**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**
**INSTITUTO DE QUÍMICA**
**Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)**

JHONATHAN STIVINS BENITES PARIENTE

# Estudo do papel de MinD na ativação de MinC, um regulador chave da divisão bacteriana em *Bacillus subtilis*

**Versão corrigida da Dissertação defendida**

**São Paulo**
**Data do Depósito na SPG:**
**14/09/2015**

JHONATHAN STIVINS BENITES PARIENTE

# Estudo do papel de MinD na ativação de MinC, um regulador chave na divisão bacteriana 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**
**2015**

**Ficha Catalográfica**
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Benites Pariente, Jhonathan Stivins
B467e Estudo do papel de MinD na ativação de MinC, um regulador chave na divisão bacteriana em *Bacillus subtilis* / Jhonathan Stivins Benites Pariente. -- São Paulo, 2015.
79p.

Dissertação (mestrado) – Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Bioquímica.
Orientador : Gueiros Filho, Frederico José

1. Proteína : Bioquímica 2. Microbiologia I. T. II. Gueiros Filho, Frederico José, orientador.

574.19245 CDD

**A minha família,**

**por sempre me apoiarem nas minhas decisões.**

## AGRADECIMENTOS

Ao escrever estas linhas sinto uma especial satisfação. Em parte porque representa a parte final de um longo trabalho, mas principalmente porque posso expressar meu agradecimento a todas aquelas pessoas que me acompanharam neste caminho e, de uma maneira ou outra, contribuíram para atingir esse objetivo.

Aos meus pais: Jorge e Flor, por ter me brindado tudo o apoio necessário para sair adiante e sobre todo por ter me ensinado valores na minha formação. Aos meus irmãos: Dampier, Mónica e Cinthya, porque confiaram em mim sempre.

Meu agradecimento ao Dr. Frederico José Gueiros Filho, orientador do presente trabalho, pela oportunidade, ensinamentos e a sua orientação.

Ao Dr. Richard Garrat, por ter confiado em mim e me apoiado sempre.

Ao time do laboratório: Valdir, Bisson, Diego, André, Ash e Rodrigo. Pelos ensinamentos ao longo da minha estadia no lab. Agradeço mais pela amizade oferecida e por ter voltado o laboratório uma segunda casa.

Aos meus parceiros da Republica: Leandro, Edgar, Zaqueu, Raula, Ariel e Rodrigo, por sua amizade e por ser minha família em São Paulo.

Aos meus amigos todos, que me fazem sentir profundamente afortunado e sem cujo apoio esse trabalho não houvesse sido possível. Obrigado por ter estado sempre comigo.

Aos laboratórios dos Professores: Chuck, Alicia e Sueley por ter me permitido o uso de alguns equipamentos.

A CAPES e CNPq pela bolsa concedida.

Minha profunda gratidão para todos.

**RESUMO**

Pariente, J.S.B. **Estudo genético e bioquímico do papel de MinD na ativação de MinC, um regulador chave na divisão bacteriana em *Bacillus subtilis*.** 2015. 79p. Tese – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo-Brasil.

A divisão bacteriana é efetuada por um complexo macromolecular conhecido como divisomo. Um componente central do divisomo é FtsZ, uma proteína homóloga de tubulina que se polimeriza no meio da célula formando uma estrutura em forma de anel (anel Z). O controle da divisão é exercido por proteínas que modulam a habilidade de FtsZ de formar o anel Z. Dois fatores principais estão envolvidos na seleção do correto sitio de divisão. O melhor estudado é o sistema Min, o qual é responsável pelo bloqueio específico de sítios de divisão não desejados nos polos da célula. O componente do sistema Min que inibe a polimerização de FtsZ é a proteína MinC e é sabido que MinC requer MinD para se ativar, mas o mecanismo dessa ativação não está completamente compreendido. No presente trabalho investigamos o papel da associação de MinD à membrana na ativação de MinC. Usando um mutante que não mais se associa à membrana (MinDΔMTS) mostramos que o efeito de MinC em inibir a divisão celular é altamente dependente de seu recrutamento à membrana por MinD. No entanto, ensaios *in vitro* mostraram que o complexo MinCDΔMTS é mais eficiente em desfazer polímeros de FtsZ que MinC sozinho, indicando que MinD promove a ativação de MinC por outro mecanismo além de recrutamento à membrana. Esta ativação pode resultar de um efeito alostérico ou da criação de um sítio para FtsZ na interface do complexo MinCD, porém resultados preliminares não conseguiram detectar aumento da afinidade de MinC por FtsZ quando na presença de MinD.

**Palavras chave:** Divisão celular, *Bacillus subtilis*, MinCD, FtsZ.

**ABSTRACT**

Pariente, J.S.B. **Genetic and biochemistry study of the role of MinD in MinC activation, a key regulator in bacterial division in *Bacillus subtilis*.** 2015. 79p. PhD Thesis – Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo-Brasil.

Bacterial division is performed by a macromolecular complex known as the divisome. The central component of the divisome is FtsZ, a tubulin protein homolog, which polymerizes at the mid-cell forming a ring-like structure (Z-ring). This division is regulated by proteins that modulate ability of FtsZ to form the Z-ring. Two principal factors are involved in selecting the correct site of division. The best-studied factor is the Min system, which is responsible for the specific blockade of unwanted potential sites in the cell poles. The component of the Min system that inhibits FtsZ polymerization is the MinC protein. MinC requires the MinD protein for activation, but the mechanism of this activation is not completely understood. Here, we investigate the role of the association of MinD to the membrane during MinC activation. Using a mutant that does not interact with the membrane (MinDΔMTS) we show that the effect of MinC in inhibiting cell division is highly dependent on its recruitment to the membrane by MinD. However, *in vitro* assays show that MinCDΔMTS is more efficient in disrupting FtsZ polymers than MinC alone, indicating that MinD promotes MinC activation by a mechanism other than membrane recruitment. This activation could be due to an allosteric effect or the formation of a site for FtsZ on the MinCD interface; however, preliminary results could not detect any increase in the affinity of FtsZ to MinC in the presence of MinD.

**Keywords:** Cell division, *Bacillus subtilis*, MinCD, FtsZ.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BCA: Ácido bicinconínico

BSA: Albumina sérica bovina

CTP: Peptídeo do extremo C-terminal de FtsZ

DNA: Ácido desoxirribonucléico

$DO_{600}$: Densidade óptica a 600 nm

EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético

GDP: Guanosina difosfato

GFP: Proteína fluorescente verde

GTP: Guanosina trifosfato

GTPase: Enzima hidrolase que se liga e hidroliza GTP

IPTG: Isopropil β-D-tiogalactopiranosídeo

kb: Quilobase

kDa: Quilodálton

LB: Meio lisogênico (Luria-Bertani)

NO: Oclusão do nucleóide

PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida

PCR: Reação em cadeia da polimerase

PMSF: Fluoreto de fenilmetilsulfonila

SDS: Dodecil sulfato de sódio

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

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

TRIS: Tris (hidroximetil) aminometano

**SUMÁRIO**

**1. INTRODUÇÃO.....10**

1.1. FtsZ e o anel Z.....11

1.2. Regulação da montagem do anel Z..... 14

1.2.1. Moduladores positivos..... 15

1.2.1.1. FtsA..... 15

1.2.1.2. ZipA.....16

1.2.1.3. ZapA..... 16

1.2.1.4. SepF..... 18

1.2.2. Moduladores Negativos.....18

1.2.2.1. Noc/SlmA..... 18

1.2.2.2. EzrA.....20

1.2.2.3. SulA..... 20

1.3. O Sistema Min.....21

**2. OBJETIVOS..... 28**

2.1.Objetivos Específico..... 28

**3. MATERIAIS E MÉTODOS..... 29**

3.1. Cepas bacterianas e condições de crescimento.....29

3.2. Manipulação de DNA..... 29

3.3. Microscopia de Fluorescência.....31

3.4. Purificação de $His_6$- FtsZ, $His_6$-MinC e MinCDΔMTS-$His_6$..... 32

3.5. Ensaio de Sedimentação..... 32

3.6. Espalhamento de luz..... 33

3.7. Mutagênese sítio dirigida.....33

3.8. Fluorescência intrínseca do triptofano.....34

3.9. Microscopia Eletrônica..... 35

3.10. *Western Blotting*.....35

**4. RESULTADOS..... 37**

4.1. Capacidade de MinD de ativar MinC *in vivo*.....37

4.2. Co-expressão e co-purificação do complexo MinCDΔMTS..... 48

4.3. Medição da atividade de MinCDΔMTS frente aos polímeros de FtsZ.....51

4.3.1. Sedimentação..... 51

4.3.2. Espalhamento de Luz..... 52

4.3.3. Microscopia Eletrônica..... 55

4.4. Medição da interação de MinCDΔMTS com FtsZ..... 56

**5. DISCUSSÃO..... 59**

5.1. Importância da localização de MinC na membrana..... 59

5.2. MinD ativa MinC por mecanismos além do recrutamento à membrana..... 62

**6. CONCLUSÕES.....69**

**7. REFERÊNCIAS.....70**

# 1. INTRODUÇÃO

A divisão bacteriana (Figura 1) é efetuada por um complexo macromolecular conhecido como divisomo, contendo pelo menos uma dúzia de proteínas conservadas, que montam-se com uma hierarquia de dependência definida no local de divisão (Adams D. e Errington J., 2009).

A principal proteína no processo de divisão é chamada de FtsZ (*Filamentation temperature-sensitive protein* Z). Essa proteína é a primeira a localizar no futuro sítio de divisão, formando uma estrutura em forma de anel (anel Z) no meio da célula. (Bi E. e Lutkenhaus J., 1991). O anel Z serve como uma estrutura organizadora para a montagem do divisomo (Figura 1) (Weiss D., 2004; Margolin W., 2005). Esta estrutura citoesquelética recruta toda uma maquinaria de proteínas cujo papel é promover a invaginação da membrana plasmática assim como a síntese do peptidoglicano da parede celular necessários para a formação do novo septo. Diversos componentes do divisomo são proteínas que estão envolvidas na síntese de peptidoglicano (DivIB, DivIC, FtsA, FtsL, FtsW, SepF, PBPs) e que uma vez concentradas no sítio de divisão promovem o crescimento transversal da parede celular neste local (Popham D. e Young K., 2003). No final do processo, duas novas células filhas idênticas são formadas.

As proteínas constituintes do divisomo foram inicialmente estudadas em *Escherichia coli* e, em menor extensão, em *Bacillus subtilis* (Errington J. *et al*., 2003). Desde 2003 o processo de divisão passou a ser investigado mais ativamente em outras bactérias também, como *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Streptomyces*, etc. (Margolin W., 2005; Harry E. *et al*., 2007).

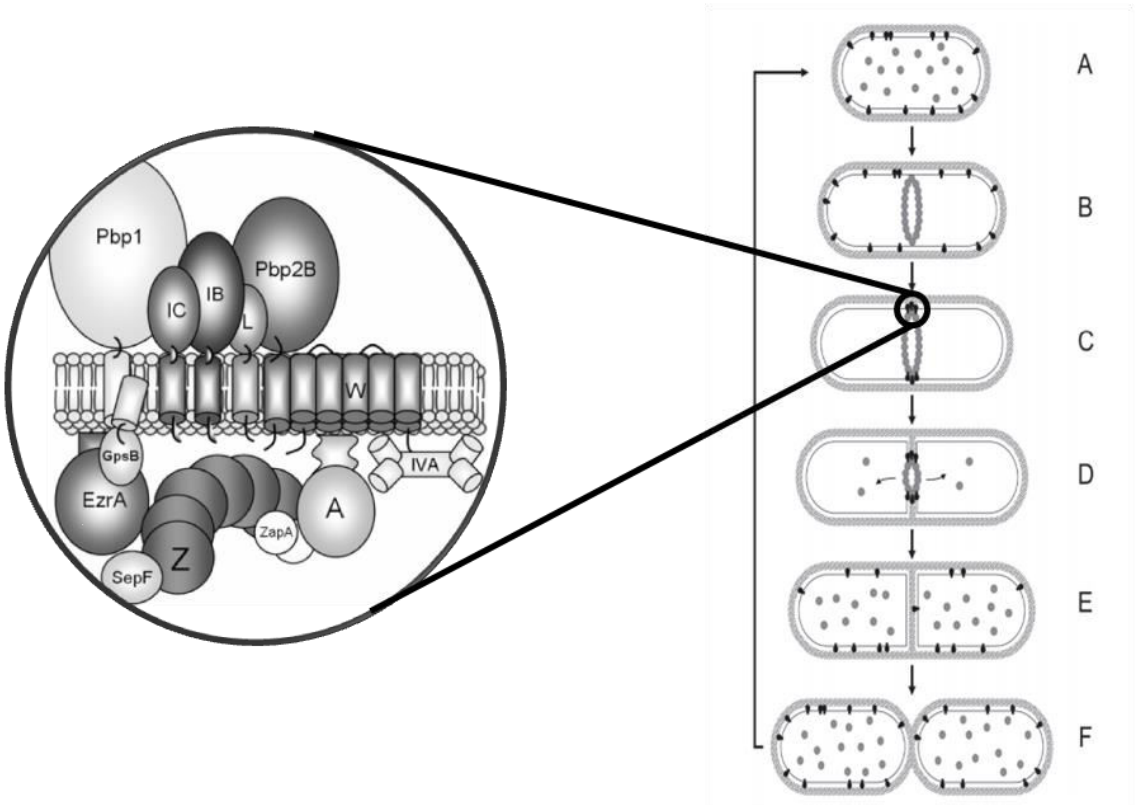


**Figura 1. Esquema das etapas da divisão bacteriana** (direita). A. Numa célula recém-nascida, FtsZ (círculos cinza) e outras proteínas de divisão, aqui representadas como complexos associados à membrana (em preto), estão dispersos na célula. B. Após a decisão de se dividir, FtsZ se associa em uma estrutura de anel no meio da célula. C. Esse anel recruta as outras proteínas de divisão ao sítio de divisão, formando o **divisomo** (esquerda, ilustração de Gamba P. *et al*., 2009). D. A montagem completa do divisomo desencadeia o crescimento transversal do peptidoglicano da parede celular e a invaginação da membrana plasmática. E. O crescimento interno da parede e membrana celular produzirá o septo, separando a célula progenitora em duas células filhas independentes. F. A separação das células filhas é realizado pela degradação da parte interna do peptidoglicano septal. (Gueiros-Filho F., 2007).

## 1.1.FtsZ e o anel Z

A formação do anel Z é geralmente considerada como o evento chave na iniciação da divisão celular. O anel é composto por FtsZ, uma proteína de 40 kDa altamente conservada em bactérias e homóloga à tubulina eucariótica (Erickson H. 1997; Errington J. *et al*, 2003). Além disso, FtsZ pode ser encontrada em cloroplastos e mitocôndrias (Vaughan S. *et al*., 2004; Margolin W., 2005). Assim como tubulina, FtsZ liga

nucleotídeos de guanina e possui atividade GTPásica, e além de polimerizar *in vivo*, demonstrou essa habilidade *in vitro* (Lutkenhaus J. e Addinall S. 1997).

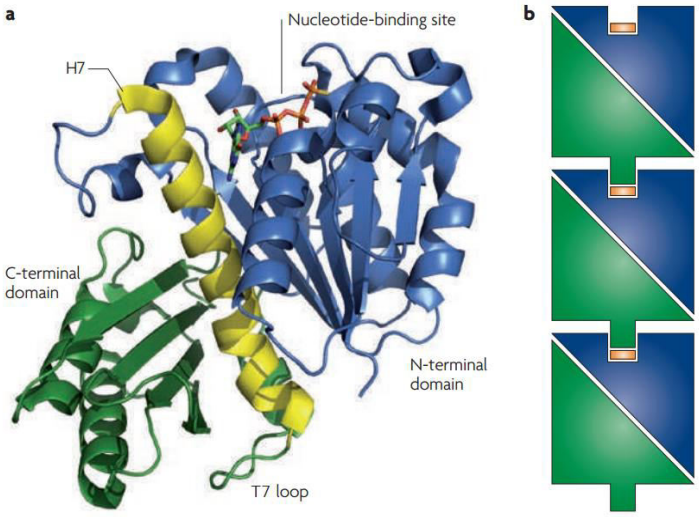


**Figura 2. a.** A estrutura cristalográfica de FtsZ de *B. subtilis* ligado a GTP-γS (2RHO). FtsZ é composto de dois domínios separados por uma hélice central (H7). O domínio N-terminal contém o motivo GGGTGTG, e forma o sítio de ligação ao nucleotídeo de guanina. Na base do domínio C-terminal, em seguida à hélice H7, está a alça catalítica T7. A cauda do extremo C-terminal (CTP), que forma o sitio de ligação de diferentes proteínas de divisão que interagem com FtsZ não está visível na estrutura cristalográfica. **b.** FtsZ polimeriza por uma associação cabeça-cauda de subunidades individuais, apresentadas em azul e verde, para formar um protofilamento simples, similar aos filamentos individuais que formam um microtúbulo. A inserção da alça T7 (protuberância verde) dentro do sitio de ligação ao GTP (laranja) da subunidade inferior aproxima resíduos de aspartato presentes na alça T7 do GTP da subunidade inferior. Assim forma-se um sítio catalítico completo e ativa-se a GTPase de FtsZ (Figura retirada de Adams D. e Errington J., 2009).

A estrutura cristalográfica de FtsZ revelou que a proteína é dividida em dois domínios globulares, separados por uma hélice (H7) e seguidos por uma cauda desestruturada no extremo C-terminal (CTP), sendo os últimos 17 aminoácidos altamente conservados (Figura 2). A região N-terminal de FtsZ apresenta o sítio de ligação ao nucleotídeo e a alça T7 requerida para a hidrólise de GTP encontra-se na região C-terminal (Erickson H. *et al*., 2010).

A polimerização de FsZ é induzida por GTP e a polimerização, por sua vez, ativa a hidrólise de GTP (Mukherjee A. e Lutkenhaus J., 1994). A propriedade de polimerização, ou automontagem, exibida por FtsZ possibilita a formação de protofilamentos que se organizam no meio da célula formando a estrutura em anel (Figura 3).

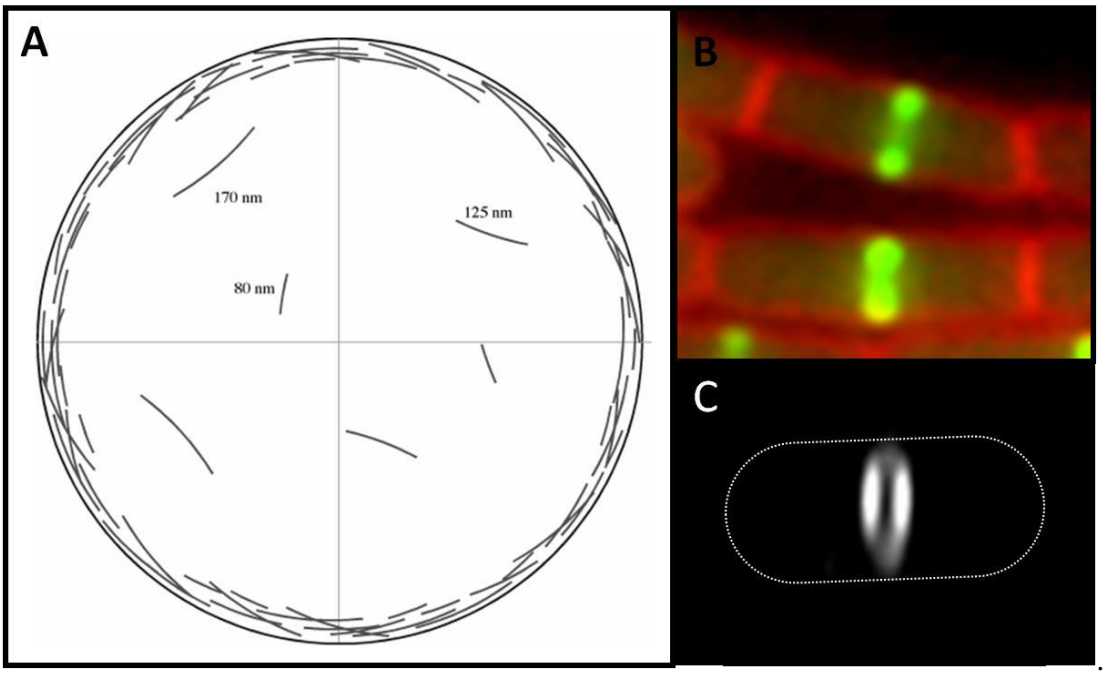


**Figura 3. O anel Z.** A. Modelo estrutural do anel Z formado por protofilamentos curtos de 125 nm. O círculo representa vista transversal da membrana interna da bactéria (retirado de Erickson H., 2009, editado de Osawa M., *et al*., 2008) B. Microscopia de fluorescência do anel Z em *B. subtilis* expressando FtsZ-GFP. C. O anel Z em três dimensões. Reconstrução 3D do anel Z foi realizada de seções ópticas de uma célula expressando FtsZ-GFP como na figura B. (Figuras B e C editadas de Gueiros-Filho J., 2007 retiradas de Ben-Yehuda S. e Losick R., 2002).

Os filamentos de FtsZ são formados por interação "cabeça-cauda", as regiões N-terminal e C-terminal de duas subunidades consecutivas de FtsZ interagem formando o filamento (Oliva M. *et al*., 2004) (Figura 4). Esses protofilamentos (80-200 nm – correspondentes a 20-50 subunidades de FtsZ) se associam à face interna da membrana e se agrupam em feixes por interações laterais (Figura 4) (Si F. *et al*., 2013; Strauss M. *et al*., 2012; Li Z. *et al*., 2007). O CTP, a porção desestruturada no extremo C-terminal de FtsZ, não é essencial para interação "cabeça-cauda" de FtsZ-FtsZ, mas mostrou-se

importante para interação lateral entre polímeros de FtsZ (Buske P. e Levin P., 2012). Essa região também é conhecida por ser alvo para ancoragem de diversas proteínas moduladoras da polimerização de FtsZ (Adams D. e Errington J., 2009; Buske P. e Levin P., 2012).

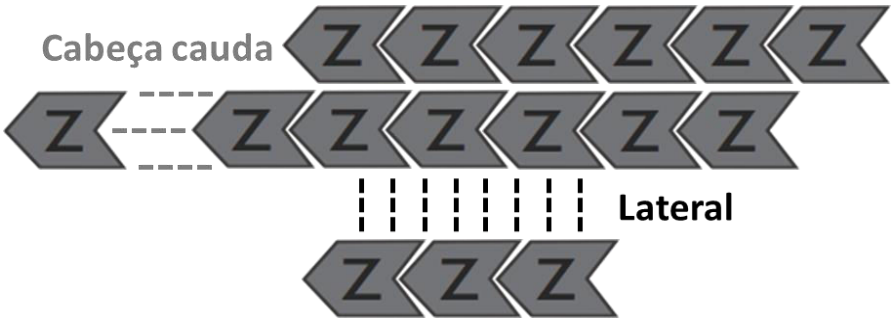


**Figura 4.** Esquema das interações entre subunidades de FtsZ. Em cinza está representada a interação "cabeça-cauda", formando protofilamentos. Em preto, a interação lateral entre protofilamentos de FtsZ (retirado de Blasios V., 2014).

Em geral, todas as outras proteínas de divisão requerem FtsZ para o direcionamento para o sítio da divisão (Errington J. *et al*., 2003). Assim, é o anel Z que marca o futuro sítio de divisão. Desta maneira, o controle do momento de sua montagem e o posicionamento da sua estrutura é importante para que a divisão da célula seja bem sucedida.

### 1.2. Regulação da montagem do anel Z

A questão de como a formação do anel Z acontece no lugar e momento certo é respondida pela variedade de proteínas que regulam tanto o posicionamento correto do anel Z, como a formação e estabilização dos polímeros de FtsZ. Certas proteínas podem prevenir a montagem inicial de polímeros de FtsZ, sequestrando monômeros individuais, como SulA que se liga à alça T7 de FtsZ (Chen Y. *et al*., 2012) ou fazendo capeamento de polímeros, como reportado para MciZ (Bisson-Filho A. *et al*., 2015). Por outro lado,

outras proteínas promovem a polimerização ou estabilização de polímeros já formados. Isto ocorre pela concentração de FtsZ na membrana por FtsA (Jensen S. *et al*., 2005) e ZipA (Pichoff S. e Lutkenhaus J., 2002), pela facilitação da formação e estabilização de interações laterais entre protofilamentos como reportado para ZapA, (Gueiros-Filho F. *et al*., 2002), assim como pelo impedimento da desmontagem dos protofilamentos pela inibição da hidrólise de GTP, como SepF (Singh J. *et al.*, 2008). Essas proteínas são chamadas de moduladores, os quais podem ser classificados como positivos (aqueles que ajudam na formação e estabilização dos polímeros) e negativos (aqueles que desfazem ou inibem a formação dos polímeros).

### 1.2.1. Moduladores positivos

#### 1.2.1.1. FtsA

Um dos modulares mais bem estudados é FtsA, uma proteína de 50 KDa (Lutkenhaus J. e Donachie W., 1979) a qual encontra-se amplamente conservada em bactérias e cuja estrutura, resolvida da bactéria *Thermotoga maritima* mostrou que FtsA é homóloga à actina eucariótica (van den Ent F. e Löwe J., 2000). Assim como actina, FtsA forma filamentos (Szwedziak P. *et al*., 2012).

A localização de FtsA tem o mesmo padrão do que FtsZ, em forma de anel (Ma X. *et al*., 1996; Addinall S. e Lutkenhaus J., 1996), sendo importante para a formação eficiente do anel Z (Jensen S. *et al*., 2005). FtsA é uma proteína periférica que se associa à membrana por uma hélice anfipática no domínio C-terminal (Pichoff S. e Lutkenhaus J., 2005) e serve como a principal ancoragem de membrana para o anel Z. A estrutura cristalográfica do complexo FtsA:FtsZ revelou que eles interagem pela cauda CTP de FtsZ com o subdomínio 2B na região N-terminal de FtsA (Szwedziak P. *et al*., 2012). FtsA também contém 10-13 resíduos conservados no seu domínio C-terminal que

poderiam facilitar o recrutamento de componentes do divisomo ao anel Z (Löwe J. e van den Ent F., 2001). Além disso, dados obtidos com a reconstituição do anel Z em lipossomos sugerem que apenas FtsZ e FtsA são suficientes para a divisão dos mesmos (Loose M. e Mitchison T, 2014; Schwille P., 2014; Osawa M. e Erickson H., 2013). Há evidências que FtsZ sozinho é capaz de gerar a força constritora que levaria à formação do septo (Meier E. e Goley E., 2014) e que a reciclagem das subunidades de FtsZ é importante para a constrição acontecer (Osawa M. e Erickson H., 2011). Entretanto, a constrição promovida por FtsZ não chegaria até o fim. Assim, é possível que FtsA seja necessário para a contração completa do anel Z que levaria à fissão da membrana dos lipossomos e provavelmente também *in vivo* (Loose M. e Mitchison T, 2014; Schwille P., 2014; Osawa M. e Erickson H., 2013).

#### 1.2.1.2. ZipA

ZipA é uma proteína integral de membrana, conservada apenas em enterobactérias e assim como FtsA, interage diretamente com a região C-terminal desestruturada de FtsZ (Hale C. e de Boer P., 1997; Haney A. *et al*., 2001) e participa diretamente na ancoragem e estabilização do anel Z (Pichoff S. e Lutkenhaus J., 2002; Kuchibhatla A. *et al.*, 2011). Embora ZipA não seja requerida para a formação do anel Z, ela é importante para o recrutamento de outras proteínas (Pichoff S. e Lutkenhaus J., 2002). O papel talvez mais importante de ZipA é proteger FtsZ da degradação direta por ClpX nas fases iniciais da formação do anel Z (Pazos M. *et al*, 2013).

#### 1.2.1.3. ZapA

ZapA é uma proteína altamente conservada entre as bactérias, a qual colocaliza com o anel Z *in vivo* e é capaz de se ligar a FtsZ e promover a formação de estruturas

poliméricas contendo múltiplos filamentos *in vitro* (Gueiros-Filho J. e Losick R., 2002). ZapA foi descoberto em *B. subtilis* numa triagem buscando antagonistas dos efeitos inibitórios da divisão causados pela superexpressão das proteínas Min (Gueiros-Filho J. e Losick R., 2002; Scheffers D., 2008). O mecanismo pelo qual ZapA neutraliza os efeitos inibitórios das proteínas Min é pela estabilização e agrupamento dos polímeros de FtsZ, e foi sugerido que essa estabilização é obtida pela inibição da atividade GTPásica de FtsZ devido a uma mudança conformacional no sitio de ligação ao nucleotídeo. (Mohammadi T. *et al*., 2009; Pacheco-Gómez R. *et al*., 2013). Assim, foi proposto que ZapA aumenta a cooperatitividade na formação do anel Z *in vivo* (Gueiros-Filho J. e Losick R., 2002; Mohammadi T. *et al.*, 2009; Monahan L. *et al.*, 2009). Também foi proposto que ZapA, além de ajudar na formação de feixes de FtsZ, poderia formar ligações cruzadas (*crosslinks*) entre polímeros de FtsZ e a estabilização de ligações longitudinais entre monômeros de FtsZ. A formação de redes via ligações cruzadas seria importante na estabilização do anel Z, fazendo-o uma estrutura mais rígida (Dajkovic A. *et al.*, 2010).

Estudos *in vivo* mostraram que a deleção de *zap*A não afeta a viabilidade das células, mas em combinação com a deleção de *ezr*A, causa um bloqueio severo na divisão (Gueiros-Filho J. e Losick R., 2002). Já em *E. coli* o efeito observado é maior, a deleção de *zap*A causa defeitos significativos na citocinese, evidenciados pela presença de células filamentosas (Dajkovic A. *et al.*, 2010). A estrutura cristalográfica de ZapA de *Pseudomonas aeruginosa* e de *E. coli*, assim como a estrutura resolvida por NMR de *Geobacillus stearothermophilus* mostraram que ela existe como dímero e tetrâmero, mostrando além disso que ZapA interage com FtsZ com uma razão molar 1:1 (Low H. *et al*., 2004; Roach E. *et al*., 2014; Nogueira M. *et al*., 2015).

Além de ZapA, existem outros moduladores positivos denominados Zap, como ZapB, ZapC e ZapD. Esses moduladores atuam induzindo a formação de feixes de FtsZ,

mas ao contrário de ZapA, estão presentes apenas em *E. coli* (Durand-Heredia J. *et al.*, 2011; Durand-Heredia J. *et al.*, 2012; Hale C. *et al.*, 2011).

#### 1.2.1.4. SepF

SepF é uma proteína conservada em bactérias Gram-positivas e cianobactérias, que foi chamada de SepF porque tem um papel importante na formação do septo. Bactérias que carecem da proteína SepF são viáveis, mas o septo é formado mais lentamente e com uma morfologia anormal (Hamoen L. *et al.*, 2006). Assim como ZapA, SepF promove a formação de feixes de FtsZ e inibe a atividade GTPásica de FtsZ (Singh J. *et al.*, 2008). Ensaios de *pull-down* mostraram que FtsZ liga-se a SepF, e essa ligação é dada pela mesma região de 16 aminoácidos conservados na extremidade C-terminal (CTP) de FtsZ que medeia a interação com FtsA e ZipA (Król E. *et al*, 2012). Análise da estrutura mostrou uma hélice anfipática na região N-terminal de SepF que funcionaria como domínio de ligação à membrana. Isto esclareceria por que *B. subtilis* pode crescer sem FtsA (Duman R. *et al*, 2013) e por que bactérias que não possuem FtsA, como as micobactérias, tem homólogos de SepF, sendo eles parte importante do processo de divisão destes microrganismos (Gola S. *et al.*, 2015).

### 1.2.2. Moduladores Negativos

#### 1.2.2.1. Noc/SlmA

Um mecanismo para a coordenação da divisão celular com a replicação e segregação do nucleóide foi proposto há mais de duas décadas atrás (Woldringh C. *et al.*, 1991). O modelo original se baseia em que, o estado conformacional e metabólico do DNA informa à superfície celular como crescer e onde se dividir. Essas informações, segundo esse modelo, seriam dadas pelo processo ativo de transcrição/tradução que

ocorre na vizinhança do nucleóide, e esse efeito foi chamado de oclusão do nucleóide (*Nucleoid Occlusion*, NO) (Mulder E. e Woldringh C. *et al*., 1989; Woldringh C. *et al*., 1991). Estudos mais recentes mostraram que a oclusão do nucleóide é exercida por proteínas associadas ao DNA que funcionam como inibidores da formação do anel Z. Essas proteínas associadas ao DNA são: SlmA em *E. coli* e Noc em *B. subtilis* (Wu L. e Errington J., 2004; Bernhardt T. e de Boer P., 2005). Noc liga-se a regiões específicas do DNA, se associando de forma desigual ao longo do cromossomo (Wu L. *et al*., 2009). A localização de Noc no cromossomo faz com que o anel Z só se forme depois que a região do término do cromossomo esteja replicada e os nucleóides parcialmente segregados (Wu L. e Errington J., 2012). Apesar de ser tratado aqui como um modulador de FtsZ, não foi detectada interação entre FtsZ e Noc (Wu L. e Errington J., 2012). Um trabalho recente propõe um modelo simples para Noc, o qual demonstra a associação de Noc à membrana, formando um complexo com DNA (nucleoproteína). Assim, esse complexo obstrui fisicamente a montagem da maquinaria de divisão na vizinhança do nucleóide (Adams D. *et al*., 2015).

Em *E. coli* essa mesma função é exercida pela proteína SlmA (Bernhardt T. e de Boer P., 2005). Apesar da falta de similaridade de sequência primária (pertencem a diferentes famílias de proteínas que ligam DNA), SlmA e Noc possuem propriedades genéticas e citológicas similares (Bernhardt T. e de Boer P., 2005). Uma diferença importante, no entanto, é que SlmA se liga diretamente a FtsZ e inibe a formação de estruturas multifilamento de FtsZ (Cho H. *et al*., 2011; Tonthat N. *et al*., 2011). A interação entre SlmA e FtsZ é ativada pela ligação de SlmA a regiões específicas do DNA (SBS) (Cho H. *et al*., 2011).

#### 1.2.2.2. EzrA

EzrA é um regulador negativo da formação do anel Z e modula a frequência e posição do anel Z, sendo que a perda de *ezr*A resulta em células com múltiplos anéis Z. EzrA é uma proteína integral de membrana que encontra-se distribuída ao longo da membrana plasmática em células em crescimento e é recrutada ao anel Z assim que este se forma (Levin P. *et al*., 1999). Uma mutação de perda de função em EzrA suprime a desestabilização dos polímeros de FtsZ devido à superexpressão de MinCD. Isso se deve possivelmente ao fato que a deficiência de EzrA estabilizaria os polímeros de FtsZ fazendo eles mais resistentes à atividade de MinCD (Levin P. *et al*., 2001). Embora EzrA seja capaz de inibir a montagem de FtsZ, não é capaz de desfazer os polímeros já formados (Haeusser D. *et al*., 2004). O mecanismo proposto de EzrA na montagem no anel Z se baseia em que a interação de EzrA e FtsZ reduziria a habilidade de FtsZ de se ligar a GTP, e ao mesmo tempo, acelera a velocidade de hidrólise de GTP (Chung K. *et al*., 2007).

#### 1.2.2.3. SulA

SulA é um inibidor da divisão bacteriana encontrado em espécies Gram-negativas. SulA tem um papel importante na resposta SOS (Gottesman S. *et al*., 1981). SulA interage diretamente com FtsZ bloqueando a formação do anel Z, inibindo a atividade GTPásica devido à inibição da formação de protofilamentos de FtsZ (Jones C. e Holland I., 1985; Mukherjee A. *et al*, 1998; Tusca D. *et al*., 1998). A estrutura resolvida de SulA de *P. aeruginosa* e em complexo com FtsZ mostraram que SulA é um dímero e que ela se liga à alça T7 de FtsZ, uma região que participa da interface FtsZ-FtsZ, assim bloqueando a formação do polímero (Cordell S. *et al*., 2003). Um trabalho recente demonstrou que SulA inibe a montagem de FtsZ por um mecanismo de sequestro, que consiste na ligação de

SulA por um monômero de FtsZ, impedindo este de se ligar a outra subunidade de FtsZ (Chen Y. *et al*., 2012).

### 1.3. O Sistema Min

Dois fatores principais estão envolvidos na seleção do sítio correto para a divisão celular. Uma delas envolve o próprio cromossoma, através do efeito de oclusão do nucleóide, descrito acima. A segunda, denominada de sistema Min, é responsável pelo bloqueio específico dos sítios potenciais de divisão indesejados nos polos celulares (Errington J. *et al*., 2003) (Figura 6).

O Sistema Min é assim chamado porque a sua inativação dá origem a mutantes que produzem minicélulas através da inadequada divisão nos polos da célula (Figura 5). Em *E. coli*, o sistema Min consiste de três proteínas; MinC, MinD e MinE (de Boer P. *et al*., 1989). MinC e MinD agem juntos como um regulador negativo da montagem do anel FtsZ (Lutkenhaus J., 2007). A função descrita para MinE é como fator topológico, pela sua capacidade de localizar o complexo MinCD nos polos da célula (Rothfield L. *et al*., 1999). Foi reportado também em *E. coli* que MinD sofre uma oscilação entre os polos da célula, fazendo com que a presença de MinCD seja maior nos polos do que no meio da célula (Raskin D. e de Boer P., 1999; Fu X. *et al*, 2000). MinE é um fator que modula a interação de MinD com a membrana e assim cria uma estrutura dinâmica capaz de oscilação. MinE se liga a MinD competindo pelo sítio de MinC (Ghosal D. *et al*., 2014) e ao mesmo tempo ativa a ATPase de MinD, liberando-o da membrana e fazendo com que MinD se reassocie à membrana no outro polo, gerando oscilação na localização de MinD com período de cerca de 50 segundos (Raskin D. e de Boer P., 1999; Fu X. *et al*, 2000).

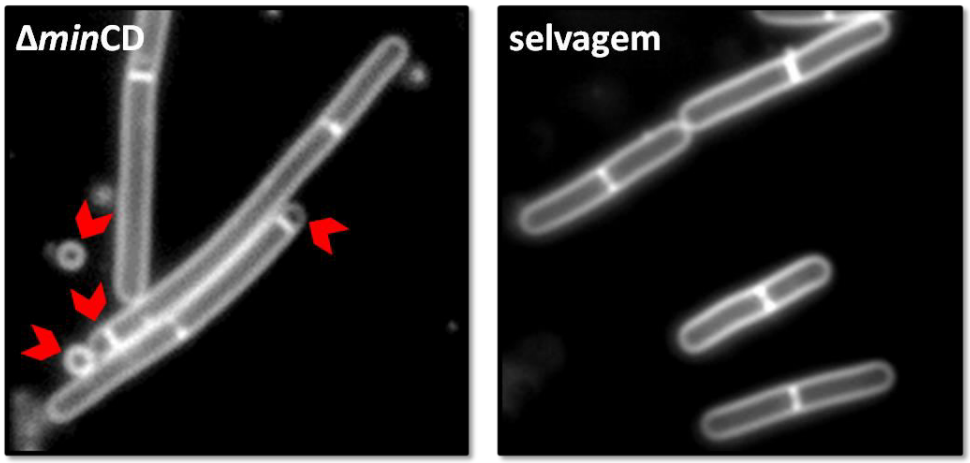


**Figura 5. Efeito de mutação em MinCD na divisão de *B. subtilis*.** Fenótipo de uma linhagem de *B. subtilis* em que os genes *min*C e *min*D foram deletados (esquerda), mostrando as características minicélulas assinaladas por setas vermelhas, assim como células dividindo assimetricamente. A foto da direita mostra o fenótipo da linhagem selvagem.

Em *B. subtilis,* a inibição pelo sistema Min ocorre por meio de três proteínas: MinC, MinD e DivIVA. MinC forma um complexo com MinD, e este por sua vez interage com DivIVA, que possui localização restrita aos polos (Edwards D. e Errington J., 1997; Marston A. *et al*., 1998). Mais recentemente foi mostrado que a interação entre DivIVA e MinD é indireta e requer uma outra proteína, chamada de MinJ, a qual funciona como ponte entre estas duas proteínas (Patrick J. e Kearns D., 2008; Bramkamp M. *et al*., 2008). A localização restrita aos polos mostrada por DivIVA é dada pela afinidade as curvaturas negativas da membrana e este é o tipo de curvatura encontrada nos polos da célula. (Lenarcic R. *et al*., 2009; Oliva M. *et al*., 2010). Deste modo, o complexo inibidor MinCD acaba se concentrando nos polos da célula (Figura 6), impedindo a formação indesejada do anel nestes locais.

A figura 6 mostra uma comparação entre o controle do sítio de divisão em *E. coli* e *B. subtilis*, no qual pode-se observar que apesar do mecanismo de localização do sistema Min ser diferente, o resultado é o acúmulo do complexo inibidor nos polos, impedindo assim a formação de polímeros de FtsZ nesses lugares.

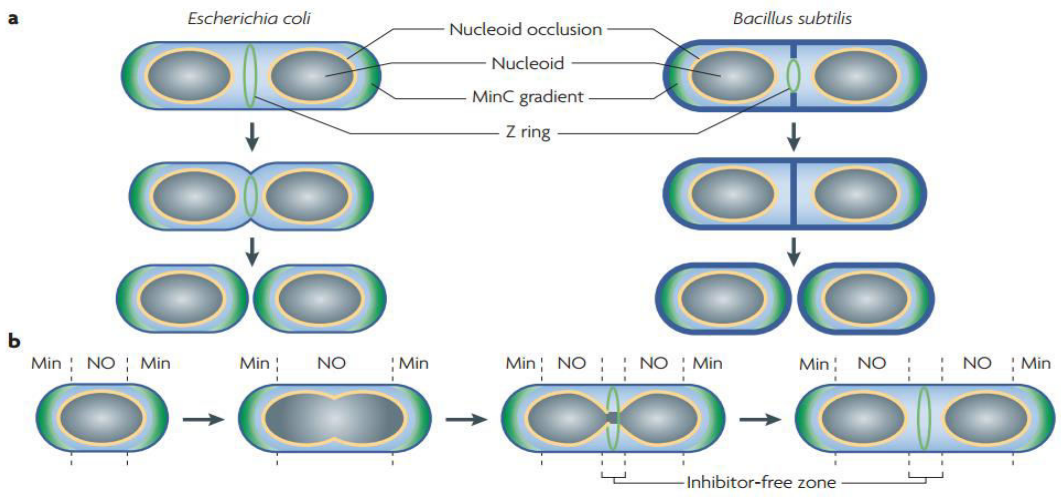


**Figura 6. Regulação da posição do septo em dois diferentes organismos modelo.** O sistema de Oclusão do Nucleóide (NO), que é mediado por Noc (em *B. subtilis*) ou SlmA (em *E. coli*), inibe a montagem do anel Z em torno do nucleóide. O sistema Min atua prevenindo a montagem do anel Z nos polos da célula. Depois da segregação dos nucleóides, uma zona livre de inibidor na metade da célula permite a montagem do anel Z (Adams D. e Errington J., 2009).

Sabe-se que o componente do sistema Min que inibe a polimerização de FtsZ é a proteína MinC (Hu Z. *et al*., 1999; Dajkovic A. *et al*, 2008; Hernández V. *et al*., 2013). Estudos mostraram que MinC parece afetar a associação lateral de protofilamentos de FtsZ (Dajkovic A. *et al*, 2008; Blasios V., *et al*., 2013); além disso, estudos mais recentes sugerem que MinC também afeta as interações longitudinais que formam o protofilamento (Shen B. e Lutkenhaus J., 2010; Hernández V. *et al*., 2013, Arumugam S. *et al*., 2014). MinC é um dímero que consiste em dois domínios ligados por uma alça flexível, ambos os quais têm atividade inibitória de divisão no contexto correto (Hu Z. *et al*., 1999; Shen B. e Lutkenhaus J., 2009; Shen B. e Lutkenhaus J., 2010). O domínio N-terminal é responsável pela inibição da montagem de FtsZ entanto que o domínio C-terminal medeia a dimerização de MinC, bem como a interação com MinD (Hu Z. e Lutkenhaus J., 2000; Cordell S. *et al*., 2001; Szeto T. *et al*., 2001). As estruturas tridimensionais de MinC e MinD (Figura 7) (Cordell S. *et al*., 2001; Wu W. *et al*., 2011; Na J. *et al*., 2013) e ensaios com mutantes dessas proteínas (Ma L. *et al*., 2004; Zhou H.

*et al*., 2005; Wu W. *et al*., 2011; Park K. *et al*., 2015) revelaram algumas informações sobre a interação entre estas proteínas.

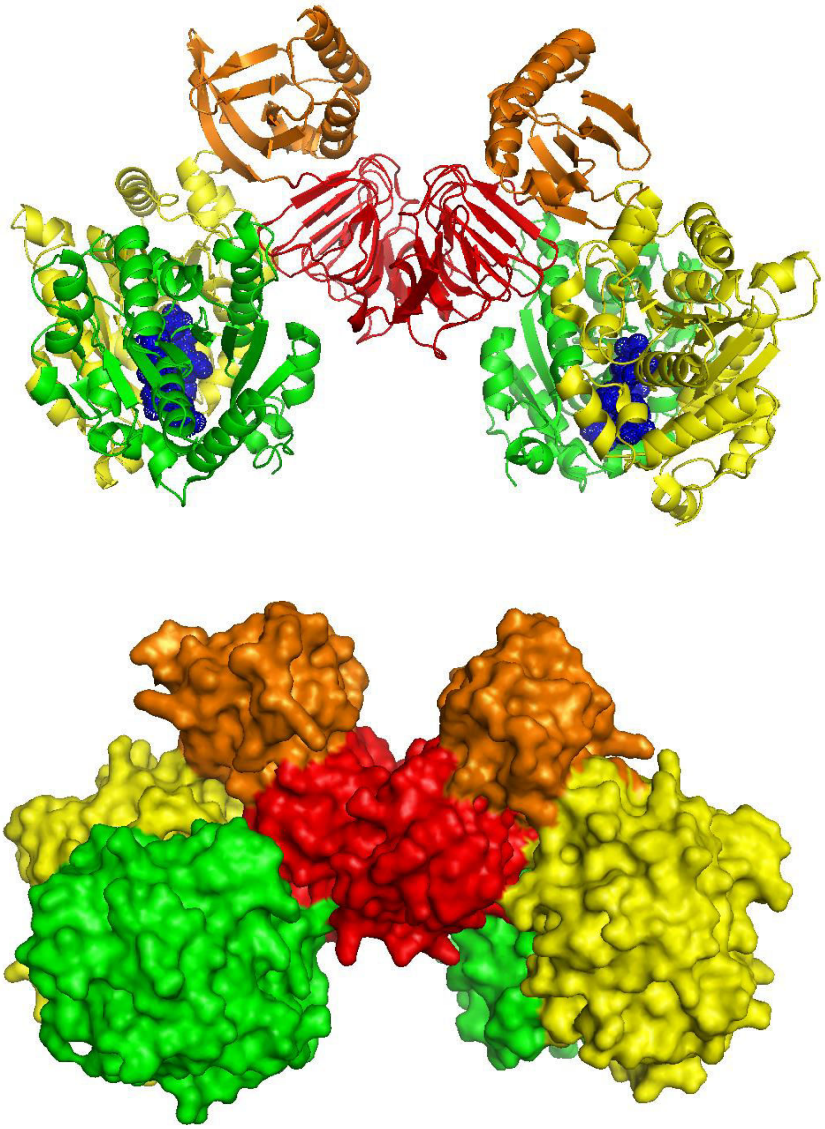

**Figura 7. Modelo do complexo MinCD**. O modelo foi realizado em PyMol, usando como molde o complexo cristalizado de *Aquifex aeolicus* (4V02). A estrutura cristalográfica do dímero de MinC de *T. marítima* (1HF2) foi alinhada no complexo MinCD de *A. aeolicus*. Em laranja o domínio N-terminal e em vermelho o domínio C-terminal, mostrando que o dímero se forma pela interação entre os domínios C-terminal. A estrutura cristalográfica de MinD dímero de *E. coli* (3Q9L) foi alinhada no complexo MinCD de *A. aeolicus*. Em verde e amarelo estão mostradas as cadeias individuais de MinD formando um dímero. As esferas em azul representam o ATP ligado a cada subunidade. Acima, representação do complexo em cartoon. Embaixo, representação do complexo da superfície

MinC requer MinD para sua localização e funcionamento correto (Figura 8). MinD é uma ATPase de membrana periférica que recruta MinC para os polos da célula. Trabalhos anteriores demonstraram que MinD liga a vesículas de fosfolipídeos de uma maneira dependente de ATP (Hu Z. *et al*., 2002). Análise da sequência de MinD de *E. coli* sugere que os 10 aminoácidos do extremo C-terminal têm o potencial de formar uma hélice anfipática (Szeto T. *et al*., 2002; Hu Z. e Lutkenhaus J., 2003), sendo isto importante para o recrutamento de MinD, e consequentemente também de MinC para membrana. Evidências também indicam que MinD é necessário para potencializar o efeito de MinC. MinC só consegue inibir a divisão celular na ausência de MinD quando é superexpressa 50 vezes acima de sua concentração celular normal (de Boer P. *et al*., 1992). Por outro lado, a superprodução moderada de ambas as proteínas (MinCD) resulta numa inibição não específica de divisão, provavelmente porque o excesso dos complexos MinCD saturam os polos e ficam distribuídos por toda periferia da célula (Figura 9). Quando apenas MinC é superproduzida, a proteína MinD nos polos da célula deve ficar saturada e o excesso de MinC não deve afetar a localização polar de MinD. O fato de que o excesso de MinC não interfere com a divisão central da célula indica que MinC requer MinD para sua atividade (Martson A. e Errington J., 1999; Shiomi D. e Margolin W., 2007) (Figura 9). Foi reportado que a ativação de MinC dada por MinD seria devida à concentração de MinC na membrana aproximando-o ao anel-Z (Hu Z. *et al*., 2003; Johnson J. *et al*., 2002). Por outro lado, foi reportado que a adição de MinD ativa ainda mais uma versão de MinC que possui sua própria âncora de membrana (Johnson J. *et al*., 2004). Outro trabalho reportou que MinC pode ser ativado por um mutante de MinD que não se liga à membrana (Hu Z. e Lutkenhaus J., 2003), sugerindo que a ativação de MinC por MinD envolve mais do que apenas o recrutamento de MinC à membrana.

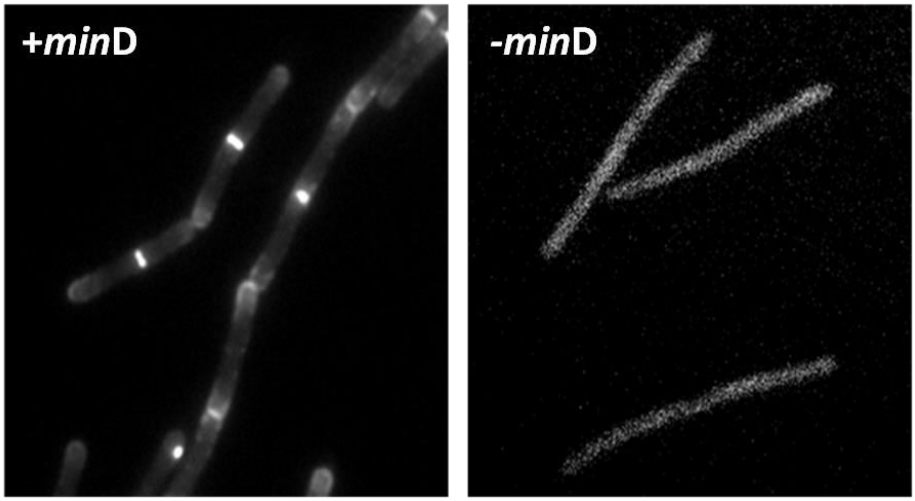


**Figura 8. Localização de MinC é dependente de MinD.** Microscopia de fluorescência mostrando a localização da fusão GFP-MinC em presencia de MinD (Esquerda) e em ausência de MinD (Direita).

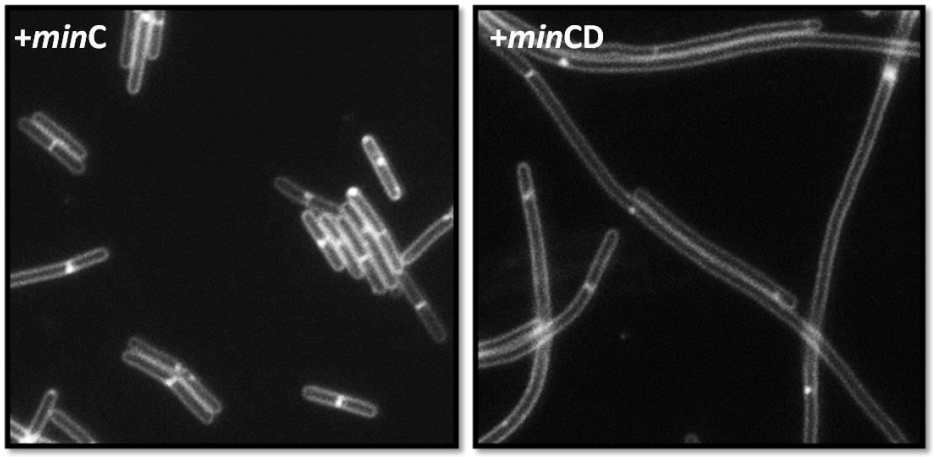


**Figura 9. Tamanho das células com superexpressão de MinC ou MinCD em *B. subtilis*.** As células com superexpressão de MinC apresentam um tamanho selvagem, ~4 µm (Esquerda). Já células com superexpressão do complexo MinCD mostram as características células filamentosas devido à inibição da divisão (Direita).

Para compreender a divisão bacteriana em sua totalidade, é importante elucidar as funções e interações das proteínas envolvidas em todo o processo. Um aspecto ainda pouco compreendido é a forma pela qual as proteínas regulatórias afetam a nível mecanístico/bioquímico a polimerização de FtsZ. Estudos realizados mostram que MinC requer MinD para ter maior atividade, mas o mecanismo desta ativação ainda não é totalmente compreendido. Nosso projeto pretende investigar este mecanismo e testar as

hipóteses de que MinD apenas recruta MinC para membrana, ou se além disso afeta alostericamente.

# 2. OBJETIVOS

Essa tese teve como objetivo desvendar o papel de MinD na ativação de MinC.

## 2.1. Objetivos Específicos

- Determinar a capacidade de MinD de ativar MinC em ensaios *in vivo* e *in vitro* usando um mutante de MinD que não se associa mais a membrana.
- Caracterizar a afinidade do complexo MinCD e FtsZ.

# 3. MATERIAIS E MÉTODOS

## 3.1. Cepas bacterianas e condições de crescimento

Todas as cepas de *B. subtilis* utilizadas são derivadas da cepa selvagem PY79 previamente descrita (Youngman P. *et al*., 1984). A cepa comercial *E. coli* DH5α foi utilizada para a clonagem das proteínas de fusão e a cepa *E. coli* BL21 (DE3) para expressão de proteínas. Tanto *B. subtilis* quanto *E. coli* foram crescidos em meio Luria-Bertani (LB) a 37 °C, com agitação. Antibióticos, quando necessários, foram utilizados nas seguintes concentrações: 100 µg/mLde espectinomicina, 20 µg/mLde tetraciclina, 100 µg/mLde ampicilina, 5 µg/mL ou 25µg/mLde cloranfenicol, 50 µg/mLcanamicina. A concentração de indutor isopropil –β-D-thiogalactopiranosídeo (IPTG) está indicada na legenda das figuras.

## 3.2. Manipulação de DNA

A manipulação de DNA e as clonagens foram feitas segundo métodos estabelecidos (Sambrook J. e Russel D., 2001). O plasmídeo pJB7 foi construído clonando uma cópia dos genes *min*C-*min*DΔMTS amplificados usando os nucleotídeos OLG1315 e oFG428. O produto de PCR foi digerido com enzimas XhoI e NheI e clonado em plasmídeo pET24b (Novagen), o qual havia sido digerido com as mesmas enzimas. Esse plasmídeo foi usado para expressar e purificar o complexo MinCDΔMTS usado em nossos ensaios *in vitro*. pJB7 foi mutagenizado pela estratégia QuickChange (Stratagene) com DNA polimerase Phusion (NEB) e usando os oligonucleotídeos oFG405 e oFG406 para obter o mutante $MinC^{Y44W}D$. Os oligonucleotídeos foram comprados da EXXTEND (Brasil) e eles estão descritos na tabela 1. Os plasmídeos utilizados estão descritos na tabela 3. Sequenciamentos foram realizados pelo serviço de sequenciamento do Instituto

de Química-USP (ssDNA-IQUSP). O preparo das amostras foi realizado segundo o protocolo do *kit Big Dye Terminator* (*Applied Biosystems*) e a precipitação segundo Sambrook J. e Russel D.,2001.

**Tabela 1. Oligonucleotídeos**

| Nome | Sequência |
|---|---|
| OLG1315 | 5' AAGCTAGCGGCCGCGTGAAGACCAAAAAG 3' |
| oFG428 | 5' CTCGAGAACAGATTCACCTAAGATGCGG 3' |
| oFG405 | 5' CAA TGG ACC GAT GGA AAA GGC CAG AAA ATC 3' |
| oFG406 | 5' TCCATCGGTCCATTGTTCAATTGACAGCATATTCT 3' |
| oFG637 | 5' CCGCTAGCTTAAACAGATTCACCTAAGATGC3' |
| oFG638 | 5' CGGTCGACGTGAAGACCAAAAAGCAGCA 3' |
| oFG635 | 5'CTGTCGACGGGAAAAGGTGGTGAACTACTATGAG 3' |

**Tabela 2. Cepas**

| Cepa | Genótipo | Referência |
|---|---|---|
| ***B. subtilis*** | | |
| PY79 | selvagem (prototrófica) | Youngman P. *et al.*, 1984 |
| FG203 | Δ*min*CD::cat | Nosso laboratório |
| FG343 | *ysh*ABD::tet | Gueiros-Filho J. e Losick R. ,2002 |
| JB59 | PY79 *amy*E::P*spank-hymin*C $Spc^R$ | Essa tese |
| JB60 | PY79 *amy*E::P*spank-hymin*CD $Spc^R$ | Essa tese |
| JB61 | PY79 *amy*E::P*spank-hymin*CDΔMTS $Spc^R$ | Essa tese |
| JB62 | PY79 *amy*E::P*spank-hygfp-min*C $Spc^R$ | Essa tese |
| JB63 | PY79 *amy*E::P*spank-hygfp-min*CD $Spc^R$ | Essa tese |
| JB64 | PY79 *amy*E::P*spank-hygfp-min*CDΔMTS $Spc^R$ | Essa tese |
| JB65 | FG343 *amy*E::P*spank-hygfp-min*C $Spc^R$ | Essa tese |
| JB66 | FG343 *amy*E::P*spank-hygfp-min*CD $Spc^R$ | Essa tese |
| JB67 | FG343 *amy*E::P*spank-hygfp-min*CDΔMTS $Spc^R$ | Essa tese |
| JB90 | FG203 *amy*E::P*spank-hygfp-min*C $Spc^R$ | Essa tese |
| JB91 | FG203 *amy*E::P*spank-hygfp-min*CD $Spc^R$ | Essa tese |
| JB92 | FG203 *amy*E::P*spank-hygfp-min*CDΔMTS $Spc^R$ | Essa tese |
| ***E. coli*** | | |
| DH5α | supE44 (lac)U169 80dlacZ M15 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi1 relA1 | |
| BL21 (DE3) RIL | B F - ompThsdS(rb-mb-) dcm - TetRgal l(DE3) endAhte (argUileYleuWCamR) | |
| JB7 | DH5α pET24b+*min*CDΔMTS | Essa tese |

| | | |
|---|---|---|
| JB37 | DH5α pET24b+*min*C(Y44W)DΔMTS | Essa tese |
| JB53 | DH5α pDR111+*min*C | Essa tese |
| JB54 | DH5α pDR111+*min*CD | Essa tese |
| JB55 | DH5α pDR111+*min*CDΔMTS | Essa tese |
| JB56 | DH5α pDR111+*gfp-min*C | Essa tese |
| JB57 | DH5α pDR111+*gfp-min*CD | Essa tese |
| JB58 | DH5α pDR111+*gfp*-m*in*CDΔMTS | Essa tese |

**Tabela 3. Plasmídeos**

| Plasmídeo | Genótipo | Referencia |
|---|---|---|
| pJB7 | *min*CDΔMTS em pET24b (kan) | Essa tese |
| pDR111 | Vector de integração, $Amp^R Spec^R$ | Nosso laboratório |
| pAB20 | *fts*Zem pET28a (kan) | Blasios V. *et al*., 2013 |
| pAB30 | *min*Cem pET24b (kan) | Blasios V. *et al*., 2013 |
| pAB30-Y44W | *min*$C^{Y44W}$em pET24b (kan) | Blasios V. *et al*., 2013 |
| pJB37 | *min*$C^{Y44W}$*min*D em pET24b (kan) | Essa tese |
| pJB53 | *min*C em pDR111 | Essa tese |
| pJB54 | *min*CD em pDR111 | Essa tese |
| pJB55 | *min*CΔMTS em pDR111 | Essa tese |
| pJB56 | *gfp-min*C em pDR111 | Essa tese |
| pJB57 | *gfp-min*CD em pDR111 | Essa tese |
| pJB58 | *gfp-min*CΔMTS em pDR111 | Essa tese |

### 3.3. Microscopia de Fluorescência

As microscopias de fluorescência de membrana e GFP foram realizados em um microscópio Nikon Eclipse Ti, equipado com filtros GFP BrightLine® e mCherry BrightLine® (Semrock), Objetiva Plan APO VC Nikon 100X (NA = 1,4), SmartShutter de 25 mm e uma câmera Andor EMCCD i-Xon. O tempo de exposição das imagens variou de 1 a 2 s. As células bacterianas foram crescidas com indutor (0,5 mM de IPTG) até a fase exponencial, colhidas e montadas em tapetes de 1,5 % de agarose em LB, mantendo-as vivas durante todo o experimento. O corante de membrana FM4-64 (Molecular Probes) foi usado na concentração final de 50 µg/mL. Todas as imagens foram capturadas usando o software NIS Elements v3.07 (Nikon) e processadas com o software ImageJ (http://rsb.info.nih.gov/ij/).

### 3.4. Purificação de $His_6$- FtsZ, $His_6$-MinC e MinCDΔMTS-$His_6$

Tanto FtsZ quanto MinC e MinCDΔMTS foram expressos na cepa de *E. coli* BL21 (DE3). As células foram crescidas a 37 °C *overnight* em 10 mL de LB. Essa cultura serviu de inóculo para 1 L de meio de cultura, que foi crescido até a $DO_{600}$ estar em ~0,6. Neste estágio foram adicionados 0,5 mM de IPTG à cultura e incubados a 37 °C sob agitação durante ~4 horas. As células foram ressupendidas em tampão ao qual se adicionou 1 mM de PMSF e lisadas por sonicação (Sonics VCX500, sonda SM0421) com 5 ciclos de 30 segundos com intervalos de 1 min. O sobrenadante foi recolhido após centrifugação de 45 minutos a 35000 g. MinC e MinCDΔMTS foram purificadas usando cromatografia de afinidade a níquel em colunas HiTrap™ Chelating HP. As proteínas foram eluidas da coluna aplicando imidazol (300 mM) em Tampão HKG (50 mM HEPES, 150 mM KCl e 10 % glicerol) pH 7,2. O tampão de eluição foi trocado por HEKG (50 mM HEPES, 0,1 mM EDTA, 150 mM KCl e 10 % glicerol) pH 7,2, por meio de uma cromatografia de exclusão molecular (PD-10, GE Healthcare). Já a proteína FtsZ foi purificada primeiro por cromatografia de afinidade (como acima) e subsequentemente por precipitação dos polímeros formados pela adição de 2 mM GTP e 20 mM $CaCl_2$ (Sigma-Aldrich). Esses polímeros foram ressuspendidos em tampão TKEG (50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 50 mM KCl e 10 % Glicerol) pH 8 adicionado de 1 mM GDP e 10 mM $MgCl_2$ para induzir a despolimerização de FtsZ. Todas as proteínas foram quantificadas utilizando o método BCA com o kit comercial da Pierce (ThermoScientific), tendo BSA como padrão.

### 3.5. Ensaio de Sedimentação

As reações foram preparadas em tubos de ultracentrífuga Beckman (8x34 mm, policarbonato). contendo 15 μM de FtsZ em tampão de polimerização HMK (50 mM

Hepes, 5 mM MgAc e 100 mM KAc), pH 7,7 com 20 mM $CaCl_2$ e 2 mM de GTP. As reações tinham um volume total de 100 µL e foram incubadas a 37 °C por 5 min antes da centrifugação. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 100 000 rpm usando rotor TLA 120.1. O sobrenadante (S) foi recolhido e o precipitado (P) foi ressuspendido com 100 µL. Tanto o precipitado como o sobrenadante foram aplicados em um gel de poliacrilamida de 15 % e as bandas obtidas por coloração com Coomasie Blue foram quantificadas usando o programa ImageJ (http://rsb.info.nih.gov/ij/). Todas as reações foram feitas em triplicata. A percentagem de polimerização de FtsZ foi calculada com a seguinte formula: (P / (S+P))*100 e os dados plotados em um gráfico de barras.

### 3.6. Espalhamento de luz

O espalhamento de luz dos polímeros de FtsZ foi medido usando um fluorímetro Hitachi F-4500. O comprimento de onda de excitação e emissão utilizado foi 350 nm, com aberturas de 5 nm, fotomultiplicador a 950 V e velocidade de *scan* de 60 nm/s. As reações foram preparadas com as proteínas em um total de 150 µL de tampão de polimerização HMK (50 mM HEPES, 5 mM MgAc, 100 mM KAc) pH 7,7 a 30 °C, em uma cubeta de quartzo de 100 µL. A linha de base foi capturada por aproximadamente 25 s, foi adicionado 1 mM de GTP e a mudança no espalhamento foi medida durante aproximadamente 300 s. MinC ou MinCDΔMTS foram adicionados à reação antes da adição de GTP. Os possíveis efeitos do tampão foram investigados em reações "branco" nas quais o tampão HEKG foi adicionado no mesmo volume que MinC ou MinCDΔMTS foram adicionados às reações.

### 3.7. Mutagênese sítio dirigida

A PCR do tipo QuickChange foi realizada para inserir a mutação Y44W no gene *min*C. Nela utilizamos oligonucleotídeos complementares com a mutação desejada. A reação foi composta por 1 µL pJB7, 1 µL oligonucleotídeo iniciador, 2 µL dNTPs (5 mM), 5 µL tampão HF (Phusion), 0,5 µL Phusion, 13 µL Betaína (4M), 27,5 µL água mili-Q. O programa de ciclagem de temperatura foi o seguinte: 98 °C por 30 segundos, 18 ciclos (98 °C 10 s, 60 °C por 30 s, 72 °C por 4 minutos), 72 °C por 5 minutos. Após o término da reação, foi adicionado 1 µL de enzima de restrição DpnI (New England Biolabs), 5 µL de 10X NEB Buffer Cutsmart (20 mM tris-acetato, 10 mM acetato de magnésio, 50 mM acetato de potássio, 100 µg/mL BSA, pH 7,9) e a digestão foi incubada a 37 °C por 4 horas. Por fim, o DNA foi purificado utilizando o "GeneJET PCR purification Kit" da Fermentas e células de *E. coli* DH5α competentes foram transformadas por choque térmico. O DNA plasmidial dessas bactérias foi extraído e seqüenciado para confirmação da mutação.

### 3.8. Fluorescência intrínseca do triptofano

Os ensaios de fluorescência foram realizados na presença de tampão 20 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, pH 7,5. Utilizando o fluorímetro Hitachi F-4500, configurado com PMT 700 V, abertura da luz emitida e excitada de 5 nm . O comprimento de onda de excitação foi 295 nm, e os dados de emissão foram coletados entre 320 e 360 nm, coletando os pontos de emissões a cada 0,4 nm. Todas as medições foram realizadas em triplicata. A intensidade de fluorescência líquida de MinC(Y44W)DΔMTS na presença de FtsZ foi determinada usando a seguinte equação $(F_{MZ} - F_Z)*V_{total}$, onde $F_{MZ}$ é a fluorescência da mistura de MinC(Y44W)DΔMTS + FtsZ, $F_Z$ é a fluorescência da mesma quantidade de FtsZ na ausência de MinC(Y44W)DΔMTS, e V é o volume da reação.

Desta maneira, o espectro de fluorescência foi corrigido para a fluorescência de FtsZ e dos componentes do tampão e para variação no volume das reações.

### 3.9. Microscopia Eletrônica

Para visualização em coloração negativa, foi usado um total de 10 µL de uma reação de polimerização de FtsZ (5 µM). A reação continha tampão de polimerização HMK (50 mM Hepes, 5 mM MgAc e 100 mM KAc) pH 7,7 e foi incubada por 1 min a temperatura ambiente após a adição de 1 mM de GTP. Os experimentos contendo FtsZ e MinC ou MinCDΔMTS (com/sem 1 mM ATP) foram preparados com uma proporção de 1:1. As reações foram dispensadas em telas para microscopia eletrônica de cobre 300 *mesh* recobertas com filmes de *formvar* e carbono. Após 60 segundos, o excesso de líquido foi removido com um papel filtro e a grade foi corada com 10 µL de acetato de uranila 2 % por aproximadamente 10 segundos e o excesso foi removido com um papel filtro. As imagens foram feitas usando 50000X de aumento com um microscópio JEOL JEM-2100 operando a 200 kV e equipado com uma câmera TVIPS F-416 CMOS. A microscopia foi realizada na Central Analítica do Instituto de Química - USP.

### 3.10. *Western Blotting*

Todos os procedimentos padrão de *Western Blotting* foram realizados de acordo com Towbin H. *et al.*, 1979. Os lisados bacterianos foram resolvidos em gel de poliacrilamida (15 %) sob corrente contínua e posteriormente transferidos para a membrana de PVDF (Amersham Hybond TM-P GE Healthcare). A transferência foi feita em tampão de transferência (2,5 mM Tris-HCl, 20 mM Glicina, 20% Metanol e 0,1 % SDS) a 300 mA por 2 horas a 5 °C. O bloqueio da membrana foi *overnight* e utilizamos TBST contendo Tween-20 0,7% e 5 % de leite desnatado. Em seguida foi adicionado o

anticorpo primário anti-MinC (doação do Dr. Jeff Errington, Newcastle University, Inglaterra) na proporção 1:1000 e incubado por 1 hora. As membranas foram lavadas posteriormente com TBST+Tween-20 por três vezes e a seguir foi adicionado e incubado por 1 hora o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com HRP (Pierce) na proporção de 1:15000. Após novas lavagens, a membrana foi revelada com o substrato para HRP (ECL *Prime Western Blotting Detection Reagent* – GE Healthcare) usando High Performance Chemiluminescence Film (GE Healthcare).

# 4. RESULTADOS

## 4.1. Capacidade de MinD de ativar MinC *in vivo*

Para determinar a capacidade de MinD de ativar MinC *in vivo*, comparamos as consequências fenotípicas da superexpressão de MinC nas seguintes condições: MinC sozinho (MinC), MinC com MinD selvagem (MinCD) e MinC com uma versão truncada de MinD com o segmento de ligação à membrana deletado (MinCDΔMTS). Todas as construções possuíam a proteína GFP fusionada à região N-terminal de MinC (GFP-MinC), com objetivo de observar a localização de MinC por microscopia de fluorescência. MinD ou MinDΔMTS foram colocados em *cis* com MinC (GFP-MinCD e GFP-MinCDΔMTS), já que foi reportado que MinC e MinD formam o complexo inibitório da divisão e este último por sua vez apresenta localização polar (Marston A. e Errington J., 1999).

Trabalhos anteriores mostraram que para MinC ter um efeito no fenótipo da célula, ela necessita ser expressa em altas quantidades (50 vezes o nível fisiológico) (de Boer P. *et al*, 1991). Por isso, todas as construções foram feitas no plasmídeo pDR111, que é um plasmídeo de integração e tem um promotor forte, Phyperspank (P*spank-hy*), induzido por IPTG (Britton R. *et al*, 2002), gerando os plasmídeos pJB56 (P*spank-hy-gfp-min*C), pJB57 (P*spank-hy-gfp-min*CD) e pJB58 (P*spank-hy-gfp-min*CDΔMTS). Esses plasmídeos finalmente foram integrados no genoma de *B. subtilis* por dupla recombinação no locus *amy*E.

Os plasmídeos foram inicialmente introduzidos em uma cepa mutante para MinCD (Δ*min*CD) e as linhagens resultantes foram observadas em microscópio de fluorescência com adição de corante vermelho de membrana FM4-64 para visualização de seu tamanho celular e padrão de divisão (Figura 10, 11, 12). Os dados obtidos mostraram que todas as linhagens apresentaram um fenótipo parecido a uma cepa

Δ*min*CD na ausência de IPTG, com médias de tamanho de 8±2,8; 7,4±2,4 e 7,7±2,5 µm para as linhagens com cópias extras de *min*C (JB90), *min*CD (JB91) e *min*CDΔMTS (JB92) respectivamente, e uma porcentagem de mini-células variável entre 22-30 % (Tabela 4). Já na presença de IPTG, as células da linhagem induzida a superexpressar MinCD exibiram o fenótipo filamentoso esperado (>20 µm) (Figura 10, Tabela 4) (Marston A. e Errington J., 1999) e as mini-células desapareceram (Figura 10, Tabela 4). No caso da superexpressão de MinC as células exibiram um tamanho médio de 8,4±2,9 µm, com cerca de 26 % de minicélulas, sendo mais parecidas com a cepa Δ*min*CD, não sendo observada diferença significativa quando comparado com a mesma linhagem sem induzir ($t_1$=1,44 p=0,23). Isso sugere que no nível de superexpressão obtido a partir de nossa construção, MinC sozinho não é capaz de inibir a divisão celular. Finalmente, quando o complexo MinCDΔMTS foi superexpresso, levou a um pequeno mas significativo incremento ($t_1$=14,4 p=0,00) no tamanho das células, com uma média de tamanho de 8,9±3,3 µm e uma porcentagem de mini-células de cerca de 27 % (Tabela 4). Embora o teste estatístico tenha sido significativo nesta situação, não foi observada uma diminuição na porcentagem de minicélulas (Tabela 4) que indicasse o resgate do fenótipo. Este comportamento é muito semelhante ao apresentado pela superexpressão de MinC sozinho e isso sugere que o complexo de MinC com MinDΔMTS não é ativo suficiente para inibir a divisão ou resgatar o fenótipo selvagem.

Uma informação importante para a interpretação dos resultados acima é a localização subcelular de MinC. Quando o complexo GFP-MinCD foi superexpresso, a fusão GFP-MinC, como observado na figura 10 localizou-se na membrana, diferente do que acontece em condições normais (localização polar) (Figura 8), dessa maneira o complexo estaria inibindo a divisão ao longo de toda a célula e isto explicaria porque a suprexpressão do complexo estaria formando células filamentosas. Por outro lado,

quando GFP-MinC foi superexpresso, ele não se localizou, ficando espalhado no citoplasma como se observa na figura 10. Isto confirma a importância de MinD na localização de MinC (Marston A. e Errington J., 1999; Hu Z. e Lutkenhaus J., 2003). Finalmente, quando o complexo GFP-MinCDΔMTS foi superexpresso, GFP-MinC também estava deslocalizada, assim como no caso de MinC sozinha (Figura 10). Isto confirma que a perda do segmento de ligação à membrana (MTS) de MinD impede que o complexo MinCD se associe à membrana.

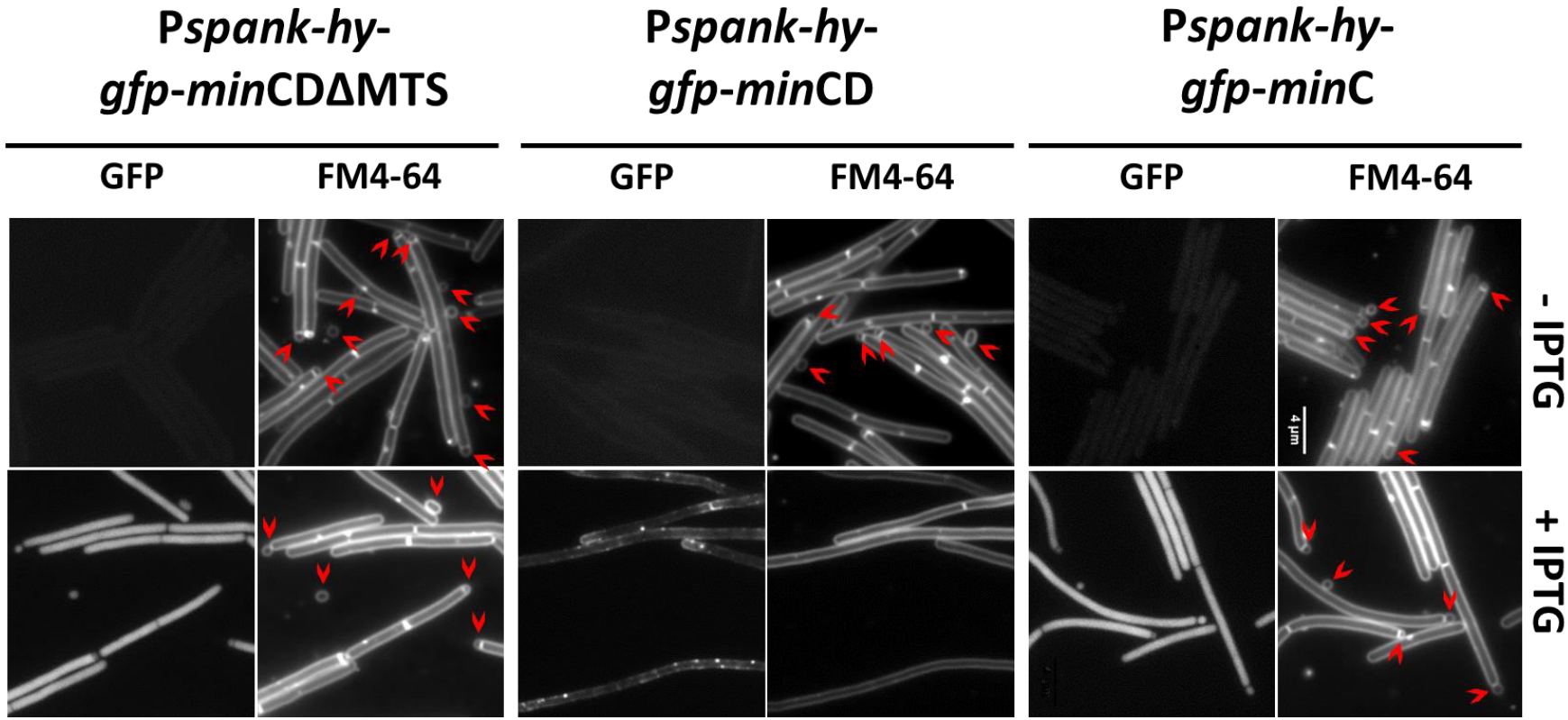


**Figura 10.** Fenótipo de divisão e localização subcelular de MinC das linhagens Δ*min*CD com/sem superexpressão de MinC, MinCD ou MinCDΔMTS. As células das linhagens JB90 (P*spank-hy-gfp-min*C), JB91 (P*spank-hy-gfp-min*CD) e JB92 (P*spank-hy-gfp-min*CDΔMTS) foram crescidas até fase exponencial na ausência (-IPTG) ou na presença de 0.5 mM de IPTG (+IPTG), subsequentemente tratadas com corante FM4-64 e cerca de 8 µL de cada cultura foi inoculado num tapete de LB-agarose 1.5% em lâminas para microscópio. As setas vermelhas indicam as características mini-células. Barra de escala 4 µm.

**Tabela 4.** Medidas de tamanho e porcentagem de mini-células nas linhagens Δ*min*CD com/sem superexpressão de MinC, MinCD ou MinCDΔMTS.

| | **Tamanho (µm)** | | **% Mini-células** | |
|---|---|---|---|---|
| | -IPTG | +IPTG | -IPTG | +IPTG |
| Δ*min*CD | 8,1 | | 25 | |
| P*spank-hy-gfp-min*C | 8±2,8 | 8,3±2,9 | 30 | 26 |
| P*spank-hy-gfp-min*CD | 7,4±2,4 | >20 | 22 | 0 |
| P*spank-hy-gfp-min*CDΔMTS | 7,7±2,5 | 8,9±3,3 | 27 | 27 |

Em uma cepa Δ*min*CD existe uma variação no tamanho das células devido as divisões assimétricas que ocorrem na ausência de um sistema Min funcional. Essa grande variação de tamanho, observável no desvio padrão da tabela 4, torna difícil de discernir se existe alguma diferença discreta no fenótipo das células. Assim, com a finalidade de evitar as variações obtidas na cepa Δ*min*CD, as construções foram introduzidas em uma cepa selvagem (PY79), gerando as linhagens JB62 (P*spank-hy-gfp-min*C), JB63 (P*spank-hy-gfp-min*CD) e JB64 (P*spank-hy-gfp-min*CDΔMTS), que além da cópia indutível de GFP-MinC, GFP-MinCD ou GFP-MinCDΔMTS possui os genes endógenos sendo expressos de seu promotor natural. As médias do tamanho das linhagens sem induzir a expressão das cópias extras de *min*C, *min*CD e *min*CDΔMTS foram: 4,7±1; 4,8±1 e 4,8±0,8 µm respectivamente, sendo semelhantes ao tamanho da cepa selvagem. Assim como no caso da linhagem Δ*min*CD, quando MinCD foi superexpresso, como esperado, foram observadas células filamentosas (Figura 11) com tamanhos >20 µm (Tabela 5). Por outro lado, quando superexpressamos MinC a média do tamanho das células não exibiu diferença significativa ($t_1$=0,25 p=0,62) se comparada com a mesma linhagem sem indução, sendo de 4,7±1 µm. Finalmente, a superexpressão do complexo MinCDΔMTS levou a um pequeno aumento significativo ($t_1$=33,4 p=0,00) no comprimento de ~0,9 µm, com uma média de tamanho de 5,6±1,3 µm (Tabela 5). Os resultados obtidos foram

semelhantes ao obtido com as linhagens Δ*min*CD, em que a superexpressão do complexo truncado (MinCDΔMTS ) conseguiu ter um ligeiro efeito no tamanho celular, corroborado pela significância dos testes estatísticos.

Neste experimento também determinamos a localização subcelular de MinC. Quando o complexo GFP-MinCD foi superexpresso, a fusão GFP-MinC, como observado na figura X localizou-se na membrana, como aconteceu na linhagem Δ*min*CD. Por outro lado, quando GFP-MinC ou GFP-MinCDΔMTS foram superexpressos, eles exibiram uma localização parcial no septo de divisão, isto possivelmente devido a interação com a proteína endógena (MinD) que estaria localizando-as (Figura 11).

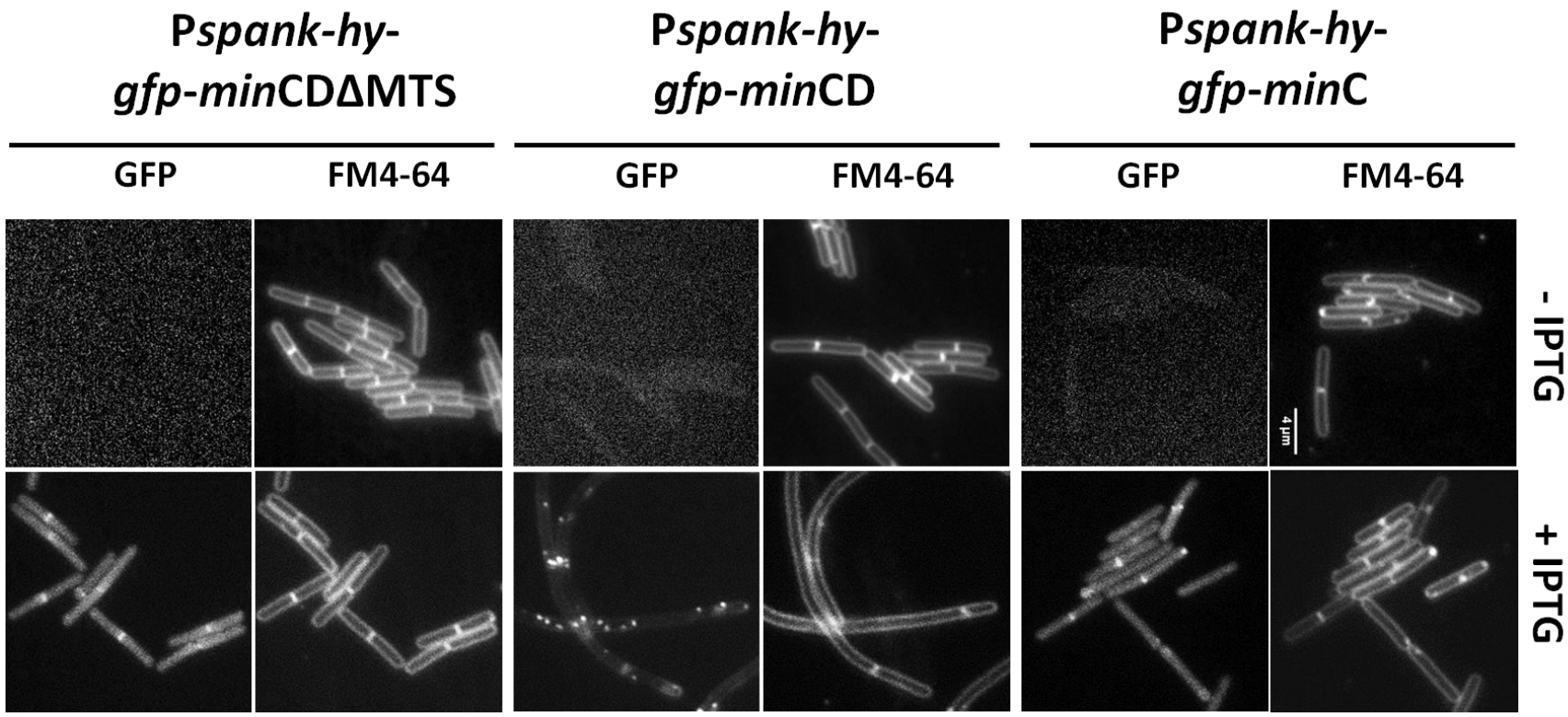


**Figura 11.** Fenótipo de divisão e localização subcelular de MinC das linhagensselvagem com/sem superexpressão de MinC, MinCD ou MinCDΔMTS. As células das linhagens JB59 (P*spank-hy-gfp-min*C), JB60 (P*spank-hy-gfp-min*CD) e JB61 (P*spank-hy-gfp-min*CDΔMTS) foram crescidas até fase exponencial na ausência (-IPTG) ou na presença de 0.5 mM de IPTG (+IPTG), subsequentemente tratadas com corante FM4-64 e cerca de 8 µL de cada cultura foi inoculado num tapete de LB-agarose 1.5% em lâminas para microscópio. Barra de escala 4 µm.

**Tabela 5.** Medidas de tamanho e porcentagem de mini-células nas linhagens selvagens com/sem superexpressão de MinC, MinCD ou MinCDΔMTS.

| | **Tamanho (µm)** | | **% Mini-células** | |
|---|---|---|---|---|
| | -IPTG | +IPTG | -IPTG | +IPTG |
| Selvagem | 4,4 | | 0 | |
| P*spank-hy-gfp-min*C | 4,7±1 | 4,7±1 | 0 | 0 |
| P*spank-hy-gfp-min*CD | 4,8±1 | >20 | 0 | 0 |
| P*spank-hy-gfp-min*CDΔMTS | 4,7±0.8 | 5,6±1,3 | 0 | 0 |

Tanto MinC como MinCDΔMTS não exibiram um efeito notável nas linhagens apresentadas acima. Se conseguíssemos um efeito mais forte desses inibidores talvez fosse possível ver uma maior diferença entre eles. Para tentar favorecer o efeito inibitório de MinC se decidiu tentar outra abordagem. Essa nova abordagem consistiu em deixar a divisão celular mais sensível, pois isso poderia aumentar o efeito de nossos inibidores. Para isso, introduzimos as nossas construções em uma cepa Δ*zap*A. ZapA é uma proteína conhecida pela função de estabilizar os polímeros de FtsZ e que é capaz de antagonizar os efeitos inibitórios de MinCD (Gueiros-Filho F. e Losick R., 2002). As medições obtidas das células sem indução mostraram ser parecidas com uma cepa selvagem, com médias de 3,46±0,8; 3,23±0,8 e 3,95±0,8 µm para as linhagens com cópias extras de *min*C (JB65), *min*CD (JB66) e *min*CDΔMTS (JB67) respectivamente. Assim como no caso do experimento feito nos *backgrounds* Δ*min*CD e selvagem, quando MinCD foi superexpresso se observaram as características células filamentosas (Figura 12) com comprimentos >20 µm (Tabela 6). Em contraste, a superexpressão de MinC levou a um pequeno aumento significativo ($t_1$=53,4 p=0,00) de comprimento das células de ~0,7 µm, com uma média de tamanho de 4,15±1 µm, enquanto que a superexpressão de MinCDΔMTS levou a um pequeno aumento significativo ($t_1$= 63,28 p=0,00) de comprimento das células de ~1 µm, com uma média de tamanho de 4,99±1.3 µm (Tabela 6). Os dados obtidos mostraram que as construções feitas no mutante Δ*zap*A tiveram um

efeito ligeiramente maior do que na cepa selvagem, já que se observou um aumento no comprimento das células inclusive quando MinC foi superexpresso.

Para saber se o incremento de tamanaho observado foi significativo quando MinCDΔMTS foi superexpresso, o *t-teste welch* foi feito comparando as situações da superexpressão de MinCDΔMTS e MinC sozinho nas diferentes condições. Assim, na linhagem selvagem quando MinCDΔMTS foi superexpresso exibiu diferença significativa ($t_1$=25,4 p=0,00) quando comparada com a superexpressão de MinC sozinho, sendo essa diferencia significativa também na linhagem Δ*zap*A ($t_1$=39,2 p=0,00). No entanto, mesmo nessa situação de divisão sensibilizada o efeito da superexpressão de MinC e MinCDΔMTS foi pequeno quando comparada com a suprexpressão de MinCD.

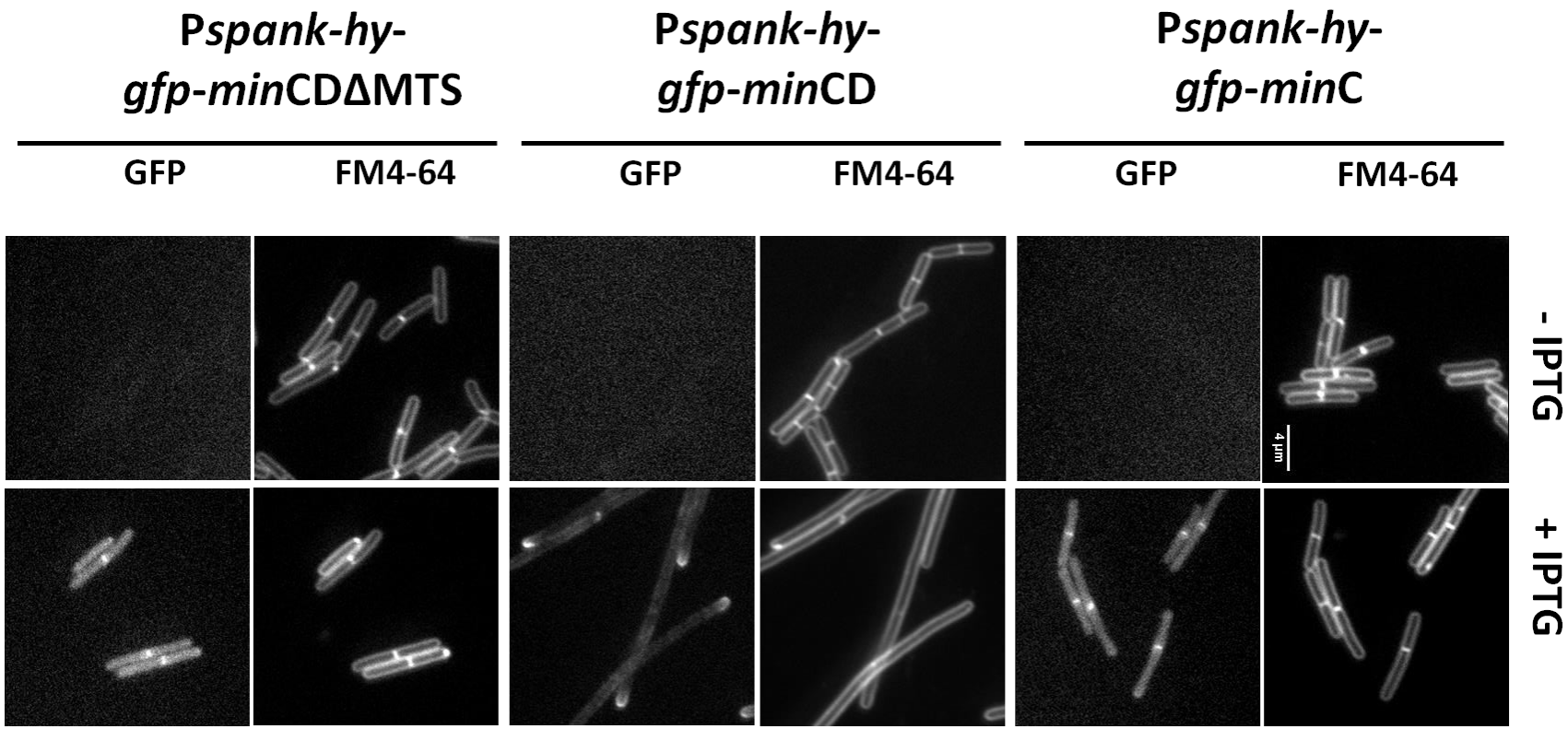


**Figura 12.** Fenótipo de divisão e localização subcelular de MinC das linhagens Δ*zap*A com/sem superexpressão de MinC, MinCD ou MinCDΔMTS. As células das linhagens JB (P*spank-hy-gfp-min*C), JB (P*spank-hy-gfp-min*CD) e JB (P*spank-hy-gfp-min*CDΔMTS) foram crescidas até fase exponencial na ausência (-IPTG) ou na presença de 0.5 mM de IPTG (+IPTG), subsequentemente tratadas com corante FM4-64 e cerca de 8 µL de cada cultura foi inoculado num tapete de LB-agarose 1.5% em lâminas para microscópio. Barra de escala 4 µm.

**Tabela 6.** Medidas de tamanho e porcentagem de mini-células nas linhagens Δ*zap*Acom/sem superexpressão de MinC, MinCD ou MinCDΔMTS.

| | **Tamanho (µm)** | | **% Mini-células** | |
|---|---|---|---|---|
| | -IPTG | +IPTG | -IPTG | +IPTG |
| Δ*zap*A | 3,5 | | 0 | |
| P*spank-hy-gfp-min*C | 3,46±0,8 | 4,15±1 | 0 | 0 |
| P*spank-hy-gfp-min*CD | 3,23±0,8 | >20 | 0 | 0 |
| P*spank-hy-gfp-min*DΔMTS | 3,95±0,8 | 4,99±1,3 | 0 | 0 |

Um controle importante para a interpretação dos resultados descritos até aqui foi a quantificação dos níveis de MinC em cada uma de nossas linhagens. Para isto, realizamos experimentos de *Western Blot* que mostraram que as nossas construções não causaram redução na concentração intracelular de MinC endógeno e exibiram uma expressão de GFP-MinC de ~10X vezes acima dos níveis endógenos desta proteína (Figura 13), sendo este nível semelhante independentemente da construção indutível utilizada (P*spank-hy-GFP-MinC*, P*spank-hy-GFP-MinC* ou P*spank-hy-GFP-MinCDΔMTS*). Isso confirma que as diferenças de atividade apresentadas pelas diferentes construções não são um artefato resultante de diferentes níveis de expressão de MinC.

Em conjunto, estes experimentos sugerem que MinC requer de MinD para se localizar na membrana e para ter atividade *in vivo*. Entretanto, os resultados estatísticos mostraram que o incremento de tamanho foi significativo quando MinCDΔMTS foi superexpresso nas diferentes linhagens. Isto, sugere que é possível que alguma mudança esteja acontecendo em MinC quando MinDΔMTS é superexpresso junto com MinC, tornando MinC mais ativo.

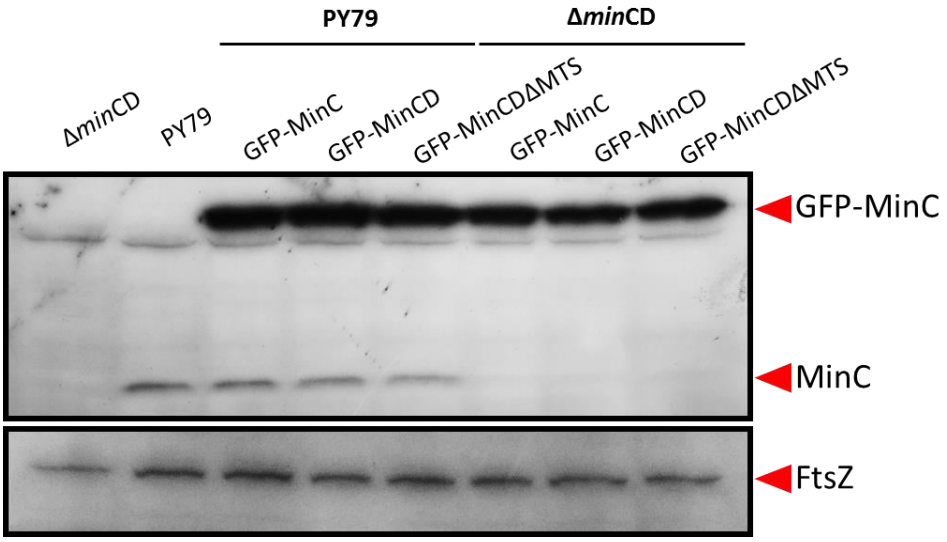


**Figura 13.** *Western blotting* com as construções que superexpressam GFP-MinC. As células foram induzidas com 0,5 mM de IPTG por 2 horas. As amostras foram incubadas com anticorpo policlonal de coelho anti-MinC. Após lavagens, a incubação ocorreu com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado a HRP (*horseradish peroxidase*), as membranas foram lavadas novamente e reveladas por quimioluminescência. Como normalizador da quantidade de proteína aplicada no gel, utilizou-se anticorpo anti-FtsZ. A canaleta Δ*min*CD mostra que a banda logo abaixo de GFP-MinC é reconhecida inespecificamente pelo anticorpo.

### 4.2. Co-expressão e co-purificação do complexo MinCDΔMTS

Os resultados dos experimentos *in vivo* sugeriram a possibilidade de um efeito de MinD sobre MinC, além do recrutamento à membrana. Esse efeito poderia ser uma mudança alostérica em MinC que o tornasse mais ativo. Para testar essa hipótese se caracterizou o efeito do complexo MinCDΔMTS sobre FtsZ *in vitro*, e se comparou com o efeito de MinC. Assim, foi feita uma construção capaz de co-expressar as proteínas MinC e MinDΔMTS em *E. coli* (Figura 14A). Para isso, os genes *min*C-*min*D foram amplificados por uma PCR a partir de DNA genômico de *B. subtilis* PY79. O par *min*CD foi amplificado sem a região dos aminoácidos de MinD que tem afinidade pela membrana (MTS). Os genes codificantes de MinCD foram cortados com enzimas de restrição XhoI e NheI e clonados em plasmídeo pET24b (Figura 14B), que apresenta uma cauda de histidina no C-terminal. A cauda de histidinas ($his_6$) estaria fusionada à região C-terminal

de MinD de nossa construção e ela serviria para se ligar ao níquel, assim MinC se ligaria a MinD-his$_6$ e o complexo seria co-purificado. As construções para expressão e purificação de MinC (em plasmídeo pET24b) e FtsZ (em plasmídeo pET28a) foram obtidas da coleção de nosso laboratório. O promotor que expressa esses genes em pET24b e pET28a pode ser induzido por IPTG. Assim, os plasmídeos foram transformados em cepas de *E. coli* BL21(DE3) CodonPlus-RIL competentes, crescidos em meio adicionado do indutor e as células foram lisadas por sonicação. Após esse processo, as proteínas foram purificadas por cromatografia de afinidade em coluna de níquel (HiTrap™ Chelating HP).

A purificação das proteínas foi realizada inicialmente em tampão TEKG (50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 50 mMKCl e 10 % Glicerol), pH 8. O complexo MinCDΔMTS foi obtido corretamente neste tampão (tampão I), aparentando conter quantidades semelhantes de MinC e MinDΔMTS (1:1) (Figura 16, raia 13), algo esperado pela estrutura cristalográfica de MinCD (Ghosal D. *et al*., 2014) e os polímeros formados por MinCD observados em ensaios de microscopia eletrônica (Conti J. *et al*., 2014; Ghosal D. *et al*., 2014). No entanto, a proteína precipitava a concentrações maiores que ~5 µg/µL nesse tampão. Devido à necessidade de ter a proteína mais concentrada para facilitar os ensaios *in vitro* foram realizados testes com outros tampões para a otimização do protocolo de purificação (Figura 15). A utilização de tampão com mais alta concentração de sal (tampão II na Figura 15) levou à desestabilização do complexo e perda de MinC durante a purificação. O tampão IV que usou 150 mM de NaCl e com o pH mais alcalino também desestabilizou o complexo, causando a perda de MinC durante a purificação. O tampão com melhor desempenho foi o tampão III: HEKG (50 mM HEPES, 0,1 mM EDTA, 150 mM KCl e 10 % glicerol), pH 7,2, no qual conseguimos concentrar o complexo até ~10 µg/µL. Nessas condições o complexo foi mantido estável e com

concentrações estequiométricas de MinC e MinDΔMTS. A figura 16 mostra um exemplo da purificação otimizada tanto de MinCDΔMTS como de MinC e FtsZ, monitorada numa eletroforese SDS-PAGE 15 %.

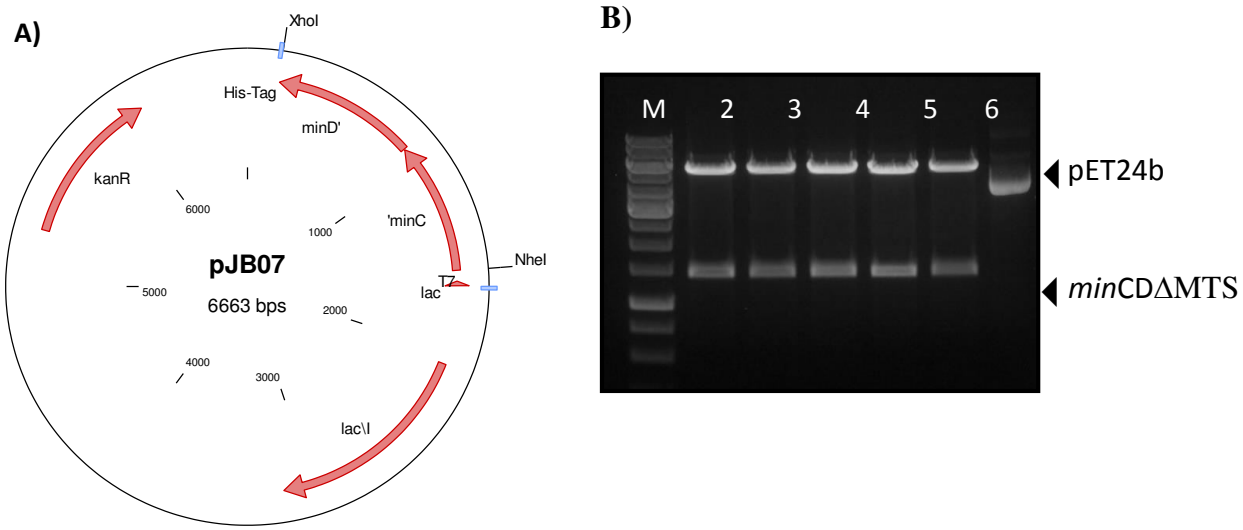


**Figura 14. A)** Plasmídeo pJB07 (pET24b + *min*CDΔMTS). **B)** Teste de restrição dos clones, cortados com enzimas XhoI e NheI. M, marcador de peso molecular 1Kb. 2-6, clones. 7, plasmídeo pET24b não digerido.

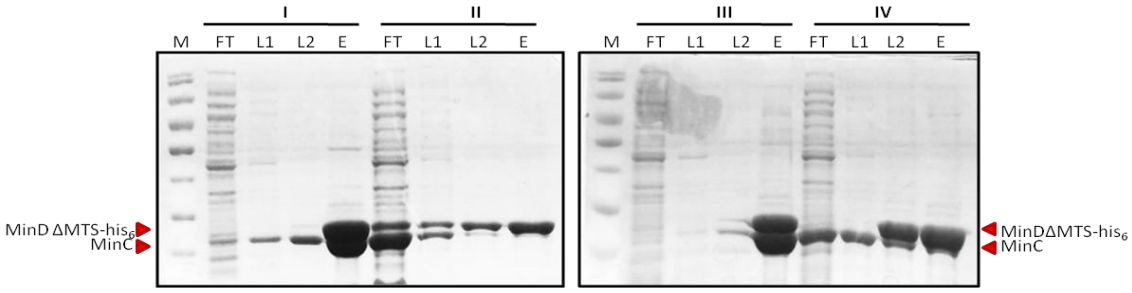


**Figura 15.** Teste de tampões para otimização da purificação do complexo MinCDΔMTS. **I**, 50 mM Tris 50 mM KCl 1 mM EDTA pH 8; **II**, 20 mM Tris 200 mM NaCl 2 mM EDTA 25 % Glycerol pH 7,5; **III**, 50 mM Hepes 150 mM KCl 0,1 mM EDTA 10 % Glycerol pH 7,2; **IV**, 50 mM Tris 150 mM NaCl 0,5 mM EDTA 10 % Glycerol pH 8. **M:** Marcador de peso molecular. **FT:** *Flow Through*. **L1:** Primeira lavagem com 5 mM de imidazol. **L2:** Segunda lavagem com 10 mM de imidazol. **E:** Eluição com 300 mM de imidazol.

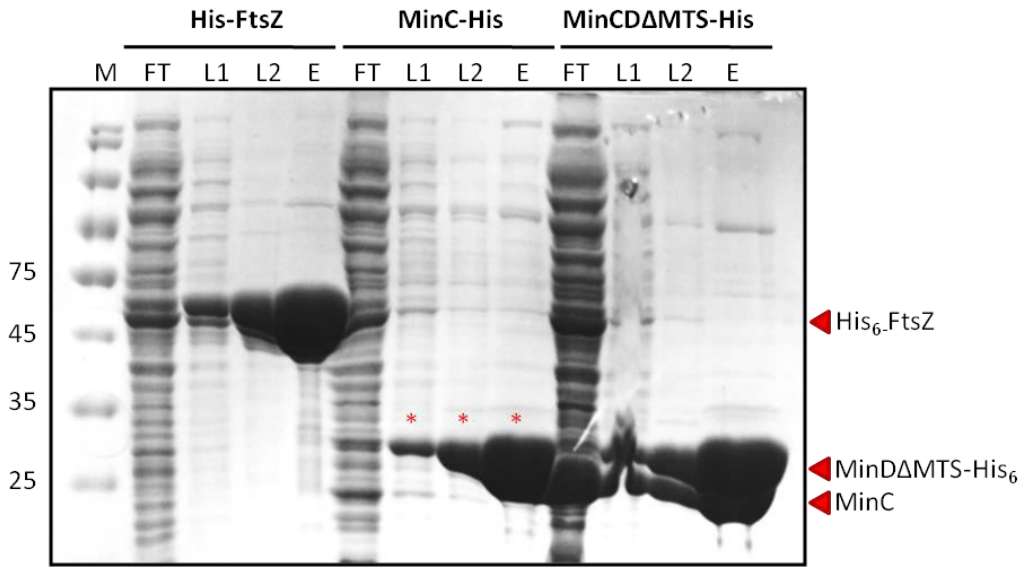


**Figura 16.** Eletroforese SDS-PAGE da marcha de purificação das proteinas FtsZ, MinC e MinCDΔMTS por cromatografia de afinidade ao níquel. **M:** Marcador de peso molecular. **FT:** *Flow Through*. **L1:** Primeira lavagem com 5 mM de imidazol. **L2:** Segunda lavagem com 10 mM de imidazol. **E:** Eluição com 300 mM de imidazol.* Indica MinC-$His_6$.Exibe um maior tamanho, devido ao peso da cauda de histidinas.

### 4.3. Medição da atividade de MinCDΔMTS frente aos polímeros de FtsZ

#### 4.3.1. Sedimentação

Para comparar a atividade de MinCDΔMTS com a de MinC sozinho, realizamos experimentos de sedimentação dos polímeros. Os ensaios foram realizados em tampão HMK (50 mM Hepes, 5 mM MgAc e 100 mM KAc) pH 7.7, adicionado de 10 mM de $CaCl_2$ e 2 mM GTP para polimerizar 10 µM de FtsZ, além de MinC ou MinCDΔMTS adicionados numa concentração de 20 µM. FtsZ foi induzido a polimerizar, depois MinC ou MinCDΔMTS foram adicionados, a mistura foi incubada 10 min a 30 °C e em seguida centrifugada a 100000 rpm por 15 min em um rotor TLA 120.1 (Beckman). O precipitado obtido foi ressuspendido no mesmo volume que o sobrenadante e ambos foram resolvidos num gel de poliacrilamida 15 %. A figura 17 mostra o gel de uma reação de sedimentação de FtsZ com e sem inibidor (MinC ou MinCDΔMTS). O ensaio foi feito em triplicata e a quantificação das bandas com o software ImageJ mostra que MinC reduziu a quantidade de FtsZ sedimentado de ~30 % para ~19 %, enquanto MinCDΔMTS reduziu a quantidade

de FtsZ sedimentado de 30 % para ~16 % (Figura 17). Portanto, a inibição de MinC ou MinCDΔMTS contra os polímeros de FtsZ não exibiu uma diferença notável quando usamos esta técnica.

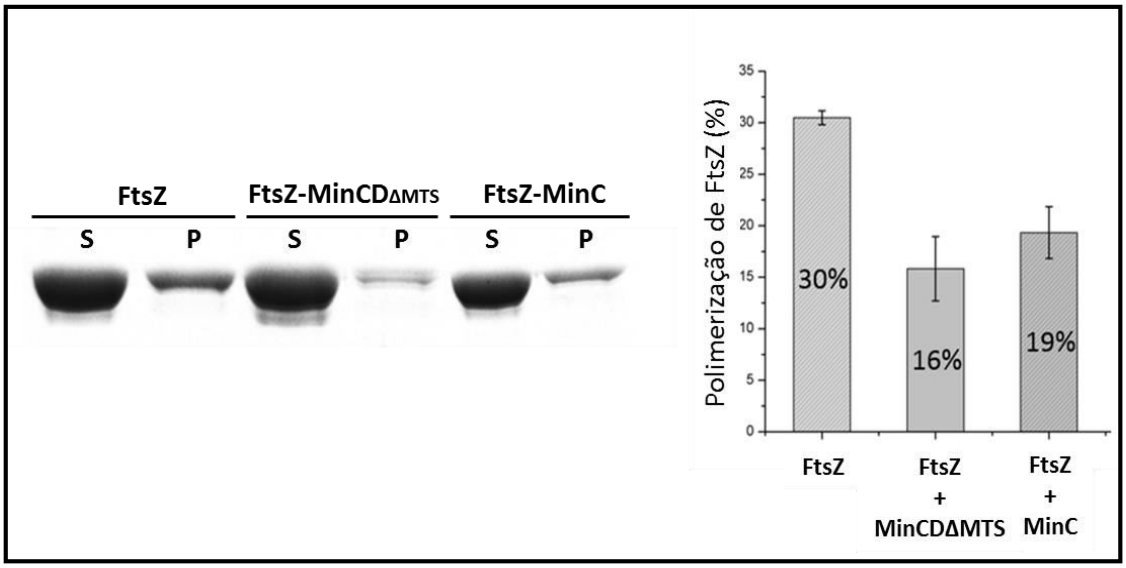


**Figura 17.** Esquerda, exemplo de ensaio de sedimentação de FtsZ com/sem inibidor. Reações contendo 10 µM de FtsZ em tampão de polimerização HMK pH 7,7 com 10 mM de $CaCl_2$ e 2 mM de GTP, com ou sem 20 µM de inibidor. Após centrifugação, os precipitados (P) foram ressuspendidos no mesmo volume do sobrenadante (S) e resolvidos por SDS-PAGE. Direita, quantificação do ensaio feito em triplicata.

### 4.3.2. Espalhamento de Luz

Como nos ensaios de sedimentação não se conseguiu detectar uma diferença notável entre a atividade de MinC e MinCDΔMTS em desfazer os polímeros de FtsZ, se decidiu tentar uma abordagem diferente, utilizando a técnica de espalhamento de luz, que é frequentemente usada para determinar a polimerização de FtsZ (Mukherjee A. e Lutkenhaus J., 1999; Król e Scheffers, 2013). Esse ensaio foi realizado no tampão HMK pH 7,7 e a reação foi iniciada pela adição de GTP. No caso de MinCDΔMTS, ATP também foi adicionado já que ele promove a dimerização de MinD (Hu Z. *et al.*, 2002; Szeto T. *et al.*, 2003) e isto poderia ter algum efeito na atividade do complexo MinCDΔMTS. A polimerização de FtsZ foi inibida pela adição de MinCDΔMTS em uma concentração molar duas vezes maior do que a de FtsZ (15 µM de MinCDΔMTS para 7,5

μM de FtsZ), resultando em uma inibição de ~50 % na intensidade de luz espalhada (Figura 18). Em comparação, a adição de MinC à reação de polimerização resultou em ~15 % de inibição (Figura 18), sugerindo que na forma de complexo com MinDΔMTS, MinC torna-se mais ativo. Além disso, a inibição por MinCDΔMTS em nosso ensaio mostrou-se maior (~70 %), quando ATP foi adicionado à reação. Como descrito, o ATP induz a oligomerização de MinCD (Conti J. *et al*., 2014; Ghosal D. *et al*., 2014) e para determinar se isso estava acontecendo e se essa era a razão pela qual o complexo MinCDΔMTS estava sendo mais ativo na presença de ATP, realizamos um ensaio de espalhamento de luz para determinar se o ATP induzia a formação de estruturas oligoméricas de MinCDΔMTS. No entanto, não foi observado um incremento de sinal quando o ATP foi adicionado a MinCDΔMTS (Figura 19). Como o espalhamento de luz é uma técnica que só detecta agregados de grande massa molecular, realizamos também uma cromatografia de exclusão molecular para verificar a possível formação de oligômeros de MinCDΔMTS quando o ATP foi adicionado. O ensaio exibiu uma diminuição nas espécies que corresponderiam a MinD e MinCDΔMTS e um pequeno aumento deslocado para a esquerda na linha azul (Figura 20) quando o ATP foi adicionado às proteínas. Isto, sugere que o ATP poderia estar induzindo a formação de oligômeros de MinCDΔMTS que não estariam sendo detectados pelo espalhamento de luz.

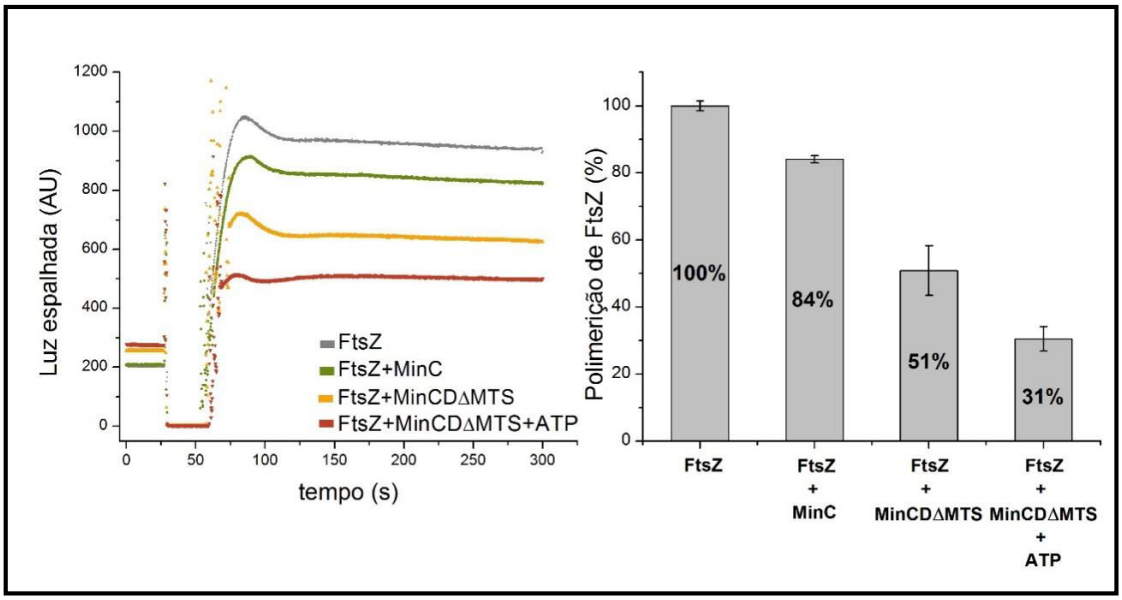


**Figura 18.** Esquerda, traçado representativo de espalhamento de luz de um experimento realizado com FtsZ na ausência de inibidor e na presença de MinC ou MinCDΔMTS. Reações contendo 7,5 µM de FtsZ e 15 µM de MinC ou MinCDΔMTS (com ou sem 1 mM de ATP) em tampão HMK pH 7,7. Direita, experimentos similares ao da esquerda foram realizados e a inibição da polimerização de FtsZ por MinC ou MinCDΔMTS (com ou sem ATP) foi quantificada em relação ao sinal máximo do espalhamento de luz na ausência de inibidores. Medições foram repetidas três vezes para cada condição com resultados similares.

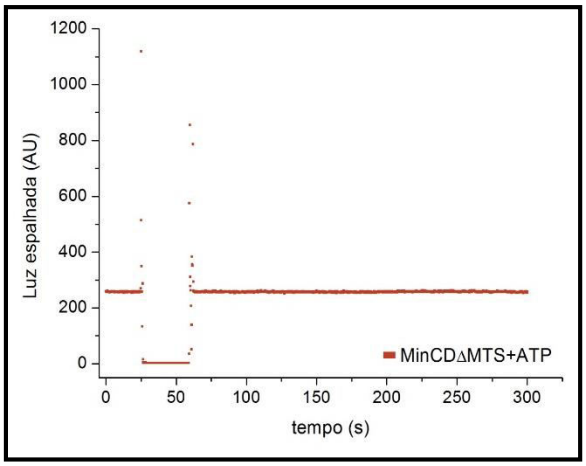


**Figura 19.** Traçado representativo de espalhamento de luz de um experimento realizado com MinCDΔMTS na presença de ATP. Reações contendo 15 µM de MinCDΔMTS e 1 mM de ATP em tampão HMK pH 7,7.

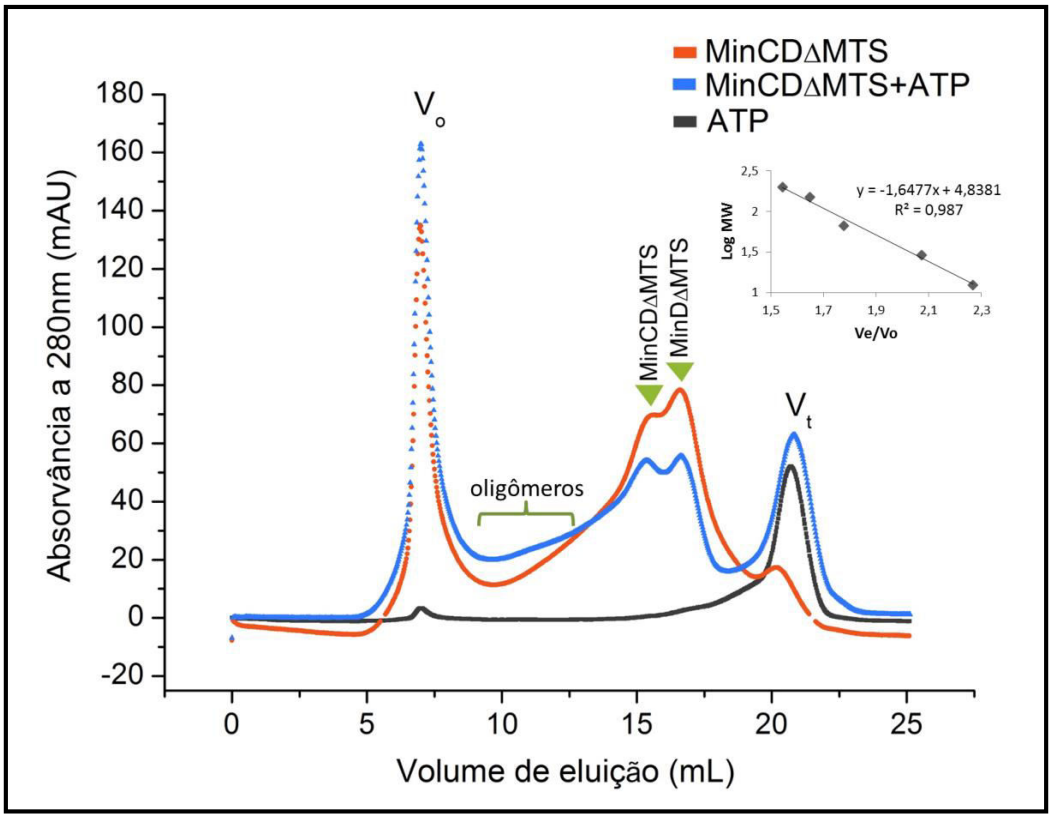


**Figura 20.** Cromatografia de exclusão molecular realizada numa coluna S200, 25mL com a adição de 100 µM de MinCDΔMTS na ausência ou presença de 1 mM de ATP.

### 4.3.3. Microscopia Eletrônica

Para tentar determinar o mecanismo de ação do nosso complexo MinCDΔMTS frente aos polímeros de FtsZ, observamos por microscopia eletrônica de transmissão e coloração negativa o que aconteceu quando os inibidores foram adicionados à reação de polimerização de FtsZ.

Experimentos realizados com FtsZ polimerizado pela adição de GTP exibiram protofilamentos individuais, assim como formação de feixes e estruturas tipo anel (Figura 21), como já reportados (Beuria T. *et al*., 2006; Popp D. *et al*., 2009; Pacheco-Gómez R. *et al*., 2011). Esse ensaio foi repetido agora com a presença de inibidor e revelou que na presença de MinC os feixes de FtsZ continuaram aparecendo, mas desta vez em menor quantidade, indicando a atividade de MinC em inibir a polimerização de FtsZ (Figura 21).

Entretanto, na presença do complexo MinCDΔMTS, deixamos de visualizar feixes e só protofilamentos individuais foram observados (Figura 21).

Esses dados, sugerem que o mecanismo de ação de MinC seria impedir a formação de feixes, inibindo as interações laterais entre protofilamentos de FtsZ e que MinDΔMTS estaria tornando MinC mais ativo. Esses resultados também avalizam o nosso ensaio de espalhamento de luz, no qual o complexo MinCDΔMTS conseguiu inibir os polímeros de FtsZ melhor do que MinC sozinho.

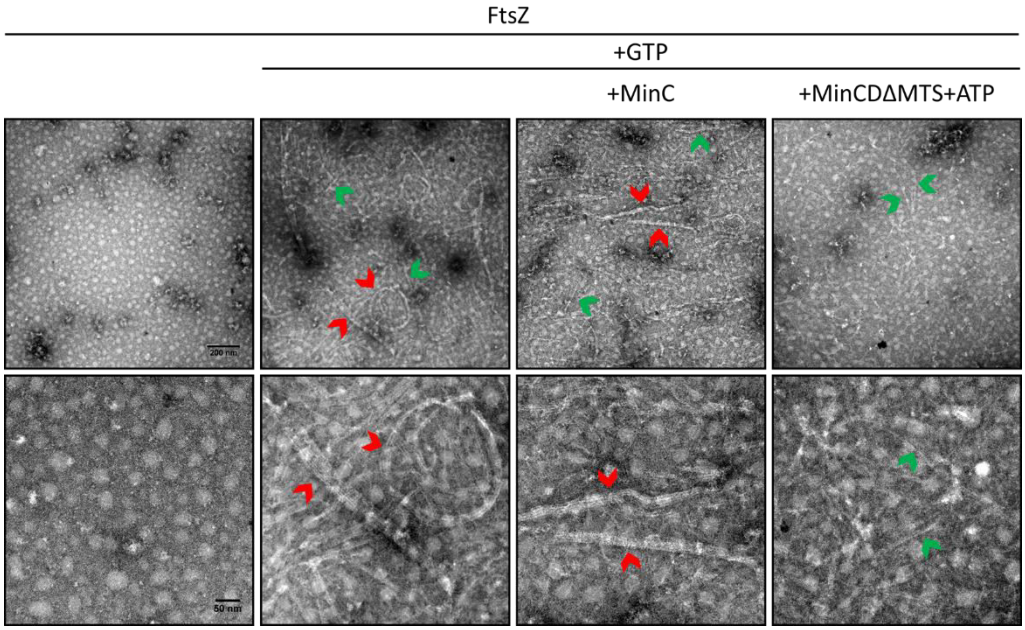


**Figura 21.** Microscopia eletrônica de transmissão dos polímeros formados na ausência e presença de MinC ou MinCDΔMTS. 5 µM de FtsZ e 1 mM de GTP em tampão HMK pH 7,7. MinC ou MinCDΔMTS estavam presentes na concentração de 10 µM. Barra de escala de 200 nm para os painéis superiores e 50 nm para os inferiores. As setas vermelhas indicam os feixes de FtsZ, as setas verdes indicam os protofilamentos individuais de FtsZ.

### 4.4. Medição da interação de MinCDΔMTS com FtsZ

Para medir a afinidade entre MinCDΔMTS e FtsZ utilizamos a fluorescência intrínseca do triptofano. Como MinC não apresenta na sua sequência nenhum resíduo de triptofano, usamos mutação sitio dirigida para introduzir um resíduo de triptofano no domínio N-terminal de MinC (Y44W), como em Blasios V. *et al*, 2013. A mistura de $MinC^{Y44W}$ ou $MinC^{Y44W}$MinDΔMTS com FtsZ mostrou um incremento de ~20% na

intensidade de emissão de fluorescência (Figura 22). Isto sugere que o triptofano na posição 44 é menos exposto ao solvente na presença de FtsZ. Embora a baixa razão sinal-ruído em nosso ensaio tenha impedido a determinação de um $K_D$ preciso por titulações, a tendência à saturação em 1,5 µM de FtsZ (Figura 23) implica que o $K_D$ para interação entre FtsZ e MinCDΔMTS em *B. subtilis* seria ao redor de 1.5 µM, sendo assim parecido ao valor medido por Blasios V. *et al*, 2013 para MinC (1 µM). Portanto, o incremento do efeito de MinCDΔMTS no ensaio de espalhamento de luz e na microscopia eletrônica sugerem que MinD estaria tornando MinC mais ativo por um mecanismo que não afeta significativamente sua afinidade por FtsZ.

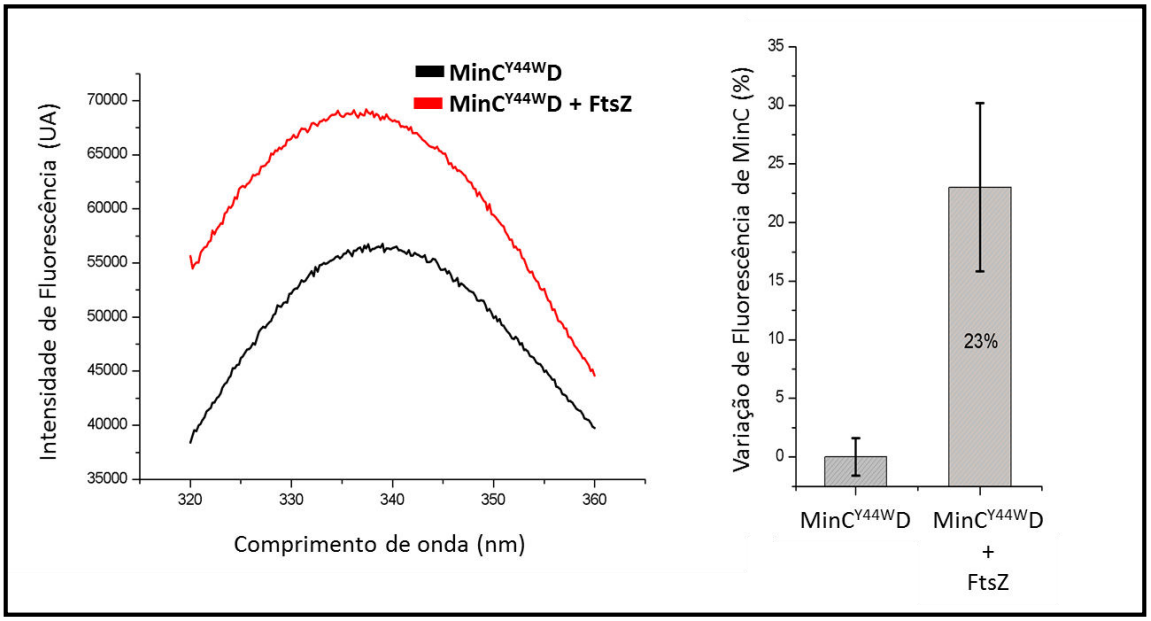


**Figura 22.** Medição do efeito de FtsZ na fluorescência do triptofano do mutante MinCDΔMTS. 2 µM de FtsZ foi misturado com 1 µM de MinC$^{Y44W}$MinDΔMTS em tampão 20 mM Tris/HCl, 100 mM KCl, pH 7,5 e a emissão de fluorescência foi registrada a 320-360 nm. Esquerda, traçado representativo de um experimento. Direita, quantificação média de 3 experimentos, com desvio padrão.

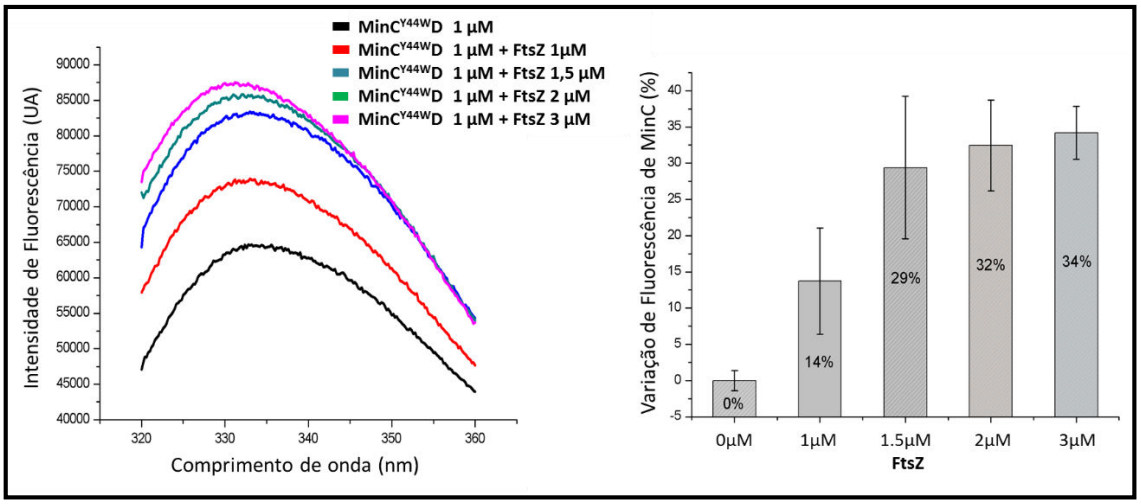


**Figura 23.** Titulação de MinCDΔMTS com FtsZ. O espectro de emissão de fluorescência de 1 µM de MinC$^{Y44W}$MinDΔMTS na presença de 1; 1,5; 2 e 3 µM de FtsZ em tampão 20 mM Tris/HCl, 100 mM KCl, pH 7,5. Esquerda, traçado representativo de um experimento. Direita, quantificação média de 3 experimentos com desvio padrão.

# 5. DISCUSSÃO

## 5.1. Importância da localização de MinC na membrana

Trabalhos anteriores em *E. coli* demonstraram que MinD recruta MinC para membrana tornando-o ativo (Hu Z. *et al*., 2002; Zhou H. e Lutkenhaus J., 2003; Hu Z. e Lutkenhaus J., 2003). Além disso, foi reportado também que MinD apresenta uma hélice anfipática com a qual consegue ligar-se à membrana (Szeto T. *et al*., 2002; Zhou H. e Lutkenhaus J., 2003). Sabe-se também que o verdadeiro inibidor é a proteína MinC (de Boer P. *et al*., 1990), e que ela só inibe a divisão na ausência de MinD quando é superexpressa ~50 vezes acima dos níveis endógenos (de Boer P. *et al*., 1992), demonstrando que quando ligada a MinD, a atividade de MinC é incrementada. Outras evidências da importância do recrutamento a membrana são baseadas em mutantes de MinD com segmentos truncados da região C-terminal (MinDΔ3 ou MinDΔ10) que perderam a habilidade de se ligar à membrana e ativar MinC. No entanto, existem evidências de que existiria um papel além do recrutamento à membrana por MinD na ativação de MinC. Nesse contexto, trabalhos demonstraram que MinC pode ser ativado pela proteína DicB (que em condições normais não é sintetizada), essa ativação é dada pelo recrutamento de MinC ao septo (Johnson J. *etal*., 2002) e a proteína ZipA é requerida para esse recrutamento (Johnson J., *et al*., 2004). Em contraste, os mutantes com o MTS de MinD truncado são ineficientes em recrutar MinC para o septo (Hu Z. e Lutkenhaus J., 2003). Finalmente, foi reportado um mutante de MinD ($MinD^{E126A}$) que consegue recrutar MinC para membrana assim como para o septo, mas ele é deficiente em ativar MinC (Zhou H e Lutkenhaus J., 2003). Todos esses dados em conjunto nos levaram a perguntar: Qual é o papel de MinD na ativação de MinC no caso das proteínas de *B. subtilis*? Como existem diferenças significativas no funcionamento dos sistemas Min de

*E. coli* e *B. subtilis* (Blasios V. *et al*. 2013) parecia possível que o mecanismo de ativação em *B. subtilis* não seria igual ao de *E. coli*.

Para caracterizar o efeito de MinD sobre a ativação de MinC, o primeiro passo foi determinar a importância da localização de MinC na membrana. Para isso, foram observadas por microscopia de fluorescência linhagens que superexpressavam GFP-MinC, GFP-MinCD ou GFP-MinCDΔMTS e assim poder observar o padrão de divisão das células e localização subcelular de MinC nas diferentes situações. As informações tiradas das medições do comprimento das células mostraram que MinC requer estar localizado na membrana para ter atividade na inibição da divisão bacteriana em *B. subtilis*.

Os dados obtidos exibiram que a superexpressão de GFP-MinC não teve algum efeito notável no fenótipo das células nas diferentes linhagens (Figuras 10, 11 e 12, Tabelas 4, 5 e 6). Tanto em *E. coli* como em *B. subtilis*, a superexpressão de MinC demonstrou não ter efeito no fenótipo de uma cepa carente do sistema Min (de Boer P. *et al*., 1989; Marston A. e Errington J., 1999). Em *B. subtilis*, a superexpressão de MinC em condições normais (na presença de MinCD endógeno) não causou mudança no comprimento das células (Marston A. e Errington J., 1999). Em contraste, foi reportado em *E. coli* um efeito da superexpressão de MinC sozinho, mas essa superexpressão foi 50 vezes acima dos níveis endógenos (de Boer P. *et al*, 1991). Em comparação, as nossas construções foram integradas como cópia única no genoma de *B. subtilis*, conseguindo expressar ~10 vezes mais do que os níveis endógenos segundo *Western Blotting* (Figura 13). Foi observado um ligeiro incremento de tamanho de ~0,7 µm apenas na cepa Δ*zap*A e isso foi possivelmente devido a que essa cepa deixou a divisão mais sensível ao inibidor (MinC). Por outro lado, a superexpressão de MinCD levou a formação de células filamentosas com comprimentos >20 µm em todas as construções (Figuras 10, 11 e 12,

Tabelas 4, 5 e 6), como já demonstrado por Marston A. e Errington J., 1999. Em comparação, quando MinCDΔMTS foi superexpresso, exibiu um incremento no comprimento de ~0,9 μm e de ~1 μm nas construções selvagem e Δ*zap*A respectivamente (Tabelas 5 e 6). Estes resultados exibiram que mesmo deixando a divisão celular mais sensível, o efeito da superexpressão de MinCDΔMTS não foi o suficiente para inibir completamente a divisão como quando o complexo se localiza na membrana. Isso indica a importância do recrutamento à membrana na ativação de MinC.

A localização da fusão GFP-MinC na cepa Δ*min*CD demonstrou que MinC requer MinD para se localizar à membrana (Figura 10) e que o MTS de MinD é importante para a localização de MinD na membrana, como já foi reportado em outros trabalhos (Szeto T. *et al*., 2002; Hu Z. e Lutkenhaus J., 2003; Taghbalout A. *et al*., 2006), já que a nossa construção MinCDΔMTS não localizava na membrana (Figura 10). Embora fosse observada uma localização septal da fusão GFP-MinC ou GFP-MinCDΔMTS quando superexpressas nas cepas selvagem ou Δ*zap*A, as quais apresentam as proteínas MinC e MinD endógenos (Figuras 11 e 12). Essa localização é mais parecida com aquela reportada pelo complexo MinC/DicB (Jhonson J. *et al*., 2002; Johnson J. *et al*., 2004), embora esse último apresentou atividade. Uma possível explicação para essa localização em nossas linhagens, seria devido a que nossa fusão poderia estar interagindo e formando complexos com as proteínas endógenas, conseguindo assim se localizar parcialmente.

Em conjunto, esses resultados nos levam a concluir que a localização de MinC em membrana é importante para sua ativação. Embora os pequenos incrementos de tamanho promovidos pela superexpressão do complexo MinCDΔMTS que demonstraram ser significativos, sugerem que poderia existir um outro mecanismo de ativação de MinC, além do recrutamento a membrana. Esses resultados são parecidos com os obtidos em *E. coli*, onde mutantes de MinD com MTS truncado conseguem ter uma ativação de MinC

muito menos potente do que o MinD selvagem (Hu Z. e Lutkenhaus., 2003). Portanto, tanto em *E. coli*, como em *B. subtilis*, o principal papel de MinD na ativação de MinC é seu recrutamento à membrana.

### 5.2. MinD ativa MinC por mecanismos além do recrutamento à membrana

Os resultados *in vivo* exibiram que a superexpressão de MinCDΔMTS não teve o efeito suficiente para conseguir inibir a divisão bacteriana como quando o complexo se localiza na membrana, no entanto foi detectada uma pequena atividade, sendo esta maior que aquela de MinC sozinho. Assim, se decidiu fazer experimentos *in vitro*, condições em que conseguimos ter um sistema controlado em que a localização na membrana não é relevante e isso permitiu ver efeitos que não foram visíveis *in vivo*.

Para montarmos o sistema *in vitro* tivemos que purificar o complexo MinCDΔMTS de *B. subtilis*. Como já relatado, MinD forma dímeros na presença de ATP (Hu Z. *et al*., 2002; Szeto T. *et al*., 2003). Além disso, foi relatado que em *E. coli* a ligação a ATP promove a interação com MinC e que a interação entre MinC e MinD é relativamente fraca e não pode ser detectada em experimentos de *pulldown* (Hu Z. *et al*., 2002). Em contraste, os nossos resultados sugerem que a interação entre MinC e MinD em *B. subtilis* seria mais forte, já que conseguimos a co-purificação do complexo MinCDΔMTS com facilidade. Um outro ponto notável é que a copurificação foi obtida sem a necessidade de adicionar ATP (Figura 16), que no caso de *E. coli* é fundamental para a dimerização de MinD e sua interação com MinC. Esses resultados sugerem que MinD de *B. subtilis* deve ser capaz de dimerizar na presença de MinC mesmo sem ATP.

Para determinar a atividade de MinCDΔMTS frente aos polímeros de FtsZ e comparar ela com a atividade de MinC sozinho, foi utilizado sedimentação (Król e Scheffers, 2013). Esta, entretanto, não mostrou uma diferença significativa na inibição da

formação de polímeros quando MinC ou MinCDΔMTS foram adicionados à reação de polimerização de FtsZ. Por outro lado, com os resultados mostrados nos ensaios de espalhamento de luz, demonstramos que em nossas condições MinC tem um efeito pouco significativo nos polímeros de FtsZ (~15 % de inibição). Assim, o nosso complexo MinCDΔMTS teve melhor atividade (~50 % de inibição) que MinC sozinho, sugerindo que MinD estaria tornando MinC mais ativo contra os polímeros de FtsZ. Além disso, quando adicionamos ATP, observamos que o complexo obteve melhor atividade (~70 %) que MinCDΔMTS sem ATP, em condições em que a localização na membrana não é requerida. A importância da ligação ao nucleotídeo em nosso sistema não está clara. Outros trabalhos em *E. coli*, demonstraram que MinCD forma copolímeros dependentes de ATP (Conti J. *et al*., 2014; Ghosal D. *et al*., 2014) e que estes copolímeros são importantes para a atividade (Ghosal D. *et al*., 2014). Em nosso ensaio de espalhamento de luz (Figura 19), não conseguimos observar um incremento de sinal que indique a formação de estruturas grandes contendo MinCDΔMTS quando o ATP foi adicionado a nossa reação. Embora tenhamos usado a mesma concentração de proteína que Ghosal D. *et al*., 2014, foi demonstrado que a formação de polímeros de MinCD é um processo demorado, que toma cerca de 5 minutos depois da adição de ATP. Nosso ensaio foi seguido só por 5 minutos e caso a formação de copolímeros demore mais do que isso estes não teriam sido detectados. Um dado que pode explicar o nosso resultado é que a remoção do MTS de MinD faz com que o complexo MinCDΔMTS não consiga formar copolímeros no caso de *E. coli* (Conti J. *et al*., 2014). Embora o ensaio de gel filtração mostrado na figura 20 sugira a formação de oligômeros quando ATP foi adicionado, a deficiência de oligomerização de MinCDΔMTS poderia explicar porque não conseguimos detectar polímeros pelo ensaio de espalhamento de luz, já que a gel filtração detecta oligômeros que seriam pequenos para serem detectados por espalhamento de luz.

Se considerarmos que o ATP induz a formação de oligômeros do complexo MinCDΔMTS, ainda assim não possuimos uma explicação de porque estes oligômeros seriam mais efetivos do que o complexo apenas. Apesar dos trabalhos que detectaram os oligômeros de MinCD, um trabalho recente demonstrou que a formação de copolímeros não é crucial para a atividade do complexo, sendo que a formação de um hipotético hexâmero (dois dímeros de MinD flanqueando um dímero de MinC, $MinD_2$-$MinC_2$-$MinD_2$), mostrou atividade contra polímeros de FtsZ *in vivo* (Park K. *et al*., 2015).

Um ponto interessante de nossos resultados é porque MinDΔMTS mostrou um efeito muito maior na ativação de MinC *in vitro* que *in vivo*? Sabe-se que *in vivo* a razão das concentrações de MinC:FtsZ (0,1:1), é bem menor do que as que usamos *in vitro* (Li *et al*., 2014), reforçando o fato que a concentração de MinC na membrana por MinD seria parte importante para a atividade de MinC *in vivo*. É possível que o substrato relevante para a ação de MinC sejam os filamentos de FtsZ associados à membrana e que o estado de FtsZ no citoplasma seja diferente de quando este está na membrana (formando feixes). Talvez por isso o efeito *in vitro* de MinCDΔMTS não foi observado em ensaios *in vivo* já que *in vivo* MinCDΔMTS não encontraria os feixes de FtsZ que seriam formados quando ligados a membrana por FtsA ou SepF (Singh J. *et al*., 2008). Assim MinCD precisaria localizar em membrana para ter atividade já que os feixes de FtsZ não estariam se formando no citoplasma.

Foram propostos dois modelos de como o complexo MinCD atuaria desfazendo os polímeros de FtsZ. O primeiro, postula que o complexo MinCD atuaria encurtando os protofilamentos, ou seja, inibindo a polimerização longitudinalmente (Dajkovic *et al*., 2008; Shen B. e Lutkenhaus J., 2010; Hernández-Rocamora V. *et al*., 2013; Arumugam S. et al., 2014). O segundo, postula que o mecanismo de ação de MinCD se dá na inibição

das interações laterais entre protofilamentos, inibindo a formação de feixes (Scheffers D., 2008; Blasios V. *et al*, 2013, Ghosal D. *et al*., 2014).

Para tentar entender melhor como o MinCDΔMTS estaria inibindo a formação dos polímeros de FtsZ em *B. subtilis*, foi realizado um ensaio de microscopia eletrônica de transmissão. Apesar de termos dados ainda preliminares, esse ensaio mostrou que o complexo MinCDΔMTS estaria desfazendo os polímeros de FtsZ inibindo as interações laterais, já que quando o inibidor foi adicionado à reação de polimerização, os polímeros de FtsZ mostraram protofilamentos de FtsZ, desaparecendo os feixes (Figura 21). Quando MinC foi adicionado os feixes de FtsZ continuaram aparecendo, mas em menor proporção (Figura 21), corroborando assim a diferença encontrada no ensaio de espalhamento de luz (Figura 21). Estes resultados estão de acordo com trabalhos anteriores, que propõem que, ao menos em *B. subtilis*, o mecanismo de inibição de MinC é desfazer os feixes de FtsZ (Scheffers D., 2008; Blasios V. *et al*, 2013). Nossos experimentos sugerem que o complexo MinCDΔMTS estaria afetando as interações laterais dos polímeros de FtsZ de maneira mais eficiente que MinC sozinho.

Como MinD estaria fazendo MinC mais ativo *in vitro*? Dados *in vivo* apontam que poderia existir alguma mudança alostérica em MinC, já que o mutante $MinD^{E126A}$ apesar de localizar corretamente não ativa MinC (Zhou H. e Lutkenhaus J., 2003). Isso também é sugerido pelos mutantes truncados de MinD (MinDΔMTS) que tem um pequeno efeito na ativação de MinC apesar de não localizar em membrana, como descrito em Hu Z. e Lutkenhaus J., 2003 e em nossos resultados *in vivo* e *in vitro* com MinCDΔMTS. Também foi sugerido que o aumento de afinidade pelo septo dos complexos MinC/MinD ou MinC/DicB poderia ser devido a uma mudança alostérica em MinC causada por essas interações (Johnson J. *et al*., 2002). Apesar disso, a estrutura resolvida do complexo MinCD de *A. aeolicus* não mostrou alguma mudança conformacional que indicasse um

efeito alostérico em MinC por parte de MinD, apesar do fato de que a região N-terminal não está presente na estrutura. Trabalhos anteriores demonstraram que os dois domínios de MinC (N- e C-terminal) atuam em conjunto para desfazer os polímeros de FtsZ (Hu Z. *et al*., 1999; Hu Z. e Lutkenhaus J., 2000). Ambos domínios interagem diretamente com FtsZ, o domínio N-terminal interage com a hélice H10 de FtsZ (Shen T. e Lutkenhaus J., 2010) enquanto que o domínio C-terminal que medeia a associação com MinD interage também com a cauda CTP de FtsZ (Hu Z. e Lutkenhaus J., 2000; Shen T. e Lutkenhaus J., 2009, Szeto *et al*., 2001; Zhou e Lutkenhaus J., 2005; Du S. *et al*, 2015). Sabendo isto, a nossa hipótese é que quando MinD forma um complexo com MinC estaria formando-se o sítio de ligação ao CTP como observado na figura 24. Assim, o domínio C-terminal de MinC que ligaria ao CTP de FtsZ pela interface de interação entre MinC e MinD. A ligação ao CTP por sua ver aproximaria o domínio N-terminal dos polímeros de FtsZ (Figura 25).

Em qualquer dos casos do mecanismo de ativação de MinD por MinC, uma mudança alostérica ou a criação do sítio de ligação ao CTP, deveriamos ver um aumento da afinidade por FtsZ. Embora não tenhamos conseguido demonstrar que MinC tem uma maior afinidade por FtsZ na presença de MinD, mostramos por medidas de fluorescência de Trp que o $K_d$ de MinCD é de 1,5 μM, sendo similar ao $K_d$ de MinC de 1 μM calculado por Blasios V. *et al*, 2013. O fato de não teremos visto uma mudança na afinidade pode se dever a razões técnicas. Devido a isto, propomos medir a afinidade por outros ensaios como espectroscopia de correlação de fluorescência (FCS, *Fluorescence Correlation Spectroscopy*).

Em resumo, nós mostramos que a principal contribuição de MinD para a ativação de MinC em *B. subtilis* é a sua localização na membrana. Além disso, o aumento de atividade de MinC causado pela ligação com MinD poderia se dever ao fato de que o

complexo estaria ajudando a formar o sítio de ligação ao CTP, aumentando assim a afinidade por FtsZ.

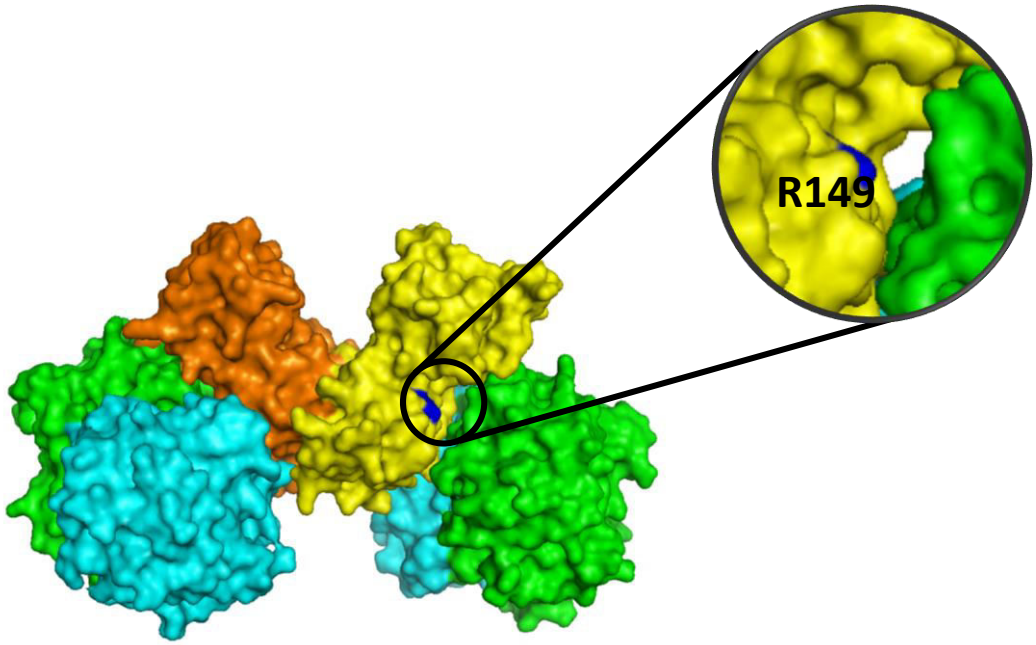


**Figura 24.** Modelo do complexo MinCD (como na figura 7) mostrando em azul o resíduo de Arginina (R149) localizado na interface de interação entre MinC e MinD, importante para a ligação com o CTP de FtsZ.

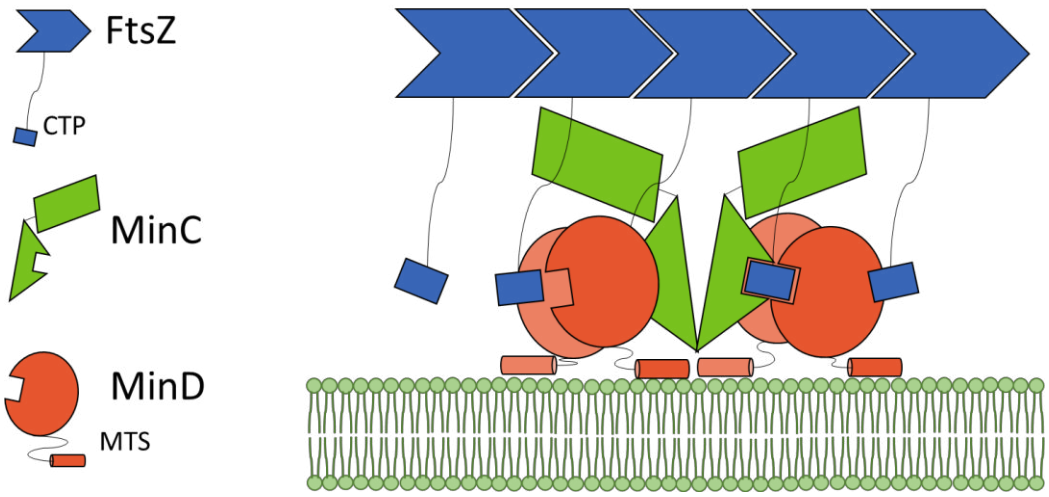


**Figura 25.** Esquema da interação entre o complexo MinCD e FtsZ. A formação do complexo MinCD permite a criação do sítio de ligação da cauda CTP de FtsZ aproximando o domínio N-terminal de MinC (verde) ao polímero de FtsZ (Azul).

## 6. CONCLUSÕES

- Os ensaios *in vivo* demonstraram que a localização de MinC à membrana é importante para sua ativação.
- Os incrementos de tamanho dados pela superexpressão do complexo MinCDΔMTS em ensaios *in vivo* são significativamente maiores que os dados por MinC sozinho.
- O complexo MinCDΔMTS demonstrou ter melhor atividade que MinC em ensaios de inibição de polimerização de FtsZ.
- A afinidade entre MinCDΔMTS e FtsZ não foi significativamente maior que a de MinC sozinha.

## 7. REFERÊNCIAS


Adams DW, Errington J. 2009. Bacterial cell division: assembly, maintenance and disassembly of the Z ring. Nat Rev Microbiol. (9): 642-53. doi: 10.1038/nrmicro2198.

Adams DW, Wu LJ, Errington J. 2015. Nucleoid occlusion protein Noc recruits DNA to the bacterial cell membrane. EMBO J. 34(4):491-501. doi: 10.15252/embj.201490177.

Addinall SG1, Lutkenhaus J. 1996. FtsA is localized to the septum in an FtsZ-dependent manner. J Bacteriol. 178(24):7167-72.

Arumugam S1, Petrašek Z, Schwille P. 2014. MinCDE exploits the dynamic nature of FtsZ filaments for its spatial regulation. Proc Natl Acad Sci U S A. 111(13):E1192-200. doi: 10.1073/pnas.1317764111.

Ben-Yehuda S, Losick R. 2002. Asymmetric cell division in *B. subtilis* involves a spiral-like intermediate of the cytokinetic protein FtsZ. Cell. 109(2):257-66.

Bernhardt TG, de Boer PA. 2005. SlmA, a nucleoid-associated, FtsZ binding protein required for blocking septal ring assembly over Chromosomes in *E. coli*. Mol Cell. 18(5):555-64.

Beuria TK1, Shah JH, Santra MK, Kumar V, Panda D. 2006. Effects of pH and ionic strength on the assembly and bundling of FtsZ protofilaments: a possible role of electrostatic interactions in the bundling of protofilaments. Int J Biol Macromol. 40(1):30-9.

Bi EF, Lutkenhaus J. 1991. FtsZ ring structure associated with division in *Escherichia coli*. Nature. 354(6349):161-4.

Bisson-Filho AW1, Discola KF, Castellen P, Blasios V, Martins A, Sforça ML, Garcia W5, Zeri AC, Erickson HP, Dessen A, Gueiros-Filho FJ. 2015. FtsZ filament capping by MciZ, a developmental regulator of bacterial division. Proc Natl Acad Sci U S A. 112(17):E2130-8. doi: 10.1073/pnas.1414242112.

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

Blasios V., Bisson A., Castllen P., Nogueira M., Bettini J., Portugal R., Zeri A. and Gueiros F. 2013. Genetic and Biochemical Characterization of the MinC-FtsZ interaction in *Bacillus subtilis*. PLos ONE 8(4) e60690. doi: 10.1371/journal.pone.0060690.

Bramkamp M, Emmins R, Weston L, Donovan C, Daniel RA, Errington J. 2008. A novel component of the division-site selection system of *Bacillus subtilis* and a new mode of action for the division inhibitor MinCD. Mol Microbiol. 70(6):1556-69. doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06501.x.

Britton RA, Eichenberger P, Gonzalez-Pastor JE, Fawcett P, Monson R, Losick R, Grossman AD. 2002. Genome-wide analysis of the stationary-phase sigma factor (sigma-H) regulon of *Bacillus subtilis*. J Bacteriol. 184(17):4881-90.

Buske PJ1, Levin PA. 2012. Extreme C terminus of bacterial cytoskeletal protein FtsZ plays fundamental role in assembly independent of modulatory proteins. J Biol Chem. 287(14):10945-57. doi: 10.1074/jbc.M111.330324.

Chen Y, Milam SL, Erickson HP. 2012. SulA inhibits assembly of FtsZ by a simple sequestration mechanism. Biochemistry. 51(14):3100-9. doi: 10.1021/bi201669d.

Cho H, McManus HR, Dove SL, Bernhardt TG. 2011. Nucleoid occlusion factor SlmA is a DNA-activated FtsZ polymerization antagonist. Proc Natl Acad Sci U S A. 108(9):3773-8. doi: 10.1073/pnas.1018674108.

Chung KM, Hsu HH, Yeh HY, Chang BY. 2007. Mechanism of regulation of prokaryotic tubulin-like GTPase FtsZ by membrane protein EzrA. J Biol Chem. 282(20):14891-7.

Conti J, Viola MG, Camberg JL. 2015. The bacterial cell division regulators MinD and MinC form polymers in the presence of nucleotide. FEBS Lett. 589(2):201-6. doi: 10.1016/j.febslet.2014.11.047.

Cordell SC, Robinson EJ, Lowe J. 2003. Crystal structure of the SOS cell division inhibitor SulA and in complex with FtsZ. Proc Natl Acad Sci U S A. 100(13):7889-94.

Cordell S., Anderson R., e Löwe J. 2001. Crystal structure of the bacterial cell division inhibitor MinC. The EMBO journal. 10: 2454-2461.

de Boer P., Crossley R. and Rothfield L. 1988. Isolation and properties of *min*B, a Complex Genetic locus involved in correct placement of the division site in *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology. 5: 2106-2112.

de Boer PA, Crossley RE, Rothfield LI. 1990. Central role for the *Escherichia coli min*C gene product in two different cell division-inhibition systems. Proc Natl Acad Sci U S A. 87(3):1129-33.

de Boer P., Crossley R., Hand A. and Rothfield L. 1991. The MinD protein is a membrane ATPase required for the correct placement of the *Escherichia coli* division site. The EMBO Journal. 10,13: 4371-4380.

de Boer PA, Crossley RE, Rothfield LI. 1992. Roles of MinC and MinD in the site-specific septation block mediated by the MinCDE system of *Escherichia coli*. J Bacteriol. 174(1):63-70.

Dajkovic, A., Lan, G. and Lutkenhaus, J. 2008. MinC spatially controls bacterial cytokinesis by antagonizing the scaffolding function of FtsZ. Current Biology 18: 235-244.

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

Dajkovic A1, Pichoff S, Lutkenhaus J, Wirtz D. 2010. Cross-linking FtsZ polymers into coherent Z rings. Mol Microbiol. 78(3):651-68. doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07352.x.

Du S, Park KT, Lutkenhaus J. 2015. Oligomerization of FtsZ converts the FtsZ tail motif (conserved carboxy-terminal peptide) into a multivalent ligand with high avidity for partners ZipA and SlmA. Mol Microbiol. 95(2):173-88. doi: 10.1111/mmi.12854. Epub 2014 Dec 19.

Duman R, Ishikawa S, Celik I, Strahl H, Ogasawara N, Troc P, Löwe J, Hamoen LW. 2013. Structural and genetic analyses reveal the protein SepF as a new membrane anchor for the Z ring. Proc Natl Acad Sci U S A. 110(48):E4601-10. doi: 10.1073/pnas.1313978110.

Durand-Heredia JM, Yu HH, De Carlo S, Lesser CF, Janakiraman A. 2011. Identification and characterization of ZapC, a stabilizer of the FtsZ ring in *Escherichia coli*. J Bacteriol. 193(6):1405-13. doi: 10.1128/JB.01258-10.

Durand-Heredia J1, Rivkin E, Fan G, Morales J, Janakiraman A. 2012. Identification of ZapD as a cell division factor that promotes the assembly of FtsZ in *Escherichia coli*. J Bacteriol. 194(12):3189-98. doi: 10.1128/JB.00176-12.

Edwards D. and Errington J. 1997. The *Bacillus subtilis* DivIVA protein targets to the division septum and controls the site specificity of cell division. Molecular Microbiology. 5: 905-915.

Erickson, H. P. 1997. FtsZ, a tubulin homolog, in prokaryote cell division. Trends Cell Biol. 7: 362-367.

Erickson HP. 2009. Modeling the physics of FtsZ assembly and force generation. Proc Natl Acad Sci U S A. 106(23):9238-43. doi: 10.1073/pnas.0902258106.

Erickson HP, Anderson DE, Osawa M. 2010. FtsZ in bacterial cytokinesis: cytoskeleton and force generator all in one. Microbiol Mol Biol Rev. 74(4):504-28. doi: 10.1128/MMBR.00021-10.

Errington J., Daniel R., and Scheffers D. 2003. Cytokineses in Bacteria. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 1: 52-65.

Fu X., Shih Y., Zhang Y. and Rothfield L. (2000). The MinE ring required for proper placement of the division site is a mobile structure that changes its cellular location during the *Escherichia coli* division cycle.

Gamba P., Veening J., Saunders N., Hamoen L., and Daniel R. 2009. Two-Step Assembly Dynamics of the *Bacillus subtilis* Divisome. Journal of Bacteriology. 191, 13: 4186-4194.

Gueiros-Filho FJ, Losick R. 2002. A widely conserved bacterial cell division protein that promotes assembly of the tubulin-like protein FtsZ. Genes Dev. 16(19):2544-56.

Graumann, P. Bacillus Cellular and Molecular Biology. 1. ed. Inglaterra: Caister Academic Press. (2007). Gueiros-Filho J. Chapter 4, Cell Division. p93-134.

Ghosal D, Trambaiolo D, Amos LA, Löwe J. 2014. MinCD cell division proteins form alternating copolymeric cytomotive filaments. Nat Commun. 5:5341. doi: 10.1038/ncomms6341.

Gola S, Munder T, Casonato S, Manganelli R, Vicente M. 2015. The essential role of SepF in mycobacterial division. Mol Microbiol. 97(3):560-76. doi: 10.1111/mmi.13050.

Gottesman S, Halpern E, Trisler P. 1981. Role of *sul*A and *sul*B in filamentation by lon mutants of *Escherichia coli* K-12. J Bacteriol. 148(1):265-73.

Hale CA, de Boer PA. 1997. Direct binding of FtsZ to ZipA, an essential component of the septal ring structure that mediates cell division in *E. coli*. Cell. 88(2):175-85.

Hale CA, Shiomi D, Liu B, Bernhardt TG, Margolin W, Niki H, de Boer PA. 2011. Identification of *Escherichia coli* ZapC (YcbW) as a component of the division apparatus that binds and bundlesFtsZ polymers. J Bacteriol. 193(6):1393-404. doi: 10.1128/JB.01245-10.

Haeusser DP, Schwartz RL, Smith AM, Oates ME, Levin PA. 2004. EzrA prevents aberrant cell division by modulating assembly of the cytoskeletal protein FtsZ. Mol Microbiol. 52(3):801-14.

Haney SA, Glasfeld E, Hale C, Keeney D, He Z, de Boer P. 2001. Genetic analysis of the *Escherichia coli* FtsZ.ZipA interaction in the yeast two-hybrid system. Characterization of FtsZ residues essential for the interactions with ZipA and with FtsA. J Biol Chem. 276(15):11980-7.

Hamoen LW, Meile JC, de Jong W, Noirot P, Errington J. 2006. SepF, a novel FtsZ-interacting protein required for a late step in cell division. Mol Microbiol. 59(3):989-99.

Harry E, Monahan L, Thompson L. 2006. Bacterial cell division: the mechanism and its precison. Int Rev Cytol. 253:27-94.

Hernández-Rocamora V., García-Montañés C., Reija B., Monterroso B., Margolin W., Alonso C. and Rivas G. (2013). MinC protein shortens FtsZ protofilaments by preferentially interacting with GDP-bound subunits. The Journal of Biological Chemistry. 288, 34: 24625-24635. doi: 10.1074/jbc.M113.483222.

Hu Z., Mukherjee A., Pichoff S and Lutkenhaus J. 1999. The MinC component of the division site selection system in *Escherichia coli* interacts with FtsZ to prevent polymerization. PNAS. 96, 26: 14819-14824.

Hu Z, Lutkenhaus J. 2000. Analysis of MinC reveals two independent domains involved in interaction with MinD and FtsZ. J Bacteriol. 182(14):3965-71.

Hu Z, Gogol EP, Lutkenhaus J. 2002. Dynamic assembly of MinD on phospholipid vesicles regulated by ATP and MinE. Proc Natl Acad Sci U S A. 99(10):6761-6.

Hu Z, Lutkenhaus J. 2003. A conserved sequence at the C-terminus of MinD is required for binding to the membrane and targeting MinC to the septum. Mol Microbiol. 47(2):345-55.

Hu Z, Saez C, Lutkenhaus J. 2003. Recruitment of MinC, an inhibitor of Z-ring formation, to the membrane in *Escherichia coli*: role of MinD and MinE. J Bacteriol. 185(1):196-203.

Jensen SO, Thompson LS, Harry EJ. 2005. Cell division in *Bacillus subtilis*: FtsZ and FtsA association is Z-ring independent, and FtsA is required for efficient midcell Z-Ring assembly. J Bacteriol. 187(18):6536-44.

Johnson J., Lackner L. and Boer P. 2002. Targeting of DMinC/MinD and DMinC/DicB Complexes to Septal Rings in *Escherichia coli* Suggests a Multistep Mechanism for MinC-Mediated Destruction of Nascent FtsZ Rings. Journal of Bacteriology. 184, 11: 2951-2962.

Johnson JE, Lackner LL, Hale CA, de Boer PA. 2004. ZipA is required for targeting of DMinC/DicB, but not DMinC/MinD, complexes to septal ring assemblies in *Escherichia coli*. J Bacteriol. 186(8):2418-29.

Jones C, Holland IB. 1985. Role of the SulB (FtsZ) protein in division inhibition during the SOS response in *Escherichia coli*: FtsZ stabilizes the inhibitor SulA in maxicells. Proc Natl Acad Sci U S A. 82(18):6045-9.

Król E, van Kessel SP, van Bezouwen LS, Kumar N, Boekema EJ, Scheffers DJ. 2012. *Bacillus subtilis* SepF binds to the C-terminus of FtsZ. PLoS One. 7(8):e43293. doi: 10.1371/journal.pone.0043293.

Król E. & Scheffers D. 2013. FtsZ Polymerization Assays: Simple Protocols and Considerations. Journal of Visualized Experiments. doi: 10.3791/50844.

Lenarcic R1, Halbedel S, Visser L, Shaw M, Wu LJ, Errington J, Marenduzzo D, Hamoen LW. 2009. Localisation of DivIVA by targeting to negatively curved membranes. EMBO J. 28(15):2272-82. doi: 10.1038/emboj.2009.129.

Levin PA, Schwartz RL, Grossman AD. 2001. Polymer stability plays an important role in the positional regulation of FtsZ. J Bacteriol. 183(18):5449-52.

Li Z, Trimble MJ, Brun YV, Jensen GJ. 2007. The structure of FtsZ filaments *in vivo* suggests a force-generating role in cell division. EMBO J. 26(22):4694-708.

Loose M, Mitchison TJ. 2014. The bacterial cell division proteins FtsA and FtsZ self-organize into dynamic cytoskeletal patterns. Nat Cell Biol. 16(1):38-46. doi: 10.1038/ncb2885.

Low HH, Moncrieffe MC, Löwe J. 2004. The crystal structure of ZapA and its modulation of FtsZ polymerisation. J Mol Biol. 341(3):839-52.

Löwe J, van den Ent F. 2001. Conserved sequence motif at the C-terminus of the bacterial cell-division protein FtsA. Biochimie. 83(1):117-20.

Lutkenhaus JF, Donachie WD. 1979. Identification of the *fts*A gene product. J Bacteriol. 137(3):1088-94.

Lutkenhaus, J. and Addinall S.G. 1997. Bacterial cell division and the Z ring. Annual Review of Biochemistry. 66: 93-116.

Lutkenhaus J. 2007. Assembly dynamics of the bacterial MinCDE system and Spatial Regulation of the Z Ring. Annual Review of Biochemistry. 76: 539-562.

Ma L., Glenn F. and Rothfield L. 2004. Positioning of the minE binding site on the minD surface suggests a plausible mechanism for activation of the Escherichia coli MinD ATPase during division site selection. Molecular Microbiology. 54,1: 99-108.

Ma X, Ehrhardt DW, Margolin W. 1996. Colocalization of cell division proteins FtsZ and FtsA to cytoskeletal structures in living *Escherichia coli* cells by using green fluorescent protein. Proc Natl Acad Sci U S A. 93(23):12998-3003.

Margolin W. 2005. FtsZ and the division of prokaryotic cells and organelles. Nat Rev Mol Cell Biol. 6(11):862-71. Review.

Marston A., Thomaides H., Edwards D., Sharpe M. and Errington J. 1998. Polar localization of the MinD protein of *Bacillus subtilis* and its role in selection of the mid-cell división site. Genes & Development 12: 3419-3430.

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

Meier EL, Goley ED. 2014. Form and function of the bacterial cytokinetic ring. Curr Opin Cell Biol. 26:19-27. doi: 10.1016/j.ceb.2013.08.006.

Monahan LG, Robinson A, Harry EJ. 2009. Lateral FtsZ association and the assembly of the cytokinetic Z ring in bacteria. Mol Microbiol. 74(4):1004-17. doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06914.x.

Mohammadi T, Ploeger GE, Verheul J, Comvalius AD, Martos A, Alfonso C, van Marle J, Rivas G, den Blaauwen T. 2009. The GTPase activity of *Escherichia coli* FtsZ

determines the magnitude of the FtsZ polymer bundling by ZapA *in vitro*. Biochemistry. 48(46):11056-66. doi: 10.1021/bi901461p.

Mukherjee A, Lutkenhaus J. 1994. Guanine nucleotide-dependent assembly of FtsZ into filaments. J Bacteriol. 176(9):2754-8.

Mukherjee A1, Lutkenhaus J. 1999. Analysis of FtsZ assembly by light scattering and determination of the role of divalent metal cations. J Bacteriol. 181(3):823-32.

Mukherjee A, Cao C, Lutkenhaus J. 1998. Inhibition of FtsZ polymerization by SulA, an inhibitor of septation in *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A. 95(6):2885-90.

Mulder E, Woldringh CL. 1989. Actively replicating nucleoids influence positioning of division sites in *Escherichia coli* filaments forming cells lacking DNA. J Bacteriol. 171(8):4303-14.

Nogueira ML, Sforça ML, Chin YK, Mobli M, Handler A, Gorbatyuk VY, Robson SA, King GF, Gueiros-Filho FJ, Zeri AC. 2015 Backbone and side chain NMR assignments of *Geobacillus stearothermophilus* ZapA allow identification of residues that mediate the interaction of ZapA with FtsZ. Biomol NMR Assign.

Oliva MA, Cordell SC, Löwe J. 2004. Structural insights into FtsZ protofilament formation. Nat Struct Mol Biol. 11(12):1243-50.

Oliva MA, Halbedel S, Freund SM, Dutow P, Leonard TA, Veprintsev DB, Hamoen LW, Löwe J. 2010. Features critical for membrane binding revealed by DivIVA crystal structure. EMBO J. 29(12):1988-2001. doi: 10.1038/emboj.2010.99.

Osawa M, Anderson DE, Erickson HP. 2008. Reconstitution of contractile FtsZ rings in liposomes. Science. 320(5877):792-4. doi: 10.1126/science.1154520.

Osawa M, Erickson HP. 2011. Inside-out Z rings--constriction with and without GTP hydrolysis. Mol Microbiol. 81(2):571-9. doi: 10.1111/j.1365-2958.2011.07716.x.

Osawa M, Erickson HP. 2013. Liposome division by a simple bacterial division machinery. Proc Natl Acad Sci U S A. 110(27):11000-4. doi: 10.1073/pnas.1222254110.

Pacheco-Gómez R, Roper DI, Dafforn TR, Rodger A. 2011. The pH dependence of polymerization and bundling by the essential bacterial cytoskeletal protein FtsZ. PLoS One. (6):e19369. doi: 10.1371/journal.pone.0019369.

Pacheco-Gómez R1, Cheng X, Hicks MR, Smith CJ, Roper DI, Addinall S, Rodger A, Dafforn TR. 2013. Tetramerization of ZapA is required for FtsZ bundling. Biochem J. 449(3):795-802. doi: 10.1042/BJ20120140.

Park KT, Du S, Lutkenhaus J. 2015. MinC/MinD copolymers are not required for Min function. Mol Microbiol. doi: 10.1111/mmi.13164.

Patrick JE, Kearns DB. 2008. MinJ (YvjD) is a topological determinant of cell division in *Bacillus subtilis*. Mol Microbiol. 70(5):1166-79. doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06469.x.

Pazos M, Natale P, Vicente M. 2013. A specific role for the ZipA protein in cell division: stabilization of the FtsZ protein. J Biol Chem. 288(5):3219-26. doi: 10.1074/jbc.M112.434944.

Pichoff S, Lutkenhaus J. 2002. Unique and overlapping roles for ZipA and FtsA in septal ring assembly in *Escherichia coli*. EMBO J. 21(4):685-93.

Pichoff S, Lutkenhaus J. 2005. Tethering the Z ring to the membrane through a conserved membrane targeting sequence in FtsA. Mol Microbiol. 55(6):1722-34.

Popham DL, Young KD. 2003. Role of penicillin-binding proteins in bacterial cell morphogenesis. Curr Opin Microbiol. 6(6):594-9.

Popp D, Iwasa M, Narita A, Erickson HP, Maéda Y. 2009. FtsZ condensates: an *in vitro* electron microscopy study. Biopolymers. 91(5):340-50. doi: 10.1002/bip.21136.

Raskin DM, de Boer PA. 1999. MinDE-dependent pole-to-pole oscillation of division inhibitor MinC in *Escherichia coli*. J Bacteriol. 181(20):6419-24.

Raskin DM, de Boer PA. 1999. Rapid pole-to-pole oscillation of a protein required for directing division to the middle of Escherichia coli. Proc Natl Acad Sci U S A. 96(9):4971-6.

Roach EJ, Kimber MS, Khursigara CM. 2014. Crystal structure and site-directed mutational analysis reveals key residues involved in *Escherichia coli* ZapA function. J Biol Chem. 289(34):23276-86. doi: 10.1074/jbc.M114.561928.

Rothfield L., Justice S. and García-Lara J. 1999. Bacterial cell division. Annual Reviews Genet. 33: 423-448.

Sambrook, J., and Russel, D. (2001) Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY.

Scheffers DJ. 2008. The effect of MinC on FtsZ polymerization is pH dependent and can be counteracted by ZapA. FEBS Lett. 582(17):2601-8. doi: 10.1016/j.febslet.2008.06.038.

Schwille P. 2014. Bacterial cell division: a swirling ring to rule them all? Curr Biol. 24(4):R157-9. doi: 10.1016/j.cub.2014.01.025.

Shen B, Lutkenhaus J. 2009. The conserved C-terminal tail of FtsZ is required for the septal localization and division inhibitory activity of MinC(C)/MinD. Mol Microbiol. 72(2):410-24.

Shen B, Lutkenhaus J. 2010. Examination of the interaction between FtsZ and MinCN in *E. coli* suggests how MinC disrupts Z rings. Mol Microbiol. 75(5):1285-98. doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07055.x.

Shiomi D. and Margolin W. 2007. The C-Terminal domain of minC inhibits assembly of the Z Ring in *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology. Vol. 189, 1: 236-243.

Si F, Busiek K, Margolin W, Sun SX. 2013. Organization of FtsZ filaments in the bacterial division ring measured from polarized fluorescence microscopy. Biophys J. 105(9):1976-86. doi: 10.1016/j.bpj.2013.09.030.

Singh JK, Makde RD, Kumar V, Panda D. 2008. SepF increases the assembly and bundling of FtsZ polymers and stabilizes FtsZ protofilaments by binding along its length. J Biol Chem. 283(45):31116-24. doi: 10.1074/jbc.M805910200.

Strauss MP, Liew AT, Turnbull L, Whitchurch CB, Monahan LG, Harry EJ. 2012. 3D-SIM super resolution microscopy reveals a bead-like arrangement for FtsZ and the division machinery: implications for triggering cytokinesis. PLoS Biol. 10(9):e1001389. doi: 10.1371/journal.pbio.1001389.

Szeto TH, Rowland SL, King GF. 2001. The dimerization function of MinC resides in a structurally autonomous C-terminal domain. J Bacteriol. 183(22):6684-7.

Szeto TH, Rowland SL, Rothfield LI, King GF. 2002. Membrane localization of MinD is mediated by a C-terminal motif that is conserved across eubacteria, archaea, and chloroplasts. Proc Natl Acad Sci U S A. 99(24):15693-8.

Szeto TH, Rowland SL, Habrukowich CL, King GF. 2003. The MinD membrane targeting sequence is a transplantable lipid-binding helix. J Biol Chem. 278(41):40050-6.

Szwedziak P, Wang Q, Freund SM, Löwe J. 2012. FtsA forms actin-like protofilaments. EMBO J. 31(10):2249-60. doi: 10.1038/emboj.2012.76.

Taghbalout A, Ma L, Rothfield L. 2006. Role of MinD-membrane association in Min protein interactions. J Bacteriol. 188(8):2993-3001.

Tonthat NK, Arold ST, Pickering BF, Van Dyke MW, Liang S, Lu Y, Beuria TK, Margolin W, Schumacher MA. 2011. Molecular mechanism by which the nucleoid occlusion factor, SlmA, keeps cytokinesis in check. EMBO J. 30(1):154-64. doi: 10.1038/emboj.2010.288.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci U S A. 76(9):4350-4.

Trusca D, Scott S, Thompson C, Bramhill D. 1998. Bacterial SOS checkpoint protein SulA inhibits polymerization of purified FtsZ cell division protein. J Bacteriol. 180(15):3946-53.

Woldringh C., Mulder E., Valkenburg J., Wientjes F., Zaritsky A. and Nanninga N. (1990). Role of the nucleoid in the toporegulation of division. Research in Microbiology. 141: 39-49.

Wu W., Park K., Holyoak T. and Lutkenhaus J. 2011. Determination of strtucutre of the minD-ATP complex reveals the orientation of Min Don the membrane and the relative location of the binding sites for Min and MinC. Molecular Microbiology. 79,6: 1515-1528.

van den Ent F1, Löwe J. 2000. Crystal structure of the cell division protein FtsA from Thermotoga maritima. EMBO J. 19(20):5300-7.

Vaughan S, Wickstead B, Gull K, Addinall SG. 2004. Molecular evolution of FtsZ protein sequences encoded within the genomes of archaea, bacteria, and eukaryota. J Mol Evol. 58(1):19-29.

Weiss DS. 2004. Bacterial cell division and the septal ring. Mol Microbiol. 54(3):588-97. Review.

Woldringh CL, Mulder E, Huls PG, Vischer N. 1991. Toporegulation of bacterial division according to the nucleoid occlusion model. Res Microbiol. 142(2-3):309-20.

Wu LJ, Errington J. 2004. Coordination of cell division and chromosome segregation by a nucleoid occlusion protein in *Bacillus subtilis*. Cell. 117(7):915-25.

Wu LJ, Ishikawa S, Kawai Y, Oshima T, Ogasawara N, Errington J. 2009. Noc protein binds to specific DNA sequences to coordinate cell division with chromosome segregation. EMBO J. 28(13):1940-52. doi: 10.1038/emboj.2009.144.

Wu LJ, Errington J. 2011. Nucleoid occlusion and bacterial cell division. Nat Rev Microbiol. 10(1):8-12. doi: 10.1038/nrmicro2671.

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

Zhou H, Lutkenhaus J. 2003. Membrane binding by MinD involves insertion of hydrophobic residues within the C-terminal amphipathic helix into the bilayer. J Bacteriol. 185(15):4326-35.

Zhou H, Lutkenhaus J. 2005. MinC mutants deficient in MinD- and DicB-mediated cell division inhibition due to loss of interaction with MinD, DicB, or a septal component. J Bacteriol. 187(8):2846-57.

Zhou H, Schulze R, Cox S, Saez C, Hu Z, Lutkenhaus J. 2005. Analysis of MinD mutations reveals residues required for MinE stimulation of the MinD ATPase and residues required for MinC interaction. J Bacteriol. 187(2):629-38.