá a divisão. O anel Z recruta as demais proteínas que formarão o divisomo, um complexo protéico formado na região medial da célula, responsável pela invaginação da membrana e parede, culminando com a formação do septo de divisão (Romberg e Levin, 2003; Errington *et al*, 2003). Dentre os componentes do divisomo representados na Figura 2, existem proteínas que interagem diretamente com FtsZ: FtsA é uma proteína semelhante à actina, responsável por estabilizar os polímeros de FtsZ e anexá-los à membrana através de uma alfa-hélice anfipática C-terminal (Pitchoff e Lutkenhaus, 2007); SepF é uma proteína recém-descoberta que provavelmente atua com FtsA para a estabilização do polímero de FtsZ (Hamoen *et al* 2006); ZapA é uma proteína não-essencial para a divisão, mas atua como modulador positivo da polimerização de FtsZ, estimulando sua polimerização *in vitro* e a estabilização do anel *in vivo* (Gueiros-Filho e Losick, 2002); e EzrA é uma proteína não essencial, modulador negativo da polimerização de FtsZ. EzrA se liga à membrana da célula e inibe a adição de novas moléculas de FtsZ ao polímero de FtsZ, sem a capacidade de desestabilizá-lo quando já formado (Haeusser *et al*, 2007).

Além das proteínas citadas, há as que compõem o divisomo que não se ligam diretamente a FtsZ. Estas proteínas, também conhecidas como tardias (Meira, 2010; Gamba *et al.*, 2009), se dividem em três principais grupos – as que sintetizam o peptídeoglicano do septo, as que conectam as proteínas sintetizadoras de peptídeoglicano àquelas iniciais do divisomo e as proteínas que permanecem no novo pólo após o término da divisão.

Figura 2. Representação esquemática das proteínas conhecidas que formam o divisomo. Figura adaptada de Meira (2010).

A síntese do peptídeoglicano é realizada pelas proteínas Pbp1, Pbp2B e FtsW. FtsW tem 10 domínios transmembrana e funciona como um transportador de precursores de peptideoglicano para a síntese de parede (Mohammadi et al 2011). Já as PBPs (*penicilin-binding proteins*) possivelmente tem funções redundantes na síntese da parede (Gueiros-Filho, 2011), sendo parte da “fábrica de peptideoglicano” do septo - Pbp1, com atividade de transglicosilase e transpeptidase e Pbp2B, transpeptidase com evidências de interação com o trímero DivIB-DivIC-FtsL (Gueiros-Filho, 2011). As proteínas responsáveis por conectar o divisomo à “fábrica de peptideoglicano” incluem DivIB, proteína de membrana monotópica com uma região C-terminal extracitoplasmática e uma pequena região N-terminal citoplasmática, que provavelmente forma um complexo com DivIC e FtsL (proteínas de membrana com topologia semelhante a de DivIB, ou seja, com domínios maiores extracitoplasmáticos), são necessárias para a localização de Pbp2B no septo (Daniel e Errington, 2000).

Após o término da divisão, as proteínas MinC, MinD, DivIVA e YpsB permanecem no novo pólo. Enquanto sugere-se que a última tenha ação modulando a atividade de Pbp1 durante a síntese de parede no septo (Tavares et al, 2008; Claessen et al., 2008), as três primeiras fazem parte do sistema de inibição da formação do anel Z nos pólos da nova célula, que será abordado na Seção 1.2.

A montagem do divisomo é realizada em etapas em diversos modelos bacterianos. Em *Escherichia coli*, através de estudos de co-localização com imunofluorescência de células em *steady state*, Aarsman et al (2005) caracterizaram duas etapas de montagem do divisomo: na primeira, são visualizadas as proteínas que não dependem de FtsQ para a associação ao complexo; na segunda, depois de um intervalo de 14 a 21 minutos, FtsQ e as demais proteínas responsáveis pela síntese de peptideoglicano são visualizadas no septo. Em *Caulobacter crescentus* Goley et al (2011) observaram, através de microscopia de co-localização com proteínas do divisomo fusionadas a proteínas fluorescentes, sete etapas de formação do divisomo: a primeira com a formação do anel Z; a segunda, com a associação das proteínas que se ligam diretamente a FtsZ; a terceira, de incorporação de proteínas envolvidas na síntese de peptideoglicano; a quarta, com a associação de FtsA ao complexo; a quinta, onde há a associação de FtsQ, FtsK, FtsI, FtsL e FtsN ao divisomo; a sexta, quando inicia a invaginação do envelope bacteriano; e a sétima, com a incorporação de proteínas marcadoras de pólo em *C. crescentus*.

Em *B. subtilis*, Gamba et al (2009) sugerem através de estudos realizados com populações de células sincronizadas em fase logarítmica ou *time-lapse* de células em processo de germinação que o divisomo é formado em duas etapas: a primeira consiste na associação das proteínas ligadas diretamente a FtsZ e, depois de progressão de 20% do ciclo celular, um segundo grupo de proteínas - incluindo YpsB, FtsL, DivIB, FtsW, Pbp2B e DivIVA - é recrutado para o complexo. O trabalho de Meira (2010), com estudos de co-localização de proteínas do divisomo fusionadas a proteínas fluorescentes em uma população não-sincronizada, propõe a existência de três etapas na formação do divisomo: na primeira, imediatamente após ou concomitantemente com a formação do anel Z, proteínas que interagem diretamente com FtsZ (ZapA e EzrA), denominadas “iniciais”, associam-se ao divisomo. Na segunda etapa, associam-se as proteínas chamadas “intermediárias”, componentes da “fábrica de peptideoglicano” (FtsZ, FtsW e Pbp2B). Por último, na terceira etapa, as proteínas denominadas “tardias” (YpsB, MinC e DivIVA) associam-se ao divisomo.

1.2. O Controle do Processo de Divisão

A exatidão com que os processos do ciclo celular são controlados nas bactérias pode ser confirmada quando se considera a eficiência e velocidade com que estas células se reproduzem - sendo raro encontrar em uma população células sem DNA ou com mais de um nucleóide, ou de massa muito maior ou menor que as demais (Dewara e Dorazia, 2000). Para uma divisão bem-sucedida são cruciais o posicionamento correto do divisomo e sua formação no tempo exato, que dependem da precisão na localização e do momento da formação do anel Z. Há dois principais mecanismos elucidados para o controle de localização do anel Z: o sistema Min é responsável por impedir a formação do anel Z nos pólos da bactéria – que acarretaria numa divisão falha, formando minicélulas sem material genético (Levin et al, 1992). Formado pelas proteínas MinC, MinD e DivIVA, é o mecanismo de controle da polimerização de FtsZ melhor caracterizado (Howard, 2004). MinC interage diretamente com FtsZ (Hu e Lutkenhaus 1999), inibindo a formação do anel, enquanto MinD e DivIVA concentram essa atividade inibitória na membrana dos pólos da célula, onde se quer evitar que a célula se divida.

Com inibição do anel Z nos pólos, resta a região medial da célula para sua formação – mas isso não restringe a polimerização de FtsZ para o exato meio da célula como de fato ocorre, ou impede que o anel se forme sobre o nucleóide recém-replicado. Para tanto, existe o sistema de “oclusão do nucleóide”, um mecanismo de prevenção da formação do divisomo sobre o DNA da célula, evitando o guilhotinamento do nucleóide pelo septo. Este sistema tem em *B. subtilis* como principal efetor a proteína Noc (Wu e Errington, 2004), uma proteína da família ParB que se liga a sítios específicos no DNA e inibe a polimerização de FtsZ – função semelhante à desempenhada em *E. coli* por SmlA (Bernhardt e de Boer, 2005).

Juntos, o sistema de oclusão do nucleóide e o sistema MinCD formam um mecanismo eficiente de posicionamento, deixando apenas a parte medial da bactéria livre para que o anel Z se forme. Deste modo, em *B. subtilis* o sítio de divisão é posicionado exatamente no centro da célula, com um desvio de apenas 6,7% (Migocki et al 2002). Embora muitos dos mecanismos de controle espacial de formação do anel Z tenham sido elucidados ao longo dos últimos anos, o controle temporal de formação do anel apresenta diversos pontos em aberto.

É possível que o tempo correto para a divisão seja determinado pelos mesmos sistemas da regulação espacial da formação do anel Z. Neste caso, os sistemas inibitórios MinCD e de oclusão do nucleóide agiriam impedindo a polimerização de FtsZ em todas as regiões da célula ao longo de todo o ciclo celular até que, somente no período D, após a segregação do material genético, fosse possível a formação do anel Z e a divisão (Fig 3). Outra possibilidade, explorada neste trabalho, é que uma ou mais das proteínas essenciais que compõe o divisomo esteja disponível somente no momento da divisão. Neste caso, a proteína em questão teria um pico de síntese momentos antes da divisão e a baixa concentração da mesma ao longo do restante do ciclo impediria a divisão em qualquer outro momento além do período D (Fig 4).

Figura 3. Modelo de controle do tempo da divisão pelos sistemas de localização do anel. Durante os períodos B e C (representados em A e B), o sistema MinCD (em laranja) inibe a divisão nos polos da célula e o sistema de oclusão do nucleóide (sobre o DNA, representado em vermelho) impede a formação do anel no comprimento da célula. No período D (representado em C), após a segregação do nucleóide, uma região livre é formada no meio da célula, o que permite a formação do anel e a divisão.

Figura 4. Modelo do processo de divisão em que uma proteína específica (círculos amarelos) é limitante para a contração do divisomo. Essa proteína seria produzida momentos antes da divisão, participaria do processo de divisão e em seguida seria degradada, de modo que sua concentração nas células filhas não seria suficiente para que a divisão ocorra novamente até o próximo período D.

Em eucariotos o ciclo celular tem como padrão variações na expressão gênica. Existem diversos genes, bastante conservados entre espécies, cuja expressão oscila ao longo do ciclo (Bähler, 2005). Em *Saccharomyces cerevisiae*, o ciclo é coordenado através de três ondas de expressão gênica, a primeira no início da replicação do DNA (transição G1/S); a segunda no início da mitose (transição G2/M); e a terceira no término da mitose (transição M/G1) - com cerca de 800 genes mudando a expressão ao longo do ciclo celular (Spellman et al, 1998).

Cerca de 19% de todos os genes de *C. crescentus* são regulados transcricionalmente ao longo do ciclo celular (Laub et al, 2000) – dentre estes, genes envolvidos em divisão. CtrA, um dos principais reguladores do ciclo celular de *C. crescentus*, está presente na forma móvel da bactéria, que é incapaz de se dividir até se diferenciar na célula-talo. Além de se ligar à *oriC*, impedindo o início de uma nova rodada de replicação, CtrA inibe a expressão de *ftsZ* (Wortinger et al, 2000). No trabalho de Goley et al (2011) foi analisada a transcrição de 19 genes envolvidos em divisão, 10 dos quais apresentaram variação relevante a longo do ciclo celular (Fig 5).

Figura 5. Taxas de transcrição de diferentes genes que codificam para proteínas de divisão em *C. crescentus* ao longo do ciclo celular. Azul representa a taxa basal de transcrição. Figura adaptada de Goley et al (2011).

Sendo uma maneira comum de controle de processos do ciclo celular em bactérias, a variação na expressão gênica de proteínas de divisão é uma maneira

possível de regulação para que uma ou mais proteínas essenciais para a montagem do divisomo em *B. subtilis* esteja disponível apenas no período D.

Embora em *C. crescentus* a oscilação de proteínas de divisão seja bem documentada (Kelly et al 1998; Goley et al, 2011; Wortinger et al, 2000), as evidências sobre a variação na expressão destas proteínas ao longo do ciclo celular de outras bactérias ainda são controversas. Alguns estudos apontaram variações na transcrição de *ftsZ* em *E. coli* ao longo do ciclo celular: Garrido et al (1993) observaram um pico transcricional imediatamente após a replicação do DNA, enquanto Zhou e Helmstetter (1994) observaram o mesmo pico na metade do ciclo celular e um período de menor transcrição no momento da divisão. No entanto, outros estudos apontam o contrário: Arends e Weiss (2003) relatam não terem encontrado nenhuma flutuação transcricional de proteínas de divisão ao bloquear a divisão celular e quantificar RNAm, e Rueda et al (2003) observaram falta de periodicidade na concentração de FtsZ concluindo que esse provavelmente não é um mecanismo de regulação utilizado.

O trabalho de Weart e Levin (2003) em *B. subtilis* aponta que a expressão de *ftsZ* apenas através de um promotor constitutivo (eliminando qualquer possível controle transcricional no *operon*) ou a superexpressão do gene não alteram o tempo de formação do anel Z ou o crescimento da célula. No mesmo trabalho, quando as concentrações de FtsZ foram analisadas em células em diferentes condições de crescimento (de um ciclo rápido a um ciclo lento), os autores observam que a concentração de FtsZ permanece estável independentemente da taxa de crescimento da célula. Dentre as proteínas que compõe o divisomo em *B. subtilis*, evidências apontam que uma forte candidata para regular o tempo de divisão da maneira demonstrada na Fig 4 seria FtsL, uma proteína de 12kDa cujo gene faz parte do *operon* que também codifica para a proteína Pbp2B (Daniel et al 1996). Este *operon* possui um promotor com uma região para a ligação de DnaA, proteína responsável por iniciar a replicação do material genético em virtualmente todas as bactérias e um dos principais pontos de regulação do ciclo celular (Goranov et al 2005). FtsL é uma proteína bastante instável (Daniel et al, 1998) e sua super-expressão não apresenta fenótipo, embora com a deleção de RasP – protease responsável por clivar FtsL – Bramkamp et al (2006) observaram células menores, indicando que a instabilidade desta proteína pode desempenhar um papel importante na regulação temporal da formação ou contração do divisomo.

1.3. Estudos de Expressão Gênica

O modo tradicional de estudo da expressão gênica ao longo do ciclo celular faz uso da média da variação da expressão dos genes em uma população de células. Tendo sido largamente utilizados (Wheelan et al, 2008; Gygi et al, 2000) ao longo dos anos para a detecção de diversos processos de expressão gênica em células eucarióticas e bacterianas, estes estudos envolvem a sincronização de uma população de células e a quantificação da proteína ou do RNA mensageiro de interesse em cada momento do ciclo.

A sincronização em células bacterianas já foi documentada com o uso da *Baby Machine* em *E. coli* (Bates et al 2005), da separação por gradiente com centrifugação em *C. crescentus* (Shapiro et al, 1971) e germinação de esporos em *B. subtilis*. A germinação de esporos, segundo Donnellan et al (1964), garante a sincronia durante uma divisão subsequente à germinação. No protocolo descrito por Banfalvi (2011), as células germinadas permanecem em sincronia pelas duas divisões seguintes. Embora esta sincronia exista para esporos que germinam simultaneamente, devido a variações estocásticas numa população de células existe certa heterogeneidade no processo de germinação, e foram documentados vários minutos de diferença na germinação de esporos individuais de *B. subtilis* (Daniels, et al 2006; Setlow, 2003). Este fenômeno foi observado também para outras espécies de *Bacillus*: *B. cereus* (Vary e Halvorson, 1965; Hashimoto et al., 1969) e *B. anthracis* (Zaman et al 2005).

Os estudos de expressão gênica utilizando a média de uma população de células podem ter sua precisão afetada por “ruído” (*noise*) – variação na expressão gênica em células individuais e supostamente idênticas de populações isogênicas, independentemente da fonte (Raser e O’Shea, 2005): Ozbudak et al (2002) demonstraram a variação estocástica da expressão de GFP em uma população isogênica de *B. subtilis*, utilizando *gfp* sob controle de um promotor constitutivo (P_{spac}) (Fig 6), demonstrando que a média na intensidade de fluorescência não contempla a variação entre os indivíduos. Essa variação estocástica é ainda maior para genes pouco expressos (Elowitz et al, 2000), como é o caso dos genes que codificam para proteínas envolvidas na divisão (Taniguchi et al, 2010).

Figura 6. Média *versus* valores individuais em uma população. A média $\langle p \rangle$ na intensidade de fluorescência de um promotor constitutivo expressando GFP em uma população de células isogênicas mascara a variação na intensidade de fluorescência das células individuais (adaptada de Ozbudak et al, 2002).

Uma alternativa aos métodos de medida de expressão gênica utilizando a média de uma população são métodos envolvendo microscopia de fluorescência quantitativa e proteínas fluorescentes como repórteres, como utilizado por Di Talia et al (2007) e Sigal et al (2006). Estes métodos podem ser aplicados para analisar a flutuação da expressão de um gene de interesse em uma célula individual ao longo do seu ciclo, utilizando microscopia de série temporal – capturando imagens de uma mesma célula ao longo de sucessivas divisões.

Identificadas através de microscopia, variações na intensidade de fluorescência podem indicar a dinâmica da expressão de certos genes de divisão ao longo do ciclo celular – e flutuações cíclicas seriam indicativas de controle temporal da divisão através da expressão gênica. Estes métodos, menos sujeitos à interferência do ruído ou interferência da variabilidade célula-célula, uma vez que permitem sua identificação e remoção por métodos estatísticos (Longo e Hasty, 2006), foram utilizados neste trabalho como alternativas para o estudo da expressão de *ftsL* e outros genes codificantes de proteínas componentes e moduladores da formação do divisomo (sistema MinCD, ZapA, FtsA e FtsZ) ao longo do ciclo celular em *B. subtilis*.

2. OBJETIVOS

2.1. Padronização da técnica de análise da expressão gênica por microscopia de fluorescência em células individuais de *B. subtilis*;

2.2. Estudo da expressão gênica de *ftsL* e outros genes envolvidos em divisão de *B. subtilis*

2.3. Estudo da cinética de montagem do divisomo em *B. subtilis*

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Cepas bacterianas, meios e condições de crescimento

As cepas de *B. subtilis* usadas são derivadas da cepa selvagem PY79 anteriormente descrita (Youngman et al., 1983). Para as clonagens, foi utilizada a cepa comercial DH5 α de *E. coli*. Antibióticos, quando necessários, foram utilizados nas seguintes concentrações: espectinomicina, 100 μ g/mL; ampicilina, 100 μ g/mL; cloranfenicol 5 μ g/mL. As bactérias foram cultivadas em placas de LB (1% Triptona; 0,5% Extrato de Levedura; 1% Cloreto de Sódio; 2% Ágar), e meio líquido rico (CH: 1% Hidrolisado de Caseína; 0,47% Ácido L-Glutâmico; 0,16% L-Asparagina; 0,12% L-Alanina; 0,22mg/ml Sulfato de Sódio; 0,2mg/ml Nitrato de Amônio; 25mg/L Cloreto de Cálcio; 50mg/L Sulfato de Magnésio; 15mg/L Sulfato de Magnésio (II); 20 μ g/ml L-Triptofano; 1 μ g/ml Cloreto de Ferro (III); 1mM Fosfato Monopotássico; 25 mM Cloreto de Amônio; pH 7,0) e mínimo (TSS: Cloreto de Amônio 2mg/mL; Fosfato de Potássio Dibásico 0,46mg/mL; Tris Base 6mg/mL; Glicose 50% 10 μ L/mL; Sulfato de Magnésio 1,2% 10 μ L/mL; Cloreto de Ferro (III) 0,4% 10 μ L/mL; pH 7,5), a 37°C com agitação constante. IPTG e xilose foram usados como indutores quando necessário, nas quantidades indicadas em cada experimento.

3.2. Métodos gerais utilizados na construção das cepas

3.2.1 Manipulação de DNA e Clonagens

3.2.1.1 Extração de DNA Plasmidial de *E. coli*

Os plasmídeos foram extraídos com os kits *QIAprep Spin Miniprep Kit* ou *QIAprep Spin Midiprep Kit* (QIAGEN), conforme instruções do fabricante.

3.2.1.2 Purificação de DNA de Gel de Agarose

Os fragmentos de DNA obtidos por PCR ou clivagens com enzimas de restrição foram removidos do gel de agarose utilizando o *Qiaquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN) conforme instruções do fabricante.

3.2.1.3 Amplificação de DNA por PCR

As reações de PCR utilizaram os oligonucleotídeos listados na Tabela 2, além de 100ng de DNA plasmidial ou 50ng de DNA genômico de *B. subtilis*. Foram utilizados 2mM MgCl₂, 10μL de Taq Buffer (*Fermentas*), 0,25mM de dNTPs (desoxi-ribonucleotídeos), 0,4μM de oligonucleotídeos e 1,25U de Taq DNA polimerase em reações de volume final de 100μL. Os ciclos consistiram em uma desnaturação inicial a 93°C por quatro minutos seguida de 35 ciclos de desnaturação a 93°C por 1 minuto, anelamento a 50°C por 1 minuto; extensão a 72°C por 4 minutos e extensão final a 72°C por 7 minutos. O produtos obtidos destas reações foram purificados com o *Qiaquick PCR Purification Kit* conforme instruções do fabricante.

3.2.1.4 Testes de Restrição

Os plasmídeos extraídos de *E. coli* foram clivados com diversas enzimas de restrição e submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% a 70V para confirmação da clonagem.

3.2.1.5 Sequenciamento de Plasmídeos

Os DNAs plasmidiais foram sequenciados utilizando o kit *Big Dye Terminator (Applied Biosystems)* segundo recomendações do fabricante. Foram utilizados 2,5 pmol de oligonucleotídeos e 100ng de vetor como molde. A reação se inicia com uma desnaturação a 96°C por 2 minutos, e é seguida por trinta ciclos de desnaturação a 96°C por 45 segundos, anelamento a 50°C por 30 segundos e extensão a 60°C por 4 minutos. Após a amplificação, as amostras foram precipitadas com etanol 100%, 0,2mg/mL de glicogênio e acetato de sódio 3,5 mM.

3.2.1.6 Ligação de DNA

As reações de ligação foram realizadas com 100ng de vetor, com uma razão molar de inserto/vetor de três para um, 1μL de T4 Ligase (*Fermentas*), 10μL de T4 Ligase Buffer, num total de 50μL de reação, em 10h a temperatura ambiente.

3.2.1.7 Transformação das Células Competentes de DH5α

As transformações em *E. coli* foram realizadas através do *TransformAID Bacterial Transformation Kit (Fermentas)* com 100ng de vetor ou eletroporação a 1V com 50ng de vetor (as células para eletroporação foram crescidas até DO₆₀₀ 0,4 em meio 5g/L triptona e 2,5g/L de extrato de levedura, foram realizadas 3 lavagens com água

deionizada a 4°C, 1 lavagem em Glicerol 50% a 4°C, e a cultura foi ressuspensa em glicerol 50% e estocada a -80°C até o uso).

3.2.2 Transformação do DNA em *Bacillus subtilis*

Para a preparação das células competentes, uma colônia de *B. subtilis* foi inoculada em meio LB, incubada a 37°C por 12h e em seguida centrifugada por 2 minutos a 2000g. A cultura foi então ressuspensa em meio GCHE (glicose 1%; glutamato de potássio 0,2%; tampão fosfato pH 7, 100 mM; citrato trisódio, 3 mM; MgSO₄, 3 mM; citrato férrico de amônia, 22 mg por litro; L-triptofano, 50 mg por litro; caseína hidrolisada, 0,1%) e incubada até atingir o crescimento exponencial. Em seguida as células foram diluídas no mesmo volume de meio GE (glicose 1%; glutamato de potássio 0,2%; tampão fosfato pH 7, 100 mM; citrato trisódio, 3 mM; MgSO₄, 3 mM; citrato férrico de amônia, 22 g por litro; L-triptofano, 50 mg por litro) e novamente incubadas a 37°C, com agitação, por mais 1h. Para a transformação, 1µg de DNA foi adicionado a 500µL de células competentes e as células foram incubadas a 37°C por 30min. Em seguida, as células foram semeadas na placa com o antibiótico para selecionar as transformantes.

3.3. Lista de Cepas, Oligonucleotídeos e Plasmídeos Utilizados

3.3.1 Plasmídeos

Tabela 1. Plasmídeos utilizados neste estudo.

Plamídeo	Contém
pKG858	<i>gfp</i>
pJL74	amp, spec
pGET01	terminador
pGET2	<i>gfp</i> , terminador
pGET3	<i>gfpAISV</i> , terminador
pGET4	<i>gfpALAA</i> , terminador
pGET2.2	500pb <i>ftsZ</i> , <i>gfpAISV</i> , terminador
pGET3.2	500pb <i>ftsZ</i> , <i>gfpALAA</i> , terminador
pGET2.1	648pb <i>pbpB</i> , <i>gfp</i> , terminador
pGET3.1	648pb <i>pbpB</i> , <i>gfpAISV</i> , terminador

PGET4.1	648pb <i>pbpB</i> , <i>gfpALAA</i> , terminador
pGET2.3	545pb <i>minD</i> , <i>gfp</i> , terminador
pGET3.3	545pb <i>minD</i> , <i>gfpAISV</i> , terminador
pGET4.3	545pb <i>minD</i> , <i>gfpALAA</i> , terminador
pGET2.4	450pb <i>yshB</i> , <i>gfp</i> , terminador
pGET3.4	450pb <i>yshB</i> , <i>gfpAISV</i> , terminador
pGET4.4	450pb <i>yshB</i> , <i>gfpALAA</i> , terminador
pHCM	erm, amp
pHCM GFP	<i>gfpAISV</i>
pTheo	PftsL- <i>gfpAISV</i>
pGET5	<i>yfpVenusAISV</i> , terminador
pGET5.1	530pb <i>dnaN</i> , <i>yfpVenusAISV</i> , terminador
pGET5.5	500pb <i>pbpb</i> , <i>yfpVenusAISV</i> , terminador
pGET6	<i>ypetAISV</i> , terminador
pGET6.1	530pb <i>dnaN</i> , <i>ypetAISV</i> , terminador
pGET6.5	500pb <i>pbpb</i> , <i>ypetAISV</i> , terminador
pDR110	amp, spec
pDRT1	Pspac- <i>ypet</i>

3.3.2 Oligonucleotídeos

Tabela 2. Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho.

Nome	Sequência
FG295	TTAAGCTTGTGACGGGAAAAGGTGGTGAACACTACT
FG318	CGCCTCGAGGCTTTTTCGAAACTGGCG
FG319	AAAAAGCTTTTAATCAGGATTTTAAACTTAACCT
FG320	AATTCGCAGCCCGCCTAATGAGCGGGCTTTTTTCTGCA
FG321	GAAAAAAGCCCGCTCATTAGGCGGGCTGCG
FG322	CCGGAATTCTTAAGCAGCAAGAGCTTTGTATAGTTCATCCATGCC
FG323	CCGGAATTCTTAAACAGAGATAGCTTTGTATAGTTCATCCATGCC
FG324	CCGGAATTCTTATTTGTATAGTTCATCCATGCC
FG340	AAGGGCCCGAACAAATTAACAAACATGGTCCAAGAGCTC
FG341	CCCTCGAGTGATTCTATCACATTAAGATCTTACTCCGA
FG342	AAGGGCCCGACCGATGCTTGAAGCATTCCGCGAAGCGGA

FG343	CCCTCGAGACATTAGCCGCGTTTATTACGGTTTCTTAAGA
FG344	AAGGGCCCTGCAGTGCTGACAGCGGTAAATGTGGTG
FG345	CCCTCGAGGCCCGTACTGTGTCCACAGCTCTTGTAAG
FG365	CCCTCGAGGTGTATCGGATTAATAGGTTCTGAC
FG364	AAGGGCCCTGAATATCCGCACTTGCC
FG380	CAGGGCCCAAACATGATCTCTTGCCC
FG384	TTAAGCTTGGGAAAAGGTGGTGAAGTACTATGAGTAAAGGAGAAGAA
FG385	ACTCTAGAAAGACGCGATTGAGCG
FG420	GTCAAAGCTTCAGTCACTCGAGAAGGAGGTGAAACACTATGGATTCA ATAGAAAAGGTAAGCTCAAAAGGCGAAG
FG424	TATGCGGCCCGCACTTGTAAGTTCAT

3.3.3 Cepas

Tabela 3. Cepas bacterianas utilizadas neste trabalho.

Cepa	Espécie	Genótipo	Fonte
TV0	<i>E. coli</i>	pKG858	Griffith e Grossman, 2008
TV01	<i>E. coli</i>	pGET01	Este trabalho
TV02	<i>E. coli</i>	pGET2	Este trabalho
TV03	<i>E. coli</i>	pGET3	Este trabalho
TV04	<i>E. coli</i>	pGET4	Este trabalho
TV05	<i>E. coli</i>	pGET2.2	Este trabalho
TV06	<i>E. coli</i>	pGET3.2	Este trabalho
TV07	<i>E. coli</i>	pGET2.1	Este trabalho
TV08	<i>E. coli</i>	pGET3.1	Este trabalho
TV09	<i>E. coli</i>	PGET4.1	Este trabalho
TV10	<i>E. coli</i>	pGET2.3	Este trabalho
TV11	<i>E. coli</i>	pGET3.3	Este trabalho
TV12	<i>E. coli</i>	pGET4.3	Este trabalho
TV13	<i>E. coli</i>	pGET2.4	Este trabalho
TV14	<i>E. coli</i>	pGET3.4	Este trabalho
TV15	<i>E. coli</i>	pGET4.4	Este trabalho
TV16	<i>B. subtilis</i>	<i>ftsZ</i> Ω <i>ftsZ</i> GFP-AISV (<i>spec</i>)	Este trabalho
TV17	<i>B. subtilis</i>	<i>ftsZ</i> Ω <i>ftsZ</i> GFP-ALAA (<i>spec</i>)	Este trabalho

TV18	<i>B. subtilis</i>	<i>pbpB</i> Ω <i>pbpB</i> GFP (<i>spec</i>)	Este trabalho
TV19	<i>B. subtilis</i>	<i>pbpB</i> Ω <i>pbpB</i> GFP-AISV (<i>spec</i>)	Este trabalho
TV20	<i>B. subtilis</i>	<i>pbpB</i> Ω <i>pbpB</i> GFP-ALAA (<i>spec</i>)	Este trabalho
TV21	<i>B. subtilis</i>	<i>minD</i> Ω <i>minD</i> GFP (<i>spec</i>)	Este trabalho
TV22	<i>B. subtilis</i>	<i>minD</i> Ω <i>minD</i> GFP (<i>spec</i>)	Este trabalho
TV23	<i>B. subtilis</i>	<i>minD</i> Ω <i>minD</i> GFP (<i>spec</i>)	Este trabalho
TV24	<i>B. subtilis</i>	<i>yshB</i> Ω <i>yshB</i> GFP (<i>spec</i>)	Este trabalho
TV25	<i>B. subtilis</i>	<i>yshB</i> Ω <i>yshB</i> GFP-AISV (<i>spec</i>)	Este trabalho
TV26	<i>B. subtilis</i>	<i>yshB</i> Ω <i>yshB</i> GFP-ALAA (<i>spec</i>)	Este trabalho
TV27	<i>E. coli</i>	pHCM GFP	Este trabalho
TV28	<i>E. coli</i>	pTheo	Este trabalho
TV29	<i>B. subtilis</i>	pTheo	Este trabalho
TV30	<i>E. coli</i>	pGET5	Este trabalho
TV31	<i>E. coli</i>	pGET5.1	Este trabalho
TV32	<i>E. coli</i>	pGET5.5	Este trabalho
TV33	<i>B. subtilis</i>	<i>dnaN</i> Ω <i>dnaN</i> YFPVenus-AISV (<i>spec</i>)	Este trabalho
TV34	<i>B. subtilis</i>	<i>pbpB</i> Ω <i>pbpB</i> YFPVenus-AISV (<i>spec</i>)	Este trabalho
TV35	<i>E. coli</i>	pGET6	Este trabalho
TV36	<i>E. coli</i>	pGET6.1	Este trabalho
TV37	<i>E. coli</i>	pGET6.5	Este trabalho
TV38	<i>B. subtilis</i>	<i>dnaN</i> Ω <i>dnaN</i> Ypet-AISV (<i>spec</i>)	Este trabalho
TV39	<i>B. subtilis</i>	<i>pbpB</i> Ω <i>pbpB</i> Ypet-AISV (<i>spec</i>)	Este trabalho
TV40	<i>E. coli</i>	pDRT1	Este trabalho
TV41	<i>B. subtilis</i>	<i>amyE::Pspac-Ypet-AISV</i> (<i>cat</i>)	Este trabalho
FG1022	<i>B. subtilis</i>	<i>thrC::P_{spac}-ftsZ-mCherry</i> <i>amyE::Pxil-gfp-ftsL</i> (<i>erm</i>) (<i>spc</i>)	Meira, GLS (2010)
FG1032	<i>B. subtilis</i>	<i>amyE::Pspac-ftsZ-mCherry</i> <i>pbp2B::P_{xil}-gfp-pbp2B</i> (<i>cat</i>) (<i>spc</i>)	Meira, GLS (2010)
FG491	<i>B. subtilis</i>	<i>thrC::Pspac-ftsZ-YFP</i> (<i>erm</i>)	Coleção do Laboratório
FG1130	<i>B. subtilis</i>	<i>divIVA</i> Ω <i>divIVA-cfp</i> (<i>cat</i>)	David Rudner Lab
FG185	<i>E. coli</i>	pHCM	Coleção do Laboratório
FG1276	<i>B. subtilis</i>	<i>thrC::Pspac-ftsZ-YFP</i> <i>divIVA</i> Ω <i>divIVA-cfp</i> (<i>cat</i>) (<i>erm</i>)	Este trabalho
FG1137	<i>E. coli</i>	pBS7	David Rudner Lab
FG1155	<i>E. coli</i>	pDR110	Coleção do Laboratório

3.4. Construção das Cepas

TV01: Foram utilizados os oligonucleotídeos FG320 e FG321, submetidos a uma reação de anelamento (100nM/mL de cada oligonucleotídeo em tampão 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0,1M NaCl, 1mM EDTA; a reação foi aquecida até atingir 95°C e em seguida permaneceu à temperatura ambiente por 6h). Após o anelamento, o fragmento de DNA resultante possuía as extremidades correspondentes à clivagem com PstI e EcoRI. O vetor pJL74 foi clivado com as enzimas PstI e EcoRI e ligado ao terminador. O produto da reação foi transformado em *E. coli* e os recombinantes foram extraídos e selecionados por teste de restrição e confirmados por sequenciamento.

TV02, TV03 e TV04: O vetor pGET1 foi clivado com EcoRI e HindIII, e foram ligados os produtos de PCR GFP, GFP-AISV e GFP-ALAA já clivados com as mesmas enzimas. As três variantes GFP foram amplificadas do vetor KG858 (Griffith e Grossman, 2008), com GFP-AISV e GFP-ALAA construídas por PCR utilizando os oligonucleotídeos FG322 e FG323 (respectivamente), que contém uma região para o pareamento com gene *gfp* e outra com a sequência codificante para os aminoácidos da cauda instabilidade. Os genes que codificam para GFP e suas variantes foram amplificados de modo a conservar o sua sequência ATG e sítio RBS.

TV05 e TV06: Os vetores pGET3 e pGET4 foram clivados com ApaI e HindIII, e ligados ao inserto já clivado contendo os últimos 500pb do gene *ftsZ*, amplificado diretamente do genoma de PY79 com os oligonucleotídeos FG342 e FG343. Os vetores resultantes da clonagem foram denominados pGET3.2 e pGET3.2.

TV07, TV08 e TV09: Os vetores pGET2, pGET3 e pGET4 foram clivados com a enzima HindIII, e ligados ao inserto clivado com a mesma enzima, contendo os últimos 648pb do gene *pbpB*, amplificado diretamente do genoma de PY79 com os oligonucleotídeos FG318 e FG319. Os vetores resultantes da clonagem foram denominados pGET2.1, pGET3.1 e pGET4.1.

TV10, TV11 e TV12: Os vetores pGET2, pGET3 e pGET4 foram clivados com ApaI e HindIII, e ligados ao inserto já clivado contendo os últimos 545pb do gene *minD*, amplificado diretamente do genoma de PY79 com os oligonucleotídeos FG342 e FG343. Os vetores resultantes da clonagem foram denominados pGET2.3, pGET3.3 e pGET4.3.

TV13, TV14 e TV15: Os vetores pGET2, pGET3 e pGET4 foram clivados com ApaI e HindIII, e ligados ao inserto já clivado contendo os últimos 450pb do gene *yshB*,

amplificado diretamente do genoma de PY79 com os oligonucleotídeos FG340 e FG341. Os vetores resultantes da clonagem foram denominados pGET2.4, pGET3.4 e pGET4.4.

TV16, TV17, TV18, TV19, TV20, TV21, TV22, TV23, TV24, TV25, e TV26: Cada um dos vetores pGET3.2, pGET3.2, pGET2.1, pGET3.1, pGET4.1, pGET2.3, pGET3.3, pGET4.3, pGET2.4, pGET3.4 e pGET4.4 foi clivado com a enzima XhoI e em seguida ligado para formar multímeros. Estes multímeros foram então transformados em *Bacillus subtilis*, e os transformantes foram selecionados por resistência a espectinomicina.

TV30 e TV35: O vetor pGET1 foi clivado com EcoRI e HindIII, e produtos de PCR contendo *ypetAISV* (amplificado com os oligonucleotídeos FG420 e FG323 de pL452, que originou o plasmídeo pGET6), e *yfpVenusAISV* (amplificado com os oligonucleotídeos FG384 e FG323, do plasmídeo pBS7, que originou o plasmídeo pGET5) clivados com as mesmas enzimas foram ligados ao plasmídeo pGET. A cauda de instabilidade AISV foi inserida por PCR de maneira similar às cepas TV03 e TV04.

TV27, TV28 e TV29: O vetor pHCM foi clivado com HindIII e EcoRI, e ligado ao produto de PCR *gfpAISV* clivado com as mesmas enzimas, dando origem ao plasmídeo pHCM-GFP (cepa TV29). Este plasmídeo foi então clivado com XbaI e ApaI, e ligado ao promotor de do *operon ftsL-pbpB* amplificado diretamente do genoma de PY79 com os oligonucleotídeos FG385 e FG379, originando o plasmídeo pTheo (cepa TV28). O plasmídeo pTheo foi transformado em *B. subtilis* e os transformantes selecionados para resistência a eritromicina e lincomicina (cepa TV29).

TV31 e TV32: O vetor pGET5 foi clivado com ApaI e HindIII, e ligado aos produtos de PCR (clivados com as mesmas enzimas) contendo os últimos 530pb do gene *dnaN* (cepa 31) e os últimos 500pb do gene *pbpB* (cepa TV32), amplificados diretamente do genoma de PY79 com os oligonucleotídeos FG365 e FG364, e FG385 e FG319 (respectivamente).

TV36 e TV37: O vetor pGET6 foi clivado com ApaI e HindIII, e ligado aos produtos de PCR (clivados com as mesmas enzimas) contendo os últimos 530pb do gene *dnaN* (cepa 36) e os últimos 500pb do gene *pbpB* (cepa TV37), amplificados diretamente do genoma de PY79 com os oligonucleotídeos FG365 e FG364, e FG385 e FG319 (respectivamente).

TV33, TV34, TV38 e TV39: Cada um dos vetores pGET5.1, pGET5.4, pGET6.1 e pGET6.4 foi clivado com a enzima BamHI e em seguida ligado para formar

multímeros. Estes múltímeros foram então transformados em *Bacillus subtilis*, e os transformantes foram selecionados por resistência a espectinomicina.

TV40: O plasmídeo pDR110 foi clivado com XhoI e EcoRI, e foi ligado ao produto de PCR *ypetAISV* amplificado com os oligonucleotídeos FG420 e FG323, clivado com as mesmas enzimas.

TV41: O plasmídeo pDRT foi transformado em PY79, e os transformantes foram selecionados por resistência a eritromicina e lincomicina e em seguida testados para a perda da atividade da amilase codificada pelo gene *amyE*.

FG1276: O DNA genômico da cepa FG1130 foi extraído e transformado em células competentes da cepa FG491. Os transformantes foram selecionados por resistência a cloranfenicol.

3.5 Experimentos de Microscopia

O equipamento utilizado nos experimentos de microscopia consistiu de um microscópio invertido Eclipse TI 300 Nikon equipado com lâmpada Intensilight C-HGFI (Nikon), câmera iXon EMCCD (Andor), objetiva CFI Plan Apo VC 100X Oil (Nikon) e sistema Perfect Focus (Nikon). O óleo de imersão utilizado foi o FF (Nikon). Os filtros utilizados para a aquisição de imagens das proteínas fluorescentes foram: CFP-2432A-000-ZERO (Semrock), para cepas com fusões a CFP; GFP-3035B-000-ZERO (Semrock) para cepas com fusões a GFP; mCherry-A-000-ZERO (Semrock) para cepas com fusões a mCherry e YFP-2427-000-ZERO (Semrock) para cepas com fusões a YFP. O software usado para aquisição de imagens foi o NIS-Elements AR (Nikon).

3.5.1 Experimentos de Microscopia de Série Temporal (*time-lapse*)

3.5.1.1. Cultura de células

Os experimentos de microscopia de série temporal foram realizados em câmaras como descrito na Figura 7 e no Anexo A – Rados et al, 2013, no prelo. A cultura de células em fase exponencial no meio de interesse (CH ou TSS) foi inoculada na câmara e permaneceu a 37°C por 1h30min para TSS e 40min para CH, para em seguida ser levada ao microscópio. Uma vez no microscópio, a temperatura foi mantida ao longo do

experimento por um sistema de incubação e aquecimento de objetiva (Chamlide TC Incubator).

Figura 7. A câmara para a realização do *time-lapse* consiste de um suporte de alumínio (A), de 7,5cm por 2,5cm por 0,2cm, com um orifício circular de 1,5cm de diâmetro, coberto por uma lamínula em um dos lados. A câmara é preenchida com o meio de escolha com 1% de agarose, e, após a solidificação do mesmo, é cortada a lateral do meio para a criação de uma “bolsa” de ar (B). A cultura de bactérias é colocada no centro da faixa de meio solidificado (C), e o orifício é coberto com uma lamínula e vedado.

3.5.1.2. Aquisição de imagens

A aquisição de imagens de *time-lapse* foi realizada respeitando os intervalos, tempo de exposição, ganho e filtro de densidade neutra (ND) descritos em cada experimento. Mais detalhes sobre a influência destes parâmetros podem ser encontrados no Anexo A – Rados et al, 2013, no prelo.

3.5.2 Fotos estáticas

As bactérias foram semeadas em uma placa de LB-Ágar contendo o antibiótico adequado e incubadas a 37°C por 12h. Em seguida, uma colônia foi inoculada em meio mínimo (TSS) e incubada até atingir DO_{600} 0,3. A cultura foi então diluída até DO_{600} 0,05 e incubada até DO_{600} 0,15-0,25. Em seguida, as células foram analisadas no microscópio de fluorescência em lâminas contendo TSS e 1% de agarose, de maneira similar ao trabalho de Meira (2010).

3.6. Análise dos dados

3.6.1 Quantificações de intensidade de fluorescência em microscopias de série temporal

Para quantificar a intensidade de fluorescência das células analisadas, usamos o software ImageJ (NIH). Após selecionar a célula de interesse numa série temporal, iniciamos a quantificação de sua intensidade de fluorescência no primeiro quadro depois da primeira divisão observada no *time-lapse*. Para cada quadro, selecionamos uma área da célula de interesse (Fig 8), medimos a intensidade média desta área (valor de fluorescência média por pixel – uma medida que reflete a concentração de GFP na célula), subtraindo o valor do *background* do mesmo quadro. Os dados obtidos para cada foto foram então transportados para uma planilha do Excel 2010 (Microsoft) para a confecção dos gráficos.

Figura 8. Exemplo da quantificação de um quadro de uma série de curso temporal. A intensidade média de fluorescência de uma área do background (A) foi quantificada para que fosse subtraída do valor de intensidade média de fluorescência da célula (B).

3.6.2 Análise da montagem do divisomo

Utilizamos o software ImageJ para selecionar o anel a ser analisado, separando as imagens do filme, isolando o anel de interesse em cada quadro e em seguida refazendo a sequência de imagens, apenas com o anel escolhido. Cada filme analisado contém informação de dois canais de fluorescência, um para cada proteína de fusão (sendo os pares GFP e mCherry ou YFP e CFP) presente no anel de interesse. Os canais de cada imagem foram isolados e analisados separadamente (na prática, trabalhamos com dois filmes para cada anel). Utilizamos a ferramenta StackReg (Thévenaz, 2011) para alinhar os quadros de modo a compensar quaisquer flutuações na posição do anel ao longo do filme. A ferramenta MultipleKymograph (Rietdorf e Seitz, 2004) foi utilizada para criar os quimogramas – neste *plugin*, uma linha é criada sobre a sequência de imagens (no nosso caso, a linha é criada sobre a região do anel – exemplo na Fig 9, A) e a mesma área de interesse é lida em cada quadro da sequência. Estes dados são transferidos pelo *plugin* para uma nova imagem, que apresenta, em linhas verticais, a situação da estrutura em cada quadro do filme (Fig 9, B). Deste modo, o quimograma resultante mostra a situação do anel ao longo do tempo.

Figura 9. Exemplo da criação de um quimograma de um anel de FtsZ-YFP, com 20 quadros. O anel de interesse, depois de isolado e alinhado, é sobreposto por uma linha

(A). Para cada quadro do filme, o *plugin* cria uma coluna que mostra a situação do anel naquele quadro específico (B).

3.6.3 Medidas semi-automatizadas de intensidade de fluorescência em fotos estáticas

Desenvolvemos uma maneira semi-automatizada para realizar medidas de intensidade de fluorescência em fotos estáticas utilizando o software ImageJ. Primeiramente, as fotos estáticas foram transformadas em imagens binárias e assim, utilizadas para criar uma máscara que define o contorno de múltiplas células na imagem (Fig 10, A). O diâmetro mínimo e máximo das formas reconhecidas pelo software foi otimizado para evitar que grandes grupos de células (ou células em cadeia) e impurezas fluorescentes eventualmente presentes na cultura fossem quantificados. Em seguida, a máscara criada foi aplicada na foto de interesse (Fig 10, B) e todas as células foram medidas simultaneamente. Todos os comandos foram programados para serem efetuados através de atalhos de teclado, tornando a medida extremamente rápida e eficaz. O background da imagem foi então quantificado e subtraído do valor de intensidade de fluorescência das células e os dados transportados para o Excel 2010 (Microsoft) para análise e confecção dos gráficos.

Figura 10. Exemplo da quantificação da intensidade de fluorescência de 105 células simultaneamente. A máscara (A) é criada com base em uma imagem binária e são definidas as regiões de interesse (ROIs) para a imagem. A máscara é aplicada sobre a imagem capturada pelo microscópio (B) e as células são medidas simultaneamente.

4. RESULTADOS

5.1. Estudo da Expressão Gênica de *operons* Relacionados à Divisão Bacteriana com o Uso de Fusões Transcricionais a GFP

4.1.1 Variantes Construídas de GFP e *operons* Estudados

A estratégia utilizada para a análise da expressão dos genes relacionados à divisão foi inserir o gene codificante para a proteína fluorescente GFP no próprio *operon* do gene escolhido, de modo que o repórter estivesse sob controle de todos os elementos regulatórios nativos. Isto permite que a expressão gênica seja monitorada de forma fiel, mesmo com a existência de promotores secundários desconhecidos ou outras possíveis formas de controle da expressão gênica nos *operons* escolhidos. Integramos *gfp* de modo que o repórter estivesse antes do terminador de transcrição do *operon*, e fosse transcrito no mesmo RNA mensageiro que os genes de interesse; mas com sua própria sequência Shine-Delgarno e códon de iniciação, para que fosse traduzido como uma proteína separada das demais (Figura 11).

Com o intuito de evitar acúmulo de GFP que pudesse mascarar a variação de fluorescência ao longo do ciclo, inicialmente foram feitas três fusões transcricionais para cada *operon*: GFP selvagem – adiante tratado como GFP –, GFP com uma cauda com os aminoácidos Alanina, Isoleucina, Serina e Valina – a partir deste momento tratado como GFP_{AISV} – e GFP com a cauda Alanina, Leucina, Alanina e Alanina – de agora em diante denominado GFP_{ALAA}. Ambas as caudas são conhecidas por encaminhareм GFP para o sistema de degradação ClpXP (Griffith e Grossman, 2009). Era esperada uma instabilidade maior da proteína com a cauda ALAA, como já descrito na literatura, assim como uma instabilidade moderada da proteína com a cauda AISV.

Depois de realizadas as clonagens (detalhes em Materiais e Métodos, pp. 33-35, Fig 11) e da criação de cepas com cada construção integrada, a diferença na intensidade de fluorescência das construções foi avaliada por fotos estáticas (exemplificadas na Fig 11), medidas como descrito para experimentos de *time-lapse* em Materiais e Métodos (p. 37), onde a concentração de GFP na célula é inferida através da quantificação da intensidade de fluorescência em uma pequena área da célula.

Figura 11. Estratégia de clonagem para a construção das cepas com fusão transcricional a *gfp*. No exemplo, a construção da fusão transcricional a GFP do *operon* de *ftsAZ*.

Para o *operon ftsAZ* foram obtidas fusões com GFP AISV e GFP ALAA, cujas médias de intensidades de fluorescência em fotos estáticas foram 3033 e 715 unidades arbitrárias de fluorescência (AU), respectivamente. Para o *operon minCD* foram obtidas fusões com as três variantes de GFP, com intensidade média de fluorescência de 6944 AU para GFP, 3034 AU para GFP AISV e 696 AU para GFP ALAA. O promotor do *operon* de *zapA* e *yshB* tem baixa expressão, (com intensidade média de fluorescência de 3098 AU com GFP, 1429 AU com GFP AISV e 622 AU com GFP ALAA), o que condiz com dados na literatura (Gueiros-Filho e Losick, 2002) de que ZapA é uma proteína pouco abundante na célula. De início, conforme já citado, nosso maior interesse residia no promotor do *operon* do gene que codifica para a proteína FtsL (referido aqui como *operon ftsL-pbpB*), já que há diversos indícios para que a regulação transcricional deste gene seja em parte responsável pelo controle do momento da divisão no ciclo celular (p. 23, Goranov et al 2005). Observamos que este é um *operon* de baixa expressão, com a intensidade média de fluorescência de 3827 AU para GFP, 1775 AU para GFP-AISV e 621 AU para GFP-ALAA, apenas 24% mais intensa que o *operon zapA* e com o equivalente a 58% da intensidade de fluorescência da fusão ao *operon ftsZ* (na Figura 12, exemplos de fotos estáticas de células individuais e na Figura 13, comparação das médias da intensidade de fluorescência obtidas).

Por serem muito instáveis e renderem uma intensidade de fluorescência muito baixa, muito próximas do valor de autofluorescência das células (intensidade média de fluorescência de 619 AU para PY79, a cepa selvagem de *B. subtilis* utilizada neste trabalho) as fusões a GFPALAA foram descartadas para o uso em séries temporais. As fusões a GFP selvagem foram, de início, evitadas pelo risco anteriormente citado de mascarar variações sutis na intensidade de fluorescência. As fusões transcricionais a GFP AISV apresentavam intensidade de fluorescência cerca de 45% maior que a cepa selvagem assim como um padrão de variação da intensidade de fluorescência similar às fusões a GFP e, à nossa avaliação, intensidade suficiente para uso em experimentos de microscopia de série temporal.

Figura 12. Imagens comparando a fluorescência dos diferentes *operons* com fusão transcricional às variantes de GFP.

Figura 13. Gráfico comparativo da intensidade de fluorescência dos diferentes *operons* e suas fusões a GFP, obtido através da análise das fotos de microscopia exemplificadas na Fig 12. Os valores consistem na média da intensidade de fluorescência de 30 células individuais de cada fusão, analisadas em fotografias estáticas e quantificadas como descrito para os experimentos de *time-lapse* (Materiais e Métodos, p. 37). Exposição, 1s; ganho 74.

4.1.2. Experimentos de Microscopia de Série Temporal das Fusões Transcricionais a GFPAISV

4.1.2.1 Operon *ftsL-pbpB*

Foram realizados experimentos de microscopia de série temporal para avaliar a intensidade de fluorescência de GFPAISV ao longo de divisões sucessivas da bactéria em meio TSS, com fotos de 4 em 4 minutos (demonstrativo de quadros selecionados de um filme na Figura 14). Exemplos da quantificação da intensidade de fluorescência dessas células podem ser observados na Figura 15.

Figura 14. Demonstrativo de filme da cepa TV19. A figura foi editada para exibir fotos de 12 em 12 minutos, com o tempo indicado na margem inferior esquerda de cada quadro.

Procuramos alinhar o curso temporal da fluorescência com o início e fim do ciclo celular, inferidos pela ocorrência de um evento de divisão nos filmes. Uma vez que a separação das células-filha é determinada visualmente e não utilizamos corante de membrana ou qualquer outro marcador para visualizar o septo recém-formado, assumimos que a divisão possa ocorrer com um quadro (4 minutos) de diferença do momento apontado. Observamos pequenos picos na intensidade de fluorescência, sendo que a maior variação na intensidade de fluorescência observada ao longo do ciclo celular é de 23%, com uma média de 17% em todas as células analisadas. Na Figura 15, a linha verde é exemplo de uma célula que sofreu três divisões ao longo do experimento (divisões estão marcadas com quadrados). O pico de intensidade de fluorescência do segundo ciclo (apontado com a seta) é 22% maior que a intensidade média de fluorescência da célula ao longo deste ciclo. Esta pequena amplitude da variação da fluorescência pode ser devida a autofluorescência das células, que na Figura 13

representa cerca de 30% da fluorescência total produzida pela fusão transcricional ao operon *ftsL-pbpB*.

Figura 15. Exemplos do resultado da quantificação da intensidade de fluorescência de quatro células com a fusão *ftsL-pbpB* GFP AISV ao longo do ciclo celular. Cada linha do gráfico representa uma célula, medida individualmente ao longo de 150 minutos. Os quadrados marcam o momento estimado da divisão de cada célula. A seta aponta um pico observado na intensidade de fluorescência. Exposição 1s, ganho 74. Fotos de 5 em 5 minutos.

4.2.2.1 Operon *minCD*

Foram realizados experimentos de microscopia de série temporal da cepa contendo a fusão transcricional de GFP-AISV ao *operon minCD*. Não há indícios de regulação transcricional deste *operon* durante o ciclo celular descritos na literatura, portanto, não havia expectativa de uma oscilação da intensidade de fluorescência. A variação na intensidade de fluorescência ao longo do ciclo celular foi menor para a fusão *minCD* que para a fusão *ftsL-pbpB*: a maior variação observada num único ciclo foi de 19%, sendo a média 13% para os 20 ciclos celulares analisados. Um exemplo de *time-lapse* é mostrado na Figura 16, assim como exemplos da quantificação de 4 células na Figura 17.

Figura 16. Demonstrativo de microscopia de série temporal da cepa contendo fusão transcricional de GFP-AISV ao *operon minCD*. Fotos de 12 em 12 minutos, com o tempo indicado na margem inferior direita de cada quadro. Exposição 500ms, ganho 10.

Figura 17. Exemplos do resultado da quantificação da intensidade de fluorescência de 4 células com a fusão *minCD* GFP AISV ao longo do ciclo celular. Os quadrados marcam o momento estimado da divisão de cada célula. Cada linha do gráfico representa uma célula, medida individualmente de 3 em 3 minutos ao longo de 99 minutos. Exposição 500ms, ganho 10.

4.1.3 Experimentos de microscopia de série temporal da fusão do promotor de *ftsL-pbpB* a GFP AISV em plasmídeo epissomal multicópia

Como observado na Figura 13, 36% da intensidade de fluorescência da fusão de *ftsL-pbpB* ser proveniente da autofluorescência de PY79 em fotografias estáticas. Uma estratégia utilizada para aumentar a relação sinal/ruído foi a construção de uma cepa contendo o plasmídeo epissomal pTheo derivado do vetor pHCM (Nguyen et al, 2005), que contém apenas o promotor do *operon ftsL-pbpB* controlando a expressão de GFP AISV. O plasmídeo pTheo é um plasmídeo de baixo número de cópias, calculado de modo que não houvesse distúrbios pela expressão exacerbada de GFP AISV ou problemas de quantificação relacionados ao alto número de cópias do plasmídeo e eventual excesso na intensidade de fluorescência. O baixo número de cópias também foi escolhido esperando que isto gerasse uma distribuição relativamente homogênea de plasmídeos por célula. Demonstrativo de filme e de quantificação de células individuais da cepa TV29 nas Figs 18 e 19, respectivamente.

Figura 18. Demonstrativo de microscopia de série temporal da cepa TV29, com o plasmídeo episomal pTheo expressando GFP AISV sob controle do promotor de *ftsL-pbpB*. Fotos de 16,5 em 16,5 minutos, com o tempo indicado na margem inferior esquerda de cada quadro. As setas apontam células que apresentaram grande alteração na intensidade de fluorescência devido à variabilidade no número de plasmídeos.

Figura 19. Exemplos do resultado da quantificação de intensidade de fluorescência de 4 células com o plasmídeo epissomal pTheo ao longo do ciclo celular no comprimento de onda 484-507nm. Cada linha do gráfico representa uma célula, medida individualmente de 3 em 3 minutos ao longo de 102 minutos. Exposição 500ms, ganho 26.

O experimento de *time-lapse* com a cepa TV29 contendo o plasmídeo pTheo revelou células com grande diferença na intensidade de fluorescência, muito maior do que o antes observado para as fusões integradas no cromossomo. Em alguns casos, células com baixa ou média intensidade de fluorescência apresentaram um aumento repentino no sinal (exemplos nas setas), provavelmente devido a um aumento abrupto no número de cópias do plasmídeo. Portanto, apesar do baixo número de cópias, a variação intrínseca no número de plasmídeos parecia ser suficiente para que a quantificação da expressão do promotor do *operon* de *ftsL-phpB* fosse impossibilitada com essa construção. De qualquer maneira, foram quantificadas quatro células, mostradas na Figura 19. Três delas mostraram como tendência apenas o aumento da intensidade fluorescência e uma célula (em vermelho) mostrou uma possível oscilação. É um padrão bem diferente do visto na quantificação da fusão cromossomal (Figura 15) e, portanto, partimos para outra abordagem.

4.2. Estudo da Expressão Gênica de *operons* Relacionados à Divisão Bacteriana com o Uso de Fusões Transcricionais a YFP

4.2.1 Escolha de YFP

Ao avaliar os gráficos provenientes das fusões a GFP_{PAISV}, observamos que a autofluorescência intrínseca à célula era suficiente para criar uma linha de base de 36% do sinal total de fluorescência de fusões de expressão mais baixa, como *ftsL-pbpB*.

Dois exemplos bem-caracterizados de fontes de autofluorescência em células bacterianas e eucarióticas são NADH (excitação: 360nm, emissão: 450nm) e FAD (excitação: 450nm, emissão: 520nm), que se sobrepõem aos comprimentos de onda de excitação e emissão das proteínas fluorescentes GFP e CFP (Andersson et al, 1998). Analisamos a autofluorescência de PY79, nossa linhagem selvagem e desprovida de GFP, nos comprimentos de onda disponíveis para microscopia (Figura 20).

Comprimento de onda (em nm)	Excitação: 587 Emissão: 610	Excitação: 484 Emissão: 507	Excitação: 435 Emissão: 477	Excitação: 517 Emissão: 530
FP correspondente	mCherry	GFP	CFP	YFP
PY79
Autofluorescência de PY79 em relação ao <i>background</i>	18% maior que o <i>background</i>	57% maior que o <i>background</i>	42% maior que o <i>background</i>	35% maior que o <i>background</i>

Figura 20. Microscopia de PY79 com filtros adequados para diferentes proteínas fluorescentes e autofluorescência de PY79 em relação ao *background* da lâmina de TSS + 1% agarose. Barra de escala, 2 µm.

O comprimento de onda 383-445nm, que corresponderia à proteína BFP foi eliminado pela conhecida dificuldade de trabalhar com a mesma (Shaner et al, 2005). Os comprimentos de onda em que a autofluorescência de PY79 se mostrou menor foram amarelo (517-530nm) e vermelho (587-610nm).

O uso da proteína fluorescente mCherry foi descartado pelo pior desempenho da mesma a 37°C – o enovelamento ótimo da proteína é a 30°C –, bem como pelo tempo de maturação de aproximadamente 15 minutos (Shaner et al, 2005), o que dificultaria a análise do pico de expressão. Escolhemos YFP sobre CFP, uma vez que no espectro 517-530nm (amarelo) a autofluorescência de *B. subtilis* é menor.

4.2.2 Variantes de YFP e *operons* estudados

De início, optamos por, além das fusões *minCD*, *ftsAZ* e *ftsL-pbpB*, construir uma fusão transcricional ao *operon* do gene que codifica para a proteína DnaA (de agora em diante denominado *operon dnaAN*), fator de iniciação de replicação em diversas espécies bacterianas (Mott e Berger, 2007) e de expressão regulada ao longo do ciclo em *C. crescentus* e *E. coli* (Zweiger e Shapiro, 1994; Kütcherer et al, 1986). O uso de uma fusão ao *operon dnaAN* teve também a função de um possível controle positivo em *B. subtilis*, uma vez que nenhum promotor desta espécie comprovadamente oscila ao longo do ciclo celular. Contemplamos também a necessidade da construção de um controle negativo para a microscopia de série temporal. Utilizamos o promotor P_{spank}, um promotor artificial induzido por IPTG e desprovido de sequências regulatórias de *B. subtilis*, sendo frequentemente usado como um promotor invariante em estudos de expressão gênica (Fujita e Losick, 2005).

Foram construídas fusões transcricionais (detalhes Materiais e Métodos, pp 33-35; Fig 20) com duas variantes de YFP: Ypet (Nguyen e Daugherty 2005) e YFP Vênus (Nagai et al, 2002), ambas com a cauda de instabilidade AISV (de agora em diante as referidas proteínas serão denominadas Ypet-AISV e Vênus-AISV).

A análise de fotos estáticas das fusões a GFP AISV e a Vênus-AISV demonstra que, embora a intensidade de fluorescência absoluta seja maior quando usamos fusões transcricionais a GFP, a relação fluorescência da FP *versus* autofluorescência é maior no comprimento de onda 517-530nm - em média 6,5 vezes maior para a cepa com Vênus-AISV e 3,4 vezes maior para a cepa GFP - uma vez que a intensidade de autofluorescência de PY79 é menor neste comprimento de onda (Fig 20). Como o fator

mais importante para a obtenção de dados quantitativos de qualidade é a relação sinal-ruído e não a intensidade absoluta, decidimos proceder e realizar sequências temporais com nossas construções contendo YFP.

Figura 20. Intensidade de fluorescência das cepas construídas com Vênus-AISV e GFP-AISV. As barras representam a média do valor da intensidade de fluorescência de cada cepa construída. Em amarelo escuro, a média de intensidade de fluorescência de PY79 no comprimento de onda 517-530nm (amarelo); em verde escuro, a média da intensidade de fluorescência de PY79 no comprimento de onda 484-507nm (verde).

Primeiramente utilizamos Vênus-AISV com códons otimizados para a tradução em *Bacillus subtilis*, de modo a aumentar a abundância de proteína traduzida na célula e, consequentemente, o sinal de fluorescência. Foram obtidas as construções *ftsAZ* Vênus AISV, *minCD* Vênus-AISV, *dnaAN* Vênus-AISV, *ftsL-pbpB* Vênus-AISV. Em seguida, realizamos as fusões a Ypet-AISV, também otimizada para a expressão em *B. subtilis*, *pbpB-ftsL* Ypet-AISV, *dnaAN* Ypet-AISV e Ypet-AISV sob controle do promotor indutível P_{spank} (Figura 21). Ao comparar as variantes de YFP clonadas, optamos por trabalhar com Ypet-AISV, uma vez que seu sinal é 25,5% mais intenso para fotos estáticas e 36,7% mais intenso para microscopias de série temporal que Vênus-AISV; além de Ypet-AISV apresentar 43,3% de *photobleaching* após nove imagens, comparado aos 53,9% de *photobleaching* de Vênus-AISV, como pode ser visto na Fig 22.

	YFPVênusAISV	Ypet-AISV
<i>ftsAZ</i>		Não obtido
<i>minCD</i>		Não obtido
<i>dnaAN</i>
<i>ftsL-pbpB</i>
Spank	Não obtido

Figura 21. Fotos estáticas de microscopia comparando a intensidade de fluorescência das cepas com fusão dos *operons* de escolha às variantes de YFP. Spank induzido com 200μM IPTG.

Figura 22. Fluorescência das fusões *ftsL-pbpB* e *dnaAN* a Ypet-AISV e YFPVênus-AISV no primeiro (barra laranja escuro) e nono (laranja claro) quadro de um *time lapse*. Intervalo 4min, exposição 1s ganho 74.

4.2.3 Experimentos de Microscopia de Série Temporal das Fusões a Ypet-AISV

4.2.3.1 Operon *ftsL-pbpB*

Foram realizados experimentos de microscopia de série temporal da cepa de *B. subtilis* com o operon dos genes *ftsL* e *pbpB* com fusão transcricional a Ypet-AISV, em meio TSS, com imagens capturadas a cada 4 minutos. As imagens foram analisadas como descrito em Materiais e Métodos (p. 37).

Como evidenciado na Figura 24, existe uma oscilação (variável entre diferentes células), observável ao longo do ciclo celular e sucessivas divisões. Nas células representadas nesta figura, a amplitude da oscilação variou de 9 a 48%, com média de 31% para os ciclos celulares analisados. Com a mudança de proteína fluorescente, detectamos uma mudança significativa na amplitude da oscilação, que com GFP era 23%. Uma análise de um número maior de células revelou que o comportamento oscilatório é bastante heterogêneo e não é visível em todas as células analisadas (ver Apêndice I para exemplos de gráficos de células individuais). De 82 ciclos (de divisão a divisão) individuais analisados, 24,4% (20) células apresentaram uma alteração maior que 30% na intensidade de fluorescência durante o ciclo celular. Nestas, 70% (14) das células apresentavam o pico na intensidade de fluorescência na primeira metade do

ciclo, em 25% (5) ao final do ciclo e em 5% (1) destes tanto no início quanto no final do ciclo.

Figura 23. Demonstrativo de filme de células com a fusão *ftsL-pbpB* Ypet-AISV ao longo do ciclo celular. A figura foi editada para mostrar imagens capturadas de 12 em 12 minutos, com o tempo indicado na margem superior esquerda de cada quadro. Exposição 1s, ganho 74.

Figura 24. Exemplos do resultado da quantificação da intensidade de fluorescência de 4 células com a fusão *ftsL-pbpB* Ypet-AISV ao longo do ciclo celular. A linha pontilhada representa o valor de autofluorescência de PY79. Cada linha do gráfico representa uma célula, medida individualmente ao longo de 140 minutos. Os quadrados marcam o momento aproximado da divisão celular. Exposição 1s, ganho 74.

4.2.3.2 Controles

4.2.3.2.1 Promotor indutível P_{spank}

Como o padrão de oscilação detectado para *ftsL-pbpB* é heterogêneo e de pequena amplitude, tornou-se importante compará-lo com controles negativos para determinarmos se ele era um fenômeno real ou um artefato de nossas medidas. Com este propósito, foram realizados experimentos de microscopia de série temporal para determinar se um promotor induzido expressando Ypet-AISV teria a intensidade de fluorescência variável ao longo do ciclo celular. A cepa TV41 foi fotografada durante crescimento em câmara de TSS com indução de 200 μ M de IPTG, com fotografias de 4 em 4 minutos. O exemplo de série de curso temporal encontra-se na Figura 25 e um demonstrativo da quantificação de células individuais se encontra na Figura 26.

Nenhuma das 15 células analisadas apresentou picos maiores que 30% do valor da média da célula, semelhantes aos detectados para o promotor *ftsL-pbpB*. Nesta série temporal, observam-se variações de no máximo 17% de intensidade de fluorescência ao longo do ciclo celular (Fig 26). Para facilitar a comparação entre as duas cepas, construímos também um gráfico que mostra a variação na intensidade de fluorescência de duas células com a fusão *ftsL-pbpB* Ypet-AISV e duas com Ypet-AISV sob controle do promotor P_{spank} induzido com 200 μ M de IPTG (Fig 27).

Figura 25. Demonstrativo de filme da cepa TV41 (P_{spank} -Ypet-AISV). Fotografias de 8 em 8 minutos, com o tempo indicado na margem inferior esquerda de cada quadro.

Figura 26. Exemplos da quantificação de células com P_{spank} -Ypet-AISV induzido com 200 μ M de IPTG. Cada linha representa uma célula quantificada. A linha pontilhada representa a autofluorescência de PY79. Cada linha do gráfico representa uma célula, medida individualmente ao longo de 132 minutos. Os quadrados marcam o momento aproximado da divisão celular. Exposição 450ms.

Figura 27. Exemplos da variação na intensidade de fluorescência ao longo do ciclo celular de duas células com a fusão *ftsL-pbpB* Ypet-AISV (em tons de laranja) e Ypet-AISV sob controle do promotor P_{spank} (em tons de cinza). Cada linha do gráfico representa uma célula, medida individualmente ao longo de 132 minutos. Os quadrados marcam o momento aproximado da divisão celular. Exposição 1s, ganho 74 para a cepa TV39; e 450ms, ganho 0 para a cepa TV41.

4.2.3.2.2 PY79

Nessa etapa, também foi de grande relevância realizar um experimento de microscopia de série temporal para observar se a autofluorescência de PY79, a cepa selvagem de *B. subtilis* utilizada neste trabalho, oscilava ao longo do ciclo, o que poderia gerar variação artefactual nas medidas de intensidade de fluorescência das cepas com fusão a YFP. Para tanto, foram realizados experimentos de série temporal para determinar se PY79 teria a intensidade de fluorescência variável ao longo do ciclo celular. Segundo nossas quantificações, isso não ocorre (Figuras 28 e 29).

Figura 28. Exemplo de série temporal de célula de PY79. Fotos de 8 em 8 minutos, com o tempo indicado na margem inferior direita de cada quadro. Barra de escala 1 μm . Exposição 1s, ganho 74.

Figura 29. Exemplos do resultado da quantificação da autofluorescência de PY79 ao longo do ciclo celular no comprimento de onda 517-530nm. Cada linha do gráfico representa uma célula, medida individualmente ao longo de 80 minutos. Os quadrados marcam o momento aproximado da divisão celular. Exposição 1s, ganho 74.

Nos filmes de PY79, observam-se variações de cerca de 35% a 50% na intensidade de fluorescência ao longo do ciclo celular, o que indicaria que certas flutuações observadas nas cepas com YFP podem ser derivadas de variações intrínsecas da célula. Esta variação, no entanto, representa cerca de 11% do total de intensidade de fluorescência da cepa com a fusão *ftsL-pbpB* Ypet-AISV, e não seria suficiente para explicar as variações observadas ao longo do ciclo nesta cepa. Uma comparação direta das duas cepas, com exemplos de variação na intensidade de fluorescência de células com a fusão *ftsL-pbpB* Ypet-AISV e de PY79 é mostrada na Figura 30.

Figura 30. Exemplos da variação na intensidade de fluorescência ao longo do ciclo celular de três células com a fusão *ftsL-pbpB* Ypet-AISV (em tons de laranja) e PY79 (em tons de azul). Cada linha do gráfico representa uma célula, medida individualmente ao longo de 132 minutos. Os quadrados marcam o momento aproximado da divisão celular. Exposição 1s, ganho 74.

4.2.3.2.3 Operon *dnaAN*

Por fim, procuramos realizar filmes de um promotor que poderia representar um controle positivo. Optamos por trabalhar com a cepa TV39, portadora da fusão transcricional do operon *dnaAN* a Ypet-AISV pelos indícios de regulação da expressão de *dnaA* ao longo do ciclo celular de *B. subtilis*.

Foram realizados experimentos de microscopia de série temporal ao longo de divisões sucessivas da cepa TV39 em meio TSS, com fotos de 3 em 3 minutos. Exemplo de uma série temporal encontra-se na Figura 31, e a quantificação de células individuais está mostrada na Figura 32. A análise dos dados revelou uma intensidade de fluorescência muito baixa, próxima à autofluorescência. Há variabilidade de 40% na intensidade da fluorescência de uma certa célula mas isso ocorre num período bem mais curto que aquele visto para o o operon *ftsL-pbpB* com fusão transcricional a Ypet-AISV, (por exemplo os picos da linha azul na Figura 32, que mostram uma grande variação no intervalo entre duas fotos), sugerindo que esta variabilidade seja mais técnica do que biológica. Estes dados sugerem que a variação na intensidade de fluorescência ao longo do ciclo para um gene de expressão muito baixa não é detectável pelo método utilizado, que a oscilação na expressão gênica de *dnaA* ao longo do ciclo celular de *B. subtilis* ocorre várias vezes no ciclo ou não ocorre.

Figura 31. Demonstrativo de filme da cepa com o *operon dnaAN* com fusão transcricional a Ypet-AISV. Fotografias de 15 em 15 minutos. Barra de escala 1μm. Exposição 1s, ganho 74.

Figura 32. Exemplos de quantificação de células individuais com o *operon dnaAN* com fusão transcricional a Ypet-AISV. Cada linha representa uma célula individual quantificada individualmente de 3 em 3 minutos, ao longo de 156 minutos. A linha pontilhada representa o valor de autofluorescência de PY79. Os quadrados marcam o momento aproximado da divisão celular.

4.3. Quantificação da intensidade de fluorescência de células em diferentes estágios do ciclo celular

Com o grande ruído obtido nos dados dos experimentos de *time-lapse*, e a dificuldade de apontar um padrão oscilatório e seu momento exato no ciclo celular, procuramos determinar se haveria diferença na intensidade de fluorescência de células em diferentes estágios do ciclo através de fotografias estáticas, que possibilitam a avaliação de um número muito maior de células. Com isso, o ruído devido a variações estocásticas entre as células é compensado pelo volume de dados.

Em bactérias em formato de bastonete o comprimento da célula é um bom indicador de seu estágio no ciclo celular (Sharpe et al, 1998). Com base nesta premissa, quantificamos a intensidade de fluorescência das diferentes fusões através de fotos estáticas com células em todos os estágios do ciclo celular (uma cultura típica assíncrona), buscando uma relação entre o comprimento da célula e a expressão dos genes de interesse. Quantificamos as imagens de maneira semi-automatizada (desenvolvida neste trabalho, detalhes em Materiais e Métodos, pp. 39-40) utilizando o software ImageJ. Uma diferença na intensidade de fluorescência correlacionada com o tamanho da célula seria indicativa de um pico na expressão em um determinado momento do ciclo celular. Foram feitas análises das fusões aos *operons ftsL-pbpB*, *zapA-yshB*, *minC-minD*, *ftsA-ftsZ* e *dnaA-dnaN*, como demonstrado nas Figuras 33 a 37.

Figura 33. Intensidade de fluorescência de 893 células individuais com a fusão transcricional de Ypet-AISV ao *operon ftsL-pbpB* analisadas no comprimento de onda 517-530nm. Cada ponto representa uma célula analisada. Exposição 5s, ganho 20.

Figura 34. Intensidade de fluorescência de 495 células individuais com a fusão transcricional de GFP-AISV ao *operon zapA-yshB* analisadas no comprimento de onda 484-507nm. Cada ponto representa uma célula analisada. Exposição 5s, ganho 20.

Figura 35. Intensidade de fluorescência de 8633 células individuais com a fusão transcricional de GFP-AISV ao *operon minC-minD* analisadas no comprimento de onda 484-507nm. Cada ponto representa uma célula analisada. Exposição 4s, ganho 10.

Figura 36. Intensidade de fluorescência de 10394 células individuais com a fusão transcricional de GFP-AISV ao *operon ftsA-ftsZ* analisadas no comprimento de onda 484-507nm. Cada ponto representa uma célula analisada. Exposição 4s, ganho 10.

Figura 37. Intensidade de fluorescência de 492 células individuais com a fusão transcricional de Ypet-AISV ao *operon dnaA-dnaN* analisadas no comprimento de onda 517-530nm. Cada ponto representa uma célula analisada. Exposição 6s, ganho 40.

No caso dos *operons ftsAZ*, *minCD*, *zapA-yshB* e *ftsL-pbpB* não observamos correlação entre a intensidade de fluorescência e o tamanho da célula, mas no caso do *operon dnaAN* visualizamos uma pequena tendência a um aumento na intensidade de fluorescência em células medindo 3 a 3.5μm, que em meio mínimo corresponde ao final do período C, no qual o cromossomo da maior parte das células foi segregado ou está na fase final de segregação (Sharpe et al, 1998)

Além da tentativa de identificarmos uma relação entre expressão e estágio do ciclo, nossos dados também podem ser analisados para avaliar o grau de variabilidade entre células da expressão dos diferentes promotores. Observa-se que a variação populacional na expressão de genes cuja expressão é mais baixa – *zapA*, *ftsL*, *dnaA* – é maior que a variação populacional da expressão de genes mais expressos – *ftsZ*, *minD*, como demonstrado na Tabela 4 e relatado por Elowitz et al (2000).

Tabela 4. Média, desvio padrão e desvio padrão relativo das intensidades de fluorescência das cepas analisadas.

<i>operon</i>	Média	Desvio Padrão	Desvio Padrão Relativo
<i>ftsL-pbpB</i>	1504,675028	421,4077976	28%
<i>zapA-yshB</i>	2266,230505	433,5481037	19%
<i>minC-minD</i>	1952,438631	261,5412879	13%
<i>ftsA-ftsZ</i>	1891,683721	251,262532	13%
<i>dnaA-dnaN</i>	1349,163265	299,2033532	22%

4.4. Estudo da Cinética de Montagem do Divisomo

Utilizamos microscopia de série temporal para analisar a cinética de associação das proteínas iniciais e tardias ao divisomo, de modo a confirmar as etapas observadas na montagem do divisomo por experimentos de co-localização (Meira, 2010), bem como estabelecer a duração dos supostos intervalos entre a incorporação dos diferentes grupos de proteínas ao divisomo.

Os experimentos foram feitos em meio rico CH e meio mínimo TSS, de modo a avaliar se o atraso na associação das proteínas seria mais evidente com um ciclo mais lento, realizados em câmaras como descrito anteriormente (Materiais e Métodos, pp. 35-36), de CH ou TSS.

4.4.1 FtsL

Inicialmente, realizamos *time-lapse* com a cepa FG1022, que apresenta FtsZ-mCherry sob controle do promotor regulado por IPTG (P_{spac}) e FtsL-GFP sob controle do promotor regulado por xilose (P_{xyl}), em meio mínimo (TSS). A taxa de co-localização das proteínas neste meio é de 78% (Meira, 2010).

Em nosso filme, FtsL-GFP associa-se ao divisomo em média 5 minutos após a formação do anel de FtsZ-mCherry, com variações de 0 a 10 minutos em células individuais. Na Figura 37 apresentamos um exemplo de uma célula individual onde a incorporação de FtsL-GFP ocorre 5 minutos após a formação do anel Z. Para comparar

os dados adquiridos nas séries temporais com FtsL-GFP com os dados de co-localização em CH, procuramos realizar uma microscopia de série temporal com a fusão neste meio, mas esta foi impossibilitada pela autofluorescência do meio em 484-507nm, que impediu uma análise correta dos dados obtidos.

Figura 37. Exemplo de associação de FtsL-GFP ao divisomo em uma célula individual em meio TSS. A imagem foi editada de modo a mostrar apenas o início da formação do anel e o término da contração do anel Z. As setas vermelhas apontam o anel de FtsZ-mCherry e as setas verdes apontam o anel de FtsL-GFP. IPTG 100 μ M, xilose 0,2%. GFP: exposição 600ms, ganho 15; mCherry: exposição 400ms, ganho 20.

4.4.2 Pbp2B

A proteína Pbp2B, com 89% de co-localização com FtsZ em meio CH (Meira, 2010), é considerada – como FtsL – uma proteína de associação intermediária ao divisomo. Sendo uma fusão com sinal mais intenso que FtsL-GFP, foi escolhida para a análise do intervalo de associação entre FtsZ e as proteínas intermediárias ao divisomo. Foram realizados experimentos de microscopia de série temporal da cepa FG972, que contém a fusão FtsZ-mCherry e a fusão Pbp2B-GFP, com fotografias realizadas de 150 em 150 segundos em meio CH e de 4 em 4 minutos em meio TSS.

Na Figura 38 apresentamos um exemplo da associação de Pbp2B-GFP em uma célula individual em meio rico (CH), onde a associação de Pbp2B-GFP ocorre, em média, 3 minutos após da formação do anel Z, com células individuais variando de 0 a 7 minutos e 30 segundos. Para utilizarmos um critério mais objetivo na determinação do

tempo de incorporação de uma proteína, construímos quimogramas a partir dos filmes (ver Materiais e Métodos, pp. 37-38), que facilitam a comparação da cinética de incorporação das duas proteínas analisadas. Os quimogramas também serviram para a quantificação da concentração (avaliada através da intensidade de fluorescência) de cada proteína no divisomo ao longo do tempo. Na Figura 39 apresentamos dois quimogramas de células individuais em meio CH, mostrando a formação do anel Z e do anel de Pbp2B (outros exemplos encontram-se no Apêndice II). Foram quantificados os valores de intensidade de fluorescência no anel para cada imagem coletada. Observa-se que Pbp2B co-localiza com FtsZ-mCherry logo no início da formação do anel (Fig 39, B e E), mas o pico de concentração da proteína acontece cerca de 17 minutos depois do pico de concentração de FtsZ-mCherry (Fig 39, C e F) e a mesma permanece no sítio de divisão por cerca de 2,5 minutos após a saída de FtsZ (Fig 39, B e E).

Figura 38. Formação do anel Z e associação de Pbp2B-GFP ao divisomo em uma célula individual no meio CH. Fotos de 150 em 150 segundos. IPTG 100 μ M, xilose 0,5%. GFP: exposição 700ms, ganho 19; mCherry: exposição 500ms, ganho 19.

Figura 39. A formação do anel Z e do anel de Pbp2B em duas células individuais (célula 1 em A, B e C; célula 2 em D, E e F) em meio CH. Em A e D, observa-se fotos de 150 em 150 segundos do anel de ambas as proteínas. Quimogramas (as cores foram invertidas para melhor visualização) em B e E, utilizados para a quantificação dos dados expostos nos gráficos C e F, que apresentam a concentração de cada proteína no sítio de divisão ao longo do tempo. IPTG 100 μ M, xilose 0,5%. GFP: exposição 700ms, ganho 19; mCherry: exposição 500ms, ganho 19.

Com o objetivo de observar a incorporação de Pbp2B-GFP ao divisomo em maior detalhe, avaliamos as células também em meio mínimo (TSS), onde estas apresentam um ciclo mais lento. Observa-se que a associação de Pbp2B-GFP ocorre em média 4 minutos após a formação do anel Z (Figura 40, A e D; B e E), com células individuais variando de 0 a 12 minutos; e o pico de concentração de Pbp2B-GFP ocorre de 4 a 8 minutos após o pico de concentração de FtsZ-mCherry (Figura 40, C e F). A proteína Pbp2B permanece no sítio de divisão por 4 a 8 minutos após o fim da contração do anel de FtsZ (Figura 40, B e E). Outros exemplos encontram-se no Apêndice II.

Figura 40. A formação do anel Z e do anel de Pbp2B em duas células individuais (célula 1 em A, B e C; célula 2 em D, E e F) em meio TSS. Em A e D, fotos de 4 em 4 minutos do anel formado por ambas as proteínas. Quimogramas (as cores foram invertidas para melhor visualização) em B e E, utilizados para a quantificação dos dados expressos nos gráficos C e F, que apresentam a concentração de cada proteína no sítio de divisão ao longo do tempo. IPTG 100 μ M, xilose 0,5%. GFP: exposição 600ms, ganho 19; mCherry: exposição 300ms, ganho 19.

4.5.2 DivIVA

Em seguida, analisamos com experimentos de microscopia de série temporal a associação de uma proteína considerada tardia, no trabalho de Meira (2010): DivIVA, cuja taxa de co-localização com FtsZ é 41,7%. Foi utilizada a cepa FG1276, com DivIVA-CFP e FtsZ-YFP em TSS e CH. Um exemplo de uma célula individual em um *time-lapse* pode ser observado na Figura 41. Nos *time-lapses* em CH (Fig 42) e TSS (Fig 43), observa-se que a associação de DivIVA ao complexo ocorre de 10 a 22 minutos em células individuais (média de 16 minutos) após a formação do anel Z em meio rico (Fig 42, A e D; B e E), e de 10 a 32 minutos (média de 20 minutos) em meio mínimo (Fig 43, A e D; B e E). A incorporação de DivIVA ao divisomo se dá, em todas as células analisadas, apenas após o início da contração do anel (Fig 42, B e E; Fig 43, B e E; Apêndice II), e a concentração desta no sítio de divisão aumenta à medida que diminui a concentração de FtsZ (Fig 42, C e F; Fig 43, C e F). A proteína permanece no novo pólo mesmo após o final da divisão.

Figura 41. Exemplo da associação da proteína DivIVA (em verde) ao anel de FtsZ (em vermelho), em uma célula em CH. Barra de escala 1μm. IPTG 100μM. CFP: exposição 800ms, ganho 10; YFP: exposição 500ms, ganho 10.

Figura 42. A formação do anel Z e a incorporação da proteína DivIVA em duas células individuais (célula 1 em A, B e C; célula 2 em D, E e F) em meio CH. Em A e D, fotos de 2 em 2 minutos do anel formado por ambas as proteínas. Quimogramas (as cores foram invertidas para melhor visualização) em B e E, utilizados para a quantificação dos dados expressos nos gráficos C e F, que apresentam a concentração de cada proteína no sítio de divisão e subsequente pólo da célula ao longo do tempo. IPTG 100 μ M. CFP: exposição 800ms, ganho 10; YFP: exposição 500ms, ganho 10.

Figura 43. A formação do anel Z e a incorporação da proteína DivIVA em duas células individuais (célula 1 em A, B e C; célula 2 em D, E e F) em meio TSS. Em A e D, fotos de 2 em 2 minutos do anel formado por ambas as proteínas. Quimogramas em B e E, utilizados para a quantificação dos dados expressos nos gráficos C e F, que apresentam a concentração de cada proteína no sítio de divisão e subsequente pólo da célula ao longo do tempo. IPTG 100 μ M. CFP: exposição 500ms, ganho 10; YFP: exposição 450ms, ganho 10.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

5.1. Análise de Expressão Gênica com o Uso de Microscopia de Série Temporal

O método de análise da expressão gênica de células individuais de *B. subtilis* através de microscopia de fluorescência do tipo *time-lapse* foi documentado especialmente para estudo da heterogeneidade e ruído da expressão gênica (Suel et al, 2007; Rosenfeld et al, 2007, Suel et al, 2006), mas até o início deste trabalho não existiam estudos documentando seu uso para avaliação da expressão gênica ao longo do ciclo celular nesse sistema. Ao longo deste projeto, Rosenberg et al (2012) utilizaram o mesmo método para a análise da expressão gênica dos *operons rrn* ao longo do ciclo celular, que codificam para RNAs ribossomais, altamente expressos, sem encontrar variação destes ao longo do ciclo celular em crescimento vegetativo.

Pela ausência de estudos desta natureza em *Bacillus*, nosso trabalho procurou estabelecer as condições adequadas para observar o fenômeno de oscilação de maneira empírica. Uma de nossas grandes dificuldades neste sentido foi a ausência de um controle positivo que comprovadamente oscila ao longo do ciclo celular neste organismo. Procuramos obter um controle positivo construindo uma fusão transcricional ao *operon* do gene *dnaA*, que é um gene cuja expressão comprovadamente oscila ao longo do ciclo de pelo menos algumas espécies bacterianas (Wang e Levin, 2009), mas o sinal especialmente fraco desta fusão (dado que DnaA é uma proteína pouco abundante na célula) impossibilitou uma conclusão a partir dos dados. No entanto, consideramos que o controle negativo, construído com a proteína fluorescente Ypet-AISV sob controle de um promotor indutível, é uma boa opção para uso em futuros trabalhos.

Um parâmetro que exploramos foi a estabilidade do nosso repórter de expressão gênica. A cauda de instabilidade ALAA torna o sinal de GFP muito fraco para ser detectado pelo método usado, que se baseia na presença de uma cópia única do repórter integrado no cromossomo. A cauda de instabilidade AISV, que em nosso trabalho produz 50% da intensidade de fluorescência de GFP selvagem, é uma boa alternativa para o uso em construções de proteínas fluorescentes instáveis em microscopia. A autofluorescência interna de *B. subtilis* e outros organismos vivos devido às flavinas – notadamente nos comprimentos de onda com excitação 360nm e emissão 450nm e

excitação 450nm e emissão 520nm –, (Andersson et al, 1998) torna o uso de GFP e CFP pouco recomendados em sistemas com baixa expressão (ou intensidade de fluorescência), embora a análise da variação da expressão gênica de *operons* com expressão mais alta, como *minCD*, tenha se mostrado possível com a fusão a GFP-AISV. Quando possível, este tipo de estudo deve ser conduzido com o uso de YFP, pelo curto tempo de maturação, baixa taxa de autofluorescência de *B. subtilis* no comprimento de onda 517-530nm e a possibilidade de, se necessário, ser pareada com CFP para estudos que monitorem a expressão gênica de dois genes simultaneamente (Elowitz et al, 2002). Determinamos também neste trabalho que o sinal/ruído é afetado pela autofluorescência do óleo de imersão e pelo extrato de levedura presente em determinados meios de cultura (dados não mostrados), provavelmente devido às flavinas contidas no meio.

A análise da expressão gênica ao longo do ciclo celular é impossibilitada com o uso de plasmídeos (no caso, derivados do vetor pHCM) devido à variação estocástica no número de plasmídeos em cada célula. No entanto, este sistema seria bastante interessante no caso de um estudo da variação no número de cópias de um plasmídeo em células individuais ao longo do crescimento de uma população. A utilização de outro plasmídeo com um sistema *par* – de segregação ativa – (Schumacher, 2012) poderia manter o número de plasmídeos mais constante e o sinal adquirido mais homogêneo.

Os dados obtidos através da análise de fotos estáticas com fusões transcricionais não estão sujeitos à fotoinativação das proteínas fluorescentes, uma vez que cada campo só é exposto à luz uma única vez e permite o uso de exposição mais alta, o que gera dados de melhor qualidade. Estes experimentos permitem a análise de um grande grupo de células simultaneamente e, além de fornecer informações sobre a força dos promotores de cada *operon*, é uma alternativa para a análise da expressão gênica com o uso de nossas fusões. A limitação deste método é poder determinar com alguma precisão o estágio do ciclo celular em que cada célula se encontra. O comprimento das células é um critério de posição no ciclo geralmente aceito, mas que pode ser imperfeito se houver variabilidade (ruído) dos eventos do ciclo celular. O ideal seria monitorarmos outros marcadores que indicassem eventos do ciclo, como início e fim da replicação e início e fim da citocinese. Infelizmente, estes marcadores ainda não existem ou são tecnicamente difíceis de serem implementados.

O sistema padronizado ao longo deste trabalho para a confecção de *time-lapses* em câmaras foi aplicado e otimizado para a solução de outras perguntas do laboratório, como o estudo da cinética da montagem do divisomo, discutida abaixo (pp. 84-88).

5.2. Análise da expressão dos genes envolvidos em divisão ao longo do ciclo celular de *B. subtilis*

Em nossos experimentos de *time-lapse* procuramos monitorar alterações cíclicas na atividade dos promotores de alguns *operons* chave no processo de divisão. Utilizando como critério a existência de picos na intensidade de fluorescência acima de 30% da intensidade de fluorescência total e uma periodicidade destes picos semelhante à duração do ciclo celular, identificamos apenas o promotor do *operon ftsL-pbpB* como um promotor que é potencialmente regulado durante o ciclo celular. A comparação entre o comportamento deste promotor e o comportamento de um promotor artificial indutível, nosso controle negativo (Figura 27), também sugere que o promotor do *operon ftsL-pbpB* possa apresentar oscilação. No entanto, o padrão de oscilação foi detectado em apenas 24,4% das células analisadas (pp. 55-57). Essa inconsistência no comportamento de células de uma mesma cepa pode indicar que o fenômeno que observamos é uma variação estocástica na atividade deste promotor, algo diferente de uma regulação coordenada no ciclo celular. Outra explicação para a inconsistência é que nosso sistema experimental é pouco sensível e só consegue detectar oscilação quando esta ocorre com uma grande magnitude (neste caso, oscilações menores seriam encobertas por autofluorescência ou pelo excesso de estabilidade da FP). Um controle positivo poderia nos ajudar a determinar se a inconsistência na oscilação de *ftsL-pbpB* é de origem biológica ou técnica. Infelizmente, não obtivemos tal controle para *B. subtilis*. Na ausência de um controle positivo, procuramos confirmar os resultados de *time-lapse* fazendo a análise de centenas de células individuais a partir de fotos estáticas. A possibilidade de avaliar centenas de células simultaneamente e a captura de imagens com sinal/ruído maior poderiam revelar uma oscilação mascarada no *time-lapse* por algum destes fatores. A análise das fotos estáticas, no entanto, também não indica uma variação óbvia na intensidade de fluorescência do promotor do *operon ftsL-pbpB* em função do ciclo celular (p. 65). Em face destes resultados, concluímos que o promotor do *operon ftsL-pbpB* não oscila, ou oscila muito pouco, durante o ciclo celular.

Dada a alta instabilidade de FtsL (Daniel e Errington, 2000), uma regulação na sua incorporação ao divisomo impediria a associação das outras proteínas que formam a “fábrica de peptideoglicano” (Errington et al., 2003; Daniel et al., 2006; Bramkamp et al., 2006) e seria uma possível explicação para o pequeno intervalo observado entre a formação do anel e a associação das proteínas intermediárias responsáveis pela síntese de peptideoglicano (Gamba et al, 2009; Meira, 2010; este trabalho). Além disso, o aumento de concentração de FtsL na célula, decorrente da deleção da protease responsável por clivar FtsL na cepa 168 de *B. subtilis* rendeu células 30% menores (Bramkamp et al, 2006). No entanto, a deleção da mesma protease na nossa cepa selvagem PY79 não teve efeito no tamanho das células (dados não mostrados), sugerindo que a expressão de FtsL pode não ser sempre limitante. Este resultado, somado ao de fato que não observamos uma oscilação reprodutível do promotor *ftsL-pbpB*, sugere que a disponibilidade de FtsL pode não ser um mecanismo importante da regulação do ciclo.

Os dados obtidos com a análise de fotos estáticas das fusões aos *operons* *minCD*, *ftsAZ*, e *zapA-yshB*, assim como o *time-lapse* realizado com uma fusão ao *operon minCD* indicam que tampouco existe regulação transcricional ao longo do ciclo para estes *operons*. Além disso, o método utilizado nos permitiu avaliar a intensidade da expressão (a força do promotor) dos *operons* escolhidos: o *operon ftsAZ* tem alta expressão conforme dados da literatura (Rueda et al, 2003), e o *operon minCD*, cuja atividade não havia sido reportada, é quase tão expresso quanto o *operon ftsAZ*. Os *operons ftsL-pbpB*, *zapA-yshB* e *dnaAN* têm expressão muito baixa nas condições analisadas, e apresentam maior variabilidade (ruído) entre células individuais que outros promotores analisados, como reportado para promotores de baixa atividade (Elowitz et al, 2000).

A regulação temporal da divisão pode ocorrer de outras maneiras além do controle da expressão gênica, incluindo o controle pós-traducional de componentes do divisomo. Este tipo de controle não é incomum em bactérias, sendo documentado, por exemplo, para proteínas envolvidas em resposta a estresse e esporulação em *B. subtilis* (Reder et al, 2012; Kain et al, 2008) e em uma das principais proteínas reguladoras de ciclo em *C. crescentus*, CtrA (Ryan et al, 2002).

5. 3. Análise da montagem do Divisomo

Dando continuidade ao trabalho de Meira (2010), utilizamos microscopia de série temporal para avaliar a cinética de associação das proteínas ao divisomo. Através de microscopia estática de co-localização com células em diferentes momentos do ciclo, Meira (2010) havia determinado 3 etapas da incorporação de proteínas ao divisomo: proteínas com mais de 95% de co-localização com FtsZ (ZapA e EzrA) em todos os estágios do ciclo foram denominadas “iniciais”; proteínas cuja taxa de co-localização com FtsZ em todos os estágios do ciclo era de 70 a 90% foram denominadas “intermediárias” (FtsL, FtsW e Pbp2B); e proteínas cuja taxa de co-localização com FtsZ era inferior a 50% em todos os estágios do ciclo (YpsB, MinC e DivIVA) foram classificadas como “tardias”. De modo a analisar a montagem do divisomo e a cinética de incorporação destas proteínas no complexo em detalhe e adquirir dados temporais (intervalo em minutos), realizamos *time-lapse* de uma proteína classificada como intermediária e uma proteína classificada como tardia, eleitas como representantes de cada grupo específico.

Observamos que tempo de contração do anel Z é variável entre células individuais, assim como o tempo de formação do anel (mensurado desde o primeiro sinal de FtsZ na região medial célula até o início da contração). Em meio mínimo (TSS) a formação do anel Z ocorreu de 10 a 32 minutos em células individuais (sendo a média de 22 minutos), enquanto o tempo de contração variou de 16 a 34 minutos (com média de 23 minutos); e em meio rico (CH) o tempo de formação do anel variou de 10 a 22 minutos em células individuais (com média de 16 minutos) e o tempo de contração do anel Z variou de 8 a 20 minutos (com média de 13 minutos). Acreditamos que esta variação entre células numa mesma condição se deva a variações estocásticas observáveis em qualquer população isogênica, conceito abordado anteriormente neste trabalho (pp 24-25; Raser e O’Shea, 2005), e também observado por Gamba et al (2009) em meio de germinação, onde o ciclo celular variou entre 40 e 110 minutos. Já a diferença entre o tempo de formação e contração do anel em diferentes meios de cultura provavelmente se deve ao tempo de divisão maior das células em meio mínimo em relação ao meio rico – onde o ciclo celular como um todo é mais curto – além da ausência de precursores prontos para a biossíntese de parede em meio mínimo.

Nas células analisadas, observamos a incorporação de Pbp2B ao divisomo em média 4 minutos em meio mínimo e 3 minutos em meio rico após o primeiro sinal de

anel de FtsZ na região medial da célula. Este resultado difere dos dados obtidos no trabalho de Gamba et al (2009), que observaram que as proteínas da “fábrica de peptideoglicano” só se localizam no divisomo depois de 20% de progressão do ciclo celular (uma média de 12 minutos depois da formação do anel Z em um ciclo médio de 64 minutos). Neste trabalho, Pbp2B localiza-se no divisomo após a progressão de cerca de 8% do ciclo em meio mínimo e 10% da progressão do ciclo em meio rico. No caso de DivIVA, que no trabalho de Gamba et al (2009) também é observado no divisomo após 20% do ciclo celular, observamos um intervalo médio de 20 minutos em meio mínimo e 16 minutos em meio rico na associação da proteína ao divisomo, o que representa 43% e 53% do ciclo, respectivamente. No trabalho de Gamba et al (2009) os experimentos de *time-lapse* foram realizados com apenas uma proteína fusionada a GFP e corante de membrana, com intervalos de 10 a 15 minutos entre as imagens, o que impossibilita a visualização da rápida associação das proteínas da “fábrica de peptideoglicano” observada em nosso trabalho. Acreditamos que o método utilizado no trabalho de Gamba et al (2009) não permitiu resolução suficiente para a detecção das três ondas que Meira (2010) observou na montagem do divisomo, e as proteínas “intermediárias” e “tardias” foram agrupadas em apenas uma onda. Importante notar que, independente do tempo de formação e contração do anel Z, em todas as células observadas DivIVA só co-localiza com FtsZ depois do início da contração do anel. Estes dados, em conjunto com os obtidos por Meira (2010), indicam a formação do divisomo em três etapas distintas (Fig 44).

Figura 44. Modelo da cinética de associação das três ondas de proteínas que compõe o divisomo. Em A, a cor laranja representa a primeira onda (FtsZ e proteínas que ligam diretamente a FtsZ); a cor azul, a segunda onda (Pbp2B e demais proteínas da fábrica de

peptídeoglicano); em cor-de-rosa, a terceira onda (DivIVA e as proteínas marcadoras de pólo). A sobreposição da primeira e da segunda onda é representada em verde; a sobreposição das três ondas é representada em marrom e a sobreposição da segunda e da terceira ondas está representada em lilás. Em B, a localização das proteínas ao longo da divisão: em laranja, FtsZ; em azul, Pbp2B; em cor-de-rosa, DivIVA. A sobreposição de FtsZ e Pbp2B na região do anel é representada em verde.

Em *E. coli*, Aarsman et al (2005) determinaram que, num ciclo de 85 minutos, proteínas constituintes da “fábrica de peptídeoglicano” (FtsQ, FtsW, PBP3 and FtsN) são observadas no divisomo 17 minutos após a formação do anel Z. Acreditamos que só foram visualizadas duas etapas de formação do divisomo em *E. coli* porque não há homólogo de DivIVA neste organismo – ao invés do sistema estático de posicionamento do sistema inibitório MinCD em *B. subtilis*, o sistema de inibição da polimerização de FtsZ nos pólos de *E. coli* conta com MinE, que tem uma posição dinâmica oscilando entre os pólos da célula (Raskin e de Boer, 1999).

No trabalho de Gamba et al (2009), foi discutida a possibilidade de que DivIVA se localizaria na membrana apenas após o início da formação do septo, mas os autores afirmam que, devido ao limite de resolução da microscopia com corante de membrana, isso não poderia ser afirmado com certeza. Nosso trabalho confirma esta hipótese, demonstrando que DivIVA só localiza-se no septo após o início da contração do anel Z, que é acompanhado pela contração do anel de Pbp2B – uma das proteínas sintetizadoras de peptídeoglicano. Esses dados estão em concordância com os dados de Edwards e Errington (2000), Ramamurthi e Losick (2009) e Lenarcic et al (2009) que afirmaram que DivIVA seria atraído ao divisomo pela curvatura negativa da membrana da célula criada pela contração do complexo, e não por uma interação direta com componentes do divisomo. Com o objetivo de confirmar esse fenômeno, procuramos realizar experimentos de *time-lapse* de células com as fusões FtsZ-YFP e DivIVA-CFP em câmaras com os antibióticos Cerulenina (inibidor da produção de ácidos graxos) e Fosfomicina (inibidor da síntese de parede), de modo que a curvatura de membrana e parede na região do divisomo não se formasse. Os resultados foram inconclusivos, uma vez que as células entraram em processo de lise antes da contração do anel (dados não mostrados).

Em *C. crescentus*, além das três ondas de proteínas existentes em *B. subtilis* foram documentadas mais duas (Goley et al, 2011): depois da visualização de FtsZ e

proteínas diretamente ligadas a FtsZ, foi observada a associação de DipN, MurG e MreB, o complexo de elongação; e, em seguida, a incorporação de FtsA. As proteínas sintetizadoras de peptideoglicano são visualizadas no divisomo de *C. crescentus* após a progressão de 25% do ciclo celular, de maneira similar ao observado em *E. coli* (Aarsman, 2005) e diferente do que foi observado neste trabalho em *B. subtilis*. A associação de Pbp2B ao divisomo de *B. subtilis* ocorre em um intervalo muito menor que os observados para a fábrica de peptideoglicano de outras espécies. Uma das possibilidades para explicar esse intervalo seria a variação na expressão gênica de uma das proteínas intermediárias, observada para as proteínas envolvidas na síntese de peptideoglicano FtsI, FtsQ e FtsK em *C. crescentus* (Goley et al, 2011) e não confirmada para FtsL de *B. subtilis* neste trabalho.

Neste trabalho, realizamos e padronizamos os primeiros experimentos de *time-lapse* com dois componentes do divisomo simultaneamente, adquirindo em média 10 fotos de microscopia por ciclo celular. Nossa contribuição se destaca uma vez que o sinal de fluorescência de uma proteína advinda de um gene com cópia única é relativamente baixo, e a taxa de fotoinativação das proteínas fluorescentes – notadamente mCherry (Shaner et al, 2005) – consistiram um desafio, bem como a fototoxicidade decorrente da exposição das células aos comprimentos de onda responsáveis pela excitação das proteínas fluorescentes – em especial as proteínas excitadas em menores comprimentos de onda, como CFP (Wiedenmann, 2009; Shaner et al, 2005). Estes experimentos, portanto, tornaram-se possíveis pela cuidadosa padronização da captura de imagens, uso de equipamento sensível e a abundância da proteína na célula decorrente do uso de promotores indutíveis, padronizada anteriormente por Meira (2010). A resolução temporal do método nos permitiu definir claramente o momento de associação de duas proteínas representantes das ondas componentes do divisomo identificadas por Meira (2010), inclusive confirmando a existência de três ondas na montagem do divisomo em lugar das duas ondas propostas na literatura (Gamba, 2009), além de informações importantes sobre a montagem e contração do anel Z. A padronização deste método o torna aplicável ao estudo da dinâmica de outros complexos macromoleculares em *B. subtilis* e outros organismos (Anexo A – Rados et al, 2013, no prelo) .

6. CONCLUSÕES

Neste trabalho, demonstramos dois usos de microscopia de série temporal em *B. subtilis*, utilizados para investigar a existência de oscilação na expressão de genes envolvidos em divisão e para estudar em detalhe a montagem do divisomo.

Nossos dados de análise de expressão gênica não foram capazes de revelar flutuações na expressão dos genes *ftsL*, *pbpB*, *dnaA*, *minCD*, *ftsZ*, *ftsA* ou *zapA* ao longo do ciclo celular, que aponta para a possibilidade de outros mecanismos de controle temporal na formação do divisomo.

Confirmamos a existência de três ondas na formação do divisomo, e demonstramos em detalhe a associação das proteínas ao complexo, padronizando o uso de microscopia de série temporal para a análise detalhada de outros complexos macromoleculares.

7. REFERÊNCIAS

- Aarsman ME, Plette A, Fraipont, C, Vinkenvle TM, Nguyen-Distèche M, den Blaauwen T. Maturation of the *Escherichia coli* divisome occurs in two steps. Mol Microbiol. 2005. 55(6):1631-45.
- Andersson H, Baechi T, Hoechl M, Richter C. Autofluorescence of living cells. Journal of Microscopy. 1998. 191(1): 1–7.
- Angert ER. Alternatives to binary fission in bacteria. Nat Rev Microbiol. 2005. (3):214-24.
- Arends SJR, Weiss, DS (2003) Inhibiting Cell Division in *Escherichia coli* Has Little If Any Effect on Gene Expression. J. Bacteriol. 2003. 186(3):880-884.
- Bähler J. Cell-cycle control of gene expression in budding and fission yeast. Annu Rev Genet. 2005. 39:69-94.
- Banfalvi G. Synchronization of *Bacillus subtilis* cells by spore germination and outgrowth. Methods Mol Biol. 2011. 761:163-71.
- Bates D, Epstein J, Boye E, Fahrner K, Berg H, Kleckner N. The *Escherichia coli* baby cell column: a novel cell synchronization method provides new insight into the bacterial cell cycle. Mol Microbiol. 2005 Jul;57(2):380-91.
- Bernhardt TG, de Boer PA. SlmA, a nucleoid-associated, FtsZ binding protein required for blocking septal ring assembly over Chromosomes in *E. coli*. Mol Cell. 2005. 18(5):555-64
- Bramkamp M, Weston L, Daniel RA, Errington J. Regulated intramembrane proteolysis of FtsL protein and the control of cell division in *Bacillus subtilis*. Mol Microbiol. 2006 Oct;62(2):580-91.
- Claessen D, Emmins R, Hamoen LW, Daniel RA, Errington J, and Edwards DH. Control of the cell elongation-division cycle by shuttling of PBP1 protein in *Bacillus subtilis*. Mol. Microbiol. 2008. 68:1029–1046
- Cooper S, Helmstetter CE. Chromosome replication and the division cycle of *Escherichia coli* B/r. J Mol Biol. 1968 14;31(3):519–540.

Daniel RA, Errington J. Intrinsic instability of the essential cell division protein FtsL of *Bacillus subtilis* and a role for DivIB protein in FtsL turnover. Mol Microbiol. 2000. 36(2):278-89.

Daniel RA, Harry EJ, Katis VL, Wake RG, Errington J. Characterization of the essential cell division gene *ftsL* (*yIID*) of *Bacillus subtilis* and its role in the assembly of the division apparatus. Mol Microbiol. 1998. Jul;29(2):593-604.

Daniel RA, Williams AM, Errington J. A complex four-gene operon containing essential cell division gene *pbpB* in *Bacillus subtilis*. J Bacteriol. 1996 Apr;178(8):2343-50.

Daniel, R. A., E. J. Harry, and J. Errington. Role of penicillin-binding protein PBP2B in assembly and functioning of the division machinery of *Bacillus subtilis*. Mol. Microbiol. 2000. 35:299-311.

Daniels JK, Caldwell TP, Christensen KA, Chumanov G. Monitoring the kinetics of *Bacillus subtilis* endospore germination via surface-enhanced Raman scattering spectroscopy. Anal Chem. 2006 Mar 1;78(5):1724-9.

Dewara S, Dorazia R. Control of division gene expression in *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Letters. 2000. 187 (1).

Di Talia S, Skotheim JM, Bean JM, Siggia ED, Cross FR. The effects of molecular noise and size control on variability in the budding yeast cell cycle. Nature. 2007. 23;448(7156):947-51.

Donnellan JE, Nags EH, Levinson HS. Chemically defined, synthetic media for sporulation and for germination and growth of *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 1964. 87(2):332-336

Edwards DH, Errington J. The *Bacillus subtilis* DivIVA protein targets to the division septum and controls the site specificity of cell division. Mol Microbiol. 1997. 24(5):905-15.

Elowitz MB, Leibler S. A synthetic oscillatory network of transcriptional regulators. Nature. 2000 20;403(6767):335-8.

Elowitz MB, Levine AJ, Siggia ED, Swain PS. Stochastic Gene Expression in a Single Cell. Science. 2002. 16;297(5584):1183-6

Errington J, Daniel RA, Scheffers DJ. Cytokinesis in bacteria. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2003. 67:52-65.

- Fujita M, Losick R. Evidence that entry into sporulation in *Bacillus subtilis* is governed by a gradual increase in the level and activity of the master regulator Spo0A. Genes & Dev. 2005. 19: 2236-2244
- Gamba P, Veening JW, Saunders NJ, Hamoen LW, Daniel RA. Two-step assembly dynamics of the *Bacillus subtilis* divisome. J Bacteriol. 2009. 191(13):4186-94. .
- Garrido T, Sanchez M, Palacios P, Aldea M, Vicente M. Transcription of *ftZ* oscillates during the cell cycle of *Escherichia coli*. 1993. EMBO J. 12:3957–3965
- Goley ED, Yeh YC, Hong SH, Fero MJ, Abeliuk E, McAdams HH, Shapiro L. Assembly of the *Caulobacter* cell division. Mol Microbiol. 2011. 80(6):1680-98
- Goranov AI, Katz L, Breier AM, Burge CB, Grossman, AD. A transcriptional response to replication status mediated by the conserved bacterial replication protein DnaA. Proc Natl Acad Sci USA. 2005. 102: 12932–12937
- Griffith KL, Grossman AD. Inducible protein degradation in *Bacillus subtilis* using heterologous peptide tags and adaptor proteins to target substrates to the protease ClpXP. Mol Microbiol. 2008. 70(4):1012–1025
- Griffith KL, Grossman, AD. A Degenerate Tripartite DNA-Binding Site Required for Activation of ComA-Dependent Quorum Response Gene Expression in *Bacillus subtilis*. J Mol Biol. 2008. 381:261-275.
- Gueiros-Filho FJ, Losick R. A widely conserved bacterial cell division protein that promotes assembly of the tubulin-like protein FtsZ. Genes Dev. 2002 Oct 1;16(19):2544-56.
- Gueiros-Filho, F.J. Cell division. In: Peter Graumann. (Org.). *Bacillus: Cellular and Molecular Biology*. 2^a ed. Caister Academic Press: Norfolk, UK, 2012.
- Haeusser DP, Levin PA. The great divide: coordinating cell cycle events during bacterial growth and division. Curr Opin Microbiol. 2008. 11(2):94-9.
- Haeusser DP, Garza AC, Buscher, AZ, Levin, PA. The Division Inhibitor EzrA Contains a Seven-Residue Patch Required for Maintaining the Dynamic Nature of the Medial FtsZ Ring. J. Bacteriol. 2007. 189: 9001-901
- Hamoen LW, Meile JC, de Jong W, Noirot P, Errington J. SepF, a novel FtsZ-interacting protein required for a late step in cell division. Mol Microbiol. 2006. 59(3):989-999(11)

Hashimoto T, Friebe WR, Conti SF. Germination of single bacterial spores. J Bacteriol. 1969. 98(3):1011-20.

Howard, M. A mechanism for polar protein localization in bacteria. J Mol Biol. 2004 Jan 9;335(2):655-63.

Hu Z, Lutkenhaus J. Topological regulation of cell division in *Escherichia coli* involves rapid pole to pole oscillation of the division inhibitor MinC under the control of MinD and MinE. Mol Microbiol. 1999. 34(1):82-90.

Kain J, He GG, Losick R. Polar localization and compartmentalization of ClpP proteases during growth and sporulation in *Bacillus subtilis*. J Bacteriol. 2008 Oct;190(20):6749-57.

Kelly AJ, Sackett MJ, Din N, Quardokus E, Brun YV. Cell cycle-dependent transcriptional and proteolytic regulation of FtsZ in *Caulobacter*. Genes Dev. 1998 Mar 15;12(6):880-93.

Kücherer C, Lothar H, Kölling R, Schauzu M, Messer, W. Regulation of transcription of the chromosomal *dnaA* gene of *Escherichia coli*. Molecular and General Genetics MGG. 1986. 205(1):115-121

Laub MT, McAdams HH, Feldblyum T, Fraser CM, Shapiro L. Global analysis of the genetic network controlling a bacterial cell cycle. Science. 2000 Dec 15;290(5499):2144-8.

Lenarcic R, Halbedel S, Visser L, Shaw M, Wu LJ, Errington J, Marenduzzo D, Hamoen LW. Localisation of DivIVA by targeting to negatively curved membranes. EMBO J. 2009 Aug 5;28(15):2272-82.

Levin PA, Margolis PS, Setlow P, Losick R, Sun D. Identification of *Bacillus subtilis* genes for septum placement and shape determination. J. Bacteriol. 1992. 174: 6717-6728.

Longo D, Hasty J. Dynamics of single-cell gene expression. Mol. Syst. Biol. 2006. 64(2):1–10.

Meira, GLS. Estudo do Processo de Divisão em *Bacillus subtilis* por Microscopia de Fluorescência. 2010. 131p. Tese - Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Migocki MD, Freeman MK, Wake RG, Harry EJ. The Min system is not required for precise placement of the midcell Z ring in *Bacillus subtilis*. European Mole. Biol. Org. Rep. 2002. 3(12): 1163-1167.

- Miyagishima SY, Nishida K, Kuroiwa T. An evolutionary puzzle: chloroplast and mitochondrial division rings. Trends Plant Sci. 2003. 8(9):432-8.
- Mohammadi T, van Dam V, Sijbrandi R, Vernet T, Zapun A, Bouhss A, Bruin MD, Nguyen-Distèche M, Kruijff B, Breukink E. Identification of FtsW as a transporter of lipid-linked cell wall precursors across the membrane. EMBO J. 2011 20; 30(8): 1425–1432.
- Mott ML, Berger JM. DNA replication initiation: mechanisms and regulation in bacteria. Nat Rev Microbiol 2007. 5:343-354
- Nagai T, Ibata K, Park ES, Kubota M, Mikoshiba K, Miyawaki A. A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. Nat Biotechnol. 2002 Jan;20(1):87-90.
- Nguyen HD, Nguyen QA, Ferreira RC, Ferreira LC, Tran LT, Schumann W. Construction of plasmid-based expression vectors for *Bacillus subtilis* exhibiting full structural stability. Plasmid. 2005. 54(3): 241-8.
- Nguyen AW, Daugherty PS. Evolutionary optimization of fluorescent proteins for intracellular FRET. Nat. Biotechnol. 2005. 23: 355–360.
- Ozbudak EM, Thattai M, Kurtser I, Grossman AD, van Oudenaarden A. Regulation of noise in the expression of a single gene. Nat Genet. 2002 31(1):69-73
- Thévenaz P, Ruttimann UE, Unser M. A Pyramid Approach to Subpixel Registration Based on Intensity. IEEE Transactions on Image Processing. 1998. 7(1) : 27-41.
- Pichoff, S; Lutkenhaus, J. Identification of a region of FtsA required for interaction with FtsZ. Mol Microbiol. 2007. 64 (4):1129-38
- Ramamurthi KS, Losick R. Negative membrane curvature as a cue for subcellular localization of a bacterial protein. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009. 106(32):13541-5.
- Raser, JM; O'Shea EK. Noise in Gene Expression: Origins, Consequences, and Control. Science. 2005. 5743(309):2010-2013.
- Raskin DM, de Boer PA. Rapid pole-to-pole oscillation of a protein required for directing division to the middle of *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999. 96(9):4971-6.
- Reder A, Pöther DC, Gerth U, Hecker M. The modulator of the general stress response, MgsR, of *Bacillus subtilis* is subject to multiple and complex control mechanisms. Environ Microbiol. 2012. 14(10):2838-50.

Rietdorf, J; Seitz, A. Multiple Kymograph. Plugin para ImageJ, 2004. Disponível em: http://www.embl.de/eamnet/html/body_kymograph.html

Romberg L, Levin PA. Assembly dynamics of the bacterial cell division protein FtsZ: poised at the edge of stability. Annu Rev Microbiol. 2003. 57:125-54.

Rosenberg A, Sinai L, Smith Y, Ben-Yehuda S. Dynamic expression of the translational machinery during *Bacillus subtilis* life cycle at a single cell level. PLoS One. 2012. 7(7):e41921.

Rosenfeld N, Young JW, Alon U, Swain OS, Elowitz, MB. Accurate prediction of gene feedback circuit behavior from component properties. Mol. Syst. Biol. 2007. 3, 143.

Rueda S, Vicente M, Mingorance J. Concentration and assembly of the division ring proteins FtsZ, FtsA, and ZipA during the *Escherichia coli* cell cycle. J. Bacteriol. 2003. 185: 3344-3351.

Ryan KR, Judd EM, Shapiro L. The CtrA response regulator essential for *Caulobacter crescentus* cell-cycle progression requires a bipartite degradation signal for temporally controlled proteolysis. J Mol Biol. 2002 29;324(3):443-55.

Schumacher MA. Bacterial plasmid partition machinery: a minimalist approach to survival. Curr Opin Struct Biol. 2012 Feb;22(1):72-9.

Setlow P. Spore germination. Curr Opin Microbiol. 2003 6(6):550-6.

Shaner, N. C.; Steinbach, P. A.; Tsien, R. Y. A guide to choosing fluorescent proteins. 2005 Nat Meth 2: 905-909

Shapiro L, Agabian-Keshishian N, Bendis I. Bacterial differentiation. Science. 1971 3;173(4000):884-92.

Sharpe, ME.; Hauser, PM; Sharpe, RG.; Errington, J. *Bacillus subtilis* Cell Cycle as Studied by Fluorescence Microscopy: Constancy of Cell Length at Initiation of DNA Replication and Evidence for Active Nucleoid Partitioning. Bacteriol. 1998 180(3): 547–555.

Sigal A, Milo R, Cohen A, Geva-Zatorsky N, Klein Y, Liron Y, Rosenfeld N, Danon T, Perzov N, Alon U. Variability and memory of protein levels in human cells. Nature. 2006 444(7119):643-6.

Spellman PT, Sherlock G, Zhang MQ, Iyer VR, Anders K, Eisen MB, Brown PO, Botstein D, Futcher B. Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization. Mol Biol Cell. 1998 9(12):3273-97.

- Suel, GM, Garcia-Ojalvo, J, Liberman, LM & Elowitz, MB. An excitable gene regulatory circuit induces transient cellular differentiation. 2006. Nature 440, 545–550
- Suel GM, Kulkarni RP, Dworkin, J, Garcia-Ojalvo, J & Elowitz, MB. Tunability and noise dependence in differentiation dynamics. Science 315, 1716–1719 (2007).
- Taniguchi Y, Choi PJ, Li GW, Chen H, Babu M, Hearn J, Emili A, Xie XS. Quantifying *E. coli* proteome and transcriptome with single-molecule sensitivity in single cells. Science. 2010 329(5991):533-8.
- Tavares JR, de Souza RF, Meira GL, Gueiros-Filho FJ. Cytological characterization of YpsB, a novel component of the *Bacillus subtilis* divisome. J Bacteriol. 2008. 190(21):7096-107
- Thanbichler M, Shapiro L. Getting organized--how bacterial cells move proteins and DNA. Nat Rev Microbiol. 2008. 6(1):28-40.
- Vary JC, Halvorson HO. Kinetics of Germination of *Bacillus* spores. J Bacteriol. 1965 89:1340-7.
- Wang JD, Levin PA. Metabolism, cell growth and the bacterial cell cycle. Nat Rev Microbiol. 2009. 7(11):822-7.
- Weart RB, Levin PA. Growth rate-dependent regulation of medial FtsZ ring formation. J Bacteriol. 2003 May;185(9):2826-34.
- Wheelan SJ, Murillo FM, Boeke JD. The incredible shrinking world of DNA microarrays. Mol Biosyst. 2008.4(7): 726–732.
- Wiedenmann, J, Oswald F, Nienhaus, GU, Fluorescent proteins for live cell imaging: Opportunities, limitations, and challenges. IUBMB Life, 2009./61: 1029–1042.
- Wortinger M, Sackett MJ, Brun YV. CtrA mediates a DNA replication checkpoint that prevents cell division in *Caulobacter crescentus*. EMBO J. 2000/1;19(17):4503-12.
- Wu LJ, Errington J. Coordination of cell division and chromosome segregation by a nucleoid occlusion protein in *Bacillus subtilis*. Cell. 2004./117(7):915-25.
- Youngman PJ, Perkins JB, Losicks R Genetic transposition and insertional mutagenesis in *Bacillus subtilis* with *Streptococcus faecalis* transposon Tn917. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 1983. 80: 2305–2309.

Zaman MS, Goyal A, Dubey GP, Gupta PK, Chandra H, Das TK, Ganguli M, Singh Y. Imaging and analysis of *Bacillus anthracis* spore germination. Microsc Res Tech. 2005. 66(6):307-11.

Zhou P, Helmstetter C. E. Relationship between *ftsZ* gene expression and chromosome replication in *Escherichia coli*. 1994 J Bacteriol. 176:6100–610.

Zweiger G, Shapiro L. Expression of *Caulobacter dnaA* as a function of the cell cycle. J. Bacteriol. 1994. 176 (2):401-408

7. APÊNDICES

7.1 Apêndice I – Gráficos suplementares da fusão *ftsL-pbpB* Ypet-AISV

Exemplos de gráficos da quantificação de células individuais da cepa TV39. O momento estimado de divisão é marcado com a barra vertical. Picos com intensidade 30% maior que a média de intensidade de fluorescência da célula são indicados por setas. A linha vermelha representa o valor de autofluorescência de PY79. Cada gráfico representa uma célula, acompanhada individualmente ao longo de sucessivas divisões.

7.2 Apêndice II – Gráficos e quimogramas suplementares

7.1.1 Pbp2B

7.1.1.2 Meio TSS

Exemplos de quimogramas e gráficos da incorporação de Pbp2B-GFP ao divisomo em meio TSS. Cada quimograma e respectivo gráfico representam uma célula, acompanhada ao longo da divisão de 4 em 4 minutos. Cada coluna do quimograma representa um quadro do filme.

7.1.1.2 Meio CH

Exemplos de quimogramas e gráficos da incorporação de Pbp2B-GFP ao divisomo em meio CH. Cada quimograma e respectivo gráfico representam uma célula, acompanhada ao longo da divisão de 150 em 150 segundos. Cada coluna do quimograma representa um quadro do filme.

7.1.2 DivIVA

7.1.2.1 Meio TSS

Exemplos de quimogramas e gráficos da incorporação de DivIVA-CFP ao divisomo em meio TSS. Cada quimograma e respectivo gráfico representam uma célula, acompanhada ao longo da divisão de 2 em 2 minutos. Cada coluna do quimograma representa um quadro do filme.

7.1.2.2 Meio CH

Exemplos de quimogramas e gráficos da incorporação de DivIVA-CFP ao divisomo em meio CH. Cada quimograma e respectivo gráfico representam uma célula, acompanhada ao longo da divisão de 2 em 2 minutos. Cada coluna do quimograma representa um quadro do filme.

FtsZ-YFP

DivIVA-CFP

FtsZ-YFP

DivIVA-CFP

FtsZ-YFP

DivIVA-CFP

9. LISTA DE ANEXOS

9.1. Anexo A: Rados TAV, Meira GLS, Gueiros-Filho, FJ. **Colocalization microscopy to study protein complex assembly in live cells.** Journal of Visual Experiments, 2013 (no prelo).

9.2 Anexo B: Súmula Curricular

Anexo A – Rados et al, 2013, no prelo

Colocalization microscopy to study protein complex assembly in live cells

Theopi A. V. Rados
Departamento de Bioquímica – Instituto de Química
Universidade de São Paulo
varvakis@gmail.com

Guilherme L. S. Meira
Departamento de Bioquímica – Instituto de Química
Universidade de São Paulo
guilhermelouzada@yahoo.com.br

Frederico J. Gueiros-Filho
Departamento de Bioquímica – Instituto de Química
Universidade de São Paulo
fgueiros@iq.usp.br

Corresponding author: Frederico J. Gueiros-Filho

Keywords: (minimum 4, maximum 10)
time-lapse microscopy, GFP, mCherry, FtsZ, cell division, *Bacillus subtilis*

Short abstract:

We describe a microscopy method to study protein complex assembly *in vivo* based on tracking the co-localization of complex components at the population and single cell level. The approach is being used to study the cell division complex of the bacterium *Bacillus subtilis* but should be generally applicable.

Long Abstract

Cellular biochemistry is executed by elaborate protein complexes which have been likened to molecular machines. One important challenge to the understanding of molecular machines is to determine how their components assemble together into a functional complex. Here we describe a microscopy method to study the pathway and dynamics of protein complex assembly *in vivo*. The method is based on the measurement of co-localization between pairs of components of a protein complex, each tagged with a spectrally distinct fluorescent protein (FP). Tracking of co-localization is done at the population level in static pictures and confirmed by time lapse microscopy, which can provide temporal information about the assembly steps in individual cells.

As an example, we apply this strategy to the study of the divisome, the protein machine responsible for cell division in bacteria^{1,2}. The first step in divisome assembly is the polymerization of the tubulin-like protein FtsZ into a structure that is visible as a transversal band or “ring” that spans the width of the cell³. Subsequently, the FtsZ ring will serve as the scaffold for the assembly of the remaining divisome proteins⁴. Measuring the frequency of co-localization between FtsZ tagged with mCherry and other divisome components tagged with GFP in both static and time lapse experiments revealed that the divisome is assembled in at least three steps and allowed the determination of the duration of these steps. This simple, yet powerful, approach can be applied to study any protein complex of interest, be it in bacteria or eukaryotic cells.

Protocol Text:

A) Population measurement of co-localization frequencies

1) Cell culture

We describe the growth of *Bacillus subtilis* in a rich medium for which its cell cycle has been well characterized ⁵. Adjust culture conditions (media, temperature, aeration, etc.) to the organism of choice and needs. If protein fusion is not under a natural promoter, we recommend optimizing induction time and inductor concentration. One important point about culture conditions is to avoid media that exhibit high autofluorescence because this will hamper the ability to detect signal from the FP fusions.

1.1) Streak cells from a -80°C stock onto a LB-agar plate with proper antibiotics, supplements or inducers (IPTG, xylose), when required. Incubate the plate at 37°C overnight.

1.2) Take a fresh single colony and inoculate it in 2 mL CH medium ⁶. Make 10-fold serial dilutions (10^{-2} to 10^{-8} dilutions) and leave them in a rotating wheel at room temperature overnight.

1.3) Select dilution that is still exponential in the morning and dilute it to OD₆₀₀ 0.05. Add the inducers at this time. Grow cells at selected temperature until they reach an OD₆₀₀ 0.2-0.4.

1.4) Re-dilute cells in CH medium with inducers to OD₆₀₀ 0.05 and grow it to OD₆₀₀ 0.3. While the cells are growing prepare the slides or time lapse chambers that will be used for microscopy (section 2, below)

1.5) Grow cells in a minimal medium to study the same phenomenon at slower growth rates.

2) Slide preparation

2.1) Live cell microscopy must be performed on cells mounted on a thin layer of agarose-hardened medium. Mounting cells directly on glass will quickly alter protein localization and viability. Use a clean, plain slide. If only frosted slides are available, keep frosted side up.

2.2) Heat medium and 1% agarose until agarose is fully dissolved. Calculate 8 mL of medium for 10 slides. Since image acquisition is performed in a very short time, inducers are not necessary.

2.3) On a flat surface, add a thin layer of medium (600 µL) to each slide and quickly make a sandwich by placing another slide on top. Gently press upper slide with fingers to ensure that the layer of medium between the slides will be even. Be careful not to create air bubbles. Placing the upper slide at a 45° angle before lowering it over the bottom slide reduces trapping of air bubbles.

2.4) Let agarose solidify at room temperature (should take about 20-30 min).

2.5) PBS + 1% agarose slides can be used to avoid medium auto-fluorescence problems. However, switching live cells from medium to PBS may perturb protein localization. It is essential to check how your cells and protein fusions respond to a change from medium to buffer.

3) Standard Microscopy

The most common pair for dual color imaging experiments is CFP-YFP. Another popular pair is GFP-mCherry and we have used it for most of our analyses. mCherry can be paired also with CFP or YFP. With proper filters, the signal from each FP in these combinations can be captured with no contaminating cross-talk from the other FP. To determine if the microscopy setup can separate the signals from the FPs in a pair, do simple controls imaging each FP fusion separately with the filters for both FPs in the pair. In our hands mCherry is generally less bright and photobleaches faster than the other FPs. This can be an issue for time-lapse experiments. We do not recommend FPs or dyes that have blue emission for time-lapse experiments, as UV excitation damages the cells.

3.1) Open slide sandwich gently so that only a thin layer of agarose remains on top of one of the slides. Before removing top slide, it may be helpful to remove excessive agarose from the sides with a blade. Little damage to the corners of the agarose pad will not be a problem;

3.2) To assure you have an even surface, cut excessive agarose with a blade, leaving a pad that is slightly bigger than the coverslip;

3.3) Place 2 μ L of previously grown culture over a 18 x 18 mm coverslip (number 1.5) and carefully invert coverslip onto agarose layer; Place bacterial cells on the slide only at the actual time of the experiment.

3.4) Analyze sample under a fluorescence microscope. Focus cells with transmitted light (phase-contrast, DIC or brightfield), then switch to fluorescent light only at the time of acquiring a picture. Focusing cells with fluorescence will lead to photobleaching and lower quality images.

3.5) Be quick photographing cells since proteins start to lose their proper localization after some time in a non-ideal environment such as a slide (remember that the cells are alive and that in a slide with a very thin layer of medium the oxygen supply will be limited); For divisome proteins this time is around 15 minutes but the stability of different protein complexes under similar microscopy conditions may vary and must be determined in each case.

4) Analysis

Here we describe data analysis using ImageJ software because it is a widely used open source program. Commercial software such as NIS-Elements and Metamorph have equivalent capabilities and can also be used.

4.1) When working with dynamic cellular structures, one must first define criteria of what will be considered that structure for scoring purposes. In our case, we considered a ring any accumulation of fluorescence over the surrounding background that can be seen as a transversal band that completely spans the width of the cell.

4.2) Open images on ImageJ and adjust contrast and brightness to optimize visualization of ring structures. Avoid overly processing the images as this can lead to artifacts.

4.3) Use separate grayscale images for each channel for scoring. Do not color merge as this will often mask the dimmest structures. Full-formed FtsZ rings in all stages are marked in the first channel (red), and then the corresponding cells are inspected for the presence of rings of the divisome protein of interest in the green channel. The co-localization frequency is the fraction of FtsZ rings that also display a ring of the divisome protein of interest.

4.4) Co-localization experiments should be carried out in three separate days, and at least 100 rings should be counted for each experiment.

B) Time-lapse analysis of co-localization in individual cells

1) Cell culture

Cell culture procedure is the same as for co-localization experiment (A).

2) Time-lapse chamber preparation

Time-lapse experiments require cells to stay alive and replicate for a while on the slides. Therefore cells have to be mounted on thicker pads of agarose solidified medium. Below we describe a streamlined procedure for time-lapse microscopy. For an alternative and more detailed protocol readers may also want to check a paper recently published in JoVE whose focus is on time-lapse microscopy of *B. subtilis* cells⁷.

2.1) Use an aluminum slide (70 x 24 x 2.5 mm) with a 15 mm diameter hole in the middle (Figure 1). Alternatively, you may use glass slides with gene frames to create time lapse chambers⁷.

2.2) With a clean pipette tip, spread atoxic grease (silicone grease or vaseline) around the hole of the chamber (Fig 1, A);

2.3) Adhere a clean coverslip to the grease (Fig 1, B) and press to allow full adhesion;

2.4) In a microwave, heat medium (for 5 chambers, 7 mL will suffice) with 1% agarose. Make sure agarose dissolves completely. Cool it under tap water to about 50°C and add inducers and other labile supplements; Stains can be used in chambers. To use membrane dye FM5-95, stain cells prior to applying to chamber with usual concentration of the dye. On chamber, dilute dye to 10 fold less than the usual concentration in cooled medium.

2.5) Turn the chamber so that the coverslip remains on the bottom, and apply 700 μL of medium to the hole. (Fig 1, C);

2.6) Acting quickly to avoid agarose gelation, cover the medium with a slide (Fig 1, D). Apply pressure with fingers to ensure the medium will solidify flatly. Be careful not to create air bubbles;

2.7) Allow agarose to solidify (takes around 25 minutes at room temperature) then place chamber in selected temperature incubator for 20 minutes. This last step is not required, but eases bacterial adaptation;

2.8) Carefully remove upper slide. With a clean scalpel or razor blade, cut half of solidified medium (it is better to leave a portion of agarose still attached to aluminum, to reduce cell movement during the experiment) to create air supply (Fig 1, E);

2.9) Apply 1 μL of previously grown culture to agarose. Allow the drop to dry completely before sealing the chamber. Monitor drying by observing the drop reflection on the surface of the agarose. It is important that the culture dry completely before sealing the chamber to avoid cell movement and other types of drift.

2.10) Adhere upper coverslip as in steps 2.2 and 2.3.

2.11) Incubate sealed chamber at selected temperature for 40 min before imaging. Usually cells are grown at 37°C, at which temperature cells grow faster and fluorescent fusions are bright enough for good images. Nevertheless, some fluorescent proteins have better folding and will be brighter at 30°C, such as mCherry. The lower intensity of mCherry at 37°C should not be an issue in static photos. However, for time-lapse experiments working at 30°C is highly recommended.

3) Time-lapse microscopy

3.1) In time-lapse experiments, a temperature control system is crucial. Remember to pre-heat the microscope incubation chamber for at least 1 h before starting the experiment. An autofocus or focus control system is also highly desirable as even the most stable microscopes will suffer focus drift during long observations. We use Nikon's Perfect Focus System (PFS).

3.2) Focus on brightfield, turn the PFS on and do only minor focus adjustments in fluorescence using the offset control of the PFS system.

3.3) Move objective to an adjacent field, so that experiment does not start with the already photobleached cells used to focus.

3.4) Use Neutral Density filters to cut down excitation light and protect cells from photobleaching and phototoxicity. We usually lower excitation to at least 1/8 of its original intensity.

3.5) Use low exposure times - in time-lapses with mCherry fusions, 0.4 s is usually enough. Keep intervals between pictures as short to have more detailed kinetic series, but refrain from taking too many pictures as cells will suffer from photobleaching and phototoxicity. We have found that we can take pictures at 2.5-3 minute intervals in CH medium – under these conditions, we are able to acquire around 20 frames of the FtsZ-mCherry fusion before photobleaching becomes an issue. If more frames are needed, consider lowering exposure time and/or further decreasing the excitation light intensity with ND filters.

3.6) If available, an Electron Multiplying CCD camera will allow the use of shorter exposure times and thus reduce photobleaching and photodamage of cells.

3.7) We recommend doing a standard co-localization experiment first. In this experiment, take time to determine the lowest exposure time that produces useful pictures, prior to the actual time-lapse experiment;

3.8) Consider the effects of photobleaching. When testing for ideal settings, especially with proteins fused to mCherry and YFP-Venus, do not expect all frames to look like the first picture. Take at least two pictures of the same field and set exposure and gain (when available) according to the third picture.

4) Analysis

4.1) Open time-lapse file on ImageJ. Work with merged channels.

4.2) Choose a cell with a complete cycle in your time-lapse interval.

4.3) Using the “Stack” option, transform the stack into individual images. Create a ROI area that selects the whole cell, manually crop (Ctrl+Shift+X) the area of interest in all frames keeping cell centralized;

4.4) Using the “Stack” option again, make a new stack from cropped images;

4.5) Use “Split Channels” tool and “Make Montage” tool to create a panel with images like Fig. 4.

4.6) Visually inspect time-series to determine time delay between Z ring appearance and divisome protein recruitment. Do this for a number of individual cells and express results as a range.

4.7) If large amounts of data are to be analyzed, automated image analysis tools are highly recommended. Two examples of freeware of increasing popularity are MicrobeTracker⁸, which is tailored to the specificities of imaging bacteria, and CellProfiler⁹, a more general package.

Representative Results

Figure 3 shows representative images of the colocalization between FtsZ and two different divisome proteins. In the case of FtsL (panels A, B, C), most FtsZ rings detected in the red channel (A) exhibit a corresponding FtsL ring in the green channel (B). Counting of ~900 rings over three independent experiments allowed determination of an average frequency of co-localization of 83% between FtsZ and FtsL. In contrast, FtsZ and DivIVA (Panels D, E, F) exhibit a co-localization frequency of only 46%. Based on these measurements, one can conclude that FtsL is incorporated into the divisome earlier than DivIVA. Figure 4 shows a time-lapse experiment that confirms that DivIVA is recruited late to the divisome, taking 12 to 18 minutes to start to accumulate on a preassembled FtsZ ring. Because the divisome lifetime under the growth conditions of the experiment is 25 minutes, the 12 minute delay of DivIVA arrival represents almost half of the life of the complex.

Tables and Figures:

Figure 1: Making a time lapse chamber. A, B: Adhere a coverslip to one of the sides of a hollow aluminum slide using silicone grease or vaseline. C, D: Fill chamber with molten medium and flatten it with glass slide. E: Use a razor blade or scalpel to cut part of the agar pad and create room for air. F: After adding sample to agarose pad and letting it dry, cover with another coverslip and take it to microscope.

Figure 2: Rationale of co-localization measurements. This simplified cartoon depicts the expected co-localization results of proteins that associate with the divisome at different moments in its assembly. In panel A and B we have a hypothetical series of steps of divisome assembly. FtsZ is represented by red circles and other divisome proteins are ovals or diamonds. An “early” protein (oval, highlighted green in panel A) will associate with the divisome soon after its initial assembly. Because growing bacterial populations are asynchronous and contains cells in all stages of the division process, taking a snapshot of the cells in panel A will reveal a high frequency of co-localization between FtsZ and the green oval protein (in this case, the frequency would be 75%: 3 out of 4 FtsZ rings also contained the green oval protein). Likewise, analysis of a “late” protein (blue diamonds in panel B) will reveal a low frequency of co-localization between FtsZ and the blue diamond protein (in this case, the frequency would be 25%: 1 out of 4 FtsZ rings also contained the blue diamond protein). Co-localization frequencies can then be used to define a pathway for complex assembly, as shown in C (here, the percentages under the arrows indicate the co-localization frequencies). In some situations divisome assembly can be synchronized in the bacterial population (see for example, ¹⁰). In this case, we could follow the incorporation of components in the complex by tracking the increase in their co-localization frequency over time, as depicted in the idealized graph in D.

Figure 3: Co-localization between FtsZ-mCherry (A) and FtsL-GFP (B), and merge of both channels (C), FtsL and FtsZ co-localize 83%. Co-localization between FtsZ-mCherry (D) and DivIVA-GFP (E), and merge of both channels (F), shows that DivIVA is a late cell division protein, with a co-localization rate of 46%. Arrows indicate examples of co-localized (yellow) and non-colocalized (red and green) structures. The frequency of co-localization is calculated as the number of co-localized structures divided by the total number of FtsZ rings (yellow/yellow+red). The green arrows show cases in which the divisome protein remains at the division site after the disappearance

of the FtsZ rings. This is particularly clear for DivIVA, a protein known to remain associated with the newly formed septum. However, the green structures are not relevant for the scoring of co-localization.

Figure 4: Time lapse co-localization experiment. Sequence of images of a strain expressing YFP-FtsZ and DivIVA-CFP acquired with a 2.5 minute time interval. In this sequence, DivIVA arrives at the division complex only at the fifth frame. This represents a delay of 12.5 minutes.

Discussion

Here we describe a live cell microscopy strategy to study the *in vivo* assembly of protein complexes. The method employs co-localization frequencies between components to infer steps in complex assembly and time-lapse microscopy to characterize the dynamics of the predicted assembly steps. A similar approach has been recently used to characterize the cell division complex of the bacterium *Caulobacter crescentus*¹⁰. The method can also be used to eukaryotic cells, if adjustments are made to adapt the cultivation and live cell microscopy procedures to the cell type of interest (for example, many animal cells are imaged adhered to glass bottom dishes, instead of being mounted on agarose pads, as described here).

Live imaging approaches akin to the one described here represent the perfect complement to genetic and *in vitro* reconstitution experiments and are being widely used to study the dynamics of eukaryotic protein complexes¹¹⁻¹³. In the case of bacteria, there are several interesting protein machines whose assembly and dynamics are poorly characterized. One example is the type-three secretion system (TTSS)^{14,15}. The TTSS of several bacteria are developmentally regulated and only become expressed and assembled upon the presence of a signal^{16,17}. Thus, to study the assembly of a TTSS one would have to induce TTSS expression with the appropriate signal and follow the kinetics of co-localization of its components like in the graph of Figure 3D.

When studying a new protein complex whose pathway of assembly is completely unknown, doing pairwise co-localization experiments with several combinations of proteins should allow an initial distinction of early versus late complex components. With this information in hand, a finer study can then be performed with selected protein components.

A critical aspect of using FP microscopy to follow protein complexes *in vivo* is to work with functional fusions at physiological expression levels. Overexpression of fusions can perturb the process under study and generate artefactual data¹⁸. Working with physiological FP fusion levels, in turn, means that samples will display a low intensity of fluorescence. This is particularly true in the case of bacterial cells which are smaller and contain fewer molecules of their protein components than eukaryotic cells, and poses a challenge to the execution of time-lapse experiments. Thus, another important requirement for successful live cell microscopy is to thoroughly optimize your fluorescence microscopy setup. Simple measures such as matching filters to fluorophores (for example, specialized filters tend to be better than FITC filters to image GFP) use of high quality slides and coverslips and of non-fluorescent immersion oil can significantly improve the signal-to-noise ratio of images.

Acknowledgments

This work was funded by grant 08/58821-1 from Fundação de Amparo a Pesquisa de São Paulo (FAPESP). T.A.V.R. was a recipient of a M.Sc. fellowship from CAPES and G.L.S.M. was a recipient of a Ph.D. fellowship from CNPq.

Disclosures

We have nothing to disclose

References

1. Goehring, N.W. & Beckwith, J. Diverse paths to midcell: assembly of the bacterial cell division machinery. *Curr Biol* **15**, R514-26 (2005).
2. Gueiros-Filho, F. Cell division. in *Bacillus: Cellular and Molecular Biology* (ed. Graumann, P.L.) 85-122 (Caister Academic Press, Norfolk, 2011).
3. Bi, E.F. & Lutkenhaus, J. FtsZ ring structure associated with division in *Escherichia coli*. *Nature* **354**, 161-4 (1991).
4. Adams, D.W. & Errington, J. Bacterial cell division: assembly, maintenance and disassembly of the Z ring. *Nat Rev Microbiol* **7**, 642-53 (2009).
5. Sharpe, M.E., Hauser, P.M., Sharpe, R.G. & Errington, J. *Bacillus subtilis* cell cycle as studied by fluorescence microscopy: constancy of cell length at initiation of DNA replication and evidence for active nucleoid partitioning. *J Bacteriol* **180**, 547-55 (1998).
6. Sterlini, J.M. & Mandelstam, J. Commitment to sporulation in *Bacillus subtilis* and its relationship to development of actinomycin resistance. *Biochem J.* **113**, 29-37. (1969).
7. de Jong, I.G., Beilharz, K., Kuipers, O.P. & Veening, J.W. Live Cell Imaging of *Bacillus subtilis* and *Streptococcus pneumoniae* using Automated Time-lapse Microscopy. *J Vis Exp* (2011).
8. Sliusarenko, O., Heinritz, J., Emonet, T. & Jacobs-Wagner, C. High-throughput, subpixel precision analysis of bacterial morphogenesis and intracellular spatio-temporal dynamics. *Mol Microbiol* **80**, 612-27 (2011).
9. Carpenter, A.E. et al. CellProfiler: image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes. *Genome Biol* **7**, R100 (2006).
10. Goley, E.D. et al. Assembly of the *Caulobacter* cell division machine. *Mol Microbiol* **80**, 1680-98 (2011).
11. Kaksonen, M., Sun, Y. & Drubin, D.G. A pathway for association of receptors, adaptors, and actin during endocytic internalization. *Cell* **115**, 475-87 (2003).
12. Wan, X. et al. Protein architecture of the human kinetochore microtubule attachment site. *Cell* **137**, 672-84 (2009).
13. Dultz, E. & Ellenberg, J. Live imaging of single nuclear pores reveals unique assembly kinetics and mechanism in interphase. *J Cell Biol* **191**, 15-22 (2010).
14. Galan, J.E. & Wolf-Watz, H. Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. *Nature* **444**, 567-73 (2006).
15. Izore, T., Job, V. & Dessen, A. Biogenesis, regulation, and targeting of the type III secretion system. *Structure* **19**, 603-12 (2011).
16. Sperandio, V., Mellies, J.L., Nguyen, W., Shin, S. & Kaper, J.B. Quorum sensing controls expression of the type III secretion gene transcription and protein secretion in enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 15196-201 (1999).
17. Lee, V.T., Mazmanian, S.K. & Schneewind, O. A program of *Yersinia enterocolitica* type III secretion reactions is activated by specific signals. *J Bacteriol* **183**, 4970-8 (2001).
18. Doyon, J.B. et al. Rapid and efficient clathrin-mediated endocytosis revealed in genome-edited mammalian cells. *Nat Cell Biol* **13**, 331-7 (2011).

Name of Reagent	Company	Catalog Number
Media and Supplements		
LB Broth, Miller (Luria Bertani)	Amresco	J106-2KG
Ammonium Chloride	EM Science	AX-1270-1
Ammonium Nitrate	Alfa Aesar	12363
Calcium Chloride	Alfa Aesar	12316
Casein Hydolysate	Merck	1.022.450.500
IPTG	Serva	26600
Iron (III) Chloride	Alfa Aesar	12497
L-Alanine	Sigma-Aldrich	A7627
L-Asparagine	Amresco	94341-100G
L-Glutamic Acid	Amresco	0421-1KG
L-Tryptophan	Amresco	E800-100G
Magnesium Sulfate	Alfa Aesar	11596
Manganese (II) Sulfate	Alfa Aesar	33341
Monopotassium Phosphate	Amresco	0781-500G
Sodium Sulfate	Amresco	0836-1KG
Microscopy - Equipments		
Camera	Andor	iXon EMCCD
CFP Filter	Semrock	CFP-2432A-000-ZERO
Chamlide TC Incubator	LCI	TC-L-Z003
Eclipse TI microscope	Nikon	
GFP filter	Semrock	GFP-3035B-000-ZERO
Lamp	Nikon	Intensilight C-HGFI
mCherry Filter	Semrock	mCherry-A-000-ZERO
Objective	Nikon	CFI Plan Apo VC 100X
YFP filter	Semrock	YFP-2427-000-ZERO
Microscopy - Reagents and slides		
22X22mm Coverslips	Knittel	102222
26X76mm Glass Slides	Perfecta	200
Agarose (UltraPure)	Invitrogen	15510-027

Table 1. Reagents and Equipments

Figure 1 - Rados et al.

Figure 2 - Rados et al.

Figure 3 - Rados et al.

Figure 4 - Rados et al.

Anexo B – Súmula Curricular

DADOS PESSOAIS

Nome: Theopi Alexandra Varvakis Rados

Local e data de nascimento: Porto Alegre, 16 de julho de 1986.

EDUCAÇÃO

Colégio Energia, Florianópolis (SC), 2003.

Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis (SC), 2009.

Enfermagem (Bacharel)

OCUPAÇÃO

Bolsista de Mestrado, CNPq, 2010-2012.

PUBLICAÇÕES

Artigos completos publicados em periódicos

1. Ishida MMI, Almeida MSS, Espíndola NM, Iha A, Pereira DA, Souza JG, Varvakis TAR, Vaz AJ. Seroepidemiological study of human cysticercosis with blood samples collected on filter paper, in Lages, State of Santa Catarina, Brazil, 2004-2005. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2011. 44: 339-343.

2. Kunz JM, Vieira AS, Varvakis TAR, Gomes GA, Rosetto ALOF, Bernardini OJ, Almeida MSS, Ishida MMI. Parasitas intestinais em crianças de escola municipal de Florianópolis, SC - Educação ambiental e em saúde. Biotemas (UFSC). 2008. 21: 157-162.

Resumos publicados em anais de congressos

1. Gene expression of divisome proteins in the *Bacillus subtilis* cell cycle In: XXXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq, 2010, Foz Iguaçu. Livro de Resumos, 2010.

2. Varvakis TAR, Gueiros-Filho FJ. Gene expression of cell division proteins in *Bacillus subtilis* cell cycle. In: 27a. REGEM, 2010, Guarujá. Anais da 27a. Reunião de Genética de Microrganismos.

3. Ishida MMI, Varvakis TAR, Almeida MSS, Espíndola NM, Iha A, Pereira DA, Vaz AJ, Souza JG. Immunodiagnosis of Cysticercosis by ELISA with Whole Blood and by Immunoblot Assay Using Taenia crassiceps Heterologous Antigen in Santa Catarina State, Brazil. In: XX Congresso Brasileiro de Parasitologia, 2007, Recife. Revista Brasileira de Patologia Tropical. Goiânia : SBP, 2007. v. 36. p. 347-347.

5. Varvakis TAR, Ishida MMI, Vieira AS, Bernardini OJ, Almeida MSS, Kunz JM, Rosetto ALOF, Gomes GA, Gonçalves, J. Avaliação de Parasitoses Intestinais em Escolares: Educação Ambiental e em Saúde. In: XX Congresso Brasileiro de Parasitologia, 2007, Recife. Revista de Patologia Tropical. Goiânia : SPB, 2007. v. 36. p. 697-697.