UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas
(Bioquímica)

MAXWELL DE CASTRO DURVALE

Estudo Genético da Interação Entre as Proteínas FtsZ e SpoIIE
em *Bacillus subtilis*

Versão Original da Dissertação Defendida

São Paulo

2013

Dada de depósito da dissertação:

26/07/2013

MAXWELL DE CASTRO DURVALE

Estudo Genético da Interação Entre as Proteínas FtsZ e SpoIIE em *Bacillus subtilis*

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

Orientador: Prof. Dr. Frederico José Gueiros Filho

São Paulo

2013

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

Durvale, Maxwell de Castro
D968e Estudo genético da interação entre as proteínas FtsZ e SpoIIE em *Bacillus subtilis* / Maxwell de Castro Durvale. -- São Paulo, 2013.
66p.

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

1. Biologia molecular 2. Proteína : Interação molecular : Bioquímica 3. Divisão celular I. T. II. Gueiros Filho, Frederico José, orientador.

574.88 CDD

Para meus pais, por acreditarem.

AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo amor, carinho e compreensão.

Aos meus amigos, de ontem e de hoje, de perto e de longe.

Aos conhecidos que marcaram presença.

Aos desconhecidos que fizeram a diferença.

Ao Fredy, pela confiança e perseverança.

Aos companheiros de laboratório: Guilherme, Valquiria, Theopi, Valdir, Bisson, André, Rodrigo, Camila, Ilda, Felipe, Chico, Ivi e Lucy.

Aos amigos do IQ, em especial: Theopi, Valquiria, Bisson, Valdir, Rodrigo e Camila .

Aos amigos do "Apê": Rodrigo, Filipe, Marlous, Márcio, Nikolas e Márcio.

Aos amigos do ORFUD: Lorena, Irving, Mariana, Saulo, Jesylaine, Amanda e Tica.

Aos meus avós, que fizeram a história.

Aos meus sobrinhos, a quem pertence o futuro.

Ao Santi, que sempre se fez estar por perto.

Ao Steven, por seu apoio incondicional.

Aos funcionários do IQ que desempanham seus trabalhos com competência e dedicação.

Aos laboratórios dos professores Carla e Chuck.

À USP, pela oportunidade.

Ao CNPq, CAPES e FAPESP pelo apoio financeiro.

RESUMO

Durvale, MC. **Estudo Genético da Interação entre as Proteínas FtsZ e SpoIIE em *Bacillus subtilis*.** (2013) 66p. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Um dos principais componentes envolvidos no processo de divisão celular bacteriana é FtsZ, uma proteína homóloga à tubulina eucariótica. FtsZ polimeriza no interior da célula formando um anel ao qual dá-se o nome de anel Z, responsável pelo recrutamento de diversas outras proteínas de divisão, formando o divisomo. Como meio de sobrevivência sob condições adversas, alguns procariotos, como *B. subtilis*, podem sofrer um tipo de diferenciação celular que forma um organismo em estado latente, conhecido como esporo. A primeira etapa da formação do esporo é a mudança da posição do anel Z para mais próximo a um dos pólos da célula, produzindo duas células com tamanhos diferentes. SpoIIE é uma proteína fosfatase integral de membrana, que se localiza especificamente no septo assimétrico de uma célula em processo de esporulação. Além de um papel na ativação do fator de transcrição de esporulação σ^F, SpoIIE se liga a FtsZ e a auxilia na formação do septo assimétrico. Para definirmos a região de FtsZ responsável pela interação com SpoIIE, neste trabalho foram realizados ensaios de duplo-híbrido utilizando vetores com domínios de ativação e de ligação ao DNA do fator de transcrição GAL4 de levedura fusionados a diferentes porções de FtsZ, bem como a SpoIIE. Esses experimentos não forneceram informações sobre interação entre essas proteínas, já que através deles não foi possível reproduzir o resultado positivo descrito na literatura. Como alternativa ao duplo-hibrido para identificarmos o sítio de interação entre as duas proteínas, criamos uma triagem genética capaz de identificar mutantes de FtsZ que não interagem com SpoIIE, fazendo uso de uma biblioteca de mutantes de FtsZ já disponível no laboratório. Foi padronizada uma técnica de microscopia em larga escala em placas de 96 poços, que permitiu a triagem de mais de mil de mutantes de FtsZ, em busca de um em que SpoIIE-GFP induzido não localizasse no anel Z em célula vegetativa. Porém todos os mutantes triados ainda localizavam SpoIIE-GFP. Paralelamente, foi realizada uma triagem de supressão, utilizando como ponto de partida um mutante de SpoIIE que perdeu capacidade de interagir com FtsZ e buscando mutações em FtsZ que

reestabelecessem a interação com SpoIIE mutante. Foram triados cerca de 35000 mutantes nesse ensaio, dentre os quais dezoito apresentaram o fenótipo esperado para um supressor. No entanto, todos os candidatos selecionados tratavam-se de falsos-positivos. O motivo que leva esses candidatos a apresentarem o fenótipo esperado sem reestabelecer a interação entre as duas proteínas ainda é desconhecido. A fim de confirmar se não haveria outras proteínas do divisomo responsáveis por intermediar a interação entre FtsZ e SpoIIE, foram feitos experimentos de co-localização de FtsZ e SpoIIE na ausência de DivIB e FtsA. Em ambos os casos SpoIIE ainda localiza no divisomo, descartando a possibilidade de que DivIB e FtsA sejam mediadores da interação FtsZ-SpoIIE. Por fim, foram realizados experimentos de co-localização de SpoIIE com mutantes de FtsZ previamente identificados em outros experimentos em nosso laboratório. Nesse experimento foi identificado que a expressão de SpoIIE-GFP induzida por IPTG é capaz de reestabelecer a frequência de divisão no mutante FtsZ-R376T, que normalmente é deficiente na formação de divisomos. Esse resultado reforça a idéia de que essas proteínas interagem diretamente, e sugere que SpoIIE é capaz de reestabelecer a atividade de FtsZ em um mutante que apresente falhas na polimerização.

Palavras-chave: *Bacillus subtil*is, Divisão Celular, Esporulação, Interação entre Proteínas, FtsZ, SpoIIE.

ABSTRACT

Durvale, MC. **Genetic Study of the Interaction between the FstZ and SpoIIE Proteins in *Bacillus subtilis*.** (2013) 66p. Masters Thesis – Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

One of the major components involved in bacterial cell division is FtsZ, a protein homologous to the eukaryotic tubulin. FtsZ polymerizes inside the cell forming a ring to which is given the name Z ring, wich is responsible for the recruitment of several other proteins division, forming the divisome. As a means of survival under adverse conditions, some prokaryotes such as *B. subtilis* may undergo a type of cell differentiation that results in an organism in a latent state, known as a spore. The first stage of the spore formation is to change the Z ring position closer to the poles of the cell, producing two cells of different sizes. SpoIIE is an integral membrane phosphatase protein, which is specifically located in the septum of an asymmetric cell in sporulation process. In addition to a role in the activation of the sporulation transcription factor σ^F, SpoIIE binds to FtsZ and assists in the formation of the asymmetric septum. To define the FtsZ region responsible for interaction with SpoIIE, in this work we performed tests using two-hybrid vectors with activation and DNA binding domains of the yeast transcription factor GAL4 fused to different portions of FtsZ and SpoIIE. These experiments did not provide information on the interaction between these proteins, since through them it was not possible to reproduce the positive results reported in the literature. As an alternative to the two-hybrid to identify the site of interaction between the two proteins, we created a genetic screening that can identify FtsZ mutants that cannot interact with SpoIIE, using a library of FtsZ mutants already available in the laboratory. We standardized a large scale microscopy using 96-well plates, allowing the screening of over a thousand mutants of FtsZ in search of a induced SpoIIE-GFP which would no longer localize at the vegetative cell Z ring. However, all the screened mutants still localized SpoIIE-GFP. In parallel, we performed a screening of suppression, using as a starting point a SpoIIE mutant that lost the ability to interact with FtsZ and searching for mutations in FtsZ that would reestablish interaction with the SpoIIE mutant. We screened approximately 35,000 mutants in this essay, eighteen of which showed the

phenotype expected for a suppressor. However, all selected candidates were false positives. The reason why such candidates do show the expected phenotype without reestablishment of the interaction between the two proteins is still unknown. In order to confirm whether there would be other divisiome proteins responsible for mediating the interaction between FtsZ and SpoIIE, co-localization experiments were made using FtsZ and SpoIIE in the absence of DivIB and FtsA. In both cases SpoIIE still located in divisome, ruling out the possibility that DivIB and FtsA are essencial mediators of the SpoIIE-FtsZ interaction. Finally, co-localization experiments were carried out with SpoIIE and FtsZ mutants previously identified in other experiments in our laboratory. In this experiment it was identified that the expression of IPTG-induced SpoIIE-GFP is able to restore the division frequency in the FtsZ-R376T mutant, which normally is deficient in the formation of divisomes. This result reinforces the idea that these proteins interact directly, and suggests that SpoIIE is able to restore the activity of FtsZ in a mutant that presents defect in polymerization.

Keywords: *Bacillus subtil*is, Cell Division, Sporulation, Protein Interaction, FtsZ, SpoIIE

ABREVIATURAS

AD	Domínio de Ativação da RNA Polimerase
BD	Domínio de Ligação ao DNA
CAT/CM	Antibiótico Clorafenicol
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dATP	Desoxi-Adenosina Trifosfato
dCTP	Desoxi-Citosina Trifosfato
dGTP	Desoxi-Guanosina Trifosfato
dNTPs	Desoxi-Ribonucleotídeos Trifosfato
dTTP	Desoxi-Tirosina Trifosfato
DSM	Meio de Esporulação Difco
EGTA	Ácido Etileno Glicol Tetraacético
GFP	Proteína Fluorescente Verde
IPTG	Isopropil B-D-tiogalactopiranosídeo
KAN	Antibiótico Canamicina
Kb	Quilobase
LB	Meio Lisogênico
mCherry	Proteína Fluorescente Vermelha
MLS	Antibióticos Lincomicina e Eritromicina
PCR	Reação de Polimerase em Cadeia
PEG	Polietilenoglicol
Phleo	Antibiótico Fleomicina
SPC	Antibiótico Espectiomicina
T*aq*	*Thermus aquaticus*
TET	Antibiótico Tetraciclina
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosídeo
YNB	Yeast Nitrogen Base
YPD	Yeast Extract Peptone Dextrose

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....14
1.1. A Divisão Celular em *Bacillus subtilis*.....14
1.2. O Processo de Esporulação e a Proteína SpoIIE.....16
1.3. A Estrutura de FtsZ e seus Sítios de Interação.....17
1.4. A Interação entre FtsZ e SpoIIE.....18

2. OBJETIVOS.....20

3. MATERIAIS E MÉTODOS 21
3.1. Cepas Bacterianas e Condições de Crescimento.....21
3.2. Métodos Gerais Utilizados na Construção das Cepas 21
3.2.1. Manipulação de DNA e Clonagens.. 21
3.2.2. Transformação de *Bacillus subtilis* com DNA genômico.....23
3.2.3. Transformação de DNA plasmidial em *Saccaromyces cereviseae*.....23
3.3. Construção das Bibliotecas de Mutantes de FtsZ. 24
3.4. Lista de Plasmídeos, Oligonucleotídeos e Cepas Utilizados 25
3.4.1. Plasmídeos.....25
3.4.2. Oligonucleotídeos.....25
3.4.3. Cepas.....26
3.5. Construção das Cepas.....28
3.6. Experimentos de Microscopia.....31
3.6.1. Fotos Estáticas.....31
3.6.2. Microscopia Em Massa.....31
3.7. Ensaio de Duplo-Híbrido em Levedura.....32
3.8. Western Blot.....32

4. RESULTADOS.....33
4.1. Ensaio de Duplo-Híbrido em Leveduras.....33
4.2. Triagem de Mutantes de FtsZ por Repórter LacZ e Microscopia.....37
4.3. Triagem de Supressores que Restaurem a Interação FtsZ-SpoIIE.....41

4.4. Revisando a Interação entre FtsZ e SpoIIE..... 48
4.5. Triagem por Microscopia Direta.....51
4.6. Localização de SpoIIE em Mutantes de FtsZ e Efeito da Sua Superexpressão..... 55

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....58

6. CONCLUSÕES.....60

7. REFERÊNCIAS.....61

1. INTRODUÇÃO

1.1. A Divisão Celular em *Bacillus subtilis*

As bactérias, assim como qualquer organismo vivo, dependem da multiplicação celular para garantir a perpetuação da espécie. Muito já se sabe sobre os processos que governam a divisão celular tanto em eucariotos quanto em procariotos, mas ainda restam muitas dúvidas a serem esclarecidas até que se tenha um conhecimento sólido sobre os mecanismos que controlam sua citocinese. Atualmente as duas bactérias para as quais se tem um maior conhecimento a respeito são *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis* (Barak and Wilkinson, 2007).

Recentemente foram descritas diversas proteínas bacterianas que apresentam capacidade de polimerização e interação com outros elementos celulares, sugerindo que procariotos possuem um citoesqueleto muito mais diverso e complexo do que se pensava no passado (Pogliano, 2008). A formação de um septo na faixa medial da célula que permita a sua divisão em duas células-filhas é realizada por proteínas que em alguns casos apresentam analogias em relação àquelas encontradas no citoesqueleto de eucariotos. Uma das principais proteínas envolvidas no processo é a FtsZ (Lowe e Amos, 1998 e Erickson *et al*, 2010). FtsZ é uma proteína homóloga à tubulina eucariótica, que se polimeriza no interior da célula formando um anel ao qual dá-se o nome de anel Z (Bi e Lutkenhaus, 1991). O anel Z é uma estrutura responsável pelo recrutamento de diversas outras proteínas de divisão. Esse complexo multiproteico, responsável pela citocinese bacteriana, é chamado de divisomo (Nanninga, 1998). É o divisomo que, por um processo ainda não totalmente compreendido, induz a formação de uma nova parede que, associada ao invaginamento da membrana plasmática, dividirá a célula-mãe em duas células filhas.

Muitas proteínas já foram descritas e caracterizadas como capazes de afetar a atividade de FtsZ, controlando sua polimerização tanto de forma positiva quanto negativa. ZapA é uma proteína cujo papel seria de estabilizar os polímeros de FtsZ, e sua ausência associada à falta de outros reguladores positivos geralmente resulta em bloqueio da formação do anel Z e, consequentemente, da divisão celular (Gueiros-Filho e Losick 2002, Scheffers 2008, Dajkovic 2010 e Pacheco-Gómez *et al* 2013). ZapA seria, portanto, um regulador positivo. Diversas outras proteínas associam-se a

FtsZ para permitir o correto funcionamento do anel, sua estabilização, ancoragem à membrana e associação a proteínas tardias responsáveis, entre outras funções, pela síntese de parede celular. Esse seria o caso de ZipA e FtsA, que como descrito para *Escherichia coli*, ajudam tanto a associação do anel Z à membrana como a recrutar em cascata uma série de proteínas tais como FtsK, FtsL, FtsW, FtsI e FtsN (Pichoff e Lutkenhaus 2002, Pichoff e Lutkenhaus 2005 e Pazos *et al* 2013).

Ao contrário dos reguladores positivos, os reguladores negativos atuam na célula de forma a impedir que FtsZ forme polímeros capazes de produzir um anel Z completo e funcional. Dentre essas proteínas temos EzrA. Mutantes que não expressam essa proteína apresentam uma maior polimerização de FtsZ em diversos pontos da célula, muitas vezes inviabilizando a formação de um único anel completo e funcional na região mediana, como geralmente aconteceria em uma célula selvagem (Levin *et al*. 1999, Singh *et al* 2007 e Steele *et al* 2011).

Sob condições normais, FtsZ localizado nas extremidades da célula não é capaz de formar polímeros com eficiência suficiente para gerar anéis Z funcionais. Isso ocorre devido à atuação das proteínas MinC e MinD, compondo o sistema Min. Essas proteínas inibem a polimerização de FtsZ, evitando a formação do anel Z nos polos da célula (de Boer *et al*, 1989 e Dajkovic *et al*, 2008). Caso a célula vegetativa forme um anel Z próximo a uma de suas extremidades, é muito possível que a segregação do material genético entre as células filhas não ocorra corretamente, com formação de minicélulas sem cromossomo. A localização do sistema Min na região polar da célula, portanto, ajuda a evitar que anéis Z indesejáveis sejam formados. Essa localização específica das proteínas Min é controlada por DivIVA. DivIVA é uma proteína que associa-se às extremidades da célula e promove o recrutamento do sistema Min (Cha and Stewart 1997, Marston 1998 e Eswaramoorthy *et al*, 2011).

Proteínas que se ligam ao DNA também apresentam função regulatória sobre a polimerização de FtsZ. Foi descrito um sistema no qual a proteína Noc, ligada aos cromossomos bacterianos em posições específicas (Wu et al., 2009), impede que FtsZ polimerize-se e forme um divisomo diretamente sobre o nucleóide (Wu e Errington, 2004). Esse efeito é conhecido como Nucleoid Occlusion (NO). A justaposição desses dois sistemas – Min e NO – assegura, então, que o divisomo seja formado preferencialmente na região mediana da célula, separando corretamente os dois cromossomos já formados pela replicação do DNA.

1.2. O Processo de Esporulação e a Proteína SpoIIE

Como meio de sobrevivência sob condições adversas, alguns procariotos, como *B. subtilis*, podem fazer um tipo de divisão diferencial que forma um organismo em estado latente, conhecido como esporo. A formação do esporo tem início a partir de uma divisão assimétrica, conseqüência da formação de um anel Z mais próximo à extremidade da célula. O esporo apresenta volume celular menor e parede muito mais espessa do que a das células vegetativas, além de uma carapaça protéica externa adicional. Essas caracteristicas configuram, assim, uma estrutura que resiste a condições desfavoráveis de disponibilidade de água, nutrientes ou presença de agentes nocivos como radiação e enzimas degradativas (Riesenman and Nicholson, 2000). Os esporos podem permanecer nesse estado latente por anos, até que as condições do ambiente façam-se novamente favoráveis.

A primeira etapa da formação do esporo é a mudança da posição do anel Z para mais próximo a um dos polos da célula (Levin e Losick, 1996). Como a posição do anel define o sítio de divisão da célula, o anel Z polar resulta em um septo de divisão assimétrico, produzindo duas células com tamanhos diferentes. Outros fatores de esporulação, expressos diferencialmente em cada uma das células filhas, definem a especificidade de cada compartimento. O compartimento de menor tamanho, chamado de pré-esporo, acaba originando o esporo (Piggot and Hilbert, 2004).

SpoIIE é uma proteína fosfatase integral de membrana, que se localiza especificamente no septo assimétrico de uma célula que esteja em processo de esporulação. A localização no septo assimétrico faz com que a concentração e, consequentemente, a atividade desta proteína seja mais alta no pré-esporo. Essa atividade fosfatásica mais elevada no pré-esporo leva à ativação de um fator sigma, σ^F, especificamente no pré-esporo, por um mecanismo que envolve a defosforilação de uma proteína ativadora de σ^F (King et al., 1999). Isso demonstra a magnitude da importância de SpoIIE para desencadear a rede de eventos necessários para o sucesso da formação do esporo.

1.3. A Estrutura de FtsZ e seus Sítios de Interação

A montagem dos filamentos de FtsZ é altamente regulada, e o amplo repertório de proteínas acessórias responsável por esse controle atua em diferentes porções, ou sítios, da proteína. FtsZ é composta por duas porções globulares separadas por uma α-hélice central (Figura 1.1). Essas duas porções atuam tal como as subunidades da tubulina eucariótica (cabeça-cauda), formando um filamento polarizado sob hidrólise de GTP (Mukherjee e Lutkenhaus, 1994). Além da porção globular, há a região C-terminal, que é desestruturada.

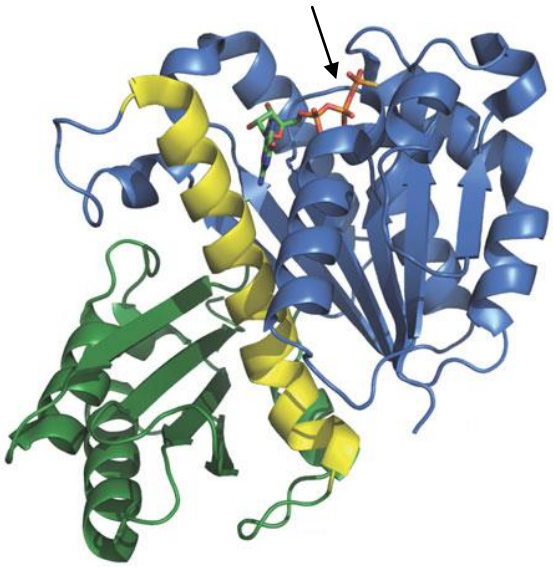


Figura 1.1 – Estrutura Tridimensional de FtsZ: As duas porções globulares de FtsZ são destacadas em azul (porção N-terminal), verde (porção C-terminal) e amarelo (Hélice H7, separando os dois principais domínios). A seta indica uma molécula de GTP em seu sítio de hidrólise. A porção desestruturada e o CTP no extremo C-terminal não são visíveis na estrutura cristalográfica. Adaptado de Adams e Errington, 2009.

Diferentes proteínas acessórias podem interagir em diferentes sítios de FtsZ (Adams e Errington, 2009). É sabido que o CTP presente no extremo C-terminal é muito importante para a interação com diversas dessas proteínas. Entre elas, podemos citar ZipA (Mosyak *et al.*, 2000), FtsA (Haney *et al.*, 2001), MinC (Shen e Lutkenhaus, 2009 e Blasios *et al.*, 2013), EzrA (Singh *et al.*, 2007) e SepF (Król, *et*

al. 2012). No entanto, outras proteínas podem fazer interações com outras porções de FtsZ. Esse é o caso de SulA (Cordell *et al.*, 2003) e MciZ (Handler *et al.*, 2008), que interagem com a porção globular da proteína.

1.4. A Interação entre FtsZ e SpoIIE

Além do papel na ativação de σ^F, SpoIIE se liga a FtsZ e a auxilia na formação do septo assimétrico. A co-localização entre SpoIIE e FtsZ já foi demonstrada por experimentos de microscopia de fluorescência. Células em processo de esporulação apresentam SpoIIE associada ao anel assimétrico, enquanto células manipuladas para expressar SpoIIE constitutivamente apresentam-na na região medial da célula em divisão, coincidindo com a posição do anel Z nas células vegetativas (em crescimento) (Levin *et al.*, 1997 e Wu *et al.*, 1998). Essa co-localização é devida à interação direta que ocorre entre FtsZ e SpoIIE. Tal interação já foi demonstrada por ensaio de duplo-híbrido e por pull down (Lucet *et al.*, 2000 e Barak *et al*, 1996). Aparentemente a interação entre essas proteínas é crucial para que haja a formação do anel assimétrico, já que mutantes incapazes de produzir SpoIIE apresentam dificuldade em gerar esses anéis (Khvorova *et al*. 1998, Ben-Yehuda e Losick 2002, e Carniol *et al.*, 2005).

SpoIIE pode ser dividida em três regiões ou domínios: a região I contém a extremidade N-terminal e está imersa na membrana celular; a região III está na extremidade C-terminal e apresenta atividade fosfatásica; o domínio II, na região central da proteína, tem função menos estabelecida, mas aparentemente é importante junto com a região III para que haja a formação do septo assimétrico. Aparentemente a atividade fostatase em si da região III não apresenta importância direta na formação do septo assimétrico, sendo importante, no entanto, para a ativação de σ^F tal como descrito acima (Barak e Youngman 1996 e Carniol et al. 2005).

Em vista desses dados, pode-se admitir que a presença de SpoIIE na célula resulta em uma maior capacidade de polimerização do anel Z, sendo esta proteína então um regulador positivo de FtsZ. Durante a esporulação, o polímero de FtsZ assume uma forma espiralada que posteriormente se estabiliza na forma de anel na região polar da célula (Ben-Yehuda e Losick, 2002). Acredita-se que SpoIIE de alguma maneira promova essa transição de espiral para anel polar durante a esporulação.

Até o momento não está elucidado o mecanismo que permite a SpoIIE promover a polimerização de FtsZ, mais intrigantemente na região polar da célula, onde há atividade do sistema Min. Uma hipótese que explicaria a formação dos anéis polares seria a de que a interação direta entre SpoIIE e FtsZ torne o anel Z mais estável, se sobrepondo ao efeito inibidor do sistema Min. Essa hipótese é apoiada pelos dados de Meira (2010), que mostram que a expressão de SpoIIE compensa a superexpressão de Min, colaborando para o sucesso na formação de novos anéis. Assim, propomos neste projeto a identificação dos sítios de ligação entre FtsZ e SpoIIE. Ao compreendermos melhor as interações que SpoIIE e FtsZ realizam entre si poderemos entender melhor o mecanismo pelo qual SpoIIE afeta a formação do anel Z e contribuir para uma melhor compreensão dos mecanismos de regulação da divisão em *B. subtilis*.

2. OBJETIVOS

2.1. Identificar e caracterizar os domínios de interação entre as proteínas FtsZ e SpoIIE

2.2. Padronizar uma técnica de triagem de mutantes através de microscopia em larga escala

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 *et al.*, 1983). A cepa comercial *E. coli* DH5α foi utilizada para a clonagem das proteínas de fusão. Tanto *B. subtilis* quanto *E. coli* foram crescidos em LB líquido a 37ºC, com agitação. Antibióticos, quando necessários, foram utilizados nas seguintes concentrações: espectinomicina, 100 μg/mL; tetraciclina, 10 μg/mL; ampicilina, 100 μg/mL; cloranfenicol 5 μg/mL; canamicina, 5 μg/mL. IPTG foi utilizado como indutor quando necessário, nas quantidades indicadas em cada experimento.

3.2. Métodos Gerais Utilizados na Construção das Cepas

3.2.1. Manipulação de DNA e Clonagens

3.2.1.1. Extração de DNA Plasmidial de *E. coli*

Os plasmídeos foram extraídos com o kit *QIAPrep Spin Miniprep Kit* (QIAGEN), conforme instruções do fabricante.

3.2.1.2. Purificação de DNA de Gel de Agarose

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

3.2.1.3 Amplificação de DNA por PCR

As reações de PCR utilizaram os oligonucleotídeos listados na Tabela 2, além de 100ng de DNA plasmidial ou 50ng de DNA genômico de *B. subtilis.* Foram utilizados 2mM $MgCl_2$, 10μL de tampão para T*aq* (Fermentas), 0,25mM de dNTPs, 0,4μM de oligonucleotídeos e 1,25U de T*aq* DNA Polimerase em reações de volume final de

50µL. Os ciclos consistiram em uma desnaturação inicial a 94ºC por 1 minuto, anelamento a 55ºC por 1 minuto e extensão a 72ºC por 2 minutos, por 30 ciclos, e extensão final a 72ºC por 7 minutos. Os produtos obtidos destas reações foram purificados com o *Qiaquick PCR Purification Kit* conforme instruções do fabricante.

3.2.1.4. Testes de Restrição

Os plasmídeos extraídos de *E. coli* foram clivados com diversas enzimas de restrição e submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% a 70V para confirmação da clonagem. Os fragmentos no gel foram visualizados por impregnação com Brometo de Etídeo e exposição à luz ultravioleta.

3.2.1.5. Sequenciamentos

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

3.2.1.6 Ligações de DNA

As reações de ligação foram realizadas com 100ng de vetor, com uma razão de inserto:vetor de 6:1, 1µL de T4 Ligase (Fermentas), 10µL de T4 tampão de Ligase, num total de 50µL de reação, por 10h em temperatura ambiente.

3.2.1.7 Transformações das Células Competentes DH5α

As transformações de *E. coli* foram realizadas através do *TransformAID Bacterial Transformation Kit* (Fermentas) com 100ng de vetor ou eletroporação a 2.5kV em cubetas de 2mm com 50ng de vetor (as células para eletroporação foram crescidas até DO_{600} 0,4 em meio 5g/L triptona e 2,5g/L de extrato de levedura. Foram realizadas 3 lavagens em água deionizada a 4ºC, e a cultura foi ressuspendida em glicerol 50% e estocada a -80ºC até o momento de uso).

3.2.2. Transformação de *Bacillus subtilis* com DNA genômico

3.2.2.1. Preparação de Células Competentes

As bactérias foram semeadas em meio LB sólido overnight formando uma fina camada sobre o meio. As células foram então suspensas a uma densidade de 70-90 unidades Klett (filtro verde) em 20mL de meio SpC (Tampão Tris pH7,0, Glicose 0,5%, $MgSO_4$ 0,018%, Extrato de Levedura 0,2%, Casaminoácidos 0,025% e suplementos, quando necessário). As células foram mantidas sob agitação a 37ºC até atingir fase estacionária, e então foram diluídas na proporção de 1:10 em meio SpII (Tampão Tris pH 7,0, Glicose 0,5%, $MgSO_4$ 0,084%, $CaCl_2$ $5{,}55.10^{-3}$%, Extrato de Levedura 0,1%, Casaminoácidos 0,01% e suplementos, quando necessário). A cultura foi então mantida sob agitação a 37ºC por mais 90 minutos, e então centrifugada a 2000g por 10 minutos. As células do pellet foram ressuspendidas em 1,6 mL de sobrenadante (a partir de cultura de 20mL) e transformadas.

3.2.2.2. Transformação

Às células competentes previamente obtidas foi adicionada quantidade igual do meio de transformação SPII-EGTA (Tampão Tris pH7,0, Glicose 0,5%, $MgSO_4$ 0,084%, Extrato de Levedura 0,1%, Casamino 0,01%, EGTA 2.10^{-3}M) totalizando um volume de 150µL. A essa mistura foi adicionado 1µL do DNA genômico a ser transformado. As células foram mantidas sob agitação a 37ºC por 40 minutos, e então semeadas em placa de LB com o antibiótico para selecionar as transformantes.

3.2.3. Transformação de DNA plasmidial em *Saccaromyces cereviseae*

As leveduras foram inoculadas em meio YPD (Extrato de Levedura 1%, Peptona 2% e Glicose 2%) e incubadas a 30ºC sob agitação até atingir $DO_{600} > 1$. Elas foram então centrifugadas a 2000g por 2 minutos e ressuspensas em TE. Após nova centrifugação, foram ressuspensas então em solução 0,2N LiOAc, 40% PEG_{3350}, 100mM DTT. Foram adicionados de 2 a 5 µg de DNA plasmidial para 100µL de células, e então incubadas a 42ºC por 30 minutos. Em seguida, as células foram semeadas em meio YNB (Yeast Nitrogen Base: YNB 0,7%, Glicose 2% e Agar 2% e suplementos) seletivo com carência de nutriente que seleciona transformantes.

3.3. Construção das Bibliotecas de Mutantes de FtsZ.

A construção da biblioteca de mutantes de FtsZ foi feita por Alexandre Bisson Filho, estudante de doutorado do laboratório, pelo método de Error Prone PCR. Neste método é feito um PCR modificado com adição de $MnCl_2$ e com altas concentrações de alguns dNTPs para que a enzima Taq Polimerase insira erros aleatórios durante a cópia do gene (*ftsZ*).

Foram usados, para uma reação de volume final 100µL, 7mM $MgCl_2$, 50mM KCl, 20mM Tris (pH 8.4), 0,2mM $MnCl_2$, 1mM dTTP, 1mM dGTP, 0,2mM dCTP, 0,2mM dATP, 100ng DNA (*ftsZ* clonado em plasmídio), 2µM primer extremidade 3´, 2µM primer extremidade 5´, 1µL Taq Polimerase.

A reação foi realizada com 1 etapa de 3 minutos (95ºC), 30 ciclos de 1 minuto (93ºC), 1 minuto (55ºC), 5 minutos (72ºC) e mais uma etapa de 10 minutos (72ºC), sendo posteriormente mantida a 4ºC, num termociclador convencional.

Os produtos do PCR mutagênico foram clonados em um vetor competente para recombinar com *ftsZ* cromossomal (pAB10). Os plasmídios obtidos foram clivados com a enzima EcoRI e religados para formar multímeros. Esses multímeros foram transformados na cepa selvagem PY79 com seleção por tetraciclina, obtendo-se um *pool* de transformantes contendo mutantes. O DNA genômico desses transformantes foi extraído, e então transformado nas linhagens adequadas para a triagem, como descritas em cada tópico. O sequenciamento dos mutantes de *ftsZ* selecionados ao longo dos experimentos foi realizado em duas etapas. A primeira delas foi uma reação de PCR tal como descrito no item 3.2.1.3, utilizando os pares de oligos FG239 e FG213 (anelando, respectivamente, acima da região RBS de *ftsZ* e no cassete de TET) ou FG239 e FG506 (anelando, respectivamente, acima da região RBS de *ftsZ* e na região entre *ftsZ* e o cassete de TET). A segunda etapa foi realizada tal como descrito no item 3.2.1.5, utilizando os pares de oligos FG69 e FG70, que anelam na região mediana de *ftsZ*, em sentidos opostos.

3.4. Lista de Plasmídeos, Oligonucleotídeos e Cepas Utilizados

3.4.1. Plasmídeos

Tabela 1. Plasmídeos utilizados neste trabalho

Plasmídeo	**Contém**
pAB10	*ftsZ, tet*
pGAD-C2	*gal4-AD, amp, leu*
pGBDU	*gal4-BD, amp, ura*
pMAD1	*pGBDU, ftsZ, amp, ura*
pMAD2	*pGBDU,* $ftsZ^{CTP}$*, amp, ura*
pMAD3	*pGBDU,* $ftsZ^{\Delta CTP}$*, amp, ura*
pMAD4	*pGAD-C2, spoIIE, amp, leu*
pMAD5	*pGAD-C2, ftsZ, amp, leu*
pMAD6	*pGAD-C2,* $ftsZ^{CTP}$*, amp, leu*
pMAD7	*pGAD-C2,* $ftsZ^{\Delta CTP}$*, amp, leu*
pMAD8	*pGBDU, spoIIE, amp, ura*
pGBDUDivIVA	*pGBDU, divIVA, amp, ura*
pGADC2DivIVA	*pGAD-C2, divIVA, amp, leu*

3.4.2. Oligonucleotídeos

Tabela 2. Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho

Nome	**Sequencia**
FG69	AAAACACACCGATGCTTGAA
FG70	ACCGATACCCATCAAAGCAG
FG213	GGTCTCAGCAGGATCGAATTCCTGTTATAAAA
FG239	ATATGTCGACGTCATTCGGCAGATTAGG
FG409	ACTGAATTCATGTTGGAGTTCGAAACA

FG410	ACTGGATCCTTAGCCGCGTTTATTACG
FG411	ACTGAATTCGATGATACGCTTGACATC
FG412	ACTGGATCCAGCCGGCTGTGAAGTATG
FG413	ACTGGATCCGAAGGAAAGTGGCGAGATAT
FG414	ACTGTCGACTTATGAAATTTCTTGTTT
FG442	CGCGTTTGGAATCACTACAG
FG443	CGACATCATCATCGGAAGAG
FG506	GCAATAGCGTCCTTGCTCTC

3.4.3. Cepas

Tabela 3. Cepas bacterianas utlizadas neste trabalho

Cepa	Espécie	Genótipo	Fonte
PY79	*B. subtilis*	Selvagem	Coleção do Laboratório
DH5α	*E. coli*	*deoR endA1 gyrA96 hsdR17 (lac)U169 recA1 relA1 supE44 thi-1(Φ80 lacZM15)*	Cepa Comercial
PJ69-4a	*S. cereviseae*	*MATa, trp1-901, leu2-3, 112ura3-52, his-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2::GAL1-HIS3, GAL2-ADE2, met2::GAL7-lacZ*	Azizi, B. (2003)
AB177	*B. subtilis*	*ftsZΩftsZ-R376T*	Coleção do Laboratório
FG13	*B. subtilis*	*thrC::$_{PspoIIQ}$-lacZ, mls*	Coleção do Laboratório
FG338	*B. subtilis*	*spoIIEΩphleo, ywclΩtet, amyE::P_{spak}-ftsZ-GFP*	Coleção do Laboratório
FG71	*B. subtilis*	*ΔdivIB::spc*	Coleção do Laboratório
FG718	*B. subtilis*	*ftsA ko (in frame), amyE-Pxyl-ftsA*	Coleção do Laboratório
FG712	*B. subtilis*	*amyE::P_{spak}-ftsZ-mCherry, spcR cat*	Coleção do Laboratório
FG1343	*B. subtilis*	*spoIIE48-gfp, spec, spoIIA::cat*	Coleção do Laboratório
FG1345	*B. subtilis*	*spoIIE-686A-gfp, kan, spoIIA::cat*	Coleção do Laboratório
FG633	*B. subtilis*	*amyE::ftsAZ, cat, zae-86::Tn917::pTV21d2::P_{spank}-spoIIE-Q483A-gfp, kan, spc, cat*	Carniol, K. (2005)
SB220	*B. subtilis*	*amyE::ftsAZ, cat, zae-86::Tn917::pTV21d2::P_{spank}-spoIIE-gfp, kan, spc, cat*	Carniol, K. (2005)
FG1342	*B. subtilis*	*amyE::ftsAZ, cat, zae-86::Tn917::pTV21D2::P_{spank}-spoIIE48-gfp, kan spec, cat*	Carniol, K. (2005)
FG1344	*B. subtilis*	*amyE::ftsAZ, cat, zae-86::Tn917::pTV21D2::P_{spank}-spoIIE-D686A-gfp, spec, cat, kan*	Carniol, K. (2005)

FG1346	*B. subtilis*	*amyE::ftsAZ, cat zae-86::Tn917::pTV21D2:: P_{spank}-spoIIE-gfp, kan, spec, cat*	Carniol, K. (2005)
FG907	*B. subtilis*	*spoIIE-34-320, amyE::spoIIAA-AC kan, Δ(spoIIAA-AC)::spc*	Coleção do Laboratório
MD3	*B. subtilis*	*thrC::$_{PspoIIQ}$-lacZ, mls, ΔspoIIE::phleo*	Este Trabalho
MD6	*B. subtilis*	*amyE::spoIIAA-AC, kan, Δ(spoIIAA-AC)::spc*	Este Trabalho
MD7	*B. subtilis*	MD6, *thrC::spoIIQ-lacZ, mls*	Este Trabalho
MD8	*B. subtilis*	MD6, *thrC::spoIIQ-lacZ, mls, zae-86::Tn917::pTV21d2::P_{spank} -spoIIE-Q483A-gfp, spc, kan, cm*	Este Trabalho
MD9	*B. subtilis*	MD6, *thrC::spoIIQ-lacZ, spoIIE-34-320*	Este Trabalho
MD10	*B. subtilis*	*Δ(spoIIAA-AC)::spc*	Este Trabalho
MD11	*B. subtilis*	*amyE::spoIIAA-AC, kan*	Este Trabalho
MD12	*B. subtilis*	MD6, *zae-86::Tn917::pTV21d2::P_{spank}-spoIIEQ483A-gfp, spc, kan, cm*	Este Trabalho
MD13	*B. subtilis*	*thrC::P_{spoIIQ}-lacZ mls, Δ(spoIIAA-AC)::spc*	Este Trabalho
MD14	*B. subtilis*	*ΔspoIIE::phleo*	Este Trabalho
MD15	*B. subtilis*	*thrC::P_{spoIIQ}-lacZ, mls, spoIIE-34-320*	Este Trabalho
MD25	*B. subtilis*	*amyE::P_{spac}-ftsZ-mCherry, spc, cat, zae-86::Tn917::pTV21d2::P_{spank}-spoIIE-Q483A-gfp, kan, spec, cat*	Este Trabalho
MD26	*B. subtilis*	*ΔftsA::spc, amyE::P_{xyl}-ftsA, zae-86::Tn917::pTV21d2::P_{spank}-spoIIE-Q483A-gfp, kan, spec, cat*	Este Trabalho
MD27	*B. subtilis*	*zae-86::Tn917::pTV21d2::P_{spank}-spoIIE-Q483A-gfp, kan, spec, cat, ΔdivIB::spec*	Este Trabalho
MD28	*B. subtilis*	MD7, *zae-86::Tn917::pTV21d2:;P_{spank}-spoIIE-gfp, kan, spc, cat*	Este Trabalho
MD29	*B. subtilis*	*thrC::P_{spoIIQ}-lacZ, mls, spoIIE-D686A-gfp, kan*	Este Trabalho
MD30	*B. subtilis*	*thrC::P_{spoIIQ}-lacZ, mls, spoIIE-S361F-gfp, spc*	Este Trabalho
MD31	*B. subtilis*	*thrC::P_{spoIIQ}-lacZ mls, amyE::spoIIAA-AC, kan, spoIIE-S361F, spc*	Este Trabalho
MD32	*B. subtilis*	*zae-86::Tn917::pTV21D2::P_{spank}-spoIIE S361F-gfp, kan spec, cat*	Este Trabalho
MD33	*B. subtilis*	*zae-86::Tn917::pTV21D2::P_{spank}-spoIIE-D686A-gfp, spec, cat, kan*	Este Trabalho
MD34	*B. subtilis*	*thrC::P_{spoIIQ}-lacZ, mls, spoIIE-D686A-gfp, kan, zae-86::Tn917::pTV21D2::P_{spank}-spoIIE-D686A-gfp, spec, cat, kan*	Este Trabalho
MD36	*B. subtilis*	*zae-86::Tn917::pTV21d2::p_{spank}-spoIIE-gfp*	Este Trabalho
MD38	*B. subtilis*	*zae-86::Tn917::pTV21d2::p_{spank}-spoIIE-gfp, ftsZΩftsZ-R376T*	Este Trabalho

MD39	*S. cereviseae*	*PJ69-4a, pGAD-C2, pGBDU*	Este Trabalho
MD40	*S. cereviseae*	*PJ69-4a, pMAD1, pMAD5*	Este Trabalho
MD41	*S. cereviseae*	*PJ69-4a, pMAD4, pMAD8*	Este Trabalho
MD42	*S. cereviseae*	*PJ69-4a, pMAD5, pMAD8*	Este Trabalho
MD43	*S. cereviseae*	*PJ69-4a, pMAD6, pMAD8*	Este Trabalho
MD44	*S. cereviseae*	*PJ69-4a, pMAD7, pMAD8*	Este Trabalho
MD45	*S. cereviseae*	*PJ69-4a, pMAD4, pMAD1*	Este Trabalho
MD46	*S. cereviseae*	*PJ69-4a, pMAD4, pMAD2*	Este Trabalho
MD47	*S. cereviseae*	*PJ69-4a, pMAD4, pMAD3*	Este Trabalho
MD48	*S. cereviseae*	*PJ69-4a, pMAD5, FG1045*	Este Trabalho
MD49	*S. cereviseae*	*PJ69-4a, pMAD1, FG1044*	Este Trabalho
MD50	*S. cereviseae*	*PJ69-4a, pMAD4, FG1045*	Este Trabalho
MD51	*S. cereviseae*	*PJ69-4a, pMAD8, FG1044*	Este Trabalho
MD52	*S. cereviseae*	*PJ69-4a, FG1044, FG1045*	Este Trabalho

3.5. Construção das Cepas

MD3: O DNA genômico de FG338 foi extraído e transformado em células competentes da cepa FG13. Os transformantes foram selecionados por resistência a fleomicina.

MD6: O DNA genômico de FG907 foi extraído e transformado em células competentes da cepa selvagem PY79. Os transformantes foram selecionados por resistência simultânea a SPC e KAN.

MD7: O DNA genômico de FG13 foi extraído e transformado em células competentes da cepa MD6. Os transformantes foram selecionados por resistência a MLS.

MD8: O DNA genômico de FG633 foi extraído e transformado em células competentes da cepa MD7. Os transformantes foram selecionados por resistência a CM.

MD9: O DNA genômico de FG13 foi extraído e transformado em células competentes da cepa FG907. Os transformantes foram selecionados por resistência a MLS

MD10: O DNA genômico de FG907 foi extraído e transformado em células competentes da cepa selvagem PY79. Os transformantes foram selecionados por resistência a SPC.

MD11: O DNA genômico de FG907 foi extraído e transformado em células competentes da cepa selvagem PY79. Os transformantes foram selecionados por resistência a KAN.

MD12: O DNA genômico de FG633 foi extraído e transformado em células competentes da cepa MD6. Os transformantes foram selecionados por resistência a CM.

MD13: O DNA genômico de FG907 foi extraído e transformado em células competentes da cepa FG13. Os transformantes foram selecionados por resistência a SPC.

MD14: O DNA genômico de FG338 foi extraído e transformado em células competentes da cepa selvagem PY79. Os transformantes foram selecionados por resistência a fleomicina.

MD15:

MD25: O DNA genômico de FG633 foi extraído e transformado em células competentes da cepa FG712. Os transformantes foram selecionados por resistência a KAN.

MD26: O DNA genômico de FG633 foi extraído e transformado em células competentes da cepa FG718. Os transformantes foram selecionados por resistência a SPC.

MD27: O DNA genômico de FG633 foi extraído e transformado em células competentes da cepa FG71. Os transformantes foram selecionados por resistência a KAN.

MD28: O DNA genômico de FG1346 foi extraído e transformado em células competentes da cepa MD7. Os transformantes foram selecionados por resistência a CM.

MD29: O DNA genômico de FG1345 foi extraído e transformado em células competentes da cepa FG13. Os transformantes foram selecionados por resistência a SPC.

MD30: O DNA genômico de FG1343 foi extraído e transformado em células competentes da cepa FG13. Os transformantes foram selecionados por resistência a SPC.

MD31: O DNA genômico de FG907 foi extraído e transformado em células competentes da cepa MD30. Os transformantes foram selecionados por resistência a KAN.

MD32: O DNA genômico de FG1342 foi extraído e transformado em células competentes da cepa selvagem PY79. Os transformantes foram selecionados por resistência a SPC.

MD33: O DNA genômico de FG1344 foi extraído e transformado em células competentes da cepa selvagem PY79. Os transformantes foram selecionados por resistência a SPC.

MD34: O DNA genômico de FG1342 foi extraído e transformado em células competentes da cepa MD29. Os transformantes foram selecionados por resistência a SPC.

MD36: O DNA genômico de FG1346 foi extraído e transformado em células competentes da cepa selvagem PY79. Os transformantes foram selecionados por resistência a SPC.

MD38: O DNA genômico de AB177 foi extraído e transformado em células competentes da cepa MD36. Os transformantes foram selecionados por resistência a TET.

MD39, MD40, MD41, MD42, MD43, MD44, MD45, MD46, MD47, MD48, MD49, MD50, MD51, MD52: Os vetores pGBDU e pGAD-C2 foram clivados com as enzimas EcoR1 e BamH1 e ligados aos produtos de PCR de *ftsZ*, também clivados pelas mesmas enzimas, obtidos pelos pares de oligos FG409 + FG410, FG411 + FG410 e FG409 + FG412, obtendo-se respectivamente os plasmídeos pMAD1, pMAD2, pMAD3, pMAD5, pMAD6 e pMAD7. Os vetores pGBDU e pGAD-C2 foram clivados com as enzimas EcoR1 e Sal1 e ligados aos produtos de PCR de *spoIIE*, também clivados pelas mesmas enzimas, que foram obtidos pelo par de oligos FG413 e FG414, obtendo-se respectivamente os plasmídeos pMAD8 e pMAD4. O produto obtido pela reação de PCR em *spoIIE* não inclui a porção transmembrana da proteína. A clonagem foi confirmada pelo sequenciamento dos insertos com o uso dos oligos FG442 para pGAD-C2 e FG443 para pGBDU, ambos Forward.

Sempre que aplicável, a não ocorrência de congressão foi confirmada pela ausência de resistência a outros antibióticos além dos esperados para aquela cepa. O teste da amilase foi utilizado para confirmar a inserção de genes em *amyE*, por plaqueamento das cepas em placa de amido 1% em LB, com posterior impregnação com iodo e observação do halo de degradação.

3.6. Experimentos de Microscopia

A microscopia de fluorescência foi realizada em microscópio invertido Nikon Eclipse Ti 300, equipado com lâmpada Intensilight C-HGFI (Nikon) e objetiva CFI Plan Apo VC 100X Oil (Nikon). O óleo de imersão utilizado foi o FF (Nikon). Os filtros utilizados foram GFP BrightLine® Filter Set e mCherry BrightLine® Filter Set (Semrock), e obturador de 25mm *Smart*Shutter. As fotos foram capturadas utilizando câmera Andor, modelo Ixon EMCCD com sensor CCD 1004 x 1002 SQ Pixels. Todas as imagens foram capturadas utilizando o software NIS (Versão 3.07, Nikon) e então processadas utilizando-se o software ImageJ.

3.6.1. Fotos Estáticas

As bactérias foram semeadas em placa de LB-Ágar contendo o antibiótico adequado e incubadas a 37ºC por 12 horas. Em seguida, uma colônia foi inoculada em meio LB Líquido e incubada até atingir DO_{600} 0,3. A cultura foi então diluída à DO_{600} 0,05 e incubada até DO_{600} 0,3, contendo indutor quando necessário. Em seguida, as células foram analisadas no microscópio de fluorescência em lâminas contendo LB e 1% agarose, de maneira similar ao trabalho de Meira (2010). Para a visualização da membrana foi utilizado 1µg/mL do corante FM-595.

3.6.2. Microscopia em Massa

Para as microscopias em larga escala realizadas durante triagem de mutantes foram utilizadas placas do tipo µ-Plate 96 well (Ibidi, Alemanha), modelos 89626 ou 89621. As bactérias foram transformadas com a biblioteca de mutantes de *ftsZ* e plaqueadas em meio LB+TET. Cada colônia formada foi transferida para um dos poços da placa, contendo LB líquido 25% + 0,5mM IPTG. A placa foi então incubada a 37ºC por 2 horas, e logo em seguida levada ao microscópio. Tanto o equipamento quanto o software para realização das microscopias automatizadas foram os mesmos descritos para as microscopias em lâmina de agarose.

3.7. Ensaio de Duplo-Híbrido em Levedura

Foi utilizada a cepa de levedura PJ69-4a (FG579), que foi disponibilizada gentilmente pelo Dr. Shaker Chuck Farah. Os vetores pGBDU (*ura*) e pGADC2 (*leu*) foram utilizados para clonar os genes e transformar a cepa PJ69-4A, usando o método já descrito (Bongiorni *et al.*, 2005), com pequenas modificações. As células selecionadas foram então cultivadas em meio YNB-Ágar seletivo da presença dos plasmídios (sem uracila e leucina). Para o ensaio de β-galactosidase as células foram cultivadas em membrana de nitrocelulose sobre meio seletivo de presença de plasmídio ou sobre meio seletivo de interação (sem Uracila, Leucina, Adenina e Histidina) por 24hs, lisadas em N_2 líquido por 2 minutos, embebidas em tampão Z (Na_2PO_4 60mM, NaH_2PO_4 40mM, KCl 10mM, $MgSO_4$ 1mM em pH 7,0) + X-gal, e então mantidas a 37ºC por uma hora.

3.8. Western Blot

De cada cepa de levedura utilizada foi feita uma extração de proteína total, por lise com contas de vidro em tampão 20mM Tris pH8.0, 150mM KAc, 1mM PMSF, 1mM DTT e 5mM MgAc. As amostras foram separadas por SDS-PAGE 10% e transferidas para membrana Amersham Hybond –P GE Healthcare. A membrana foi bloqueada em TBS-Leite 5% e marcada com anticorpo primário α-FtsZ overnight. Como anticorpo secundário foi utilizado anti IgG de coelho com peroxidase (GE) por 5 horas. A membrana foi revelada em filme IBF utilizando-se ECL SuperSignal West Pico como substrato.

4. RESULTADOS

4.1. Ensaio de Duplo-Híbrido em Leveduras

Para definirmos qual região de FtsZ é responsável pela sua interação com SpoIIE, foram realizados ensaios de duplo-híbrido utilizando vetores com domínios de ativação e de ligação ao DNA do fator de transcrição GAL4 de levedura fusionados aos genes *ftsZ*, $ftsZ^{\Delta C}$, $ftsZ^{CTP}$ e *spoIIE*. No caso, *ftsZ* é o gene selvagem de FtsZ, $ftsZ^{\Delta C}$ é o gene de FtsZ sem a região CTP, $ftsZ^{CTP}$ é o gene que codifica apenas a região CTP de FtsZ (como descrito na introdução, uma região em que é sabido ocorrer interação com diversas outras proteínas) (Shen e Lutkenhaus 2009, Buske e Levin 2012 e Król *et al.* 2012) e *spoIIE* é o gene de SpoIIE sem a porção transmembrana. Essa técnica já foi utilizada por Lucet *et al*. (2000) com algumas variações, mas utilizando FtsZ somente em sua forma integral.

A princípio, o ensaio foi realizado utilizando como repórter a própria capacidade das leveduras de crescerem em meio não suplementado com histidina e adenina. A ocorrência de interação entre os domínios de ativação da transcrição e de ligação ao DNA para o fator de transcrição GAL4 resulta na expressão dos genes repórteres que codificam enzimas das vias de biossíntese de histidina e adenina, ausentes em PJ69-4a. Assim, indivíduos capazes de crescer em meio não suplementado seriam indicativos de interação entre as proteínas testadas, gerando resultado positivo. Os resultados esperados variam de acordo com a região em que ocorra a interação entre SpoIIE e FtsZ, tal como descrito na Figura 4.1 e Tabela 4.1.

FtsZ		Interação com SpoIIE	
		No CTP	**Fora do CTP**
CTP	*ftsZ* (wt)	+	+
	$ftsZ^{\Delta CTP}$	-	+
CTP	$ftsZ^{CTP}$	+	-

Figura 4.1 - Interações Previstas: À esquerda temos as 3 formas de FtsZ utilizadas neste estudo. A primeira é a proteína integral, a segunda não apresenta a região CTP e

a terceira é somente a região CTP. À direita os resultados esperados quanto à interação entre FtsZ e SpoIIE caso a região CTP seja a região responsável pela interação (Caso I) ou caso a interação ocorra em outra região de FtsZ (Caso II). Ambos os casos assumem que SpoIIE esteja sem a porção I, que é transmembrana ($SpoIIE^{\Delta I}$).

Os resultados obtidos com esse ensaio não foram conclusivos, uma vez que apenas os controles positivos (DivIVA+DivIVA e FtsZ+FtsZ) apresentaram crescimento em meio seletivo de interação (meio com carência de Leucina, Uracila, Adenina e Histidina) (Figura 4.2 e Tabela 4.1). Entre os outros pares testados, pelo menos o par SpoIIE+SpoIIE era esperado que interagisse, de acordo com dados de Lucet *et al.* (2000) que sugerem que há autointeração entre SpoIIE. Os pares FtsZ+DivIA e SpoIIE+DivIVA foram utilizados como controles negativos, visto que nunca se mostrou uma interação direta entre essas proteínas.

pGADC2	**pGBDU**	**Esperado**	**Obtido**
SpoIIE	SpoIIE	+	-
FtsZ	SpoIIE	+	-
FtsZCTP	SpoIIE	?	-
$FtsZ^{\Delta CTP}$	SpoIIE	?	-
SpoIIE	FtsZ	+	-
SpoIIE	$FtsZ^{CTP}$	?	-
SpoIIE	$FtsZ^{\Delta CTP}$	?	-
DivIVA	DivIVA	+	+
FtsZ	FtsZ	+	+
FtsZ	DivIVA	-	-
DivIVA	FtsZ	-	-
SpoIIE	DivIVA	-	-
DivIVA	SpoIIE	-	-

Tabela 1. Combinações de presas e iscas utilizadas no ensaio de duplo-híbrido. (+) Resultado Positivo; (-) Resultado Negativo; (?) Resultado esperado desconhecido.

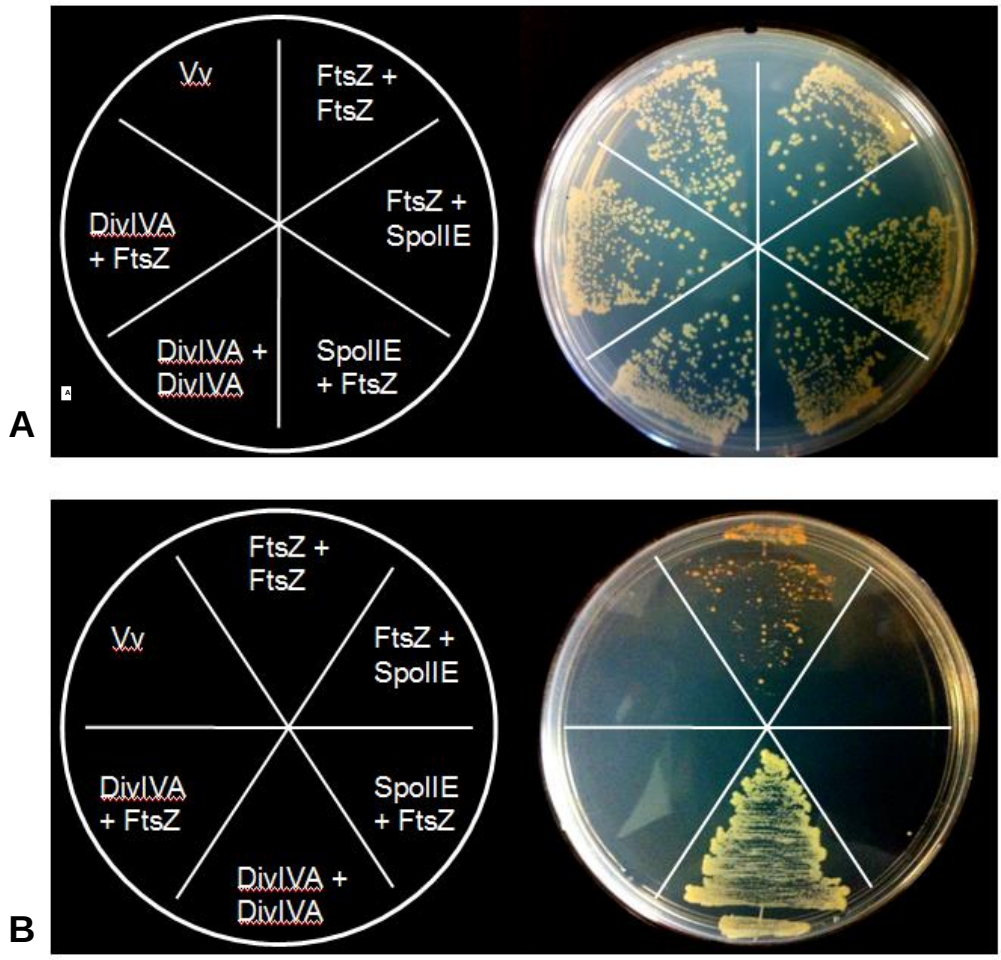


Figura 4.2 – Duplo-Híbrido: (A) Meio seletivo para presença dos plasmídeos (–LEU –URA); (B) Meio seletivo para interação (–LEU –URA –ADE –HIS). VV = Vetores Vazios

Diante desses resultados, foram realizados ensaios de atividade de β-galactosidase em membrana de nitrocelulose, já que PJ69-4a também apresenta este gene como repórter. Usualmente o ensaio de atividade de β-galactosidase é realizado em complemento ao ensaio de crescimento. Esse pode ser mais sensível para detectar interações fracas, uma vez que a produção de pouca quantidade de LacZ já pode ser suficiente para reagir com X-Gal suficiente para que forme produto visível. Porém, essa maior sensibilidade pode levar a falsos resultados positivos. O experimento foi realizado com o crescimento das leveduras sobre a membrana tanto em meio seletivo da presença dos plasmídios (-LEU –URA) quanto em meio seletivo da interação (-LEU –URA –ADE -HIS). No meio com seleção da presença dos plasmídios, todas as

cepas apresentaram resultado positivo, inclusive os vetores vazios. Enquanto isso, no meio seletivo para interação, somente o par DivIVA + DivIVA apresentou resultado positivo (Figura 4.3). Esses resultados foram também contrários às informações obtidas pelos experimentos de Lucet *et al.* (2000), que constatou por ensaio de duplo-híbrido interações diretas entre SpoIIE + SpoIIE e SpoIIE + FtsZ. O ensaio de duplo-híbrido pode ser muito útil mas é um experimento por si só inconclusivo, não sendo tão fácil detectar interações de FtsZ através dessa técnica devido à formação de polímeros (comunicação pessoal). Já foram realizados experimentos semelhantes tentando demonstrar a interação entre FtsZ e ZapA, e apesar da interação entre essas proteínas já ter sido descrita, o duplo-híbrido não foi capaz de apontar essa interação (A. Handler e F. Gueiros-Filho, dados não publicados).

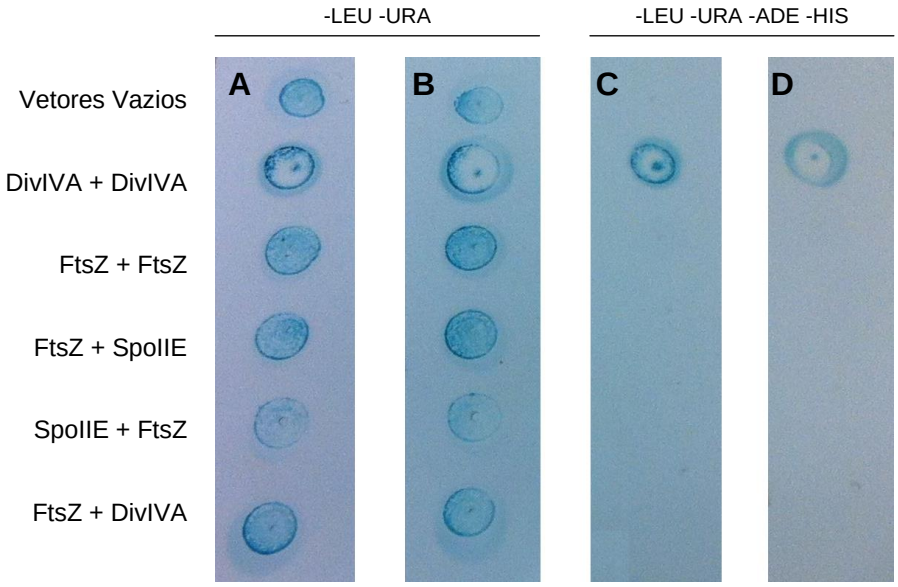


Figura 4.3 – Duplo-Híbrido: Membranas de Nitrocelulose com inóculos de PJ69-4a contendo plasmídeos carregando construções como listadas ao lado. (**A** e **B**) (–LEU –URA) seleciona plasmídeos, em replicata; (**C** e **D**) (–LEU –URA –ADE –HIS) seleciona interação, em replicata. As cepas testadas continham nos plasmídios pGAD-C2 e pGBDU, respectivamente: MD39 (vetores vazios), MD52 (DivIVA + DivIVA), MD40 (FtsZ + FtsZ) MD45 (FtsZ + SpoIIE), MD42 (SpoIIE + FtsZ) e MD48 (FtsZ + DivIVA).

Em vista desses resultados, foram realizados Western Blots anti FtsZ e anti Gal4-AD, como confirmação de que as proteínas de fusão estavam, de fato, sendo expressas. Tanto o Western Blot utilizando anti-corpo primário α–FtsZ quanto α–Gal4-AD, não possibilitou essa confirmação, devido ao aparecimento de muitas bandas inespecíficas. No entanto, acreditamos que FtsZ esteja sendo expressado, já que foi possível constatar a interação entre FtsZ + FtsZ.

4.2. Triagem de Mutantes de FtsZ por Repórter LacZ e Microscopia

Como tentativa de identificar o sítio específico de interação entre FtsZ e SpoIIE, criamos uma triagem genética potencialmente capaz de identificar mutantes de FtsZ que não interagem com SpoIIE. Para isso, fizemos uso de uma biblioteca de mutantes de FtsZ. A biblioteca de mutantes é transformada na cepa de triagem contendo um promotor fusionado ao gene repórter *lacZ* (P_{spoIIQ}-*lacZ*) que responde ao fator σ^F, que é o fator controlado por SpoIIE no início da esporulação. Essas bactérias são então plaqueadas em meio de esporulação (DSM) contendo X-Gal. A interação entre SpoIIE e FtsZ é importante para a ativação do fator de transcrição σ^F, uma vez que a associação de SpoIIE no anel é responsável pela ativação de sua atividade fosfatase de forma eficiente (King *et al.*, 1999). Portanto espera-se que aquelas colônias que possuem SpoIIE capaz de se ligar ao anel de FtsZ e, consequentemente, ativam o fator σ^F, apresentem uma coloração azulada resultante da atividade da β-galactosidase.

As colônias que não apresentam coloração azul são possíveis candidatos à perda de interação entre SpoIIE e FtsZ. As colônias de coloração esbranquiçada são submetidas à microscopia de fluorescência, para análise do formato das células e da localização de SpoIIE, já que a cepa de triagem expressa uma fusão SpoIIE-GFP. Caso não seja verificada uma distribuição de SpoIIE com padrão de anel, teremos a confirmação da perda de interação entre FtsZ e SpoIIE (Figuras 4.4 e 4.6.A), já que a localização de SpoIIE em forma de anel, ao que tudo indica, depende da interação com FtsZ. Portanto, a cepa para triagem foi planejada de forma a ser funcional, simultaneamente, tanto para a triagem de coloração azul (de acordo com a ativação do fator de transcrição σ^F, dependente da interação de SpoIIE com o divisomo), quanto para as microscopias de localização de SpoIIE-GFP.

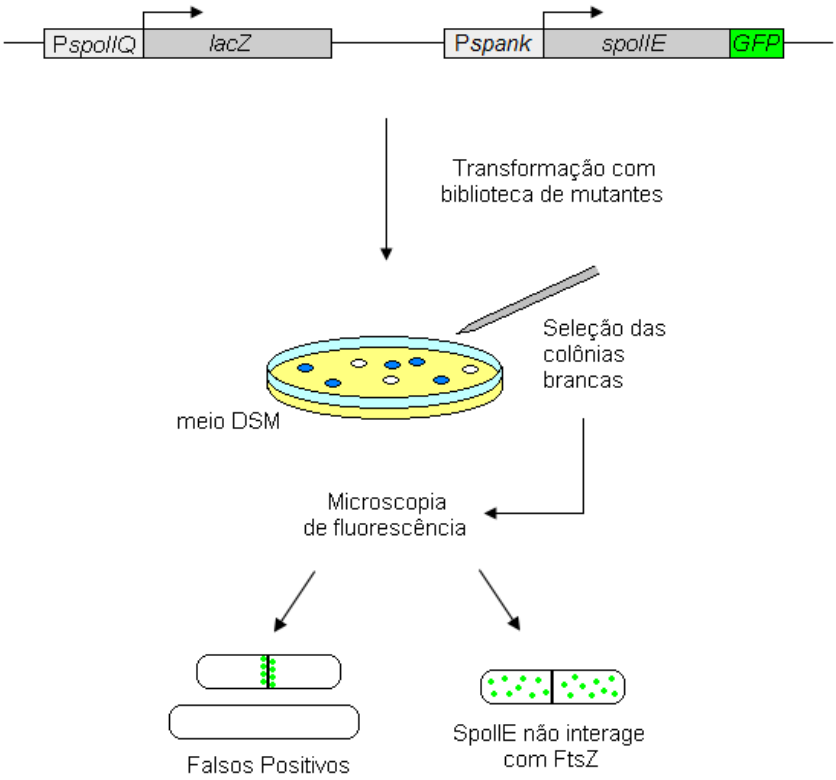
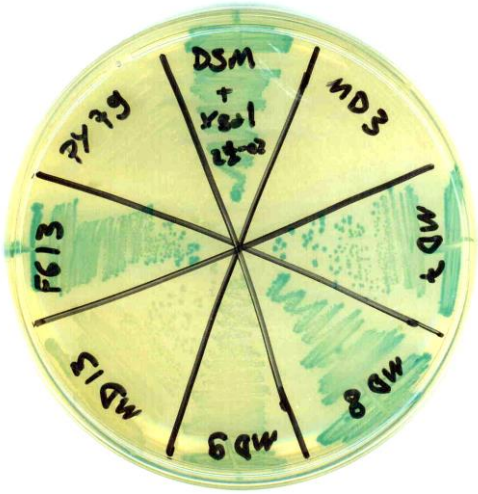


Figura 4.4. Triagem dos Mutantes de FtsZ. Ver texto para detalhes.

Nossa estratégia de triagem requereu uma alteração genética adicional para tornar a ativação de σ^F mais sensível à interação entre FtsZ e SpoIIE. A ausência de interação entre FtsZ e SpoIIE, por si só, não é suficiente para impedir uma ativação quase normal de σ^F (Dworkin & Losick, 2001). O deslocamento do operon *spoIIAA-AC*, que codifica σ^F e sua proteína ativadora, para uma posição mais próxima à origem de replicação, associada à delocalização de SpoIIE, causa uma maior deficiência na esporulação, pois há menor ativação de σ^F (Dworkin & Losick, 2001). Isso facilitaria a diferenciação das colônias de esporulação normal, azuis, para as colônias nas quais a interação entre Z e IIE foi prejudicada. Para testarmos a viabilidade de nossa triagem, construímos cepas controle que representariam os cenários que planejávamos encontrar. Estas cepas e um experimento que demonstra a intensidade de cor produzida por cada uma estão descritas na Figura 4.5. Tanto a deleção de *spoIIE* (MD3) quanto a deleção do operon *spoIIAA-AC* (MD13) resultam em colônias brancas, mostrando que a ativação de σ^F é dependente tanto de SpoIIE

quanto dos genes contidos no operon *spoIIAA-AC* (*spoIIAA*, *spoIIAB* e *spoIIAC* que é o próprio gene que codifica σ^F). O deslocamento do operon *spoIIAA-AC* para uma região mais próxima à origem de replicação por si só não causa diminuição na intensidade de azul (MD7 e MD8). Porém, quando essa construção é associada a uma situação em que SpoIIE não consegue mais localizar no divisomo (MD9), há um déficit visível na intensidade de cor. O gene de *spoIIE* presente na cepa MD9, *spoIIE-34-320*, codifica SpoIIE sem a porção transmembrana, mimetizando o fenótipo de SpoIIE que não localiza no anel Z. Assim, a cepa MD8 foi construída e transformada com a biblioteca de mutantes de FtsZ, para realização desses ensaios (Figura 4.5).



CEPA	GENÓTIPO	FENÓTIPO*
PY79	Selvagem	-
FG13	P_{spoIIQ}-lacZ	+++
MD3	P_{spoIIQ}-lacZ, ΔspoIIE	-
MD13	P_{spoIIQ}-lacZ, Δ(spoIIAA-AC)	-
MD7	P_{spoIIQ}-lacZ, amyE::spoIIAA-AC, Δ(spoIIAA-AC)	+++
MD8	P_{spoIIQ}-lacZ, amyE::spoIIAA-AC, Δ(spoIIAA-AC), P_{spank}-spoIIE-Q483A-gfp	+++
MD9	P_{spoIIQ}-lacZ, amyE::spoIIAA-AC, Δ(spoIIAA-AC), spoIIE-34-320	+

Figura 4.5 – Ativação de σ^F em Diferentes Cepas Usadas Para Calibrar a Triagem Genética: Meio de esporulação DSM com X-Gal, após dois dias de crescimento a 37ºC. Intensidade de coloração azul gerada pela degradação de X-Gal. (*) Fenótipo medido com base em intensidade de azul após crescimento em meio de esporulação (DSM) com X-Gal por 2 dias, padronizado a partir de FG13.

Logo ao início da triagem foi observada uma parcela pequena (<1%) de colônias que apresentavam coloração totalmente branca. No entanto, quando levados ao microscópio esses mutantes ainda apresentavam localização de SpoIIE-GFP na região do anel Z (Figura 4.6). Portanto, a fim de verificar se a mudança da coloração das colônias era independente de uma mutação em FtsZ, foram realizados mapeamentos genéticos (back-cross) em 6 colônias brancas. Nesse back-cross, foi extraído o DNA genômico de cada uma das cepas mutantes, e esse foi transformado na cepa MD8, que contém o repórter da ativação de σ^F utilizado em nossa triagem. A transformação foi selecionada por tetraciclina, que é o gene de resistência a antibiótico ligado aos alelos mutantes de *ftsZ*. Nos 6 casos, após transformação e plaqueamento em meio DSM+X-Gal, as colônias voltaram a apresentar coloração azulada. Esse resultado indica que a coloração branca dessas colônias é devido provavelmente a mutações espontâneas no genoma de *Bacillus* que provavelmente causam deficiência na esporulação, mas não têm relação direta com a mutação presente em FtsZ. Assim, ao coletar novos candidatos durante a triagem foi dada prioridade às colônias que apresentassem coloração esbranquiçada, mas não totalmente brancas.

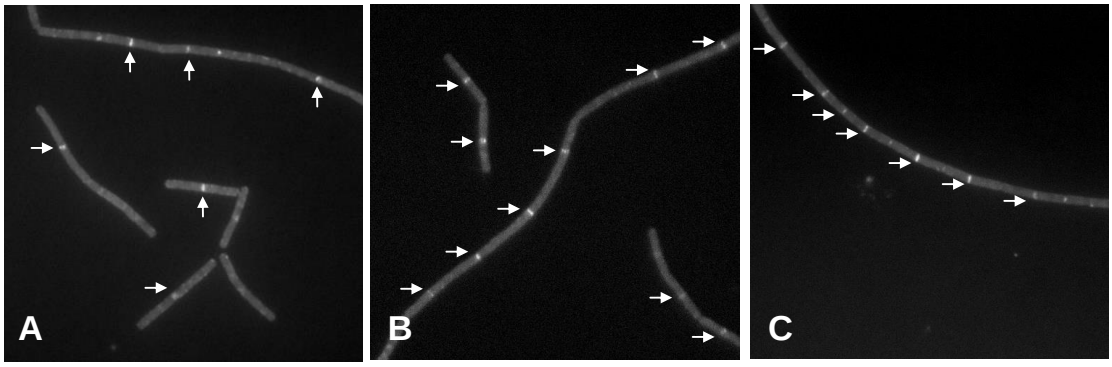


Figura 4.6 – Microscopias de Fluorescência da Cepa de Triagem e de Células Transformadas com Biblioteca de Mutantes de FtsZ: Micrografias de fluorescência evidenciando a localização de SpoIIE-GFP (P_{spank}-*spoIIE*-Q483A-*gfp*) nos anéis Z, indicando ligação de SpoIIE ao divisomo (setas). Devido à lentidão para divisão de sua parede espessa, *Bacillus subtilis* cresce em cadeias, gerando o padrão de anéis sequenciais observado. (**A**) Cepa de triagem MD8, com localização de SpoIIE-GFP em padrão de anel; (**B**) Colônia de coloração azul-claro e (**C**) colônia de coloração branca, ambas também apresentam padrão de localização em anéis.

Ao analisarmos 70000 colônias, foram selecionadas 300 com coloração azul-claro. Dessas, todas ainda apresentavam padrão de localização de SpoIIE-GFP (indutível) no divisomo, em célula vegetativa. Acreditamos que esses indivíduos apresentem uma coloração mais clara devido a variações genéticas normalmente encontradas na população. Existem mais de 100 genes relacionados ao processo de esporulação, e alguma mutação em qualquer desses genes poderia gerar um fenótipo de cor parecido com o por nós esperado. Além disso, mutações em FtsZ, mesmo que não afetem a localização de SpoIIE, podem causar deficiência na divisão celular de uma forma geral, o que acaba interferindo diretamente na eficiência da esporulação. Portanto, de acordo com o observado ao microscópio, nenhum desses candidatos apresentava mutação em FtsZ relacionada diretamente à sua interação com SpoIIE.

4.3. Triagem de Supressores que Restaurem a Interação FtsZ-SpoIIE

Paralelamente aos ensaios buscando mutantes de FtsZ que percam interação com SpoIIE, uma abordagem alternativa realizada foi uma triagem para mutações supressoras. Já estão descritos na literatura mutantes de SpoIIE que perderam total ou parcialmente sua localização ao divisomo, provavelmente por terem perdido a capacidade de interagir com FtsZ (Carniol *et al.*, 2005). Uma triagem com a transformação da biblioteca de mutantes de FtsZ em um indivíduo contendo SpoIIE mutante poderia revelar, através do repórter *lacZ* (P_{spoIIQ}-*lacZ*), indivíduos contendo mutações supressoras em FtsZ capazes de reativar a interação com SpoIIE. Essa mutação seria um indicativo do sítio de ligação entre as duas proteínas.

Para isso, foram construídas duas cepas de triagem de supressão, MD29 e MD31, que apresentam o repórter LacZ ligado ao promotor que responde ao fator de transcrição de esporulação σ^F e duas variações de SpoIIE mutante inserida em seu locus natural. A falta de interação com o divisomo deve causar um defeito na ativação de σ^F. Isto acontece no caso do mutante SpoIIE-D686A, mas o mutante SpoIIE-S361F não apresentou grande diferença na formação de coloração azul em meio DSM+X-Gal (Figura 4.8). Para tentar potencializar o defeito de ativação de σ^F associado à mutação S361F, na cepa contendo essa mutação foi inserida uma cópia adicional do operon *spoIIAA-AC* próximo à origem do cromossomo, como já feito na triagem anterior. Porém, mesmo após essa modificação, o mutante S361F ainda não

apresentou diferença na formação de coloração azul contrastante o suficiente para realização do experimento planejado (Figura 4.8). Assim, foi utilizado apenas o mutante D686A (MD29) para a triagem de supressão.

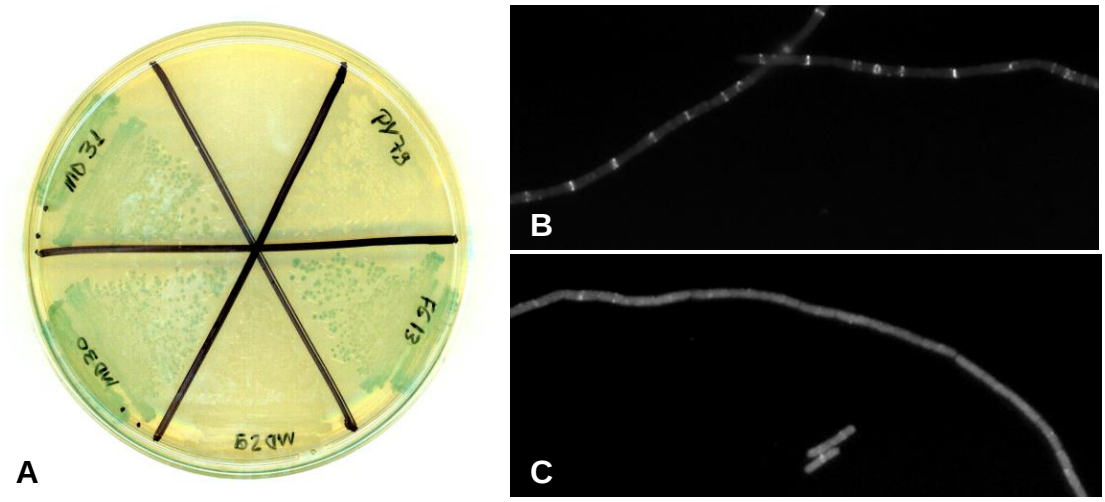


Figura 4.8 – Construções com Mutantes de SpoIIE para Ensaio de Supressão: (A) MD29, contendo SpoIIE-D686A, apresenta deficiência na ativação de σ^F. Tanto MD30, contendo SpoIIE-S361F quanto MD31, contendo SpoIIE-S361F e inserção do operon *spoIIAA-AC* próximo à origem do cromossomo apresentam padrão de ativação de σ^F semelhante ao controle positivo FG13, que não contém mutações. Portanto, somente MD29 pôde ser utilizada para o experimento de supressão por triagem de coloração; **(B)** PY79 em micrografia de fluorescência sob indução por 0,5mM de IPTG; **(C)** MD29, sob as mesmas condições de B.

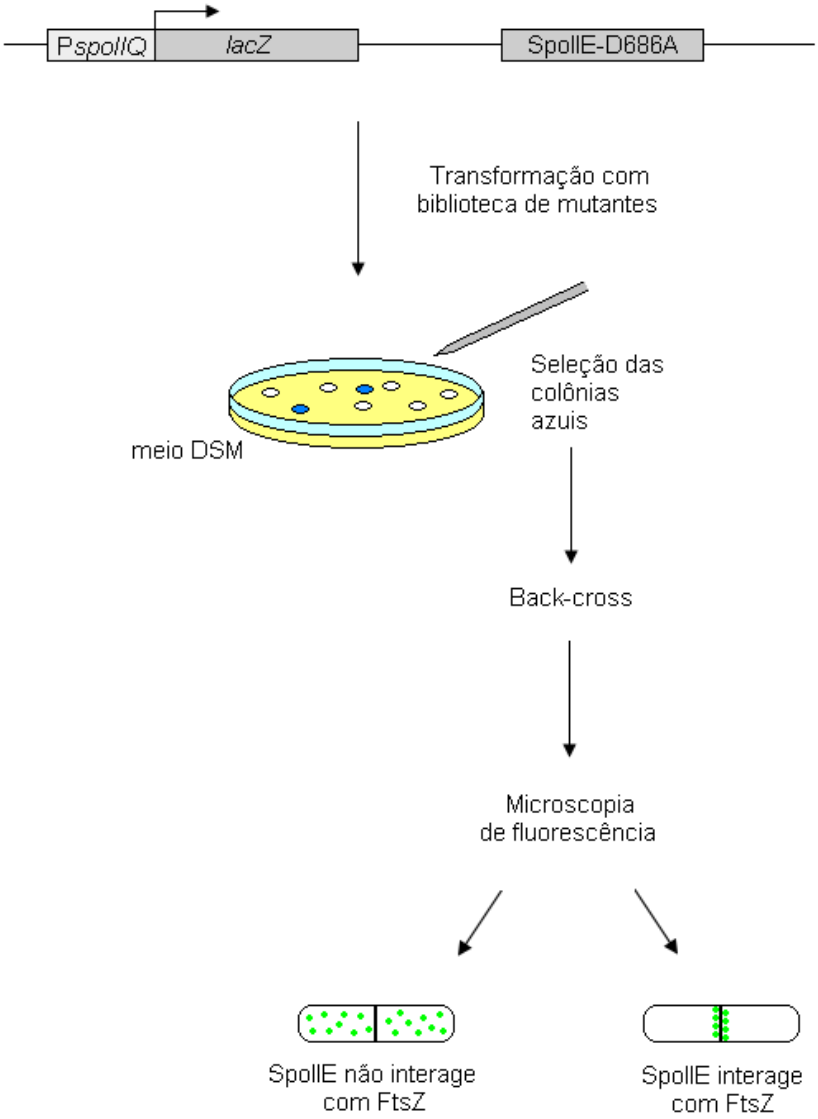


Figura 4.9 – Triagem dos Mutantes Supressores. O mutante SpoIIE-D686A localiza parcialmente no divisomo, provavelmente por ter perdido a capacidade de interagir com FtsZ (Figura 4.8). Essa falta de interação resulta em não-ativação do fator de transcrição σ^F, e, consequentemente, ausência de atividade do repórter LacZ (P_{spoIIQ}-*lacZ*). A transformação da biblioteca de mutantes de FtsZ nessa cepa poderia revelar indivíduos contendo mutações supressoras em FtsZ capazes de reativar a interação com SpoIIE, evidenciadas pela coloração azul. Uma vez coletados os candidatos azuis, o back-cross é feito para confirmar a relação entre o FtsZ inserido e a ativação do repórter. A microscopia de fluorescência é então a confirmação de que SpoIIE-D686A retomou a capacidade de interagir com o divisomo.

Ao todo foram triados 35000 candidatos em placa. Desses, 192 apresentaram coloração azul, indicando ativação do fator de transcrição σ^F, o repórter que indicaria a restituição da interação FtsZ-SpoIIE (Figura 4.9). Cada candidato foi isolado em placa, para confirmar a coloração azulada e eliminar possíveis contaminações de colônias vizinhas, garantindo a homogeneidade da amostra. Desses, 180 apresentavam coloração azul homogênea. Existe a possibilidade de que esses candidatos de coloração azulada sejam resultado de congressão, que é a situação em que dois fragmentos do DNA doador são transformados simultaneamente na mesma célula. Assim, além do loco de *ftsZ*, também pode ter ocorrido recombinação no loco de *spoIIE*, substituindo *spoIIE-D686A-kan* por *spoIIE* selvagem. Isso pode acontecer devido ao fato de a biblioteca de mutantes ter sido previamente transformada na cepa selvagem (PY79). O DNA genômico extraído desse *pool* de transformantes é que foi então utilizado na transformação da cepa de triagem. Por isso, pedaços de outras partes do genoma também podem transformar, além daquele que estamos selecionando (Figura 4.10). A congressão ocorre em uma freqüência baixa (0.5-0.2%) (Harwood and Cutting, 1990), mas que pode ser da mesma grandeza ou até maior do que a freqüência da mutação que estamos procurando. Se isso ocorre, o candidato não mais apresenta resistência a canamicina, já que, devido à proximidade, ao ocorrer recombinação no loco de *spoIIE* o cassete de canamicina provavelmente também será removido.

Dos 180 candidatos coletados, 95 mantiveram a resistência a canamicina, indicando que os outros 85 eram resultado de congressão. Dos 95 candidatos remanescentes foi extraído o DNA genômico, que foi re-transformado na cepa de triagem, a fim de averiguarmos se a ativação do repórter estava realmente ligada a FtsZ. Se a mutação responsável pelo fenótipo azul estiver em FtsZ, espera-se que essa transformação e seleção por tetraciclina resulte em colônias de coloração azul na presença de X-Gal. Se essa mutação estiver em outro lugar do genoma, espera-se que as colônias transformadas permaneçam de coloração branca. Desses candidatos transformados, 77 resultaram em colônias de coloração branca ou com baixa porcentagem de colônias azuis (Figura 4.11A), e 18 apresentaram coloração azul entre 50-85% das colônias transformantes (Figura 4.11B).

Ao analisarmos esses 18 candidatos ao microscópio, porém, nenhum deles apresentou maior localização de SpoIIE-D686A no divisomo (Figura 4.12), indicando que o fenótipo azulado, apesar de por alguma forma estar ligado à resistência a

tetracliclina (associada a FtsZ mutante proveniente da biblioteca), provavelmente não tem correlação com mutações em FtsZ em si. Uma razão para chegarmos a esta conclusão é que o PCR para seqüenciamento de FtsZ (ver materiais e métodos) não resulta em produto visível, indicando que provavelmente a recombinação de tetraciclina está ocorrendo em local atípico no genoma. Isso foi confirmado ao transformar o DNA genômico dos candidatos na cepa selvagem PY79 selecionando por tetraciclina, e replicando as colônias em placas de canamicina. Todas as colônias replicadas foram resistentes a canamicina, indicando que provavelmente a recombinação esteja ocorrendo por similaridade entre resquícios dos plasmídeos utilizados para a inserção de *spoIIE-D686A*, que carrega resistência a canamicina (MD29) e a biblioteca de FtsZ. Mesmo assim, o fato de o repórter de esporulação estar sendo ativado nessas células, mesmo na presença de SpoIIE-D686A, é bastante intrigante e ainda pode ser alvo de análises adicionais.

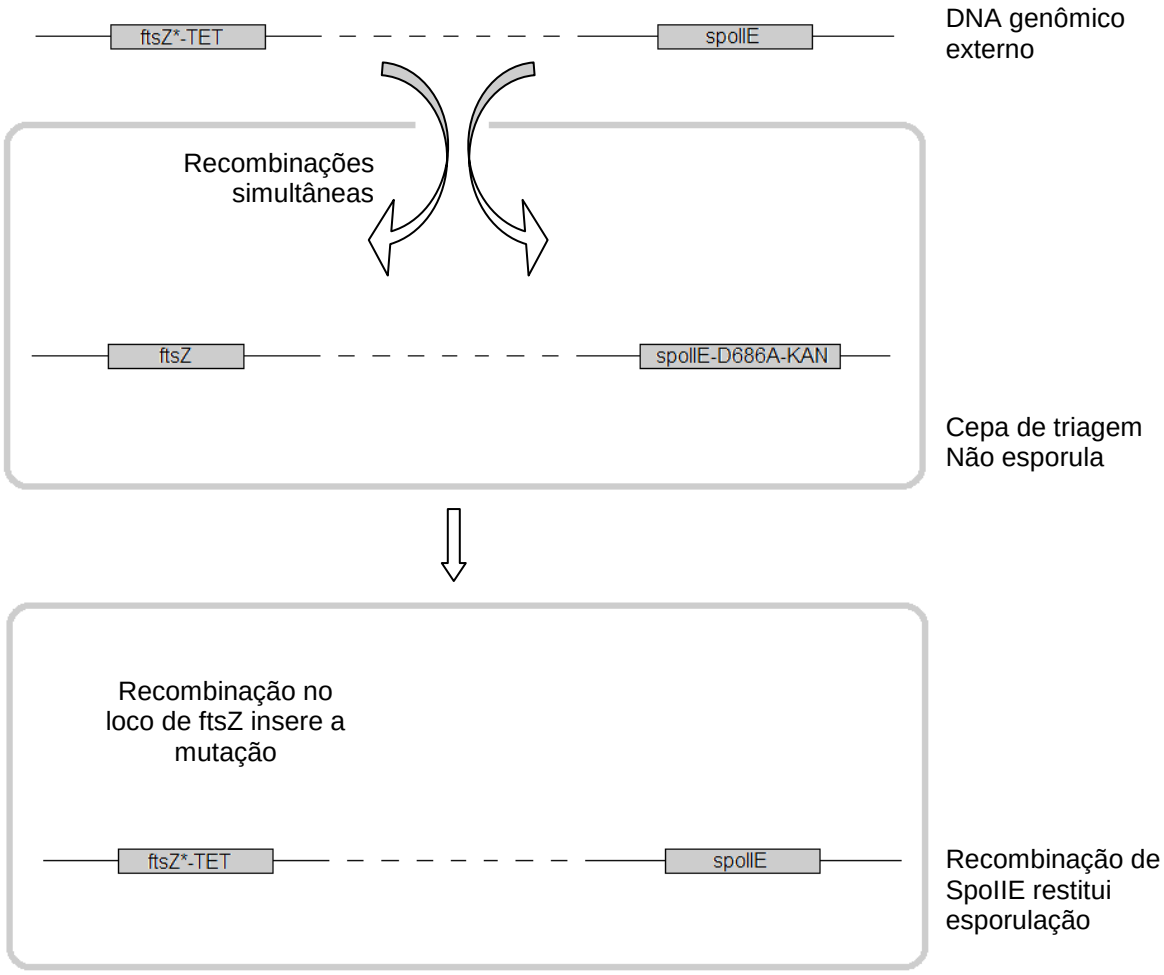


Figura 4.10 (pagina anterior) – Congressão Gera Falsos-positivos na Triagem de Supressão: Esquema ilustrando a possibilidade de ocorrência de congressão. O DNA genômico externo contém, além de *ftsZ* mutante ligado ao cassete de resistência a tetraciclina *(ftsZ*-TET*), *spoIIE* selvagem. Ao transformar a cepa de triagem (MD29) com esse DNA, é possível que a recombinação ocorra em outros locos além da região selecionada. Isso permitiria a restituição de *spoIIE* selvagem na célula, levando ao fenótipo azul independente da mutação em *ftsZ*.

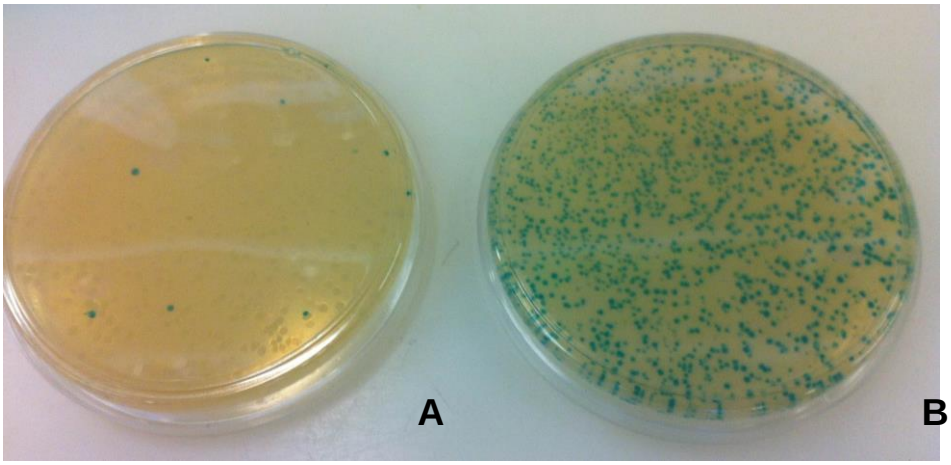


Figura 4.11 – Back-cross de Candidatos a Supressores: (**A**) A menor porção de transformantes apresenta fenótipo azul em meio DSM+X-Gal; (**B**) Back-cross em candidato com cerca de 85% de colônias transformantes azuis.

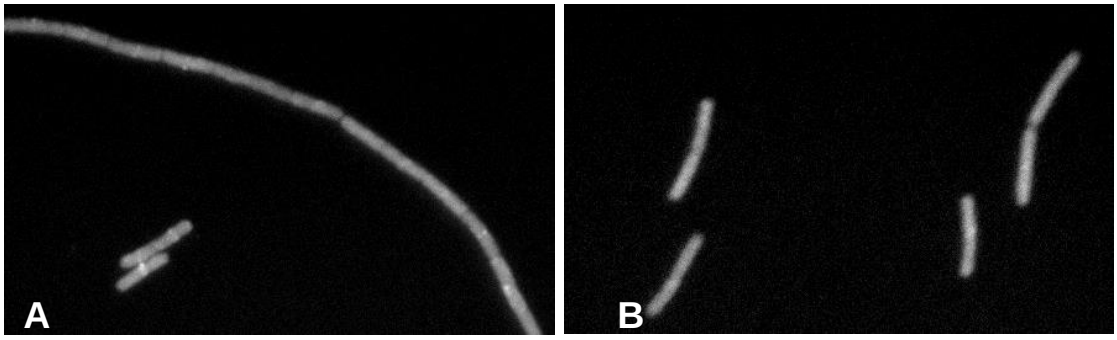


Figura 4.12 – Microscopia de Candidatos Obtidos na Triagem de Supressores: (**A**) Cepa de triagem P_{spank}-*spoIIE*-D686A-*gfp* (MD36), com FtsZ WT; (**B**) Candidato supressor (CS1). Apesar de apresentar coloração azulada em placa de X-Gal, a microscopia não evidenciou aumento na localização de SpoIIE-D686A-GFP no divisomo.

Uma das hipóteses por nós levantada para justificar a ativação de σ^F independente das mutações em FtsZ nos 18 candidatos azuis da triagem de supressão, seria a ocorrência de mutações (aleatórias, selecionadas durante a triagem de colônias azuis) em *divIB*. Alguns indícios experimentais (Bradshaw, N., Department of Molecular and Cellular Biology, Harvard University - comunicação pessoal) apontam que é possível que SpoIIE e DivIB interajam diretamente (mas esta interação não deve ser necessária para localizar SpoIIE pois no mutante *divIB* SpoIIE ainda localiza – veja seção 4.4). É possível, então, que mutações em *divIB*, de alguma forma, resultem em alteração no sistema de esporulação de *B. subtilis* ou suprimam o defeito do mutante *spoIIE*-D686A. O loco de *divIB* está próximo ao loco de *ftsZ* (Figura 4.13), possibilitando que a seleção por tetraciclina (ligada a *ftsZ*) traga consigo recombinação do gene de *divIB*. Isso poderia explicar o fato do fenótipo azul estar ligado à resistência a tetraciclina mesmo que talvez não haja mutação em *ftsZ*. Para testar a hipótese de que houvesse tais mutações, foram desenhados oligonucleotídeos para sequenciamento de *divIB* (Figura 4.14). Devido a problemas para amplificação da região, só foi possível o seqüenciamento completo do candidato 2, dentre os 18. Esse candidato apresentou genótipo selvagem, levando a crer que pelo menos para esse candidato o fenótipo observado não era decorrente de mutação em *divIB*. Porém, não pode ser descartado que mutações em *divIB* sejam de alguma forma a explicação para o fenótipo azulado de alguns candidatos.

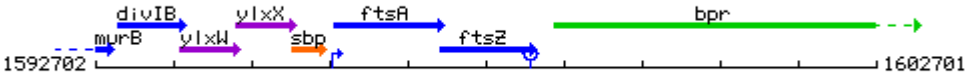


Figura 4.13 – Região genômica de *ftsZ*: *divIB* está a 4128pb de distância de *ftsZ*, possibilitando que seja recombinado na mesma transformação, quando selecionado por tetraciclina (ligada ao *ftsZ* da biblioteca de mutantes).

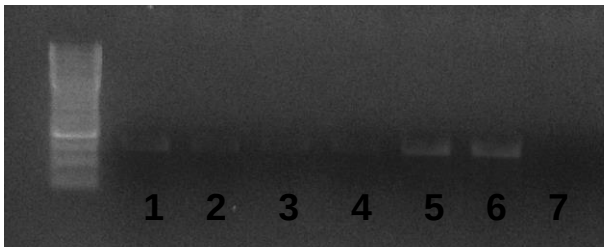


Figura 4.14 –PCR da Região de *divIB*: A baixa eficiência na amplificação de *divIB* não possibilitou o sequenciamento de todos os candidatos. (**1**) CS1 (Candidato Supressor 1); (**2**) CS2; (**3**) CS3; **(4**) CS4; (**5**) PY79; (**6**) CS5; (**7**) Reação sem molde. O único candidato sequenciado foi CS2, que apresentou genótipo selvagem.

4.4. Revisando a Interação entre FtsZ e SpoIIE

Os resultados inconclusivos obtidos pelo ensaio de duplo-híbrido, associados ao fato de até então não ter sido encontrado na triagem de mutantes de FtsZ um candidato que tivesse perdido sua interação com SpoIIE nos levou ao questionamento sobre a real existência de uma interação direta entre SpoIIE e FtsZ, apesar dos dados da literatura que suportam isto (Lucet *et al*., 2000 e Carniol *et al*., 2005). Uma hipótese que poderia justificar esses resultados negativos seria a de que essas duas proteínas interagem por intermédio de uma terceira. Uma maneira citológica de testar se uma proteína de divisão interage diretamente com FtsZ é verificar quão frequentemente ela co-localiza com o anel Z. É sabido que quando há uma baixa freqüência de co-localização entre alguma proteína de divisão e o anel Z,

essa proteína não interage diretamente com FtsZ, enquanto proteínas que interagem diretamente tem co-localização muito alta (Tavares *et al.* 2008, Meira 2010 e dos Santos *et al.* 2012). Portanto, realizamos experimento de co-localização entre FtsZ-mCherry e SpoIIE-GFP (MD25). A frequência obtida foi de praticamente 100%, indicando que provavelmente as duas proteínas fazem interação direta (Figura 4.15).

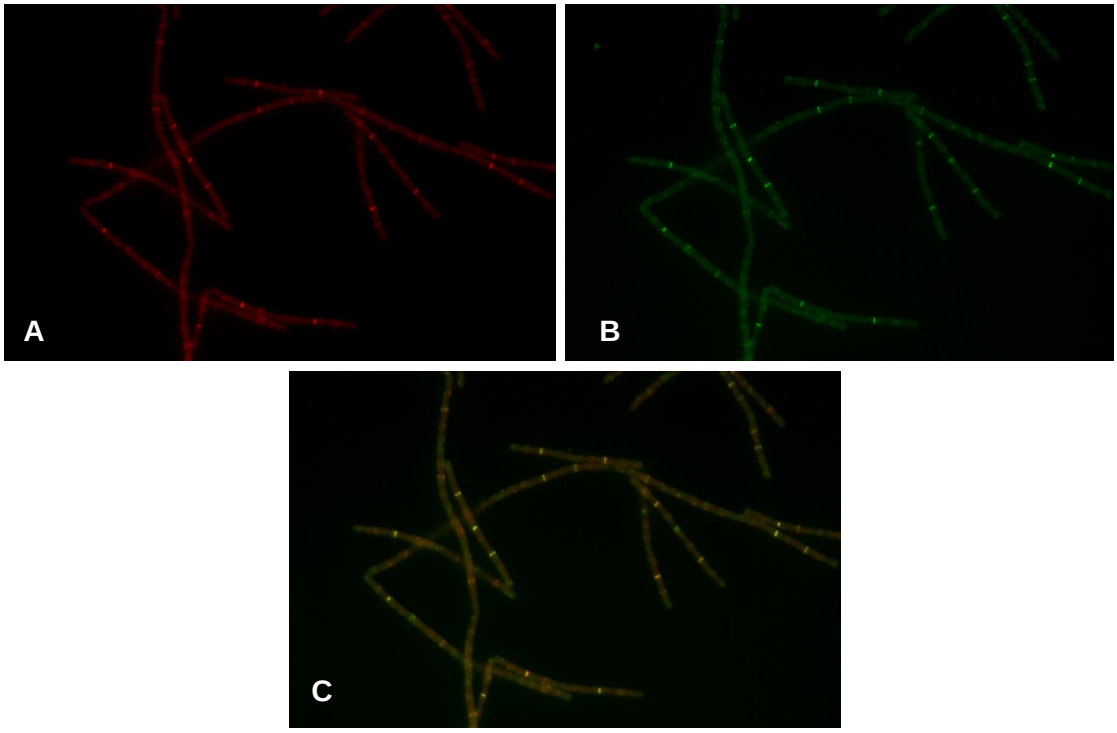


Figura 4.15 – Ensaio de Co-localização: Micrografias sequenciais no mesmo campo utilizando filtros de fluorescência diferentes (vermelho para mCherry e verde para GFP), evidenciando ambas as proteínas em todos os anéis. (**A**) FtsZ-mCherry; (**B**) SpoIIE-Q483A-GFP; (**C**) Overlay: a sobreposição do vermelho com o verde resulta em coloração amarela.

A fim de confirmarmos que a localização de SpoIIE no divisomo não é dependente de outras proteínas que também apresentam uma alta freqüência de localização com FtsZ, foram feitos experimentos de microscopia de fluorescência visando a localização de SpoIIE em cepas com deleção ou mutação dos genes para algumas dessas proteínas (FtsA e DivIB). FtsA foi considerada para este experimento por saber-se pouco a respeito de sua função no divisomo. Já DivIB é sabidamente

uma proteína necessária para a formação de septo assimétrico durante a esporulação (Thompson *et al.*, 2006), alem de haverem evidências de interação direta entre DivIB e FtsZ (N. Bradshaw, comunicação pessoal, citado anteriormente). Em ambas as situações, SpoIIE continuou apresentando padrão de anel na região do divisomo, apesar de na deleção de *divIB* terem sido observadas células alongadas e uma maior fluorescência citoplasmática, mas devido provavelmente à já documentada maior instabilidade do anel Z em mutantes de DivIB (Harry *et al.*, 1993) (Figura 4.16). Esses resultados corroboram a premissa inicial de que SpoIIE e FtsZ interagem diretamente, tal como descrito na literatura.

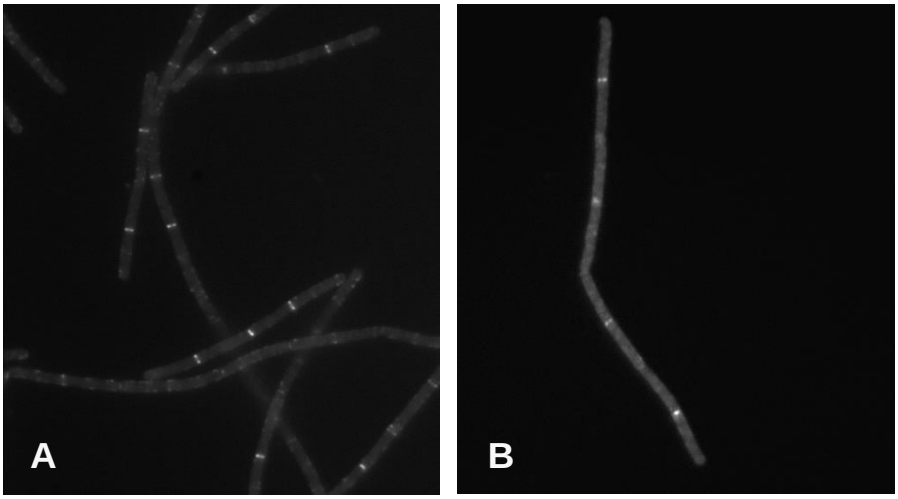


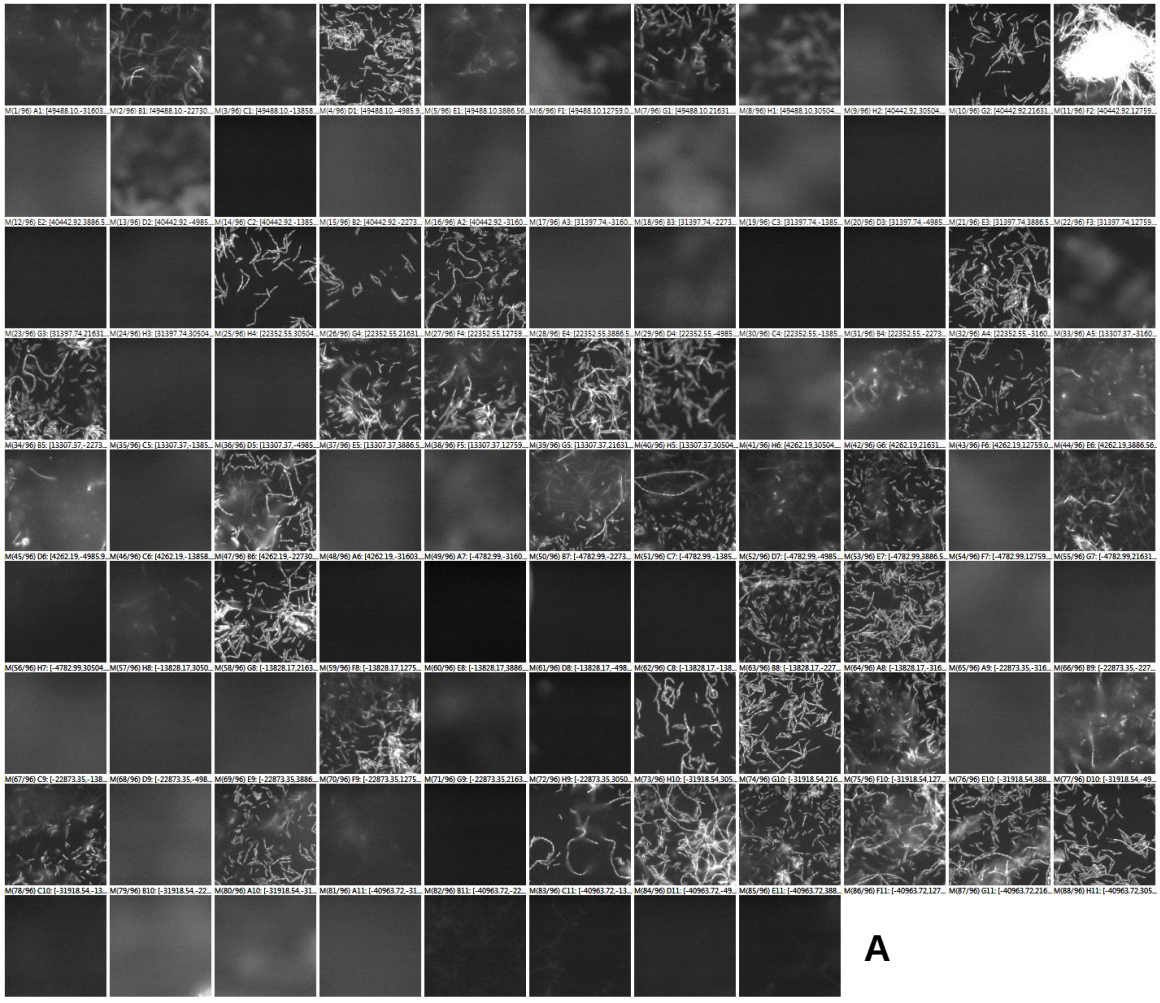
Figura 4.16 – Localização de SpoIIE ao divisomo independe de FtsA e DivIB: Micrografias evidenciando a localização de SpoIIE-GFP (P_{spank}-*spoIIE-Q483A-GFP*) nos anéis Z, indicando ligação de SpoIIE ao divisomo mesmo na ausência de outras proteínas de divisão. (**A**) MD26, *ΔftsA* (**B**) MD27, *ΔdivIB*.

4.5. Triagem por Microscopia Direta

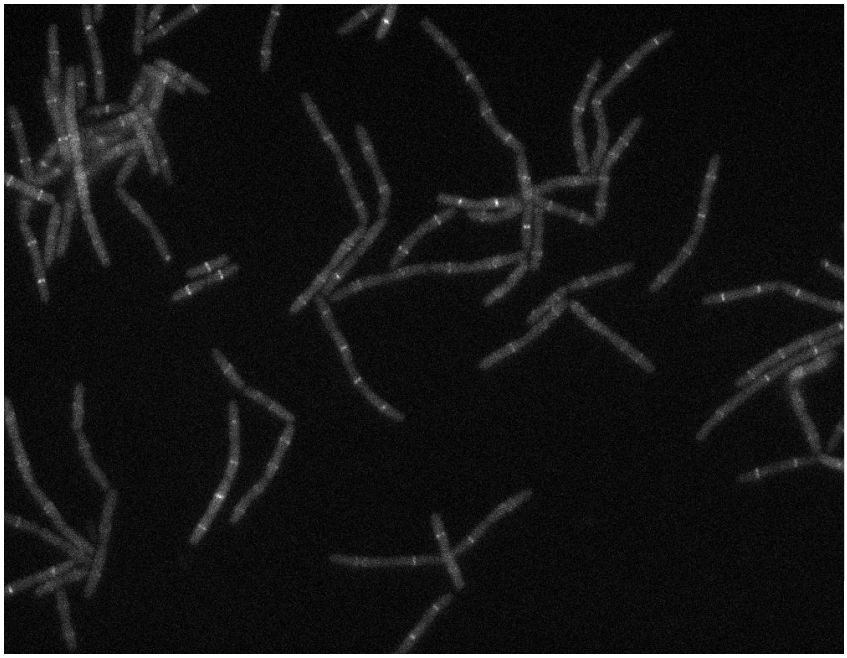
Tendo em vista que de alguma forma a pré-seleção por repórter LacZ utilizada na triagem por placas e microscopia poderia estar favorecendo eventos não-relacionados e ao mesmo tempo mascarando os nossos candidatos de interesse, decidimos continuar a triagem sem uma pré-seleção por repórter LacZ, buscando apenas mutantes nos quais SpoIIE não mais se localizasse no divisomo. De acordo com trabalhos prévios utilizando nossa biblioteca de mutantes de FtsZ (Wagner-Herman *et al*, 2012 e Blasios *et al*, 2013), observa-se que a freqüência de perda de função na interação entre FtsZ e outros moduladores é de cerca de 1 em 1000 (0.1%). Como nossa biblioteca atual apresenta aproximadamente 30% de mutações dentre os transformantes (para cada 10 colônias em placa, 3 devem apresentar mutação em FtsZ), teríamos que realizar microscopia de no mínimo 3400 colônias para termos uma alta probabilidade de encontrarmos um mutante. Para tal, seria necessária uma forma automatizada de obtenção dessas imagens. Assim, padronizamos uma técnica de microscopia em massa em placa de 96 poços que permitiu a triagem de milhares de colônias transformantes da biblioteca de mutantes em uma cepa contendo apenas SpoIIE-GFP sob indução de IPTG (MD36), sem fazer uso de uma pré-seleção.

Foram feitas diferentes tentativas de padronização de um sistema automático para captura das imagens. A princípio, foram utilizadas placas de 96 poços (Ibidi) próprias para microscopia com óleo de imersão. Porém, a necessidade de uso da objetiva com aumento de 100x, que tem uma baixa profundidade de campo, acoplada ao fato de que a altura dos poços da placa não tinham a mesma uniformidade que uma lâmina de vidro, fez com que o sistema tivesse baixa eficiência de captura de fotos no plano correto de foco. Uma segunda metodologia foi testada utilizando-se como base para crescimento das culturas mutantes um bloco de agarose, ao qual replicávamos os candidatos cultivados em placa de 96 poços com auxílio de um replicador. As culturas eram incubadas por cerca de duas horas, e então cobertas com uma única lamínula de vidro que cobria o bloco inteiro simultaneamente. O sistema foi eficiente na melhoria da qualidade das imagens obtidas, mas não se mostrou viável devido ao grande tempo e trabalho necessários para preparar cada bloco de amostras (Figura 4.17). Por fim, a tecnica de microscopia em massa acabou mostrando-se mais eficiente com uso das placas de 96 poços Ibidi sem o uso do capturador automático, fazendo-se as

visualizações em tempo real diretamente através da imagem fornecida pelo software na tela do computador.



A



B

Figura 4.17 (página anterior) - Microscopia Automatizada: Micrografias de fluorescência provenientes do sistema automatizado em placa de agarose em 96 pontos. (**A**) Cada quadro apresenta micrografia referente a um dos pontos na placa; (**B**) Micrografia ampliada de um dos quadros apresentados em **A**, onde é possível a visulização de anéis.

Ao todo, foram triados cerca de 3300 candidatos, dentre os quais foi identificado um com alterações de localização: o duplo mutante P364L D370V (Figura 4.18). Esse mutante apresenta menor freqüência de anéis com localização de SpoIIE-GFP, enquanto as células mantém freqüência de divisão semelhante à da selvagem. Seguindo essa observação, pode-se especular que essa (ou uma dessas) mutação(ões) é responsável pela perda parcial da interação entre FtsZ e SpoIIE, sem que isso esteja atrapalhando o funcionamento normal de FtsZ. Se a mutação em FtsZ fosse responsável por desestabilizar a proteína, seria esperado uma perda de localização de SpoIIE, assim como acontece com qualquer proteína que interaja com FtsZ. Em outras palavras, a diminuição do número de anéis de SpoIIE seria um reflexo da diminuição do número de anéis Z. Porém, em uma situação dessas, as células não conseguiriam se dividir normalmente, gerando um fenótipo filamentoso. Esse fenótipo filamentoso não foi observado no duplo mutante encontrado. Medições do comprimento das células do duplo mutante em comparação ao indivíduo selvagem mostram que em média a população tem 100% de similaridade (4,01µm do mutante para 4,00µm do selvagem). No entanto, o duplo mutante apresentou maior variação de tamanho entre os indivíduos dentro da população, com um desvio padrão de 1,17µm no mutante para 0,99µm no indivíduo selvagem. Seria importante quantificar a frequência exata de anéis de SpoIIE-GFP em relação aos anéis de FtsZ presentes na célula. Porém, a realização dessas medidas não foi possível devido às limitações das construções disponíveis no nosso acervo, que são incompatíveis. No entanto, foi verificado que o duplo mutante apresentou uma freqüência de células com anéis de apenas 23,65%. Assumindo que culturas em fase exponencial de crescimento apresentam taxa de praticamente 100% de presença de anéis Z por célula (Meira, 2010), e que SpoIIE localiza em praticamente 100% dos anéis Z (Figura 4.15), uma

freqüência de 23,65% de anéis com SpoIIE é bastante baixa. Portanto, é possível que essa mutação em FtsZ interfira diretamente na interação com SpoIIE, sem perturbar a função de FtsZ como um todo.

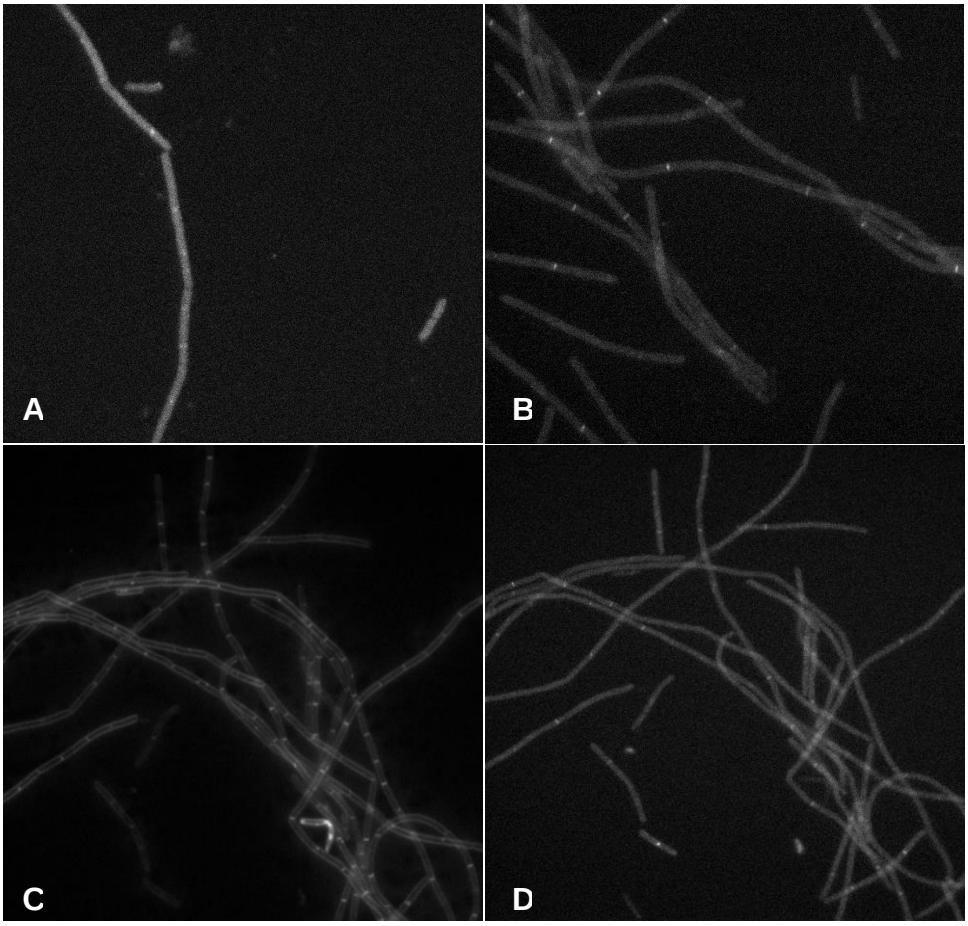


Figura 4.18 – Caracterização de um Candidato Com Deficiência na Localização de SpoIIE-GFP: Micrografias do duplo-mutante de FtsZ P364L D370V, em diferentes situações. Fluorescência obtida por SpoIIE-GFP. (**A**) Lâmina de TSS-Agarose; (**B**) Lâmina de LB25%-Agarose; (**C**) Lamina de LB25%-Agarose (Membrana); (**D**) Lâmina de LB25%-Agarose (SpoIIE-GFP).

4.6. Localização de SpoIIE em Mutantes de FtsZ e Efeito da sua Superexpressão

Uma última abordagem foi planejada na busca por mutantes de FtsZ que não localizassem SpoIIE no divisomo, fazendo uso de cepas já existentes no laboratório. Se o sítio de interação de FtsZ com SpoIIE for compartilhado com outros moduladores, existe a possibilidade de que um sítio mutante de FtsZ identificado em outra triagem seja o mesmo utilizado para sua interação com SpoIIE. Através de triagens realizadas fazendo uso da biblioteca de mutantes de FtsZ, foram identificados mutantes que apresentavam deficiência na interação com MinC. Assim, foram realizados experimentos de localização de SpoIIE-GFP nessas cepas, nas quais *ftsZ* selvagem foi substituído pelos seus mutantes K243R, D255V, D287V e R376T, selecionados por não interagirem com MinC (Blasios *et al.*, 2013). Em todos os casos, SpoIIE-GFP apresentou localização no divisomo, indicando que provavelmente nenhum desses aminoácidos mutados seria responsável pela interação FtsZ-SpoIIE (Figura 4.19). No entanto, foi observado que o mutante R376T, que normalmente apresenta alto nível de filamentação (células anormalmente alongadas, devido em geral à menor frequência de formação de anéis Z e, consequentemente, divisomos) apresentava células de tamanho muito semelhante às de uma cepa selvagem. Essa observação nos levou a crer que talvez a superexpressão de SpoIIE (P_{spank}-*spoIIE-GFP*, sob indução de IPTG 0,5mM) estivesse atuando sobre FtsZ estimulando sua polimerização, e assim revertendo o fenótipo da mutação. Para comprovar o observado, a mesma cepa foi plaqueada em meio LB sólido tanto na presença quanto na ausência de indutor. Já é sabido que essa mutação faz com que as colônias de *B. subtilis* se desenvolvam com deficiência em meio sólido. No entanto, foi observado que na presença de indutor as colônias se desenvolviam de forma muito mais saudável (Figura 4.20). Células de colônias obtidas dessa forma foram então levadas ao microscópio para uma visualização comparativa do comprimento das células (Figura 4.21). Enquanto na cultura sem indução a média do comprimento das células foi de 11,70 µm com desvio padrão de 7,65 µm, o valor encontrado na cultura sob indução de 250 µM de IPTG (diluído no meio sólido LG-ágar) foi de 4,85 µm com desvio padrão de 2,72 µm. Esses dados confirmam o efeito observado macroscopicamente.

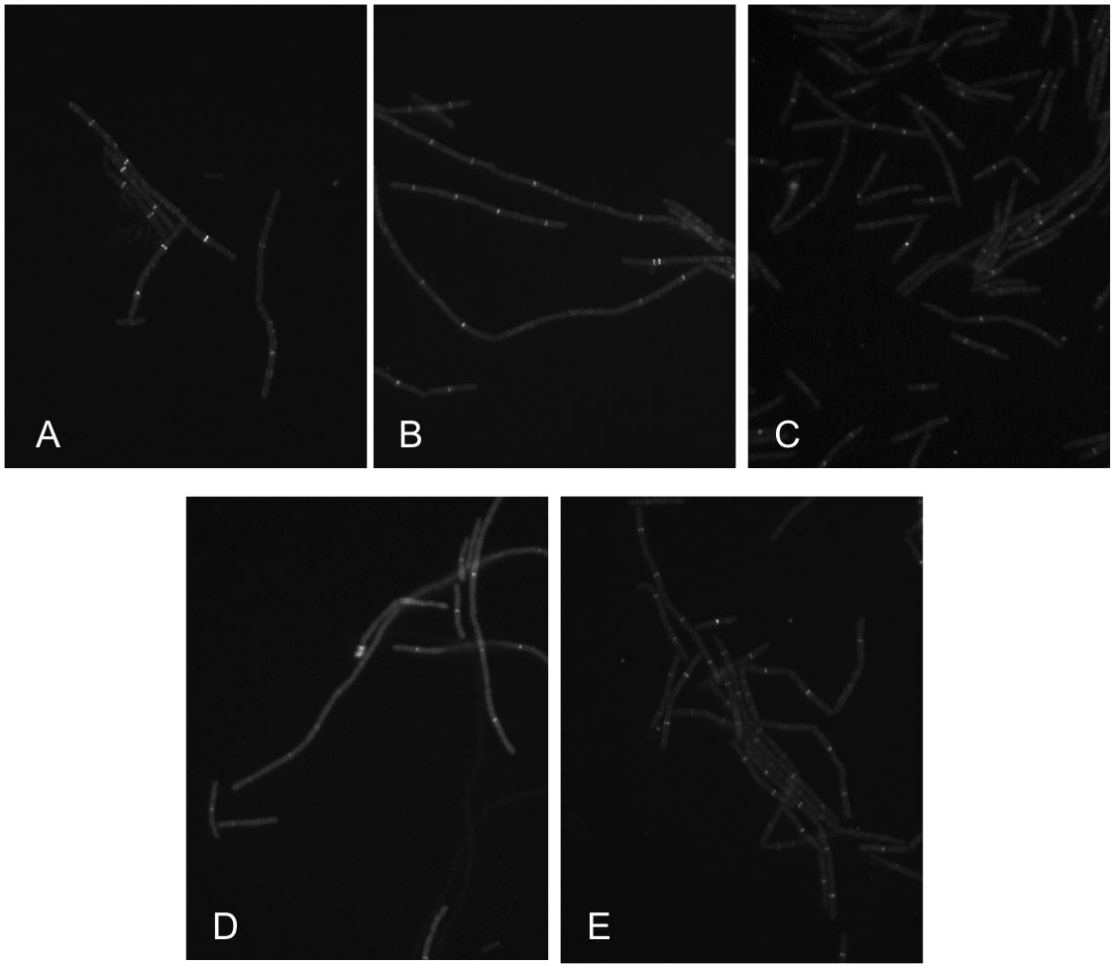


Figura 4.19 – Localização de SpoIIE-GFP em Cepas Mutantes de *ftsZ* Resistentes a MinC: Indução por 0,5mM de IPTG. (A) *ftsZ* selvagem; (B) *ftsZ-K243R*; (C) *ftsZ-D255V*; (D) *ftsZ-D287V*; (E) *ftsZ-R376T*.

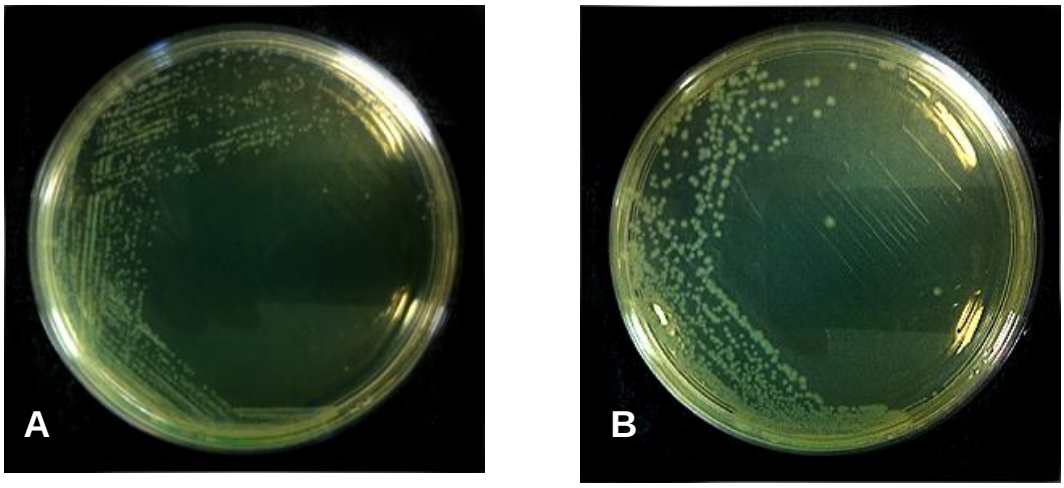


Figura 4.20 – Superexpressão de SpoIIE Resgata Crescimento de *ftsZ*-R376T: (A) Placa de LB; (B) Placa de LB + IPTG 0,25mM.

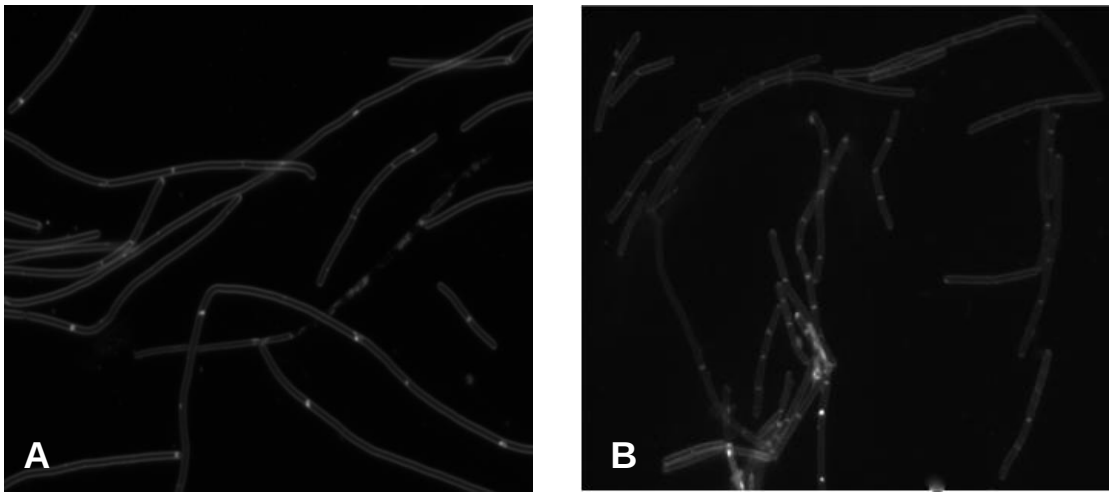


Figura 4.21 – Efeito da superexpressao de SpoIIE-GFP na freqüência de divisão de cepa *ftsZ-R376T*: (A) Células da placa sem indução; (B) Células da placa com IPTG 0,25mM.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A interação direta entre SpoIIE e FtsZ não é de fácil demonstração. A pequena quantidade de trabalhos disponíveis na literatura que comprovam experimentalmente essa interação provavelmente deve-se a essa dificuldade. Mesmo os dados já disponíveis são de difícil reprodução, como visto tanto neste trabalho como em trabalhos de colegas (Bradshaw, comunicação pessoal). Isso poderia indicar que não há realmente uma interação direta. Porém, diante de todas as evidências a favor de uma interação direta, é de se imaginar que essa dificuldade possa estar relacionada a fatores técnicos. Talvez a interação não seja de alta afinidade. Talvez, também, o fato de SpoIIE apresentar 10 domínios transmembrana dificulte os experimentos, já que em vários desses experimentos não são realizados com a proteína inteira.

Durante a triagem por mutantes supressores foram encontrados candidatos com o fenótipo esperado, mas que na verdade tratavam-se de situações anormais não previstas. O fato de não termos encontrado o mutante esperado possivelmente deve-se à grande freqüência com que esses eventos inesperados ocorrem. Esses eventos acabam por mascarar a mutação procurada, que já era esperada de ocorrer em uma freqüência muito baixa. Um mutante supressor não só deve apresentar a mutação na posição exata no gene de *ftsZ*, como também deve mutar o aminoácido correspondente para um que seja complementar (supressor) ao nosso mutante de *spoIIE*. As próprias limitações do código genético talvez façam com que uma mutação pontual não seja suficiente para gerar o mutante de nosso interesse. Além disso, como a transformação da nossa biblioteca de mutantes de *ftsZ* ocorre por recombinação por homologia, *ftsZ* sempre terá parte da sequência selvagem. Se o resíduo que procuramos estiver próximo à extremidade N-terminal, onde ocorre a recombinação, é possível que mesmo existindo a mutação desejada em nossa biblioteca, ela nunca seja inserida na cepa de triagem. Uma outra possibilidade a ser considerada é a de que a mutação de nosso interesse possa ser letal para a célula, por ser importante para interagir com outros moduladores essenciais para o ciclo de polimerização de FtsZ. No entanto, durante esse ensaio foram identificados 18

candidatos que reestabeleceram o fenótipo azul. Acreditamos que essas cepas podem conter informações relevantes sobre os mecanismos de ativação de σ^F e iniciação da esporulação que ainda podem ser desconhecidos. Isto foge ao objetivo inicial deste trabalho, mas seria uma possível nova linha de pesquisa a ser desenvolvida.

Através da triagem por microscopia direta identificamos o duplo mutante FtsZ-P364L-D370V. Os dados de frequencia de localização de SpoIIE-GFP no mutante sugerem fortemente que há uma deficiência na interação entre SpoIIE e FtsZ. As duas mutações encontram-se na região C-terminal de FtsZ, que também é sítio de interação com diversos outros moduladores de FtsZ que também são proteínas de membrana tais como ZipA (Mosyak *et al.*, 2000), FtsA (Haney *et al.*, 2001), EzrA (Singh *et al.*, 2007) e SepF (Król, *et al.* 2012). Assim, faz sentido esperarmos que SpoIIE, que é uma proteína transmembrana, também interaja nessa região, e que pelo menos um desses resíduos seja importante de alguma forma para a interação. Se dispuséssemos de maior tempo para analisar esse mutante, poderíamos refazer as análises com as mutações isoladas, bem como quantificar sua eficiência de esporulação. De qualquer forma, os dados obtidos sugerem que o sítio de interação de FtsZ com SpoIIE está na região C-terminal. Uma outra abordagem que poderia ser utilizada seria o uso de mutações sítio-dirigidas em outros resíduos da região C-terminal, na busca por uma que rompesse a interação de forma mais drástica. A triagem genética de mutantes do C-terminal é complicada devido ao fato de ser uma região essencial para interação com muitas outras proteínas, diminuindo assim a freqüência desses mutantes na população.

O efeito supressor da indução de SpoIIE no mutante FtsZ-R376T por nós observado pode ser explicado como um resultado da ação moduladora de SpoIIE sobre FtsZ. É possível que SpoIIE tenha um efeito estabilizador de polímeros de FtsZ que seja suficiente para se sobrepor ao efeito filamentoso desse mutante, característico de cepas com baixa eficiência de formação de anéis Z. Uma explicação para isso seria a de que o resíduo 376 mutado esteja impedindo que FtsZ interaja com um de seus estabilizadores naturais, e por isso a frequência de anéis nessa cepa é tão baixa. A mutação no resíduo 376 afeta a interação entre FtsZ e MinC, então faz sentido imaginar que possa ser importante para interações com outros moduladores. De fato, o resíduo 376 é importante para interação com os moduladores FtsA (Haney *et al.*, 2001), SepF (Singh *et al.*, 2008) e EzrA (Singh *et al.*, 2007), que são importantes para a polimerização de FtsZ. Porém, esse resíduo provavelmente não

seria um dos essenciais para a interação com SpoIIE, permitindo que SpoIIE induzida na célula vegetativa suprima a “falta” do modulador estabilizador original (que apesar de estar presente, não consegue interagir com FtsZ), reforçando a idéia de que a interação ocorre, de fato, na região C-terminal.

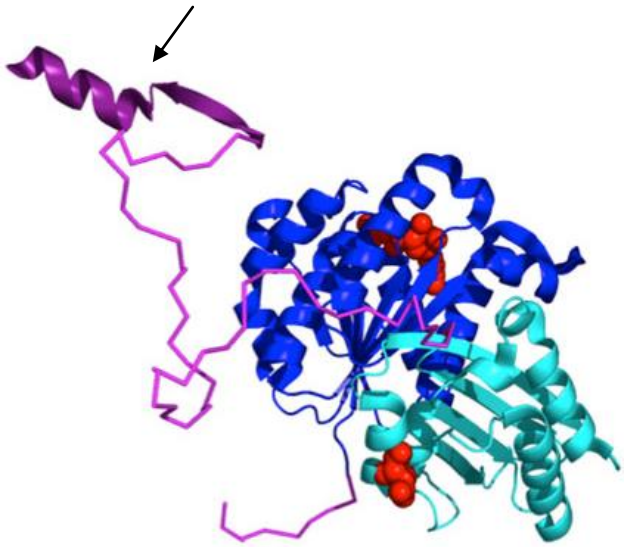


Figura 5.1 – Estrutura de FtsZ Obtida por Cristalografia Incluindo Modelo do C-terminal: Em roxo estão marcados o segmento N-terminal (em baixo) e o domínio C-terminal (50 aminoácidos, acima). O domínio C-terminal é mostrado apenas como uma representação, já que não é obtido por cristalografia por ser altamente desordenado. A extremidade do C-terminal é representada em sua forma assumida quando ligado a ZipA. A seta indica a região aproximada das mutações do duplo mutante FtsZ-P364L-D370V . Adaptado de Gardner *et al.*, 2013

6. CONCLUSÕES

Neste trabalho foi desenvolvida uma técnica de triagem por microscopia em larga escala, capaz de identificar mutantes que percam localização celular de determinada proteína.

Não foi possível, com as técnicas utilizadas, identificar o sítio exato de interação entre FtsZ e SpoIIE. Porém, um duplo mutante com deficiência na localização de SpoIIE foi identificado. Este mutante sugere que o CTP de FtsZ é importante para a interação com SpoIIE.

Foi identificado que o efeito regulatório de SpoIIE sobre a polimerização de FtsZ é capaz de reverter o fenótipo de deficiência de polimerização de pelo menos um mutante de FtsZ.

7. REFERÊNCIAS

Adams, D. W.; Errington, J. (2009) “Bacterial cell division: assembly, maintenance and disassembly of the Z ring” Nature Reviews. Microbiology 7(9):642-53

Azizi, B.; Chang, E. I.; Doyle, D. F. “Chemical complementation: small-molecule-based genetic selection in yeast” Biochemical and Biophysical Research Communications 306(3):774-80

Barak, I.; Behari, J.; Olmedo, G.; Guzmán, P.; Brown, D. P.; Castro, E.; Walker, D.; Westpheling, J.; Youngman, P. (1996) “Structure and function of the *Bacillus* SpoIIE protein and its localization to sites of sporulation septum assembly.” Molecular Microbiology 19(5):1047-60.

Barak, I.; Youngman, P. (1996) “SpoIIE mutants of *Bacillus subtilis* comprise two distinct phenotypic classes consistent with a dual functional role for SpoIIE protein” Journal Of Bacteriology 178(16):4984-9.

Barak, I. e Wilkinson, A. J. (2007). "Division site recognition in Escherichia coli and Bacillus subtilis." FEMS Microbiol Rev 31(3): 311-326.

Ben-Yehuda, S. e Losick, R. (2002). "Asymmetric cell division in B. subtilis involves a spiral-like intermediate of the cytokinetic protein FtsZ." Cell 109(2): 257-266.

Bi, E. F. e Lutkenhaus, J. (1991). "FtsZ ring structure associated with division in Escherichia coli." Nature 14;354(6349):161-4.

Blasios, V.; Bisson-Filho, A. W.; Castellen, P.; Nogueira, M. L.; Bettini, J.; Portugal, R. V.; Zeri, A. C.; Gueiros-Filho, F. J. (2013) “Genetic and biochemical characterization of the MinC-FtsZ interaction in Bacillus subtilis.” PloS One 8(4):e60690.

de Boer, P. A.; Crossley, R. E.; Rothfield, L. I. (1989) “A division inhibitor and a topological specificity factor coded for by the minicell locus determine proper placement of the division septum in *E. coli*” 56(4):641-9

Bongiorni, C., S. Ishikawa, S. Stephenson, N. Ogasawara and M. Perego (2005). "Synergistic regulation of competence development in Bacillus subtilis by two Rap-Phr systems." J Bacteriol 187(13): 4353-4361.

Buske, P. J,; Levin, P. A. (2012) “The extreme C-terminus of the bacterial cytoskeletal protein FtsZ plays a fundamental role in assembly independent of modulatory proteins.” Journal of Biology Chemistry 284: 10945–10957

Carniol, K., S. Ben-Yehuda, N. King and R. Losick (2005). "Genetic dissection of the sporulation protein SpoIIE and its role in asymmetric division in Bacillus subtilis." J Bacteriol 187(10): 3511-3520.

Cha, J. H. and G. C. Stewart (1997). "The divIVA minicell locus of Bacillus subtilis." J Bacteriol 179(5): 1671-1683.

Cordell, S. C.; Robinson, E. J.; Löwe, J. “Crystal structure of the SOS cell division inhibitor SulA and in complex with FtsZ.” Proceedings Of The National Academiy Of Sciences Of The United States Of America 100(13):7889-94.

Dajkovic, A.; Lan, G.; Sun, S. X.; Wirtz, D.; Lutkenhaus, J. (2008) "MinC spatially controls bacterial cytokinesis by antagonizing the scaffoldng function of FtsZ.” Current Biology 18(4):235-44

Dajkovic, A.; Pichoff, S.; Lutkenhaus, J.; Wirtz, D. (2010) “Cross-linking FtsZ polymers into coherent Z rings.” Molecular Microbiology 78(3):651-68

Dworkin, J. and Losick, R. (2001). "Differential Gene Expression Governed By Chromossomal Spatial Asymmetry." Cell 107: 339-346.

Erickson, H. P.; Anderson, D. E.; Osawa, M. (2000). "FtsZ in Bacterial Cytokinesis: Cytoskeleton and Force Generator all in One" Microbiol Mol Biol Rev 74(4):504-28.

Ewaramoorthy, P.; Erb, M. L.; Gregory, J. A.; Silverman, J.; Pogliano, K.; Ramamurthi, K. S. (2011) “Celular architecture mediates DivIVA ultrastructure and regulates min activity in *Bacillu subtilis*” mBio 2(6). Pii: e00257-11

Gardner, K. A.; Moore, D. A.; Erickson, H. P. (2013) “The C-terminal linker of *Escherichia coli* FtsZ functions as an intrinsically disordered peptide”. Molecular Microbiology 89(2):264-75

Gueiros-Filho, F. J. and R. Losick (2002). "A widely conserved bacterial cell division protein that promotes assembly of the tubulin-like protein FtsZ." Genes Dev 16(19): 2544-2556.

Handler, A. A.; Lim, J. E; Losick, R. “Peptide inhibitor of cytokinesis during sporulation in Bacillus subtilis.” Molecular Microbiology 68, 588–599

Haney, S. A.; 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 wit FtsA.” 276(15):11980-7

Harwood, C. R., Cutting, S. M. (1990) “Molecular Biological Methods for Bacillus” John Wiley & Sons. Chichester, England.

Harry, E. J.; Stewart, B. J.; Wake, R. G. (1993) “Characterization of mutations in divIB of *Bacillus subtilis* and cellular localization of the DivIB protein.” 7(4):611-21.

Khvorova, A., L. Zhang, M. L. Higgins and P. J. Piggot (1998). "The spoIIE locus is involved in the Spo0A-dependent switch in the location of FtsZ rings in Bacillus subtilis." J Bacteriol 180(5): 1256-1260.

King, N., O. Dreesen, P. Stragier, K. Pogliano and R. Losick (1999). "Septation, dephosphorylation, and the activation of sigmaF during sporulation in Bacillus subtilis." Genes Dev 13(9): 1156-1167.

Król, E.; van Kessel, S. P.; van Bezouwen, L. S.; Kumar, N.; Boekema, E. J., Scheffers, D. J. (2012) “*Bacillus subtilis* SepF binds to the C-terminus of FtsZ” PloS One 7(8):e43293.

Levin, P. A.; Losick, R. (1996) “Transcription fctor Spo0A switches the localization of the cell division protein FtsZ from a medial to a bipolar in Bacillus subtilis” Genes & Development 10(4):478-88.

Levin, P. A., I. G. Kurtser and A. D. Grossman (1999). "Identification and characterization of a negative regulator of FtsZ ring formation in Bacillus subtilis." Proc Natl Acad Sci U S A 96(17): 9642-9647.

Levin, P. A., R. Losick, P. Stragier and F. Arigoni (1997). "Localization of the sporulation protein SpoIIE in Bacillus subtilis is dependent upon the cell division protein FtsZ." Mol Microbiol 25(5): 839-846.

Lowe, J. and L. A. Amos (1998). "Crystal structure of the bacterial cell-division protein FtsZ." Nature 391(6663): 203-206.

Lucet, I., A. Feucht, M. D. Yudkin and J. Errington (2000). "Direct interaction between the cell division protein FtsZ and the cell differentiation protein SpoIIE." EMBO J 19(7): 1467-1475.

Marston, A. L.; Thomaides, H. B.; Edwards, D. H.; Sharpe, M. E.; Errington, J. “Polar localization of the MinD protein of *Bacillus subtilis* and its role in selection of the mid-cell division site.” 12(21):3419-30

Meira, G. L. S. (2010) Estudo do Processo de Divisão em Bacillus subtilis por Microscopia de Fluorescência 131p. Tese - Programa de Pós-Graduação em Ciencias (Bioquimica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Mosyak, L.; Zhang, Y.; Glasfeld, E.; Haney, S.; Stahl, M.; Seehra, J.; Somers, W. S. (2000) “The bacterial cell-division protein ZipA and its interaction with an FtsZ fragment revealed by X-ray crystallography.” The EMBO Journals 19, 3179–3191

Mukherjee, A.; Lutkenhaus, J. (1994) “Guanine nucletide-dependent assembly of FtsZ into filaments” Journal of Bacterilogy 176(9):2754-8

Nanninga, N. (1998). "Morphogenesis of Escherichia coli." Microbiol Mol Biol Rev 62(1): 110-129.

Pacheco-Gómez, R.; Cheng, X.; Hicks, M. R.; Smith, C. J.; Roper, D. I.; Addinal, S.; Rodger, A.; Dafforn, T. R. (2013). "Tetramerization of ZapA is required for FtsZ Bundling." The Biochemical Journal 449(3):795-802.

Pazos, M.; Natale, P., Vicente, M. (2013). "A Specific role for the ZipA protein in Cell Division: stabilization of the FtsZ protein." The Journal Of Biological Chemistry 288(5):3219-26.

Pichoff, S. e Lutkenhaus (2005) “Tethering the Z ring to the membrane through a conserved membrane targeting sequence in FtsA.” Molecular Microbiology 55(6):1722-34

Piggot, P. J. and D. W. Hilbert (2004). "Sporulation of Bacillus subtilis." Curr Opin Microbiol 7(6): 579-586.

Pogliano, J. (2008). "The bacterial cytoskeleton." Curr Opin Cell Biol 20(1): 19-27.

Riesenman, P. J. and W. L. Nicholson (2000). "Role of the spore coat layers in Bacillus subtilis spore resistance to hydrogen peroxide, artificial UV-C, UV-B, and solar UV radiation." Appl Environ Microbiol 66(2): 620-626.

dos Santos, V. T.; Bisson-Filho, A. W.; Gueiros-Filho, F. J. (2012) “DivIVA-mediatede polar localization on ComN, a posttranscriptional regulator of *Bacillus subtilis*” Journal Of Bacteriology 194(14):3661-9

Scheffers, D. J. (2008). "The effect of MinC on FtsZ polymerization is pH dependent and can be counteracted by ZapA" FEBS Letters 582(17):2601-8.

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.” Molecular Microbiology 72: 410–424.

Singh, J. K.; Makde, R. D.; Kumar, V.; Panda, D. (2007) “A membrane protein, EzrA, regulates assembly dynamics of FtsZ by interacting with the C-terminal tail of FtsZ” Biochemistry 46(38):11013-22.

Singh, J. K.; Makde, R. D.; Kumar, V.; Panda, D. (2008) “SepF increases the assembly and bundling of FtsZ polymers and stabilizes FtsZ protofilaments by binding along its length.” J. Biol. Chem. 283: 31116–31124

Steele, V. R.; Bottomley, A. L.; Garcia-Lara, J.; Kasturiarachchi, J.; Foster, S. J. (2011) “Multiple essential roles for EzrA in Cell Division of *Staphylococcus aureus*” Molecular Microbiology 80(2):542-55

Tavares, J. R.; de Souza, R. F.; Meira, G. L.; Gueiros-Filho, F. J. (2008) “Cytological characterization of YpsB, a novel component of the *Bacillus subtilis* divisome.” Journal Of Bacteriology 190(21):7096-107

Thompson, L. S.; Beech, P. L.; Real, G.; Henques, A. O.; Harri, E. J. (2006) “Requirement for the cell division protein DivIB in polar cell division and engulfment during sporulation in Bacillus subtilis” 188(21):7677-85.

Wagner-Herman JK, Bernard R, Dunne R, Bisson-Filho AW, Kumar K, Nguyen T, Mulcahy L, Koullias J, Gueiros-Filho FJ, Rudner DZ. “RefZ facilitates the switch from medial to polar division during spore formation in Bacillus subtilis” J Bacteriol. 2012 Sep;194(17):4608-18.

Wu, L. J.; Feucht, A.; Errington, J. (1998) “Prespore-specific gene expression in *Bacillus subtilis* is driven by sequestration of SpoIIE phosphatase to the prespore side of the asymmetric septum.“ Genes & Development 12(9):1371-80.

Wu, L. J. and J. Errington (2004). "Coordination of cell division and chromosome segregation by a nucleoid occlusion protein in Bacillus subtilis." Cell 117(7): 915-925.

Wu, L. J., S. Ishikawa, Y. Kawai, T. Oshima, N. Ogasawara and J. Errington (2009). "Noc protein binds to specific DNA sequences to coordinate cell division with chromosome segregation." EMBO J 28(13): 1940-1952.

Youngman, P. J., J. B. Perkins and R. Losick (1983). "Genetic transposition and insertional mutagenesis in *Bacillus subtilis* with *Streptococcus faecalis* transposon *Tn*917." Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 2305-2309.