

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUIMICA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas

(Bioquímica)

JOSÉ ROBERTO TAVARES

**Identificação e Caracterização de Novos Moduladores da
Divisão em *Bacillus subtilis*.**

São Paulo
2009

Data de depósito da tese:
26/06/09

JOSÉ ROBERTO TAVARES

**Identificação e Caracterização de Novos Moduladores da
Divisão em *Bacillus subtilis***

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

Orientador: Prof. Dr. Frederico José Gueiros Filho

São Paulo
2009

JOSÉ ROBERTO TAVARES

**Identificação e Caracterização de Novos Moduladores da
Divisão em *Bacillus subtilis***

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

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Assinatura: _____

*Ao meu avô e padrinho Sr. José Manoel Tavares, pelo grande homem que foi.
(in memorian)*

*Ao meu primo Josmar Henrique Gonçalves, uma das melhores pessoas que já conheci.
(In memorian).*

Agradecimentos.

São raros os momentos que temos para registrar a importância das pessoas em nossas vidas. Estas pessoas são especiais, cada uma a sua maneira e direta e indiretamente colaboraram para a minha vida, formação, valores e principalmente este trabalho.

Antes de tudo, gostaria de agradecer a Deus, que me permitiu entender de forma racional um pouco melhor a sua obra.

Ao Fredy, pela sua orientação, conselhos e paciência ao longo deste trabalho.

A minha mãe Eliete e minhas irmãs Ana e Morisa, pela paciência nos momentos de mau humor, trabalho, ausência e carinho.

Aos eternos membros do laboratório; Alessandra, Alexandre, Camila, Guilherme e Helena, Róbson, Theopi, Valquíria e Valdir pela caminhada juntos, conquistas e também pelos papos filosóficos.

Aos meus grandes amigos Jean e Hélio, pela incondicional ajuda, discussões filosóficas e conselhos.

Ao meu primo Belchior, Lisandra e a minha tia Matilde e tio Brás pelo sossego, carinho e conselhos.

A Etelvina, Lenita e Isabel pelo carinho e cobranças e a Gisele, pelos momentos de carinho ao meu lado.

A Lucimara, amiga de colégio e correções, sempre gentil e prestativa.

Quero deixar um beijo especial aos meus avôs José Roldon e Ana Garavello, por tudo que eles significam na minha vida.

Um abraço especial ao meu tio Ciro e Cida Pavanelli e primos Renato e Fábio pelas dicas culturais e por me ensinar a pescar.

Ao Sr. Jacir Laine, Dona Maria e seus filhos Ivan e Alan pelo respeito, amizade e acolhidas em Jales. Além deles, um abraço especial ao Sr. Antônio e Dona Flordinice, além do seu filho Edson pela amizade e acolhidas em Maringá.

Ao Prof. Walter Colli, Prof. Maria Júlia, Prof. Ivan e membros do laboratório: Ana, Viviane e Paula, Marinêi, Célia, Ketna e Roberto, Renata e Natalie, pela estadia e colaboração.

A Profa. Iolanda e Kátia pela colaboração e assistência.

A Marília e D. Conceição pela coragem, ousadia e ensinamentos.

A Lucy, sempre prestativa a nos ajudar.

A Profa. Carla Columbano e membros do laboratório: Maurício, Raphaela e Carlos, José Galeote, Márcia, Fernando, Daniela e Celso. Ao Prof. Chuck e aos membros: Diorge, Paola, Maxuel, Ilda, Cláudia e Cris. Ao Prof. Ronaldo e Carlos, todos pelos equipamentos e discussões.

Quero deixar um abraço a todos os membros da secretaria de pós-graduação, pessoal da limpeza e do almoxarifado que de forma competente e prestativa sempre colaboraram ao longo do curso.

Ao Bandeirão e a circular dois, um operon que nunca funciona, mas que você sempre precisa.

A CNPq e a Fapesp pelo auxílio e bolsa.

Resumo

Tavares, JR. Identificação e caracterização de novos moduladores de divisão em *B. subtilis* (2009). 110 p. Tese de doutorado, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Em procariotos, a principal forma de reprodução é a divisão binária, que permite à célula-mãe dar origem a duas outras células-filhas, com conteúdo genético idêntico ao da progenitora. Em *Bacillus subtilis* este processo acontece graças ao divisomo, um complexo formado por aproximadamente dezesseis proteínas, que leva à constrição da membrana e da parede, formando o septo de divisão. A montagem do divisomo é coordenada por FtsZ, um homólogo de tubulina, que polimeriza na região central da bactéria e serve de arcabouço para a montagem do divisomo. Partindo de um levantamento detalhado da distribuição dos genes envolvidos em divisão em genomas completos de procariotos detectamos que *divIVA*, um gene de divisão já bem caracterizado, apresentava um gene parálogo em *B. subtilis*, conhecido como *ypsB*.

Para determinarmos se YpsB seria um novo componente do divisomo foi realizada uma caracterização citológica e funcional desta proteína. Utilizamos microscopia de fluorescência e fusões de YpsB a GFP para determinar a localização subcelular de YpsB. Estes experimentos revelaram que YpsB está presente no divisomo, apresentando um padrão de localização semelhante mas não idêntico ao de DivIVA.

Medindo-se a taxa de co-localização entre o anel Z e YpsB ficou demonstrado que estas proteínas co-localizam em aproximadamente 50%, sugerindo que YpsB é recrutada depois que o anel Z é montado. Para determinar quando YpsB chega ao divisomo, usamos mutantes termo-sensíveis das proteínas de divisão que revelaram a dependência de YpsB pelo sub complexo DivIB-DivIC-FtsL-FtsW-PBP2B. Já na ausência de DivIVA, YpsB continua associado ao divisomo, indicando que não depende do seu parálogo para localizar.

Além disso, análises de deleções de YpsB mostraram que a porção N-terminal da proteína é a mais importante para o seu recrutamento ao divisomo.

Para determinarmos o papel de YpsB durante a divisão foi construído um mutante com deleção completa do gene. DivIVA é uma proteína responsável por localizar o sistema Min nos pólos da bactéria e assim contribui para a precisão espacial da divisão. Apesar de serem parálogos, a função de YpsB, no entanto, parece ser diferente da de DivIVA. Análise do mutante *ypsB* mostrou que na sua ausência, o divisomo é montado e o seu posicionamento tanto em fase vegetativa como em esporulação não são afetados. Como a ausência de YpsB não afeta perceptivelmente a divisão, combinamos a mutação em *ypsB* com mutações em outros genes envolvidos em divisão. A análise destes duplos mutantes revelou que a ausência simultânea de YpsB e FtsA produz exacerbada lise celular e letalidade. Com base neste fenótipo e em evidências evolutivas, sugerimos que YpsB esteja envolvida na regulação da síntese de peptideoglicano do septo. Mais especificamente, YpsB seria responsável por modular a atividade de PBP1, uma enzima necessária para a síntese de peptideoglicano septal.

Palavras-chave: Divisão celular, *Bacillus*, divisomo, FtsZ, DivIVA, YpsB, peptideoglicano, *penicillin binding protein*.

Abstract

Tavares, JR. Identification and characterization of new modulators of division in *B. subtilis*. (2009). 110 p. Tese de doutorado, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

In prokaryotes, the main form of reproduction is binary fission, which allows the mother-cell to give origin the two daughter-cells, with identical genetic material. In *Bacillus subtilis*, this process is performed by the divisome, a complex formed for approximately sixteen proteins that leads to the constriction of the membrane and the wall, creating the division septum. The assembly of the divisome is coordinated by FtsZ, a homolog of tubulin, that polymerizes in the central region of the bacteria and serves as the base for the assembly of the divisome. From a detailed survey of the distribution of the genes involved in division in complete genomes of prokaryotes, we detected that *divIVA*, a well characterized division gene, showed a paralog in *B. subtilis*, known as YpsB.

To determine if YpsB would be a new component of the divisome, a cytological and functional characterization of this protein was carried out. We used fluorescence microscopy and fusion of YpsB to GFP to determine the subcellular localization of YpsB. These experiments displayed that YpsB is present in the divisome, with similar but not identical localization as DivIVA.

Measuring co-localization between the Z ring and YpsB demonstrated that this happened in approximately 50% of the cells, suggesting that YpsB go to the divisome after the Z ring is formed. To determine when YpsB goes to the divisome, we used temperature-sensitive mutants of the division proteins. This showed that YpsB depends on the DivIB-DivIC-FtsL-FtsW-PBP2B sub-complex to associate with the divisome. In the absence of DivIVA, YpsB is still present in the divisome, indicating that it does not depend on its paralog to localize.

Moreover, deletion analyses of YpsB showed that the N-terminal portion of the protein is the most important for its recruitment to the divisome.

To determine the role of YpsB during division, we constructed a *ypsB*-mutant. DivIVA is the protein responsible for localization of the Min system in polar regions of *B. subtilis* and, thus, contributes for the spatial precision of division. Our results showed that the function of YpsB must be different from that of DivIVA, since analysis of the *ypsB*-mutant showed that in the absence of this protein the divisome is assembled and septum position in vegetatively growing or sporulating cells is not affected. Since the absence of YpsB does not affect division, we combined the *ypsB*-mutant with mutants involved in division. Analysis of these double mutants showed that the simultaneous absence of YpsB and FtsA caused cellular lysis and lethality. Based on this phenotype and evolutionary evidences, we suggest that YpsB is involved in the regulation of peptidoglycan synthesis in the septum. More specifically, YpsB would be responsible for modulating the activity of PBP1, a necessary enzyme for septum peptidoglycan synthesis.

Keywords: cell division, *Bacillus*, divisome, FtsZ, DivIVA, YpsB, peptidoglycan, penicillin binding protein.

Abreviaturas

β -Gal	β -galactosidase
BSA	albumina de soro bovino
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTPs	desoxi-ribonucleotídeos (dATP, dCTP, dTTP e dGTP)
DTT	ditiotretitol
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
FRAP	Recuperação da fluorescência após a "queima"
GFP	Proteína fluorescente verde
IEF	Focalização Isoelétrica
IPTG	Isopropil β -D-tiogalactopiranosídeo
Kb	quilobase
kDa	
quilodálon	
LB	Meio lisogênico
OD	densidade óptica
ORF	<i>open reading frame</i>
PAGE	<i>polyacrilamide gel</i>
<i>electrophoresis</i>	
pb	pares de
bases	
PBS	solução salina tamponada com fosfato
PCR	reação de polimerase em
cadeia	
PMSF	fluoreto de fenilmetilsulfonila
RPM	rotações por minuto
SDS	dodecil sulfato de
sódio	
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TAE	tampão contendo tris, acetato e EDTA
TE	tampão contendo tris e EDTA
TEMED	N,N,N', N', -tetrametiletineldiamina
Tris	tris-hidroximetilaminometano
YFP	Proteína fluorescente amarela

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.

1.1	Divisão celular em procariotos.	01
1.1.1	Proteínas do divisomo.	02
1.1.2	A montagem do divisomo	10
1.1.3	Caracterização de novas proteínas de divisão em <i>B.subtilis</i> .	13

2. OBJETIVOS. 14

3. MATERIAIS E MÉTODOS.

3.1	Cepa <i>E. coli</i> .	15
3.2	Cepas de <i>Bacillus subtilis</i> .	16
3.3	Plasmídeos.	17
3.4	Oligonucleotídeos usados no trabalho.	18
3.5	Meios e soluções utilizados.	19
3.6	Preparação das células competentes DH5 α .	19
3.7	Transformação das células competentes DH5 α .	20
3.8	Preparação das células competentes de <i>Bacillus subtilis</i> .	20
3.9	Transformação das células competentes de <i>Bacillus subtilis</i> .	20
3.10	Extração de DNA plasmidial de <i>E. coli</i> .	21
3.11	Purificação de DNA em gel de agarose.	21
3.12	Amplificação de DNA por PCR.	21
3.13	Análise de restrição.	22
3.14	Seqüenciamento de plasmídeos.	22
3.15	Construção dos Plasmídeos.	22
3.16	Construção das cepas de <i>Bacillus subtilis</i> .	23
3.17	Construção do nocaute de <i>ypsB</i> e <i>ypbR</i> .	24
3.18	Análise de Seqüência por bioinformática.	25
3.19	Microscopia de Fluorescência.	26
3.20	Lâminas e câmaras para Microscopia de Fluorescência.	26
3.21	Esporulação de <i>Bacillus subtilis</i> .	27
3.22	Fracionamento celular de <i>B. subtilis</i> .	27
3.23	Western Blot.	27

4. RESULTADOS.

Capítulo 01.

4.1. Identificação de YpsB.	29
4.2 Localização Subcelular de YpsB	36
4.3 Afinidade de YpsB pela membrana de <i>B. subtilis</i> .	40
4.4 Análise de YpsB durante a esporulação.	42
4.5 Co-localização de FtsZ e YpsB.	43
4.6 Recrutamento de YpsB para o divisomo.	45
4.7 Associação de YpsB com o divisomo.	49
4.8 YpsB não é essencial para a formação do septo de divisão em <i>B. subtilis</i> .	52
4.9 YpsB como integrante da maquinaria de partição do cromossomo	54
4.10 Letalidade sintética de YpsB.	57
4.11 Super-expressão de YpsB na presença do inibidor MinCD.	62

Capítulo 02.

4.2.1 Outras buscas para novas proteínas de divisão em <i>B. subtilis</i> .	63
4.2.2 Identificação e caracterização de YpbR, uma provável dinamina de <i>B. subtilis</i> .	63
4.2.3 Uso da genômica comparativa.	70

5. DISCUSSÃO.

5.1 Uso de métodos <i>in silico</i> para identificar novas proteínas de divisão.	76
5.2 YpsB como integrante do divisomo em <i>B. subtilis</i> .	77
5.3 Função de YpsB em <i>B. subtilis</i> .	81
5.4 YpsB na segregação cromossômica.	84

6. CONCLUSÕES.	85
----------------	----

7. REFERÊNCIAS.	87
-----------------	----

8. LISTA DE ANEXOS.

8.1 Artigo Científico	
-----------------------	--

1. Introdução:

1.1 Divisão celular em procariotos.

A maioria dos procariotos usa uma forma de divisão conhecida como “fissão binária”. A fissão binária leva à separação, quase sempre simétrica, dos componentes celulares da célula-mãe, além do seu material genético, em duas células-filhas viáveis. (Angert 2005, Barák e Wilkinson, 2007). Aparentemente simples, esta forma de divisão dependeria apenas que a célula dobrasse de tamanho até o ponto que ocorresse a partição em duas novas células. Porém, para que ela ocorra de forma acurada, a célula precisa garantir que todos seus componentes celulares sejam produzidos e separados sem erros ao longo do ciclo celular. Como consequência, estes organismos selecionaram durante a evolução sistemas para que a fissão ocorresse eficientemente (Angert 2005). Em eucariotos, a divisão depende do rearranjo do citoesqueleto e das estruturas como centríolos e fuso mitótico, que garantem a distribuição das organelas e dos cromossomos para as futuras células (Cabeen e Jacobs-Wagner, 2005). Além disso, o anel de actinmiosina, uma estrutura contrátil sob a membrana plasmática, disponibiliza a força motora que puxa a membrana para dentro e assim contrai a parte mediana da célula até a sua separação.

Em bactérias há proteínas especializadas homólogas das proteínas de citoesqueleto de eucariotos que participam para formar, na região mediana da célula, uma estrutura similar ao anel de actinmiosina, conhecido como *septassomo* ou *divisomo*. O divisomo é, portanto, o responsável pela constrição e invaginação do envelope bacteriano (Margolin, 2000).

Apesar das semelhanças estruturais entre o divisomo bacteriano e o anel de actinmiosina, o mecanismo pelo qual estes promovem a citocinese parece ser

diferente. No caso do anel de actomiosina, a força para a constrição da célula deriva da ação motora da miosina. Não são conhecidas até o momento proteínas motoras para o divisomo, sendo possível que a força para a constrição da célula derive do reposicionamento da maquinaria de síntese do peptídeoglicano e mudança do plano de síntese do envelope (Angert 2005; Vicente et al., 2006).

1.1.1 Proteínas do divisoma.

Os esforços realizados desde a década de 60 para caracterizar os processos celulares em *E. coli* levaram à obtenção de um grande número de mutantes, entre eles, mutantes termo-sensíveis, com fenótipo comprometido durante a divisão (Hirota et al., 1968). O estudo destes mutantes permitiu identificar um grupo de genes (*filamentation thermosensitive, fts*) cujos produtos eram essenciais para a divisão da bactéria. Os mutantes *fts* são capazes de replicar seu material genético e crescer, porém, são incapazes de se dividir como a cepa selvagem (Hirota et al., 1968).

Passados mais de quarenta anos desde a descoberta dos genes *fts*, aproximadamente dezesseis proteínas foram caracterizadas como componentes do divisomo (Errington et al., 2003). Entre estas proteínas, a principal delas é FtsZ. FtsZ é uma GTPase da família das tubulinas (Nogales et al., 1998), com 20% de similaridade de seqüência, estrutura tridimensional semelhante e funções conservadas evolutivamente (Margolin, 2000). FtsZ é amplamente distribuída nos procariotos sendo encontrada em eubactérias, arqueas e em algumas organelas eucarióticas, como mitocôndrias e cloroplastos (Miyagishima et al., 2003). Ela atua desde os passos iniciais da formação do septo até o final da citocinese (Weart e Levin, 2003). FtsZ é encontrada por toda a célula, porém durante a divisão, ela se concentra na região central compondo uma estrutura em forma de anel (Figura 01). Esta estrutura recebeu o nome de “anel Z” e serve de arcabouço para o recrutamento de outras proteínas engajadas na divisão, até a formação do divisomo funcional (Harry et al., 2006).

Análises de FRAP (*Fluorescence recovery after photobleaching*) demonstraram que o anel Z é dinâmico, com trocas constantes de subunidades de FtsZ presentes no anel com aquelas do citoplasma quando GTP é hidrolisado (Stricker et al., 2002). A hidrólise depende das interações entre os domínios N-terminal de uma subunidade e C-terminal de outra subunidade de FtsZ, formando um sítio ativo onde GTP é hidrolisado (Löwe et al., 1998).

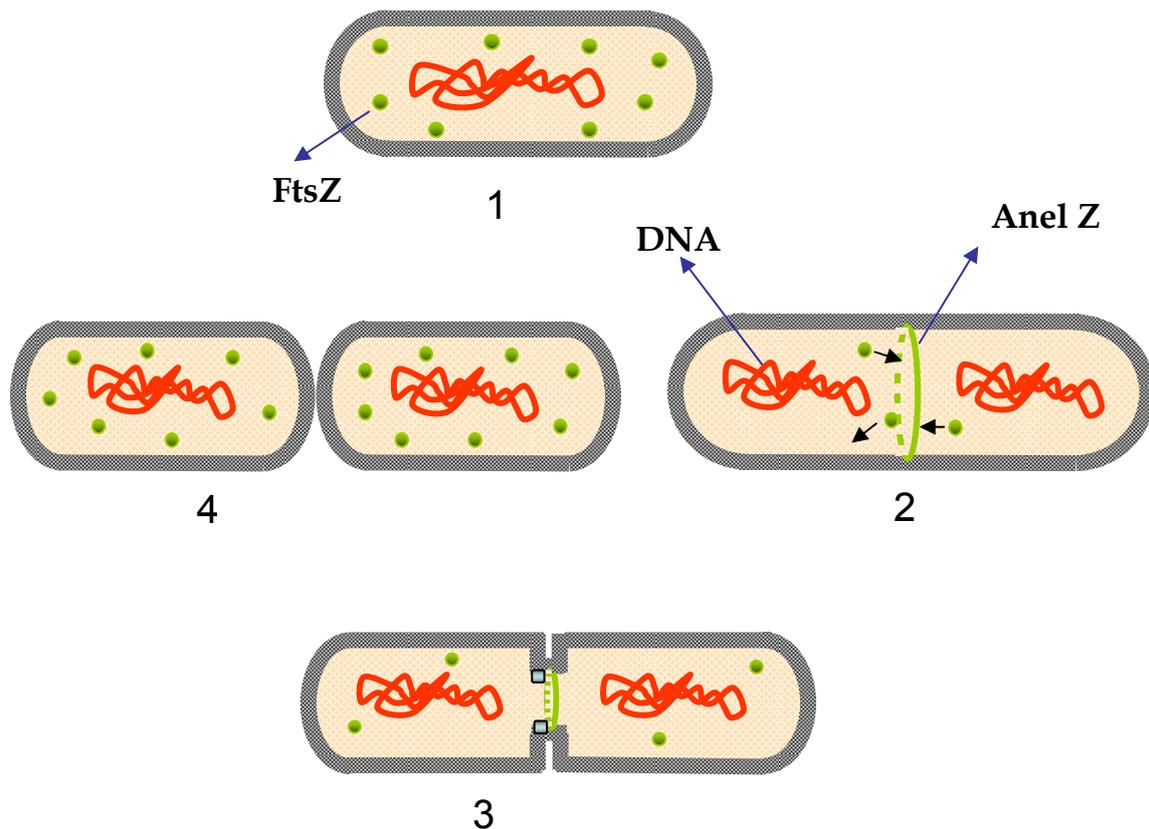


Figura 1: Esquema geral da divisão em *B. subtilis*. (1) Moléculas de FtsZ presentes por todo citoplasma na célula. (2) Durante a divisão, FtsZ polimeriza na região central da célula (anel Z) com constantes trocas de FtsZ entre as moléculas do anel e do citoplasma. (3) O anel Z recruta as proteínas que compõem o divisomo maduro, reposicionando a maquinaria de síntese do peptídeoglicano e promovendo mudança do plano de síntese do envelope (em azul) (4) até a separação em duas novas células.

Concomitante com a polimerização de FtsZ são encontrados no anel as proteínas FtsA e ZapA (Figura 02), (Errington., 2003, Gueiros-Filho e Losick, 2002). FtsA é uma proteína com atividade ATPásica, que ajuda a conectar FtsZ à face interna da membrana de *B. subtilis*, participando também do recrutamento de outras proteínas para o complexo de divisão (Margolin, 2000). Além disso, FtsA possui homologia com outra proteína eucariótica, a actina (Sánchez et al., 1994). Já ZapA, uma proteína não essencial, interage diretamente com FtsZ promovendo a estabilização dos polímeros através de ligações cruzadas entre eles (Gueiros-Filho e Losick, 2002). Em *E. coli*, além de FtsZ e FtsA, há uma terceira proteína, conhecida como ZipA, que é essencial para a montagem do divisoma e associação da proteína FtsZ com a membrana na bactéria (Hale e de Boer, 1997). ZipA e FtsA ligam-se à região C-terminal de FtsZ num domínio que se notabiliza por não ser estruturado (Pichoff e Lutkenhaus, 2007). Tanto ZipA como FtsA independentemente são capazes de levar à formação do anel Z na célula (Goehring e Beckwith, 2005).

Em *Bacillus subtilis* há outra proteína, YlmF/SepF, importante para a estabilização do anel Z. Mutações no gene *ylmF* induzem filamentação parcial e quando esta mutação é combinada com mutação em *ftsA* isto resulta em letalidade sintética, pelo total bloqueio na formação do anel Z (Ishikawa et al., 2006). Por outro lado, células sem FtsA conseguem dividir novamente quando YlmF/SepF é super-expressa, sugerindo que esta proteína possui função redundante com FtsA na formação do anel Z em *B. subtilis* (Ishikawa et al., 2006) (Figura 02).

Já as proteínas DivIB, DivIC e FtsL compõem um trímero que participa do amadurecimento do divisoma. Estas proteínas são essenciais para a divisão e apresentam interdependências para a sua estabilidade e recrutamento para o divisoma. Este complexo é um intermediário importante nas interações entre as proteínas divisomais do citoplasma, como FtsA e FtsZ, e as proteínas divisomais que ficam no periplasma, como PBP2B e FtsW (Bramkamp et al., 2006) (Figura 02).

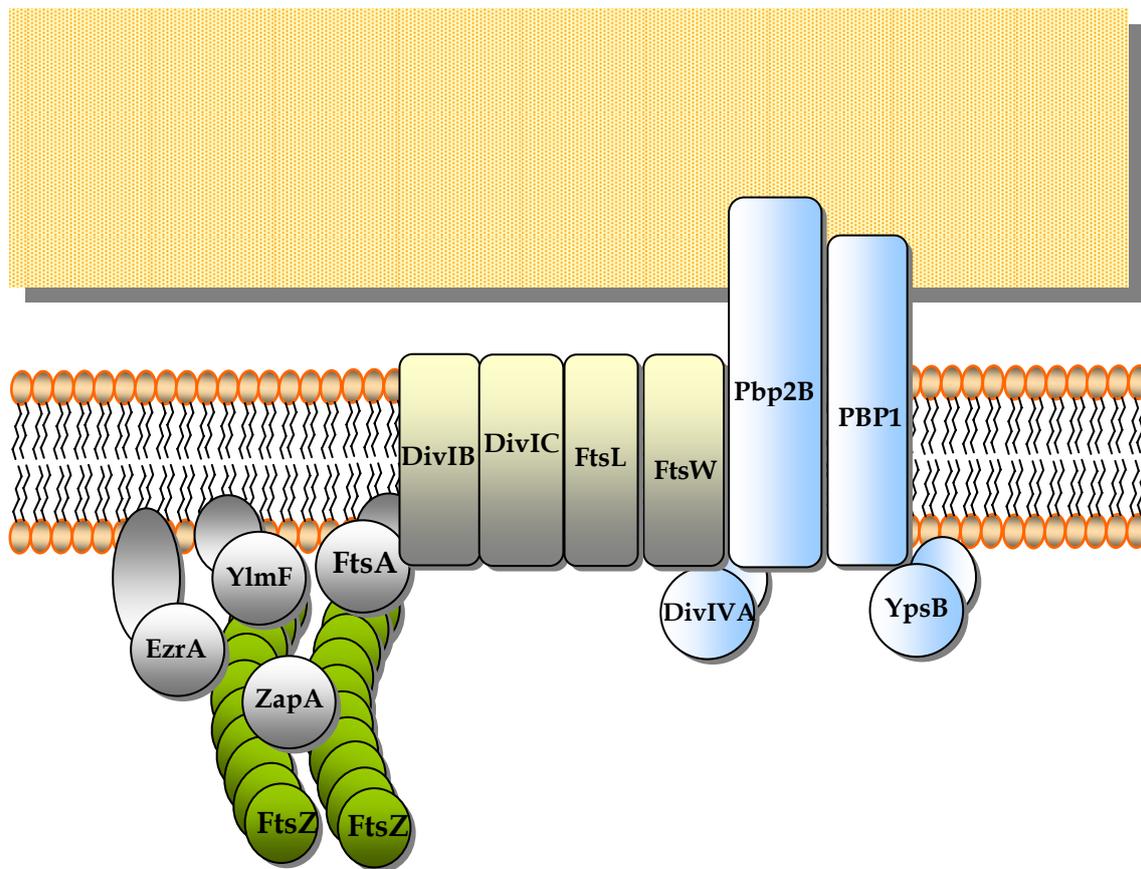


Figura 02: Esquema do complexo de divisão em *B. subtilis*. FtsZ polimeriza na região central da bactéria e recruta as proteínas ZapA, FtsA e YlmF/SepF que ajudam a estabilizar o anel. DivIB, DivIC e FtsL compõem um trímero que se conecta com as proteínas FtsW, Pbp2B e PBP1, importantes na síntese de parede. PBP1 interage com YpsB, um novo componente do divisomo descrito nesta tese. Neste esquema vemos também os moduladores negativos ErzA, que regula o número de septos formados, e DivIVA, que interage com o sistema MinCD inibindo a formação de septos nos pólos da célula.

Durante os estágios finais da montagem do divisomo, são recrutadas para o complexo de divisão as proteínas PBP (*penicillin binding protein*), que catalisam reações de transpeptidação e transglicosilação envolvidas na síntese

do peptidoglicano do septo em *B. subtilis* (Scheffers e Pinho, 2005). O peptidoglicano é composto por longas cadeias de glicanos unidas lateralmente por peptídeos. A síntese dos precursores é feita no citoplasma, pela ação dos produtos dos genes *mur*, posteriormente ligados a lipídios carreadores que transferem estes precursores para a superfície da membrana (Scheffers e Pinho, 2005). Uma vez na superfície, a transglicosilase catalisa a união destes precursores em longas cadeias de glicanos que são unidas lateralmente pelas transpeptidases (Scheffers e Pinho, 2005).

As PBPs podem ser divididas em três classes. As PBPs de classe A são proteínas com alto peso molecular, com atividade de transglicosilase e transpeptidase e participam da polimerização e ligações cruzadas das cadeias de glicanos (Popham e Young 2003). Neste grupo podemos citar a PBP1 que participa da construção do septo de divisão. As proteínas de classe B, também de alto peso molecular, mostram atividade de transpeptidase apenas, como exemplo a PBP2A que está envolvida na construção da parede lateral e PBP2B, que participa da síntese do septo. Já as PBPs de baixo peso molecular, catalisam reações de D-D-carboxipeptidase ou endopeptidase. Neste grupo podemos citar os genes *dacA* e *dacB* e seus produtos, PBP5 e PBP5* (Scheffers e Pinho, 2005, Popham e Young 2003).

Em *B. subtilis* as proteínas PBP1 e PBP2B são componentes da maquinaria de divisão e envolvidas na construção da parede lateral e septal respectivamente. Mutações no gene *pbpB* (que codifica PBP2B) levam ao bloqueio da formação do septo de divisão, porém sem influenciar no alongamento da célula (Daniel et al., 2000). PBP2B depende do trímero DivIB, DivIC e FtsL para se localizar no divisomo, indicando que estas proteínas associam-se cooperativamente num complexo. Já PBP1, uma PBP classe A codificada pelo gene *ponA* que possui atividade de transglicosilase e transpeptidase, é uma enzima que participa tanto da síntese do septo como do alongamento lateral da parede que ocorre durante o crescimento da bactéria. Para desempenhar estas duas funções, PBP1 parece alternar sua localização entre a parede lateral e o septo de divisão durante o ciclo celular (Scheffers et

al., 2004, Claessen et al., 2008). Na ausência de PBP1, a célula apresenta fenótipo alongado e com divisão comprometida quando comparado com a célula selvagem (Pedersen et al., 1999). Além das PBPs, outras proteínas estão envolvidas com síntese de parede do septo. Uma delas é FtsW, uma proteína transportadora da família SEDS (*shape, elongation, division and sporulation*), envolvida na translocação dos precursores de peptídeoglicano da parte interna para a externa da membrana da bactéria (Vicente et al., 2006, Errington et al., 2003) (Figura 02).

Além das proteínas que participam da montagem e estabilização do complexo de divisão, como citado acima, existem também reguladores da formação deste complexo. Estes moduladores influenciam no correto posicionamento do anel Z e também na quantidade de anéis formados na célula.

Um dos reguladores mais bem conhecidos é o sistema Min, um inibidor da polimerização de FtsZ (Levin et al., 1998). O sistema Min é composto pelas proteínas MinC e MinD, que formam um complexo associado à membrana que inibe a formação do anel Z nos pólos da célula. Deleções de MinC e MinD em *E. coli* e em *B. subtilis* resultam no fenótipo de mini-células, isto é, uma célula inviável, sem DNA, fruto da formação de um septo próximo a um pólo da célula (Weiss, 2004). A super-expressão de MinC e MinD acarreta células sem septo, inibindo a divisão por desestabilizar FtsZ por toda célula. MinC associa-se em dímeros e inibe a formação do anel Z via seu domínio N-terminal, pois a região C-terminal está associada à MinD (Shiomi e Margolin, 2007, Szeto et al., 2002). MinD é uma proteína da família ParA de ATPases, que se liga à membrana da bactéria via seu domínio C-terminal (Autret e Errington, 2003). MinD recruta MinC para os pólos, aumentando sua concentração local, o que é determinante para a sua atividade (Hu et al., 2003). Em *E. coli* e *B. subtilis* os mecanismos de localização do sistema Min são diferentes. Em *E. coli*, o complexo MinCD oscila de um pólo ao outro da célula num período de aproximadamente 40 segundos. Esta oscilação é dependente de MinE, que também oscila (Huang et al., 2003). Já em *B. subtilis* MinC e MinD associam-se

aos pólos da célula de forma estática, associação esta mediada pela proteína DivIVA (Edwards e Errington, 1997).

Mutantes *divIVA*⁻ não recrutam o complexo de MinCD para os pólos, culminando em fenótipo de filamentação e morte da bactéria (Cha e Stewart, 1997). Homólogos de DivIVA são amplamente distribuídos nas bactérias gram-positivas, porém não são vistos entre as gram-negativas. DivIVA é recrutada para o septo depois que o anel Z é formado e pode ser vista tanto na região central quanto nos pólos da bactéria. Este recrutamento depende não só de FtsZ, mas também das proteínas envolvidas nos últimos estágios da montagem do divisomo, como DivIB e DivIC (Marston et al., 1998). Além desta afinidade pelo divisomo, DivIVA é capaz de reconhecer curvaturas de membrana da região do septo (Lenarcic et al., 2009).

DivIVA, além de recrutar MinCD para os pólos da célula, desempenha função importante durante a esporulação. A incorporação do DNA no futuro esporo depende da ancoragem do cromossomo no pólo da célula. Uma das proteínas envolvidas nesta ancoragem é RacA e DivIVA é a responsável pela sua localização polar (Wu e Errington, 2003).

Além do sistema Min, outro regulador importante da divisão em *E. coli* é a proteína SlmA e em *B. subtilis*, a proteína Noc (Wu e Errington, 2004). Noc associa-se ao DNA e evita que o divisomo seja montado sobre os cromossomos antes que eles tenham sido replicados e segregados para as células filhas (Figura 03). Este mecanismo ficou conhecido como “oclusão do nucleóide” (Wu e Errington, 2004). SlmA tem papel semelhante ao de Noc em *E. coli*, também evitando que os cromossomos sofram estrangulamento por ação do divisomo (Bernhardt e de Boer, 2005). Mutantes *slmA* e *noc*, montam o anel Z sobre o cromossomo, gerando um cromossomo “guilhotinado” e células-filhas inviáveis. SlmA e Noc mostram homologia com proteínas que se ligam a DNA, porém elas não são relacionadas uma com a outra (Bernhardt e de Boer, 2005). Isto indica que o mecanismo molecular da “oclusão do nucleóide” pode ser diferente entre espécies de bactérias e que diferentes proteínas têm evoluído para desempenhar a mesma função. Em *Caulobacter* a oclusão do nucleóide

depende da proteína MipZ, que em conjunto com ParB interfere na polimerização de FtsZ nos pólos, restringe a montagem do anel à região central e modula a segregação do nucleóide para as células filhas (Thanbichler e Shapiro, 2006).

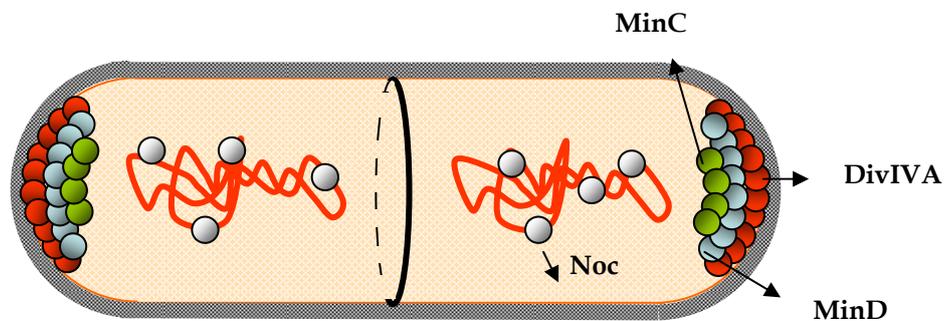


Figura 03: Esquema geral da inibição da divisão nos pólos da célula através do sistema MinCD e DivIVA e o mecanismo da oclusão do nucleóide (Noc), que evita que o divisomo seja montado sobre o cromossomo. Estes sistemas condicionam a divisão à região central da bactéria, único local da célula onde não há inibição da montagem do anel Z.

Outro modulador negativo é EzrA. Ele foi identificado como um supressor extragênico em mutantes termossensíveis de *ftsZ* que recuperava a capacidade de a bactéria formar o “anel Z” na temperatura restritiva (Levin et al., 1999). Analisando a função de EzrA, verificou-se que ela garante à bactéria que apenas um anel será formado por ciclo celular (Levin et al., 1999) (Figura 02).

Além do sistema MinCD e da oclusão do nucleóide há proteínas que ligam a FtsZ e evitam a sua polimerização quando o DNA sofre algum dano. Em *B. subtilis* a proteína YneA e em *E. coli* a proteína SulA são componentes da resposta SOS que bloqueiam a divisão interagindo diretamente com FtsZ (Kawai et al., 2003, Trusca et al., 1998).

Em muitas bactérias gram-positivas e negativas, vários genes de divisão estão agrupados num “cluster” chamado de *dcw* (*division and cell wall*)

(Massidda et al., 1998, Mingorance et al., 2004). Em *E. coli* e *B. subtilis* são encontrados genes como os da família *mur*, envolvidos na síntese do ácido N-acetilmurâmico, precursor do peptídeoglicano, além dos genes *ftsA*, *ftsZ* e *ftsL* entre outros (Massidda et al., 1998). No cluster *dcw* de *B. subtilis* também há genes envolvidos em esporulação, o que não é visto em *E. coli*.

1.1.2 A montagem do divisomo

As proteínas de divisão são recrutadas para o divisomo seguindo uma ordem ou hierarquia, ou seja, existe uma dependência entre elas para localização e montagem do divisomo tanto em *E. coli* como em *B. subtilis*. Esta montagem, porém, não segue um percurso linear, mas um modo cooperativo, onde várias proteínas podem localizar no septo de forma interdependente (Vicente e Rico, 2006) (Figura 04).

A montagem do complexo de divisão tanto em *E. coli* quanto em *B. subtilis* depende inicialmente da polimerização de FtsZ. Nenhuma das proteínas conhecidas até o momento é capaz de se localizar sem a presença de FtsZ. Em *E. coli*, simultaneamente à montagem do anel Z, as proteínas FtsA e ZipA ligam-se ao anel, ajudando a estabilizá-lo e a ancorá-lo à membrana (Goehring e Beckwith, 2005). Estas proteínas iniciais que interagem diretamente e participam da montagem do anel Z convencionou-se chamar de “proto-anel citoplasmático” (Vicente e Rico, 2006). A seguir, em *E. coli* associam-se ao complexo as proteínas FtsE e FtsX, primeiras proteínas com domínios inseridos na membrana e depois FtsK, marcando a transição das proteínas do anel citoplasmático com as do periplasma (Vicente e Rico, 2006, Goehring e Beckwith, 2005). A montagem prossegue com o ingresso das proteínas FtsQ, FtsB e FtsL, formando um sub-complexo chamado de “ponte periplasmática” entre as proteínas do citoplasma e as transmembrana envolvidas em síntese de peptídeoglicano. Por fim, FtsI (transpeptidase ortóloga de PBP2B envolvida em síntese de parede), FtsW, proteína transportadora da família SEDS (*shape, elongation, division and sporulation*), envolvida na translocação dos precursores

de peptídeoglicano da parte interna para a externa da membrana da bactéria) e FtsN (envolvida no recrutamento de AmiC) posicionam as proteínas AmiC e EnvC, que executam o papel de partição da parede em duas novas células (Vicente e Rico, 2006, Goehring e Beckwith, 2005) (Figura 04).

Em *Bacillus subtilis*, o primeiro e segundo estágio da montagem do divisomo envolve a polimerização de FtsZ e a interação das proteínas ZapA, FtsA e SepF importantes na estabilidade do anel, ancoragem de FtsZ à membrana e recrutamento das outras proteínas do divisomo. (Ishikawa et al., 2006, Errington et al., 2003, Gueiros-Filho e Losick, 2002). O terceiro estágio compreende o recrutamento das proteínas com domínios extracelulares, envolvidas principalmente na síntese de peptídeoglicano (DivIB, DivIC, FtsL, PBP2B e FtsW). Estas proteínas são essenciais para a divisão e apresentam interdependências para a sua estabilidade e localização. Um exemplo disso é o trímero composto pelas proteínas FtsL-DivIC-DivIB que se não for corretamente montado, desestabiliza este sub-complexo e compromete as interações das proteínas divisionais do citoplasma, como FtsA e FtsZ e as proteínas divisomais que ficam no periplasma, como PBP2B e FtsW (Bramkamp et al., 2006; Errington et al., 2003). Já o quarto estágio envolve o recrutamento de DivIVA acompanhado de MinCD para o septo durante o final da divisão.

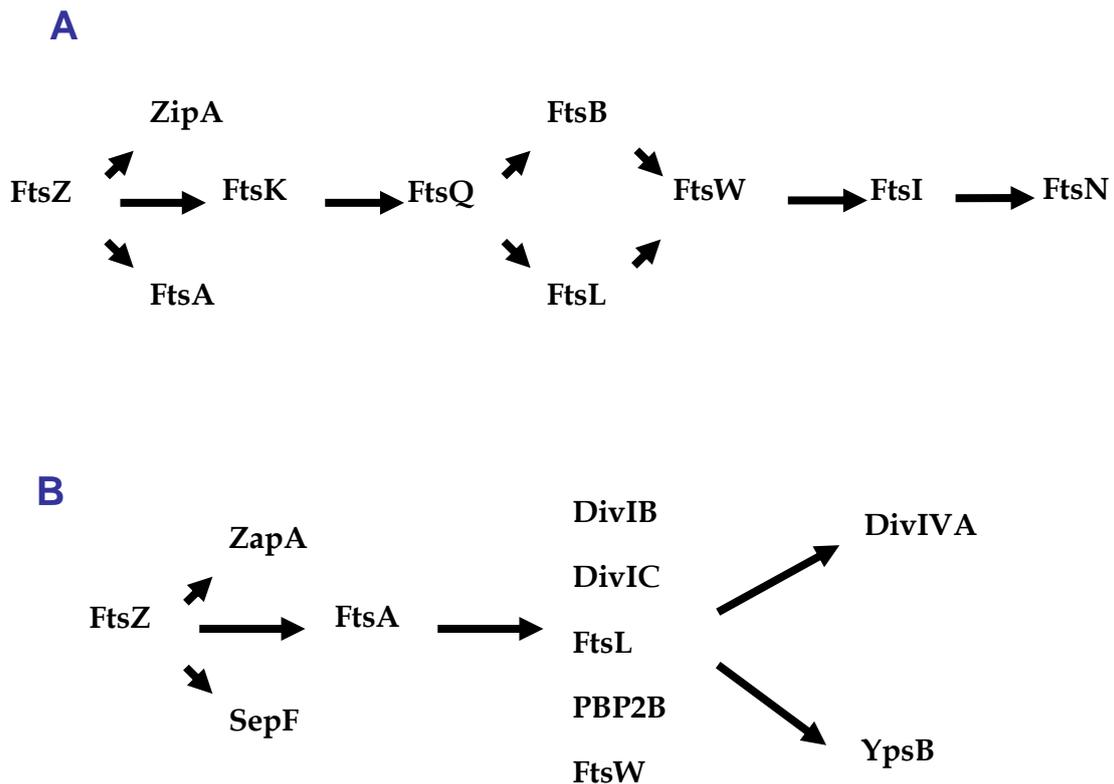


Figura 04: Esquema da hierarquia de montagem do divisomo em *E. coli* e *B. subtilis* mostrando que o complexo de divisão exibe uma relação de dependência entre as proteínas (representado por setas no esquema). Esta dependência é o resultado da proteína ligada ao divisomo que recruta uma nova proteína para integrar o sistema até o estágio final. A ordem de recrutamento, porém, não é linear, podendo agrupar sub-complexos de proteínas, como por exemplo, DivIB-DivIC-FtsL-PBP2B-FtsW ou então proteínas individuais, como FtsK-FtsQ. A inclusão de YpsB foi baseada nos dados obtidos durante este trabalho.

1.1.3 Caracterização de novas proteínas de divisão em *B.subtilis*.

Apesar dos mais de quarenta anos desde a descoberta dos genes *fts* e dos outros integrantes da maquinaria de divisão, há pontos sobre o divisomo que continuam obscuros. O primeiro destes pontos remete à função dos componentes do divisomo e também a relação de interação com outras proteínas do complexo. Um exemplo é a proteína FtsZ, que apesar dos detalhes bioquímicos e genéticos revelados, pouco é conhecido sobre as interações com as proteínas que ajudam a estabilizar o anel ou que modulam a sua atividade. Outro ponto importante é sobre novas proteínas do divisomo. Sabemos que parte do genoma de *B. subtilis* ainda não tem função caracterizada, o que torna atraente imaginar que algumas destas proteínas de função desconhecida possam fazer parte do divisomo.

Baseado nesta possibilidade, decidimos utilizar ferramentas *in silico* para encontrar novas proteínas de divisão de *B. subtilis*. Neste contexto, foi identificada e caracterizada em nosso laboratório a proteína YpsB, um novo componente do divisomo de *Bacillus subtilis* (Tavares et al., 2008).

2. Objetivos.

Utilizar ferramentas de bioinformática para identificar novas proteínas de divisão.

Caracterizar, por métodos citológicos e genéticos as novas proteínas de divisão que venham a ser encontradas.

3. Materiais e Métodos

As cepas de *B. subtilis* utilizadas durante o trabalho serão derivadas da cepa selvagem PY79 (Youngman et al., 1983). A cepa *E. coli* DH5 α foi utilizada nas clonagens das proteínas de fusão seguindo o protocolo de Sambrook et al., 1989. Quando necessárias concentrações de IPTG, xilose ou antibióticos foram adicionados às culturas bacterianas. Antibióticos foram utilizados nas seguintes concentrações: espectinomicina, 100 $\mu\text{g/ml}$; tetraciclina, 10 $\mu\text{g/ml}$; ampicilina, 100 $\mu\text{g/ml}$; cloranfenicol 5 $\mu\text{g/ml}$; canamicina, 5 $\mu\text{g/ml}$. Para a indução da expressão de *ypsB* em *B. subtilis*, xilose foi adicionada na concentração final de 0.25%, incubadas a 37°C com agitação até atingirem uma OD₆₀₀ de 0.5-0.6, para então serem usadas nos experimentos.

Características das cepas de *E. coli* e de *B. subtilis* podem ser vistos nas tabelas 1 e 2 e os plasmídeos utilizados na tabela 3. Oligonucleotídeos usados nas clonagens, seqüenciamento e nocaute estão na tabela 4.

3.1 Cepa *E. coli*.

<i>Cepa</i>	<i>Característica</i>	<i>Referência</i>
Dh5 α	<i>supE44 DlacU169 (f80 lacZDM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi1 relA1</i>	Hanahan, 1983

Tabela 01: Cepa de *E. coli* usada e seu genótipo.

3.2 Cepas de *Bacillus subtilis*.

<i>Cepas</i>	<i>Características</i>	<i>Referências</i>
PY79	Prototrófica	Youngman et al., 1983
FG91	<i>amyE::Pxyl-divIVA (cat)</i>	Este trabalho
FG96	<i>amyE::Pxyl-divIVA-gfp (cat)</i>	Este trabalho
FG117	<i>minD1 divIVA ::spc</i>	Este trabalho
FG712	<i>amyE::Pspac-ftsZ-mCherry(BS) (spc) (cat)</i>	Este trabalho
FG718	<i>ftsA amyE::Pxyl-ftsA (cat)</i>	Este trabalho
FG915	<i>amyE::Pxyl-gfp-ylaN (ble)</i>	Este trabalho
FG918	<i>amyE::Pxyl-gfp-yrzD (ble)</i>	Este trabalho
FG919	<i>amyE::Pxyl-gfp-yhsC (ble)</i>	Este trabalho
JR09	<i>chr ypbR-gfp (kan)</i>	Este trabalho
JR22	<i>amyE::Pxyl-gfp-ypsB (cat)</i>	Este trabalho
JR31	<i>minD1 divIVA ::spc amyE::Pxyl-gfp-ypsB (cat)</i>	Este trabalho
JR46	<i>ypsB ::kan</i>	Este trabalho
JR47	<i>chr ypsB-gfp (kan)</i>	Este trabalho
JR61	<i>ypsB ::Kan amyE::Pxyl-gfp-ypsB (cat)</i>	Este trabalho
JR64	<i>chr Pspac-ftsZ (ble) amyE::Pxyl-gfp-ypsB (cat)</i>	Este trabalho
JR104	<i>chr ypsB-gfp (kan) amyE::Pspac-ftsZ-mCherry(BS)</i>	Este trabalho
JR125	<i>div-355(Ts) chr ypsB-gfp (kan)</i>	Este trabalho
JR126	<i>div-355(Ts) chr ypsB-gfp (kan) amyE::Pspac-ftsZ-mCherry(BS)</i>	Este trabalho
JR128	<i>ftsA amyE::Pxyl-ftsA (cat) chr ypsBgfp (kan)</i>	Este trabalho
JR132	<i>amyE::Pspac-ftsZ-mCherry(BS) (spc) (cat) chr ypsB-gfp (kan)</i>	Este trabalho
JR133	<i>amyE::Pxyl-gfp-ypsB(N35) (cat)</i>	Este trabalho
JR134	<i>amyE::Pxyl-gfp-ypsB(N69) (cat)</i>	Este trabalho
JR135	<i>amyE::Pxyl-gfp-ypsB(30C) (cat)</i>	Este trabalho
JR136	<i>amyE::Pxyl-gfp-ypsB(70C) (cat)</i>	Este trabalho
JR137	<i>amyE::Pxyl-gfp-ypsB(30-69) (cat)</i>	Este trabalho
JR143	<i>ypsB ::kan amyE::Pxyl-gfp-ypsB(N35) (cat)</i>	Este trabalho
JR144	<i>ypsB ::kan amyE::Pxyl-gfp-ypsB(N69) (cat)</i>	Este trabalho
JR145	<i>ypsB ::kan amyE::Pxyl-gfp-ypsB(30C) (cat)</i>	Este trabalho

Continuação.

<i>Cepas</i>	<i>Características</i>	<i>Referências</i>
JR146	<i>ypsB ::kan amyE::Pxyl-gfp-ypsB(70C) (cat)</i>	Este trabalho
JR147	<i>ypsB ::kan amyE::Pxyl-gfp-ypsB(30-69) (cat)</i>	Este trabalho
JR162	<i>chr ypsB-gfp (kan) Pspac-ftsL -pbpB (cat)</i>	Este trabalho
JR166	<i>ypsB ::kan amyE::Pxyl-ftsA (cat)</i>	Este trabalho
JR180	<i>amyE::Pxyl-gfp-ypbR (cat)</i>	Este trabalho

Tabela 2: Cepas de *B. subtilis* utilizadas e suas características genotípicas.

3.3 Plasmídeos.

<i>Plasmídeos</i>	<i>Características</i>	<i>Referência</i>
pEA18	<i>amyE::Pxyl-gfp (cat)</i> Vetor de integração	Este Trabalho
pGUI6	<i>ftsZ-mCherry(BS) (spc)</i> Vetor de integração	Este Trabalho
pJR13	<i>ypbR-gfp (kan)</i> Vetor de integração	Este trabalho
pJR20	<i>amyE::Pxyl-gfp-ypsB (cat)</i> Vetor de integração	Este Trabalho
pJR47	<i>ypsB-gfp (kan)</i> Vetor de integração	Este Trabalho
pJR138	<i>amyE::Pxyl-gfp-ypsB(N35) (cat)</i> Vetor de integração	Este Trabalho
pJR139	<i>amyE::Pxyl-gfp- ypsB(N69) (cat)</i> Vetor de integração	Este Trabalho
pJR140	<i>amyE::Pxyl-gfp- ypsB(30C) (cat)</i> Vetor de integração	Este Trabalho
pJR141	<i>amyE::Pxyl-gfp- ypsB(70C) (cat)</i> Vetor de integração	Este Trabalho
pJR142	<i>amyE::Pxyl-gfp ypsB(30-69) (cat)</i> Vetor de integração	Este Trabalho
pJR191	pET28a- <i>ypsB (kan)</i>	Este Trabalho
pJR192	<i>amyE::Pxyl-gfp-ypbR (ble)</i> Vetor de integração	Este Trabalho

Tabela 3: Lista dos plasmídeos utilizados e suas principais características.

3.4 Oligonucleotídeos usados no trabalho.

<i>Nome</i>	<i>Seqüência</i>
OL1298	5' AAAGTCGACGTGATGATTCACGATACG 3'
OL1299	5' CCAGGATCCTACAATTTACAAGCGCCA 3'
OFG106	5' ATATGTCTTCAGCCACAATC 3'
OFG107	5' Phos-TCTTGTCGTCGTCAAGTCTGAACCCCTTTGTGC 3'
OFG108	5' Phos-CCGGGCTTCTCCTCAATTCAGTTGGCTTGTATTC 3'
OFG109	5' TAGCCGGCAAAGCCAATATT3'
OFG112	5' Phos-GACGACGACAAGATTAGAGTCGATAAACCCAGCGA 3'
OFG113	5' Phos-GAGGAGAAGCCCGGTCAGGTCGATACAAATTCCTCG 3'
OFG114	5' AAGCTAGCGGCCGCATGACAGATCAAAAC 3'
OFG115	5' CGCGGATCCTTACATTTTTATTGTATTGTC 3'
OFG136	5' CGCAGGATCCATTTTTATTGTATTGTC 3'
OFG137	5' AAGCTAGCGGCCGCATGCTTGCTGATAAAGT 3'
OFG138	5' AAGGATCCATCATAAAGCTTGCTGCC 3'
OFG145	5' ACGCGTCGACAAGGAGGTGAGACTT 3'
OFG158	5' GCTACGCATCAGCATTTTCA 3'
OFG159	5' AATCTTGTCGTCGTCCACCTCGTATCGTGAATC 3'
OFG160	5' ACCGGGCTTCTCCTCTTGGCAGCAAGCTTTATG 3'
OFG161	5' TTTCCCGTTATCAACCTTGC 3'
OFG181	5' CGGAGCTCCTCGAGGGATCCGGTGGAAATGGTTTCCAAGG CCGA 3'
OFG182	5' ACATCCGCGGGCATGCTTATTTGTACAGCTCATC 3'
OFG219	5' AAGGATCCTCAATCTAAAAATTTGTC 3'
OFG220	5' AAGGATCCTCACTGTTTTTTGCTGGC 3'
OFG221	5' GCTAGCGGCCGCGTTGACAAATTTTT 3'
OFG222	5' GCTAGCGGCCGCCCTGTGCAATCTAA 3'

Tabela 04: Lista dos oligonucleotídeos utilizados nas ampliações por PCR, seqüenciamento e nocaute dos genes.

3.5 Meios e soluções utilizados.

LB (Lisogenic Broth) 1% triptona; 0,5% extrato de levedura; 1% NaCl; 2% Agar

Tampão hipotônico (buffer H): 20 mM Hepes pH 8, 25 mM NaCl, 1 mM DTT, 1mM PMSF.

Tampão de transformação: (0,1M, KCl; 0,03M CaCl₂; 0,05M MgCl₂ e 7% PEG)

Tampão PBS: NaCl 137 mM, Fosfato 10 mM, KCl 2,7 mM, e um pH de 7.4

Tampão MC (*modified competence medium*): 100mM K₃PO₄ pH 7,0, 3mM de Na₃C₆H₅O₇, 3mM de MgSO₄, 2% glicose, 22mg/L citrato férrico amoniacal, 0,1% caseína hidrolisada, 0,2% glutamato de potássio.

Tampão SMM: (0.5 M sacarose, 20 mM MgCl₂, 20 mM ácido maléico pH 6.5)

Tampão de transferência: 25 mM Tris; 192 mM Glicina pH 8.3 e Metanol 20%

TYM: 2% triptona; 0,5% extrato de levedura; 0,58% NaCl; 0,25% MgSO₄

TFB1: 0,03M KOAc; 0,05M MnCl₂; 0,1M KCl; 0,01M CaCl₂ e 15% glicerol

TFB2: 0,1M MOPS, pH=7,0; 0,75M CaCl₂; 0,02M KCl; 15% glicerol

3.6 Preparação das células competentes DH5α.

Colônia isolada de *E. coli* DH5α foi inoculada em 2ml de meio TYM por 12h a 37°C sob constante agitação. Após este período, a cultura foi diluída (500 µl de cultura em 50ml de meio) e novamente transferida para 37°C até atingirem a OD₆₀₀=0,2-0,6. Os 50ml de cultura foram agora transferidos para 200ml de TYM e novamente incubados a 37°C até atingir OD₆₀₀=0,5-0,6. Posteriormente, os 250ml são misturados a 1L de meio e incubados a 37°C até atingir OD₆₀₀=0,6. A cultura foi então resfriada por 15 minutos em gelo e posteriormente centrifugada a 4000rpm por 15 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante é descartado e as células são ressuspensas em 100ml de TFB1 gelado e submetidas a nova centrifugação por 8 minutos a 4000rpm. Após novo descarte de sobrenadante, as células foram ressuspensas no tampão TFB2 gelado e divididas em alíquotas de 100µl, que foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C.

3.7 Transformação das células competentes DH5α.

Os 300ng de DNA utilizados na reação de ligação foram diluídos em água até atingirem o volume final de 20µL. Em seguida, foram adicionadas nas células 80µL do tampão de transformação e incubados em gelo por 10 minutos. Depois, são adicionados 100 µL de células DH5α competentes e novamente direcionadas para o gelo por 30 minutos. As células são submetidas a choque térmico por 10 minutos a temperatura ambiente. Após o choque térmico é adicionado 1ml de LB a cultura que é incubada por 1h sob constante agitação a 37°C. Após este período as células são centrifugadas e semeadas em placas de LB contendo a marca de seleção desejada.

3.8 Preparação das células competentes de *Bacillus subtilis*.

Uma colônia de *B. subtilis* foi inoculada em meio LB e incubada a 37°C por 12h. Na manhã seguinte a células foram centrifugadas por 2 minutos a 3000rpm e ressuscitadas em tampão MC contendo 300mM de MgSO₄. A cultura é então transferida para constante agitação a 37°C e durante a transição da fase exponencial até a estacionária serão tomadas medidas de crescimento. Durante a fase estacionária, as células são coletadas, divididas em alíquotas de 500µl, e então congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C.

3.9 Transformação das células competentes de *Bacillus subtilis*.

A transformação em *B. subtilis* processa-se com a mistura de 1µg de DNA adicionados à célula competente e transferidos para estufa a 37°C por 1h. Em seguida, as células foram centrifugadas por 1 minuto a 10.000rpm e semeadas em meio contendo marca de resistência.

3.10 Extração de DNA plasmidial de *E. coli*.

Os plasmídeos foram extraídos pelo método QIAprep Spin Miniprep Kit (250) (QIAGEN), conforme o fabricante.

3.11 Purificação de DNA em gel de agarose.

Os fragmentos de DNA obtidos por PCR ou clivagens foram recuperados do gel de agarose utilizando o *Qiaquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN, purificação do DNA por imobilização em coluna de troca iônica) conforme fabricante.

3.12 Amplificação de DNA por PCR.

As reações de PCR utilizaram os oligonucleotídeos listados na tabela 4 além de 100ng de DNA plasmidial ou 50ng de DNA genômico de *B. subtilis*. As reações continham 2mM MgCl₂, 0,2μM de dNTPs (desoxi-ribonucleotídeos), 0,4μM de oligonucleotídeos e 0,5U/μL de *Phusion* DNA polymerase (*New England Biolabs*) em reações de volume final de 100μL.

Para amplificar *ypsB* o ciclo utilizado foi: Desnaturação a 93°C por um minuto; 35 ciclos de desnaturação a 93°C por 1 minuto, anelamento a 59°C por 1 minuto; extensão a 72°C por 1 minuto e extensão final a 72°C por 3 minutos. O produto obtido desta reação foi separado por eletroforese em gel de agarose e purificado seguindo o protocolo do *Qiaquick Gel Extraction Kit* conforme o fabricante.

Já *ypbR* o ciclo utilizado foi: Desnaturação a 93°C por um minuto; 35 ciclos de desnaturação a 93°C por 1 minuto, anelamento a 50°C por 1 minuto; extensão a 72°C por 5 minutos e extensão final a 72°C por 10 minutos.

3.13 Análise de restrição.

Os DNAs plasmidiais extraídos da bactéria foram clivados com enzimas de restrição e submetido à eletroforese em gel de agarose a 1% numa voltagem de 100 volts para confirmação do inserto no vetor.

3.14 Seqüenciamento de plasmídeos.

Os DNAs plasmidiais foram seqüenciados utilizando o *kit Big Dye Terminator* (Applied Biosystem) segundo recomendações do fabricante. Foram utilizados 2,5 μ mol de oligonucleotídeos e 100ng de vetor como molde. A reação inicia-se com 96°C por 2 minutos, e trinta ciclos de desnaturação a 96°C por 45 segundos, anelamento a 50°C por 30 segundos e extensão a 60°C por 4 minutos. Após a amplificação, os DNAs são precipitados com Etanol 100% e acetato de sódio 3,5mM.

3.15 Construção dos Plasmídeos.

O plasmídeo pGUI6 contém o fragmento de *ftsZ* fusionado ao *mcherry* no C-terminal. O gene *mcherry* foi amplificado por PCR usando os oligos OFG181 e OFG182, digeridos com *XhoI* e *SphI* e clonado no vetor pGUI4 previamente clivados com *XhoI* e *SphI*.

O pJR13 contém a fusão *ypbR-gfp* para integração Campbell (crossing-over simples) no cromossomo. O gene *ypbR* foi amplificado usando os oligos OFG136 e OFG145 onde o "stop códon" foi substituído pelo sítio *BamHI*. Este fragmento foi digerido com *BamHI* e *Sall* e clonado no vetor pFG4 que foi previamente clivado com as mesmas enzimas.

O pJR20 contém a fusão *gfp-ypsB* sob o controle do promotor *Pxyl* para integração no locus de *amyE*. O gene *ypsB* foi amplificado por PCR usando oligos OL1299 e OFG137, digerido com *NotI* e *BamHI* e clonado no vetor pEA-18 cortando com *NotI* e *BamHI*.

O vetor pJR47 contém a fusão *ypsB-gfp* para integração Campbell (crossing-over simples) no cromossomo. O gene *ypsB* foi amplificado usando os oligos OL1298 e OFG138 onde o “stop códon” foi substituído pelo sítio *BamHI*. Este fragmento foi digerido com *BamHI* e clonado no vetor pFG4 que foi previamente clivado com *SacI*, tratado com T4 polimerase na presença de dNTPs, gerando uma da extremidade “cega” e a outra clivada com *BamHI*.

O plasmídeo pJR138 contém a fusão entre *gfp* e a versão truncada do gene *ypsB* (N35) sob o controle promotor *Pxyl* para integração no locus de *amyE*. O fragmento (N35) foi amplificado usando os oligos OL1299 e OFG219, digeridos com *NotI* e *BamHI* e ligados ao vetor pEA-18 previamente clivado com as mesmas enzimas.

A versão truncada de *ypsB* (N69) foi amplificada com os oligos OL1299 e OFG220. A versão 30C foi amplificada com os oligos OFG221 e OFG137 e o 70C foi amplificado com OFG222 e OFG137 gerando os plasmídeos pJR139, pJR140 e pJR141. Todas estas versões foram clivadas com *NotI* e *BamHI* e ligados no vetor pEA-18 previamente clivado com as mesmas enzimas.

O plasmídeo pJR142 contém a fusão *gfp* com *ypsB* truncado (30/69). O gene foi amplificado com os oligos OFG220 e OFG221 digeridos com *NotI* e *BamHI* e ligados no vetor pEA-18 previamente clivado com as mesmas enzimas.

O pJR192 contém a fusão *gfp-ypbR* sob o controle do promotor *Pxyl* para integração no locus de *amyE*. O gene *ypbR* foi amplificado por PCR usando oligos OFG114 e OFG115, digerido com *NotI* e *BamHI* e clonado no vetor pJR74 cortando com *NotI* e *BamHI*.

3.16 Construção das cepas de *Bacillus subtilis*.

A cepa FG91 foi obtida pela transformação do plasmídeo pOR277-*divIVA* em PY79 seguida da seleção por cloranfenicol. Já a cepa FG96 foi obtida pela transformação do plasmídeo pOR277-*divIVA-gfp* em PY79 seguida da seleção por cloranfenicol.

FG117 foi obtida pela transformação da cepa RL802, que contém uma mutação pontual em *minD* (*divIVBI*) (Cha e Stewart, 1997) com o DNA da cepa FG94 (*divIVAΔ::spc*) (Ben-Yehuda et al., 2003), seguida da seleção com espectinomicina.

A cepa FG712 foi conseguida pela transformação da cepa FG135 (*amyE::Pspac-ftsZ-gfp* (*cat*)) com o plasmídeo pGUI-6 seguida da seleção com espectinomicina. A integração simples no cromossomo (Campbell) de pGUI-6 substituiu o gene *gfp* por *mcherry* (*BS*) no C-terminal de *ftsZ*.

A cepa FG718 foi obtida pela transformação da cepa FG859 (*chrΩPspac-ftsZ* (*ble*) *amyE::Pxyl-ftsA*(*cat*)) com o fragmento de PCR gerado da região *shp* final de *ftsZ* e contém a deleção in frame do gene *ftsA*, gerando o nocaute de *ftsA*.

JR09 foi obtida pela transformação de PY79 com o plasmídeo pJR13 seguida da seleção com canamicina.

JR22 foi obtida pela transformação de PY79 com o plasmídeo pJR20 seguida da seleção com cloranfenicol.

As cepas JR31, JR46, JR47 e JR64, JR125, JR126, JR128 e JR132, JR133, JR134, JR135 e JR136, JR137, JR143 e JR144, JR145, JR146 e JR147 foram obtidas através da transformação de diferentes cepas e os genótipos estão listados na tabela 2.

JR162 foi conseguida pela transformação da cepa JR47 com DNA genômico da cepa AIG107 (Aarsman et al., 2005), seguida da seleção com cloranfenicol na presença de IPTG.

JR180 foi obtida pela transformação de PY79 com o plasmídeo pJR192 seguida da seleção com fleomicina.

3.17 Construção do nocaute de *ypsB* e *ypbR*.

A deleção de *ypsB* foi obtida através da transformação de *B. subtilis* (PY79) com fragmentos de PCR amplificados das regiões flangeadoras de *ypsB* em fusão com o gene de resistência a canamicina. A deleção estende-se do

nucleotídeo 6 até 291 do gene *ypsB* e segue o protocolo “*long flanking homology PCR*” (Wach, 1996). Segundo este protocolo, a região anterior e posterior de *ypsB* foram amplificadas usando os oligos OFG158 e OFG159 e também OFG160 e OFG161, respectivamente. Em paralelo, o gene de resistência a canamicina foi amplificado com os oligos OFG112 e OFG113. Estes três fragmentos foram purificados e ligados por um novo ciclo de PCR na ausência dos oligos citados acima. Deste novo material obtido, uma alíquota (1/10) foi então submetida a um terceiro PCR, agora com os oligos OFG158 e OFG161, gerando um fragmento que foi purificado e transformado em *B. subtilis* competente e semeado meio seletivo. A presença do gene de resistência a canamicina no locus de *ypsB* foi confirmada através de PCR.

Para a deleção de *ypbR*, o protocolo utilizado foi o mesmo, onde os oligos utilizados para amplificar a região anterior (OFG106 e OFG107) e posterior (OFG108 e OFG109) e do cassete de canamicina (OFG112 e OFG113). Estes três fragmentos foram purificados e ligados por um novo ciclo de PCR na ausência dos oligos citados acima. Deste novo material obtido, uma alíquota (1/10) foi então submetida a um terceiro PCR, agora com os oligos OFG106 e OFG109, gerando um fragmento que foi purificado e transformado em *B. subtilis* competente e semeado meio seletivo.

3.18 Análise de Seqüência por bioinformática.

Seqüências de *ypsB* e *divIVA* foram obtidas dos bancos de dados SSDB (<http://www.genome.jp/kegg/ssdb/>) ou STRING (<http://www.bork.embl-heidelberg.de/STRING/>) (von Mering et al., 2005). O alinhamento foi feito usando o programa ClustalW (Thompson et al., 1994) e manualmente editado no programa Jalview (Clamp et al., 2004). As árvores filogenéticas foram construídas pelo programa RAxML (Stamatakis et al., 2005) usando o modelo de substituição WAG com parâmetros de máxima probabilidade.

3.19 Microscopia de Fluorescência.

A microscopia de fluorescência foi feita no microscópio invertido Nikon TE 300, contendo o filtro para GFP (Endow GFP set, 41018; Chroma Technology) e quando necessário para visualização de membranas, o corante FM4-64 foi adicionado. As proteínas de fusão com GFP foram visualizadas em células vivas, montadas em lâminas contendo uma camada sólida de agarose com meio de cultura. Todas as imagens capturadas foram processadas utilizando-se o software Metamorph (Universal Imaging, Media, PA) ou ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

3.20 Lâminas e câmaras para Microscopia de Fluorescência.

Células crescendo em fase exponencial foram colocadas numa lâmina contendo uma camada de agarose solidificada preparada com tampão PBS. Para a indução das proteínas em fusão com GFP e mCherry, foi adicionado 0,25% de xilose e 50mM de IPTG, respectivamente. Membranas foram coradas com FM4-64 (Molecular Probes) numa concentração final de 1µg/ml. A adição do corante ao meio aconteceu 5 minutos antes da análise no microscópio.

Para os experimentos de depleção, células foram adicionadas em câmaras. Estas câmaras são montadas da seguinte forma: Volumes de 1µl a 2µl de células são aplicados a uma capa de agarose (feita numa concentração de 1,5%) num tamanho de aproximadamente 5x5x1mm. Posteriormente esta mesma capa é fixada contra o fundo da câmara usando Low agarose (1,5%) nas bordas. As células, portanto, ficarão na camada intermediária entre a agarose e fundo da câmara. O fundo da câmara é formado por uma lamínula (15mm) fixada com silicone. Nesta câmara então é adicionado meio LB contendo o corante FM4-64 (0,5µg/ml) e indutor, quando necessário. As câmaras são incubadas a 37°C durante o tempo necessário para a depleção (normalmente de duas a três horas). O uso das câmaras melhorou a análise de filamentos de *Bacillus*, que são frágeis e sofrem lise durante a manipulação.

3.21 Esporulação de *Bacillus subtilis*.

A esporulação em *B. subtilis* começa com o crescimento das bactérias por 12h em meio de caseína hidrolisada (CH). No outro dia, as células são diluídas para uma OD600=0,1 e então incubadas a 37°C até atingirem OD600=1,0. Em seguida, as células são centrifugadas e transferidas para o meio de ressuspensão (A+B) (Sterlini e Mandelstam, 1969) por 1h30 e então coletadas. Após coletadas, as células são observadas no microscópio.

3.22 Fracionamento celular de *B. subtilis*.

Bacillus subtilis foram crescidas em culturas de 50ml até atingirem OD600=0,5 e então centrifugadas e “lavadas” duas vezes com o tampão 1X SMM em temperatura ambiente. Posteriormente as células foram ressuspensas em 1/10 volume de 1X SMM e então se tornaram protoplastos na presença de lisozima (0,5mg/ml). Os protoplastos foram submetidos à lise osmótica com 3ml de tampão hipotônico (tampão H). A esta reação também foram adicionados 1mM MgCl₂, 1mM CaCl₂, DNaseI (10 µg/ml) (*Sigma*) e RNase A (20 µg/ml)(*USB*) e deixados uma hora no gelo. Lisados foram centrifugados a 2000g para remover células intactas e fragmentos grandes celulares. O sobrenadante desta centrifugação foi cuidadosamente transferido para um novo tubo, recebendo o nome de extrato total. Depois, uma fração deste extrato total foi novamente centrifugado a 100.000g por 1h a 4°C. O sobrenadante retirado (chamado de S100) foi mais uma vez cuidadosamente removido e o “pellet” contendo a membrana das bactérias (chamado de P100) foi ressuspensado em tampão H no mesmo volume que o extrato total.

3.23 Western Blot.

Os lisados bacterianos foram submetidos ao gel de poliacrilamida sob corrente contínua e posteriormente transferidos para a membrana de

nitrocelulose através do Electro-Blotting System (C.B.S. Scientific Company, INC.) com o tampão de transferência em 200mA por 2h a temperatura ambiente. A membrana foi “bloqueada” por 2h com PBS contendo Tween-20% mais 5% de leite desnatado. Em seguida foi adicionado o anticorpo primário por um período de 2h e lavada em seguida com PBS Tween por três vezes. Depois foi adicionado o anticorpo secundário anti-rabbit IgG (Pierce) que contém HRP (Horseradish Peroxidase) conjugado por três horas. Após novas lavagens, as amostras foram visualizadas com o substrato para HRP (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce) em Kodak BioMax Light Film.

4. Resultados

4.1. Identificação de YpsB.

YpsB foi identificada a partir da análise de distribuição dos genes de divisão em genomas completos usando o banco de dados STRING, versão 6.3 (von Mering et al., 2005) como referência. O objetivo desta análise foi estudar a evolução dos componentes do divisoma, buscando uma justificativa biológica de como a distribuição desses genes entre os procariotos foi estabelecida. Foi feito um levantamento detalhado da distribuição destes genes em genomas completos de procariotos, aplicando o método de máxima verossimilhança para inferência de estados ancestrais e reconstrução do conteúdo gênico do divisoma no último ancestral comum das bactérias atuais (Souza RF, 2007). A distribuição destes genes envolvidos em divisão pode ser vista na Tabela 05, que mostra também que *divIVA* de *B. subtilis* aparentemente contém uma duplicação no genoma. Análises desta duplicação mostraram que se tratava de um novo gene, *ypsB*, que poderia estar envolvido em divisão.

Organism	Proto-ring (cytoplasmic)				Periplasmic connector			Peptidoglycan factory			Polar targeting				Assembly inhibitors			Taxonomy						
	FlaZ	FlaA	ZlpA	ZlpA	FlaE	FlaK	FlaK	FlaH	FlaB	FlaI	FlaF	FlaI	FlaC	FlaM	FlaC	FlaD	FlaE	FlaH	FlaK	FlaM	Class	Phylum		
CAIEP	1	1		1		1	1	1	1	2	2	1		1	1	1					γ	Proteobacteria		
BUCAP	1	1								1	1	1		1	1	1								
BUCIP	1	1								1	1	1		1	1	1								
ECOF	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	3					1							
HAEI	1	1	1	1	1	1	4	1	1	2	2	1	1											
PAMU	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1	1											
YECI	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1							
PROPR	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	3	3	1	1	1	1	1							
PREAE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	3	2	1	1	1	1	1			1				
JYLFA	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1							
COXBU	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1												
BOBSR	1	1			1	1	1	1	1	2	2	1	2	1	1	1	1							
RAISO	1	1			2	1	1	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1							
HEMA	1	1		1	1	1	2	1	1	1	1	3	1	1	1	1	1							
CHERO	1	1		1	1	1	2	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1							
INCCI	1	1		1			1	1	1	2	2													
WOLFB	1	1					1	1	1	2	2													
RRIME	2	1		1	1	1	3	1	1	1	2	1		1	1	1								
RDPA	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1	1												
CACOR	1	1		1	1	1	1	1	1	3	2	1												
HELFP	1	1					2			2	2	1		1	1	1								
CAMLE	1	1					1			2	2	1												
BIBEA	1	1			1	1	1			2	3	1					1							
CBOWL	1	1			1	1	1		1	2	3	1					1							
ATMPC	1						1			1	1	3		1	1	1	1							
ANAMP	1				1	1	1			2	2	0		1	1	1	1							
RYMEL	1				1	1				2	2	2		1	1	1	1							
QYHPE	1						1			2	2	1		1	1	1	1							
PRONA	1						1			2	2	1		1	1	1	1							
SLONI	1				1	1	1			2	2	3		1	1	1	1							
DEIBA	1	1			1	1	1	1		1	1	6		1	1	1	1					Deltaproteobacteria		
TIETZ	1	1			1	1	1	1		2	2	2		1	1	1	1					Thaumarchaeota		
THINA	1	2								2	2			1	1									
ACUNE	1	1								2	2	1		1	1									
FUNMI	1	1				1				2	2	1		1	1	1								
BOBSU	1	1				1	1	1		2	2	2												
LEPIC	1	1								2	2	1												
WICBA						2																		
THIBO	1				1	1	1			2	2					1								
WIFLO	1				1	1	2		1	2	2					2								
COEPE	1				1	1	2		1	1	2	3	1											
MYCPA	1				1	1	6			2	3	3				2								
MYCO	1				1	1	12		1	1	1					2								
POBGI	1	1			1	1	1			2	2	1												
CHLTE	1	1			1	1	1			2	2	1												
CHLPI				1						2	2	1												
CULTI										2	2	1												
MYCSA	1																							
MYCFI	1																							
URSPA								1																
MYCFU	1															1								
MYCDS	1							1								1								
QNYFE																								
LACPL	1	1					2	1	1					1	1		2							
LACLD	1	1					2	1									2							
STMPH	1	1			1	1	1	1	1	2	2						2							
STIMU	1	1			1	1	2	1	1	1							2							
LACLA	1	1			1	1	1	1	1	3	2						2							
MYCBI	1	1			1	1	2	1	1	1							2							
BACBU	1	1		1	1	1	4	1	1	1	3	6	5		1	1		2						
BACBO	1	2			1	1	1	3	1	1	1	4	5	7		1	1		2					
LIBNO	1	1			1	1	1	4	1	1	1	6	3	2		1	1		2					
ITAEF	1	1			1	1		2	1	1	1	2	7	1					2					
CLOPE	1	1			1	1	1	1	1			3	6	4		1	1	1	2					
CLOMB	1	2			1	1	2	5	1			3	9	1		1	1		2					
CLOVE	1	2			1	1	1	1	1			3	4	7		1	1		2					
THETH	1	2			1	1	1	1	1			3	5	2		1	3	1	2					
METMA	2																							
BALSA	5																							
ANERE																								
MARBO	2																							

Tabela 05: Distribuição dos genes que codificam proteínas homólogas de componentes do complexo de divisão celular. Na primeira linha encontram-se os sub-componentes do complexo e as células coloridas do lado direito correspondem aos grupos taxonômicos. Em vermelho destaca-se onde está *B. subtilis* e a duplicação da proteína DivIVA. Em cinza está o número de cópias de cada proteína na espécie e em branco, a ausência destas proteínas nestes organismos.

O gene *ypsB* codifica uma proteína de 98 aminoácidos anotada no banco de dados de *B. subtilis* (Subtilist: <http://genolist.pasteur.fr/SubtiList/>) como “proteína de função desconhecida”. O gene está localizado a 200 graus no cromossomo, num operon com outro gene, *ypsA*, também anotado como de função desconhecida (figura 05). Alinhamentos de DivIVA de baixa “estrangência” (limite alto de E-value), encontraram YpsB, todavia, em condições de E-value mais baixos, YpsB não foi detectado. Isto se deve ao fato que a similaridade entre DivIVA e YpsB é de apenas 20% e talvez explique por que a semelhança entre DivIVA e YpsB não foi registrada quando da anotação do genoma de *B. subtilis*.

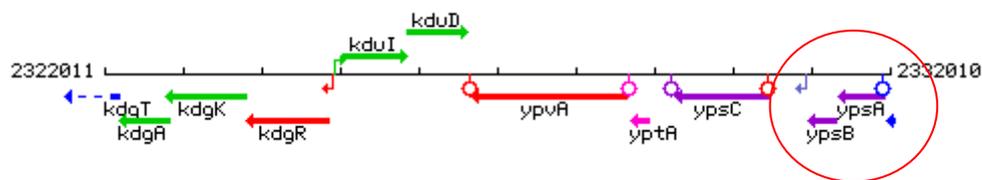


Figura 05: Região do cromossomo de *B. subtilis* onde está localizado o operon *ypsAB* (marcado pelo círculo na figura).

Os resultados assinalados na tabela 05 mostraram a conservação das proteínas de divisão entre as bactérias. Aplicando a mesma metodologia para YpsB, determinamos sua distribuição em diferentes genomas. Para isso, usamos novamente o banco de dados STRING versão 6.3 (von Mering et al., 2005) (<http://string.embl.de/>) que sinalizou a presença de YpsB em diversas espécies gram-positivas como *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Lactobacillus*.

Apesar da baixa similaridade de seqüência entre DivIVA e YpsB, a região N-terminal destas proteínas, de aproximadamente 40 aminoácidos, contém vários resíduos invariáveis entre elas, revelando uma “assinatura” para estas proteínas (Figura 06). Já as regiões C-terminais de DivIVA e YpsB exibem

diferenças tanto em tamanho como na identidade de resíduos. Em relação ao tamanho, as análises em *B. subtilis* mostraram que DivIVA contém 66 aminoácidos a mais que YpsB. Esta diferença de tamanho também é vista nos homólogos de outras espécies e ocorre principalmente pelo fato que YpsB apresenta uma deleção dentro da região homóloga à região de DivIVA que codifica a alfa-hélice (coiled coil) necessária para a oligomerização (Edwards et al., 2000, Howard, 2004).

Já em termos de identidade, YpsB possui no C-terminal os resíduos TNFDILKRLSNLEKHFVFG, que são altamente conservados nas proteínas YpsB de diferentes espécies mas não são encontrados em DivIVA (Figura 06).

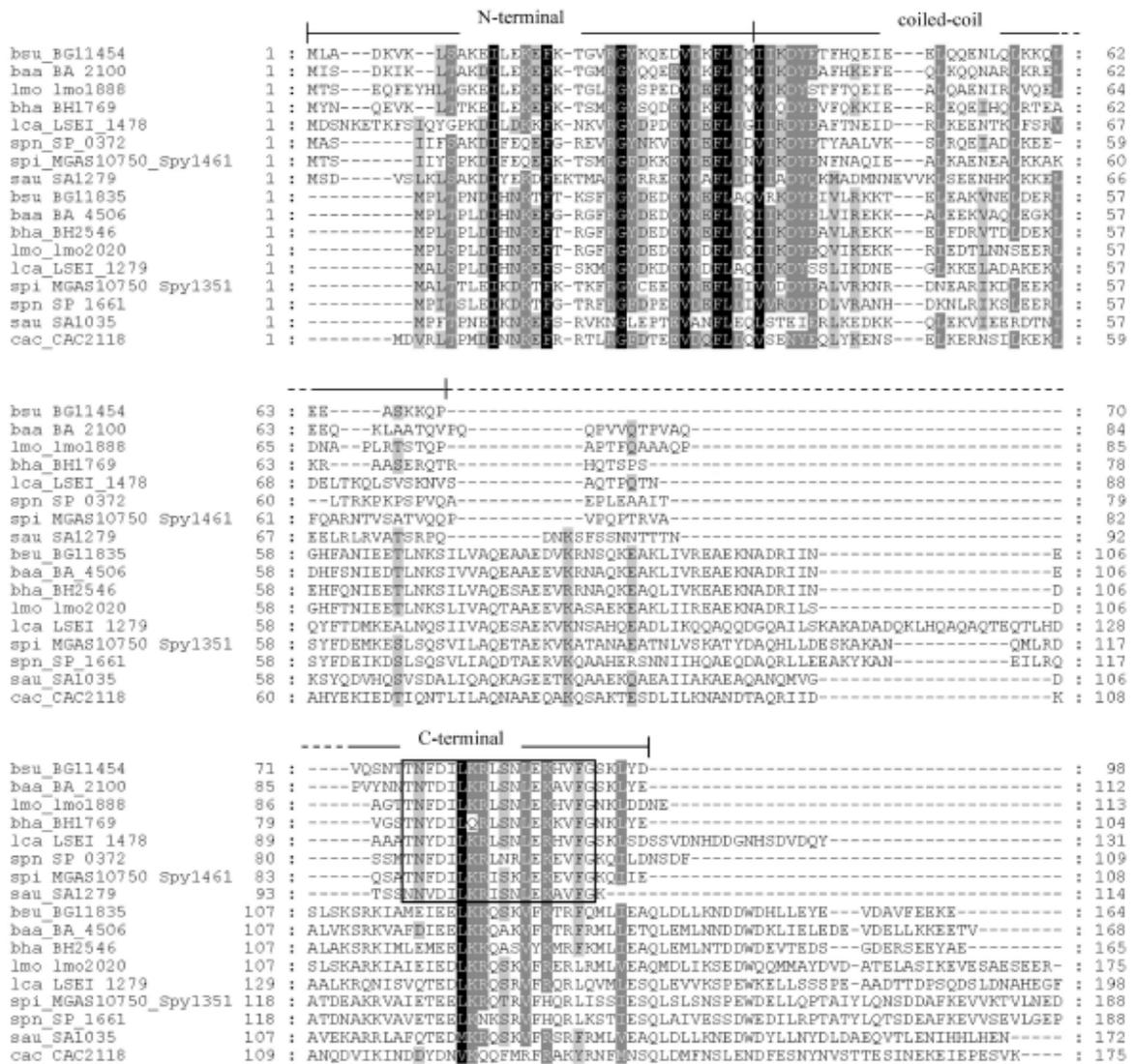


Figura 06: Alinhamentos de sequência entre YpsB e DivIVA de diferentes espécies. Em cinza estão os resíduos comuns entre as duas proteínas. Nesta figura estão indicadas as três regiões de YpsB, a N-terminal, a coiled coil e a C-terminal. No C-terminal podemos ver uma caixa com os resíduos altamente conservados que são característicos de YpsB. Sequências são identificadas pelos códigos dos organismos e números de acessos do banco de dados SSDB (<http://www.genome.jp/kegg/ssdb/>). Os organismos analisados foram: *Bacillus anthracis* A2012 (*baa*), *Bacillus halodurans* (*bha*), *Bacillus subtilis* (*bsu*), *Clostridium acetobutylicum* (*cac*), *Lactobacillus casei* (*lca*), *Listeria monocytogenes* EGD-e (*lmo*), *Staphylococcus aureus* N315 (*sau*), *Streptococcus pyogenes* MGAS10750 (serovar M3) (*spi*), e *Streptococcus pneumoniae* (*spn*).

Com o intuito de obter mais informações sobre YpsB, foi analisada também a vizinhança genômica desta proteína. Para isso, usamos novamente o STRING que detectou duas proteínas vizinhas de YpsB em diferentes espécies gram-positivas. A primeira delas é a resolvase RecU, que está relacionada com a partição dos cromossomos e reparos no DNA (Petersen e Setlow, 2000) e a outra é PBP1 (gene *ponA*) “penicillin binding protein 1”, envolvida em síntese de parede lateral e septal em *B. subtilis* (Scheffers et al., 2004, Claessen et al., 2008) (figura 07).

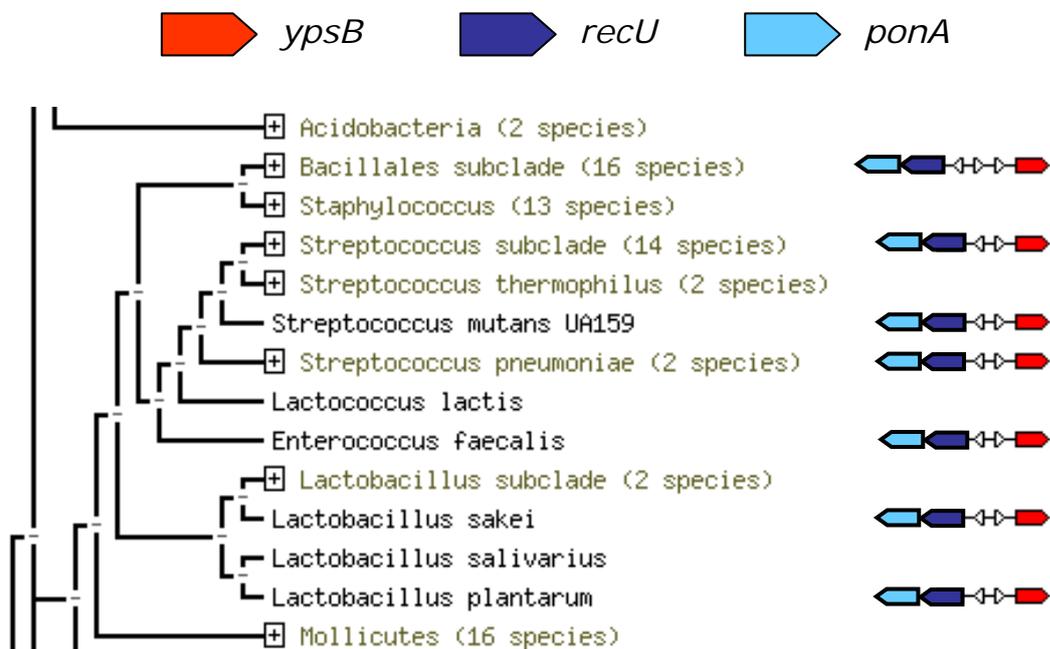


Figura 07: Análises do STRING mostrando a conservação de vizinhança de *ypsB* com *ponA* e *recU* em diferentes espécies de bactérias.

Além das análises de vizinhança, buscamos em YpsB algum domínio conservado já caracterizado. Para isso fizemos buscas no Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>), um banco de dados que disponibiliza seqüências de famílias de proteínas que compartilham domínios em diferentes espécies.

Os resultados revelaram que YpsB não contém domínios protéicos reconhecidos, além de uma região provável de coiled-coil semelhante à encontrada em DivIVA (Edwards et al., 2000, Howard, 2004). Este coiled coil, também foi detectado pelo programa de predições de estruturas secundárias Paircoil2 (<http://groups.csail.mit.edu/cb/paircoil2/paircoil2.html>), confirmando que a região entre os aminoácidos 32 e 70 de YpsB deve ser de fato uma coiled-coil.

Como existe similaridades entre DivIVA e YpsB, buscamos desvendar qual a história evolutiva destas proteínas. Para isso, usamos seqüências de DivIVA e YpsB de bactérias da ordem dos *Lactobacillales* e *Bacillales* e também de um subgrupo dos *Bacillales*, a bactéria *Clostridium acetobutylicum*, da família *Clostridium*. Todas estas seqüências foram utilizadas para gerar uma árvore filogenética. Os resultados apontam para uma paralogia entre estas duas proteínas, reflexo da duplicação de *divIVA* em um novo gene *ypsB*. Esta duplicação ocorreu possivelmente no ancestral comum entre as espécies aqui analisadas, como pode ser visto na figura 08.

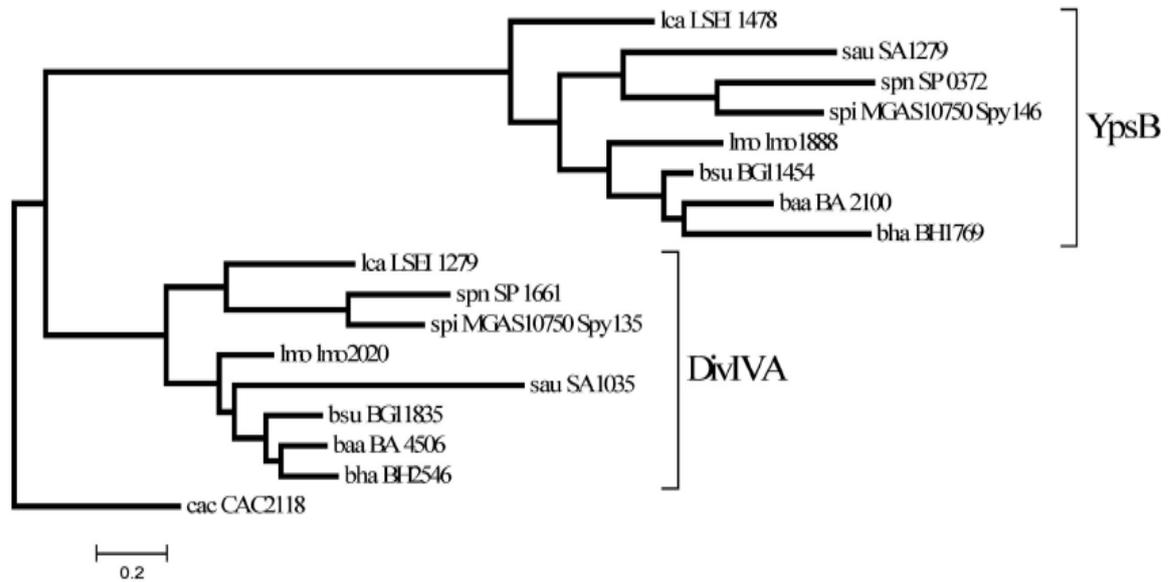


Figura 08: Árvore filogenética construída a partir dos dados de seqüência da figura 06. Os organismos presentes são: *Bacillus anthracis* (*baa*), *Bacillus halodurans* (*bha*), *Bacillus subtilis* (*bsu*), *Clostridium acetobutylicum* (*cac*), *Lactobacillus casei* (*lca*), *Listeria monocytogenes* (*lmo*), *Staphylococcus aureus* (*sau*), *Streptococcus pyogenes* (*spi*) e *Streptococcus pneumoniae* (*spn*).

4.2 Localização Subcelular de YpsB.

A similaridade de seqüência entre DivIVA e YpsB sugeriu que a proteína poderia estar envolvida em divisão. Para testar esta premissa, fusionamos YpsB com a proteína verde fluorescente (GFP), tanto no C-terminal como no N-terminal como descrito em materiais e métodos. A fusão N-terminal (GFP-YpsB) está sob o controle de um promotor indutível, o P_{xil} , que responde à presença de xilose quando adicionado ao meio de cultura.

Esta fusão foi inserida no locus de *amyE*, um gene não essencial de *B. subtilis*, resultando numa célula merodiplóide, isto é, uma célula que contém a versão natural do gene (cópia selvagem) além da outra cópia inserida. Já a fusão C-terminal de *ypsB* foi integrada por crossing-over simples de *ypsB-gfp* no

operon *ypsAB*, ficando então a fusão *ypsB-gfp* sob o controle do promotor natural de *ypsB*. O esquema dos plasmídeos e a integração podem ser vistos na figura 09.

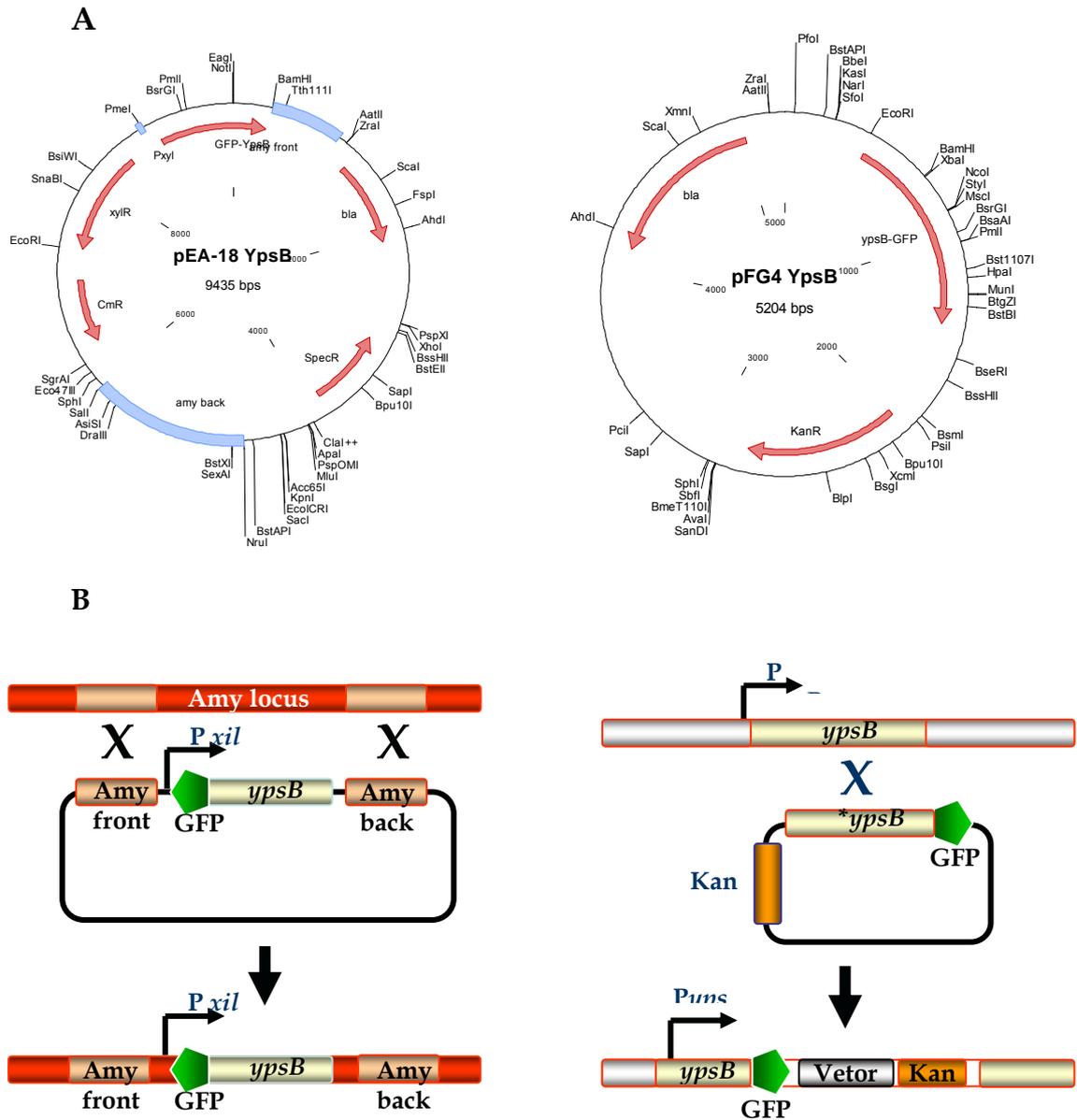


Figura 09: (A): Mapa dos plasmídeos pJR20 e pJR47 usados para integração do gene *ypsB* no genoma de *B. subtilis*. (B): Esquema da integração no cromossomo através do crossing-over duplo no locus *amyE* (pJR20) e do crossing-over simples no locus de *ypsB* (pJR47).

Os testes de microscopia de fluorescência com a fusão GFP-YpsB em células crescendo em fase exponencial na presença de 0,25% de xilose mostraram que YpsB estava localizada na região do septo (figura 10a). Um possível problema deste experimento é o fato de que a indução de uma segunda cópia de *ypsB* (a fusão GFP-YpsB) deve levar à super-expressão da proteína, o que poderia gerar resultados não fidedignos sobre a sua localização. Para descartar este possível problema, testamos a fusão YpsB-GFP, que contém apenas uma cópia do gene sob o controle do promotor natural e mesmo sob estas condições a proteína continua localizando no sítio de divisão (Figura 10b).

Além das análises com YpsB, analisamos em paralelo o padrão de localização para DivIVA (Edwards e Errington, 1997). Ao compararmos YpsB com DivIVA (figura 10c) vemos que o perfil de localização de uma proteína e da outra são diferentes. YpsB é encontrada apenas em sítios onde o divisomo está sendo montado, o que é diferente de DivIVA, que é vista nos sítios onde o divisomo está sendo montado e também nos pólos da célula (que são sítios de divisão antigos).

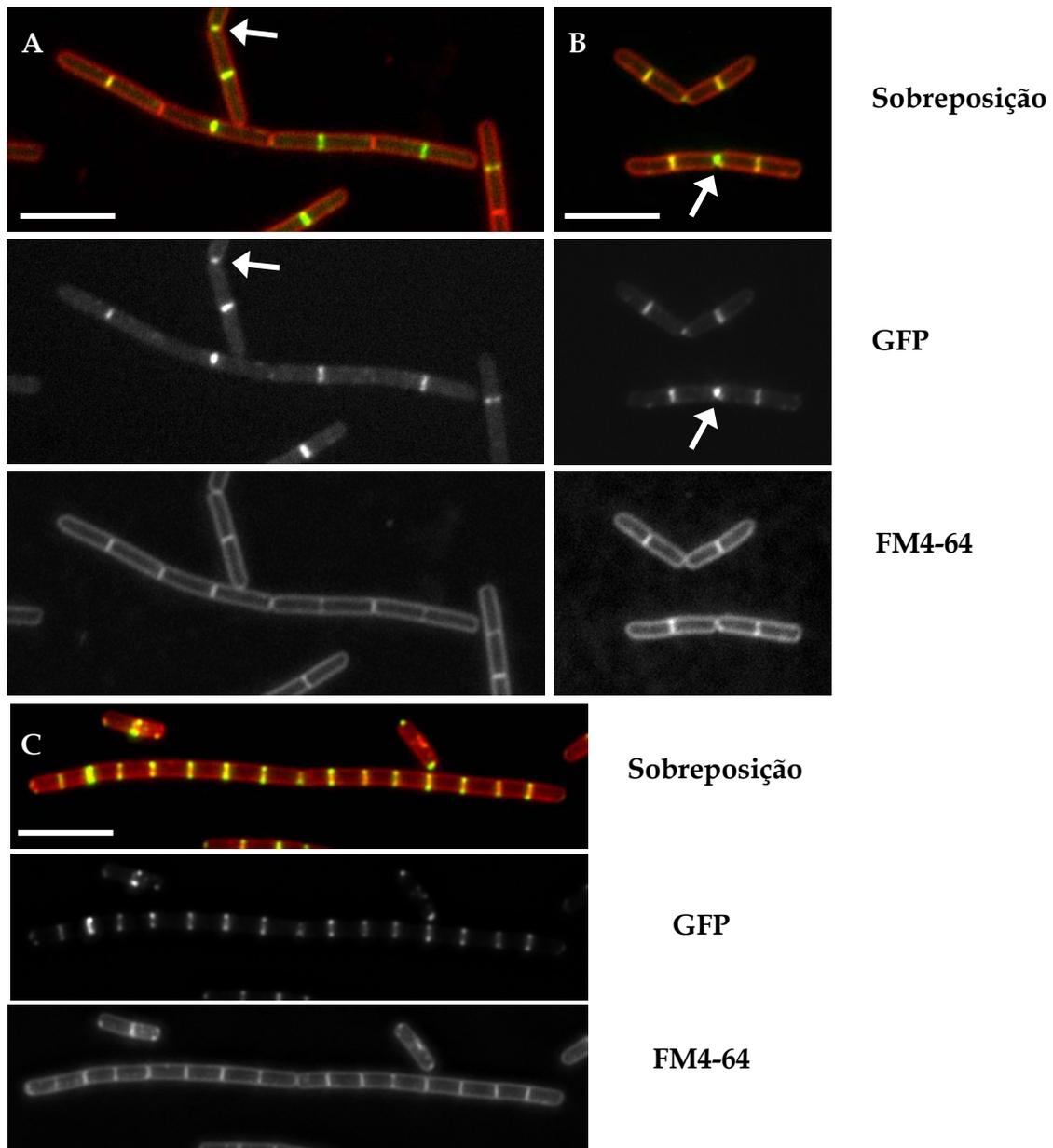


Figura 10: YpsB localiza-se no sítio de divisão na célula. **(A)** Localização de GFP-YpsB no sítio de divisão em *B. subtilis* **(B)** Localização de YpsB-GFP no divisoma. Setas indicam a localização de YpsB no divisoma da bactéria. **(C)** Localização de DivIVA-GFP nas células em divisão. DivIVA está presente nos septos em formação e pólos da célula (sítios antigos de divisão). **(D)** Localização da fusão GFP-YpsB na cepa nocaute *ypsB⁻*. Barra = 5 μ m.

Além das cepas merodiplóides, fizemos testes de localização da proteína GFP-YpsB na cepa nocaute (*ypsB*⁻). A cepa nocaute foi obtida pelo método “*long flanking homology PCR*” (Wach, 1996) e a fusão GFP-YpsB foi inserida no locus de *amyE* desta cepa nocaute. Após crescimento das células, observamos por microscopia a localização de GFP-YpsB e os resultados mostraram que o perfil de localização da proteína foi o mesmo que na cepa merodiplóide, indicando que a fusão GFP-YpsB é capaz de se associar ao complexo de divisão mesmo na ausência da proteína YpsB selvagem (Figura 11).

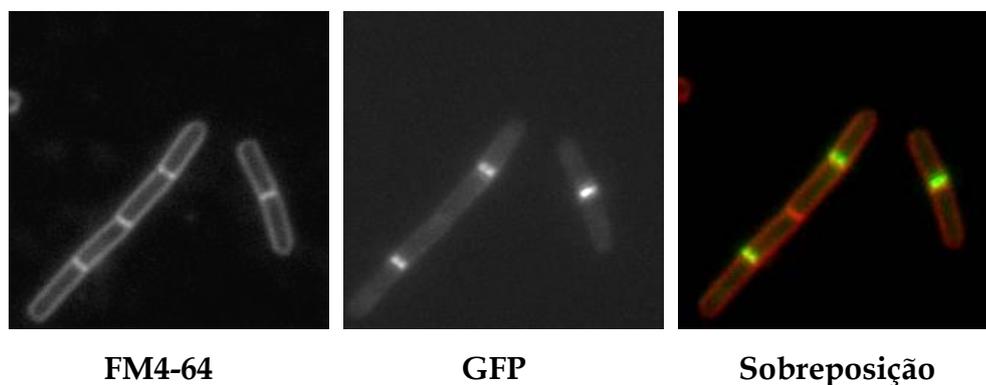


Figura 11: Microscopia de fluorescência de GFP-YpsB na cepa nocaute (*ypsB*⁻) durante crescimento em fase vegetativa.

4.3 Afinidade de YpsB pela membrana de *B. subtilis*.

Na figura 15, YpsB além de localizar na região do septo, também pode ser vista na região periférica da membrana. Este padrão de localização sugere que YpsB possua afinidade pela membrana. Isto foi sugerido também pelo programa AmphipaSeeK (Sapay et al., 2006) (<http://npsa-pbil.ibcp.fr/>), que identificou na região N-terminal de YpsB uma alfa-hélice anfipática que poderia mediar uma interação da proteína com a membrana (figura 12) .

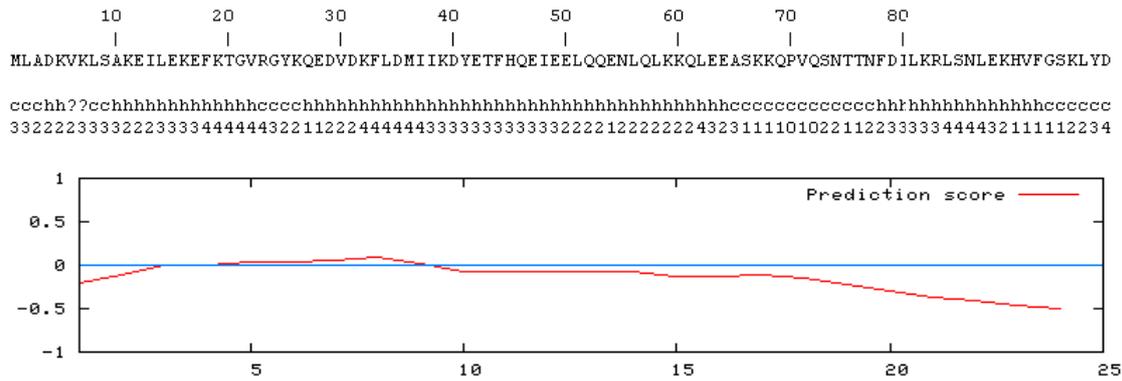


Figura 12: Análise de seqüência de YpsB através do programa AmphipaseK mostrando na região N-terminal a alfa-hélice anfipática capaz de se ligar à membrana. Neste gráfico vemos a seqüência da proteína (acima) e o resultado da análise (linha vermelha no gráfico) que reflete a região de YpsB capaz de formar a alfa-hélice, vista acima da linha de base.

A afinidade de YpsB pela membrana foi testada experimentalmente através de fracionamento celular. Para este experimento, utilizamos como controles a fusão SpoIVFB-GFP, uma proteína integral de membrana e FtsZ-GFP, uma proteína citoplasmática. Após lise das células e fracionamento subcelular por centrifugação, submetemos as amostras a SDS-PAGE, e detectamos as proteínas nas diferentes frações sub-celulares por Western blot com anticorpo anti-GFP. Os resultados desta análise mostraram que YpsB estava presente tanto na fração solúvel como na fração de membrana (Figura 13).

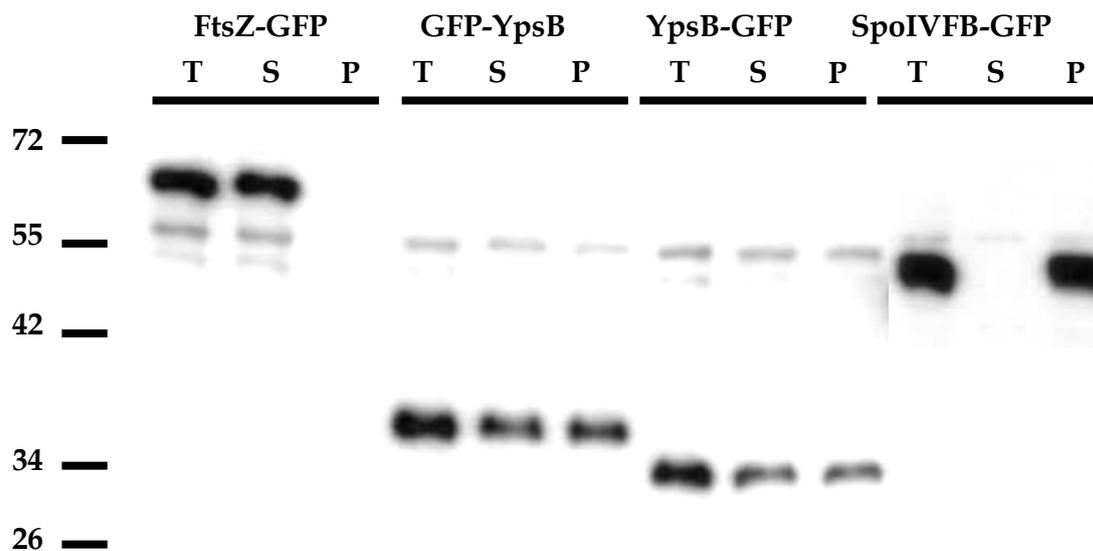


Figura 13: GFP-YpsB e YpsB-GFP estão associadas à membrana. Western blot dos extratos fracionados das cepas expressando fusões com GFP. T= Total, S= sobrenadante, P= Precipitado. Cepas: FtsZ-GFP, GFP-YpsB, YpsB-GFP e SpoIVFB-GFP. Volumes iguais das diferentes frações foram aplicados em gel SDS-PAGE e posteriormente transferidos para membrana de nitrocelulose e reconhecidos com anticorpos anti-GFP. FtsZ é uma proteína presente na fração do citoplasma e SpoIVFB é uma proteína integral de membrana. Ambas são usadas como controle neste experimento.

4.4 Análise de YpsB durante a esporulação.

Além da fase vegetativa, estudamos YpsB também durante a esporulação, uma situação onde o septo de divisão sofre uma mudança de posição com deslocamento para um dos lados da célula. O objetivo foi investigar se YpsB acompanhava esta mudança de posição. Para isso, a cepa GFP-YpsB foi submetida à esporulação por 1h30 e analisada por microscopia de

fluorescência. Os resultados podem ser vistos na figura 14 e confirmam a presença de YpsB no septo assimétrico durante a esporulação.

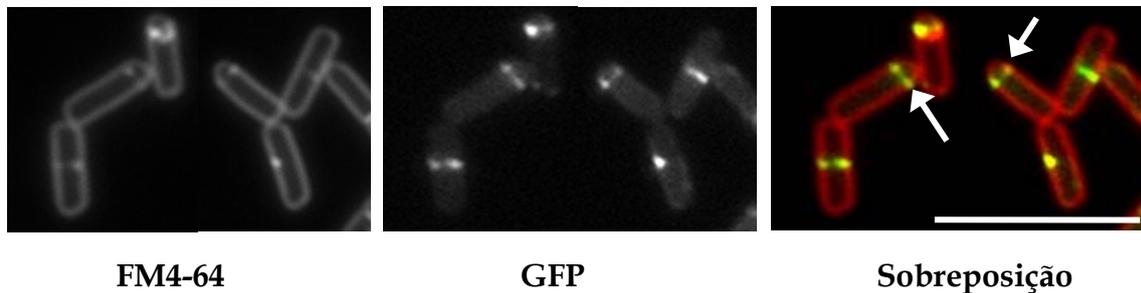


Figura 14: Cepa contendo a fusão GFP-YpsB durante a esporulação em *B. subtilis*. Setas indicam YpsB no septo assimétrico. Barra = 5 μ m.

Além das análises com GFP-YpsB, testes com a cepa YpsB-GFP também foram feitos durante a esporulação. Nesta situação, os resultados vistos anteriormente não se confirmaram, pois a cepa esporulou ineficientemente, mesmo estando YpsB-GFP sob o controle do seu promotor nativo. Uma das possibilidades para explicar a ineficiência na esporulação envolve o fato de que a fusão GFP no C-terminal tenha gerado um “efeito polar” no gene abaixo de *ypsB*, no caso *rnpB*, o componente catalítico da ribonuclease P (RNaseP), influenciando a eficiência de esporulação desta cepa.

4.5 Co-localização de FtsZ e YpsB.

Como vimos anteriormente, as proteínas de divisão são recrutadas para o divisomo numa determinada ordem, ou seja, existe uma dependência entre elas para localização e montagem do divisomo em *B. subtilis* (Vicente e Rico, 2006) (Figura 04). Esta ordem de montagem sinaliza para uma seqüência temporal, portanto, cinética, de associação das proteínas para a montagem do complexo. Assim, quanto maior for a porcentagem de co-localização de uma determinada proteína com FtsZ, menor é o tempo que a proteína leva para se associar ao

divisomo. Análises do nosso laboratório confirmam esta informação, tanto que a taxa de co-localização de FtsZ com a proteína ZapA é de 95% e com EzrA, de 96%.

Para determinar quando ocorre a associação de YpsB ao divisomo, realizados estudos de co-localização entre YpsB e FtsZ (Figura 15).

Análises de microscopias da co-localização de GFP-YpsB e FtsZ-mCherry em populações de células em crescimento mostraram que YpsB-GFP co-localiza com o anel Z numa taxa de aproximadamente 50%. Frequências de co-localização de DivIVA e FtsZ medidas por nosso laboratório pelo aluno Guilherme Louzada mostram uma taxa de 42%, que é muito parecida com YpsB sugerindo que a associação entre elas aconteçam num estágio muito parecido.

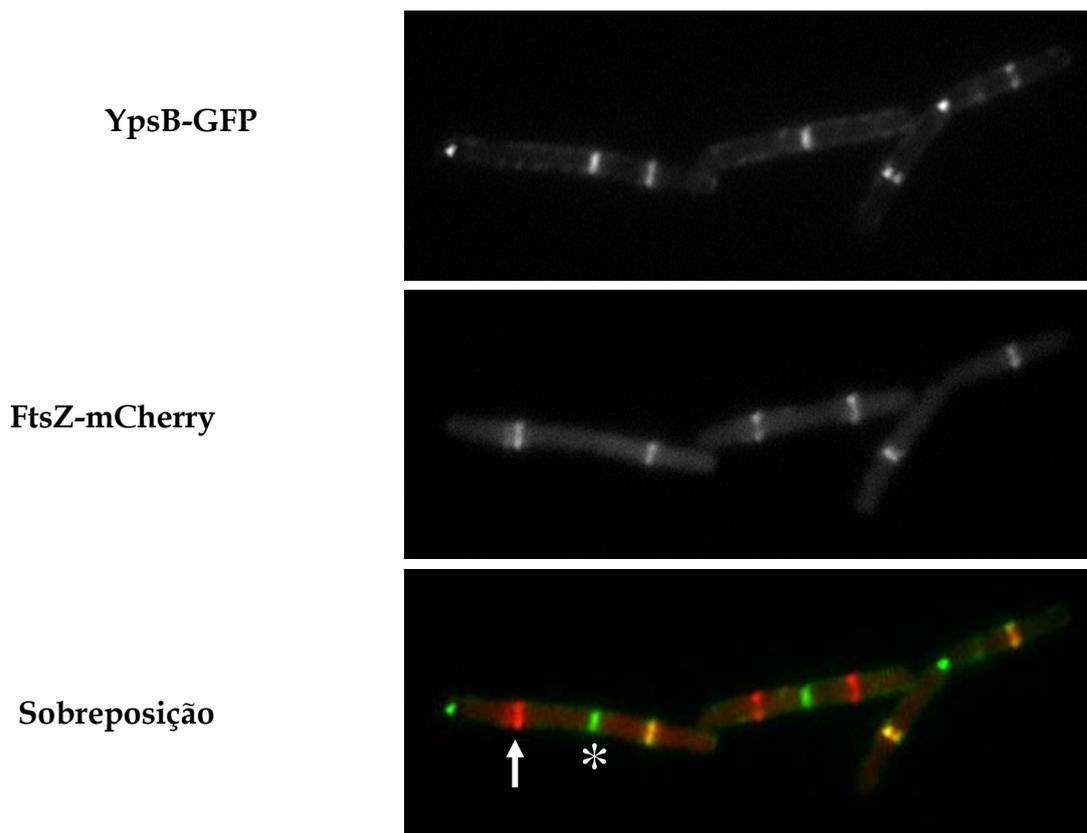


Figura 15: YpsB é recrutada tardiamente para o divisomo. Co-localização de FtsZ e YpsB. Cepa expressando FtsZ-mCherry e YpsB-GFP analisada por microscopia de fluorescência. Flechas indicam anéis Z que não contém YpsB-

GFP e possivelmente representam anéis nos estágios iniciais de montagem. Asteriscos indicam YpsB-GFP no septo de divisão provavelmente no final da divisão, quando FtsZ já saiu do complexo.

Nesta mesma figura alguns septos contêm apenas FtsZ, enquanto que em outros a proteína preferencial é YpsB. A presença de FtsZ sem YpsB indica que o septo está nos estágios iniciais da montagem do complexo de divisão. Já nos casos onde apenas YpsB pode ser vista, inferimos que representem septos nos quais o processo de divisão está no seu final, quando FtsZ já se dissociou do complexo. É provável que YpsB possa ser visto nestes sítios porque a proteína tem afinidade pelo septo mesmo após o término da divisão (figura 15). Esta afinidade pelo septo formado (ou novo pólo) não deve ser tão grande quanto a de DivIVA pois YpsB não se mantém por muito tempo nos sítios de divisão completos.

4.6 Recrutamento de YpsB para o divisomo.

Estudos conduzidos em *E. coli* e *B. subtilis* mostraram que a montagem do complexo de divisão segue uma ordem ou hierarquia, ou seja, existe uma dependência entre as proteínas componentes para localização e montagem do divisomo nestas bactérias. Esta montagem, porém, não segue um percurso linear, mas um modo cooperativo, onde várias proteínas podem localizar no septo de forma interdependente (Vicente e Rico, 2006).

No caso de *B. subtilis*, a hierarquia é composta por quatro estágios. O primeiro deles está relacionado com a polimerização de FtsZ na região central da bactéria, formando o anel Z. O próximo estágio envolve a interação das proteínas que se ligam diretamente a FtsZ ajudando na sua estabilização, como FtsA, ZapA e SepF. O terceiro passo inclui proteínas com domínios extracelulares envolvidas em síntese de peptídeoglicano (DivIB, DivIC, FtsL,

PBP2B e FtsW). Já o último estágio envolve a associação de MinCD e DivIVA no divisomo, praticamente quando a divisão já está terminando e marca o novo pólo da célula.

Para determinar a dependência de YpsB para associar-se a divisomo nós inferimos como a ausência de uma determinada proteína do complexo poderia influenciar a localização de YpsB. Para isso, usamos cepas condicionais e termo-sensíveis para as proteínas de divisão, como FtsZ, FtsA, DivIC, PBP2B e DivIVA que são integrantes dos quatro estágios citados acima.

A primeira análise de dependência foi feita na ausência de FtsZ. FtsZ além de ser a principal proteína do divisomo pode ser utilizada como controle neste experimento. Até o momento nenhuma proteína envolvida com divisão é capaz de localizar sem FtsZ e desta forma, verificamos se YpsB seguia a mesma tendência. Usando a cepa de expressão de FtsZ regulada por IPTG porém, sem o indutor para FtsZ, as células ficam filamentosas e após duas horas os resultados mostraram que na ausência de FtsZ a proteína YpsB ficava distribuída por toda célula, perdendo sua localização, indicando mais uma vez que ela é um integrante da maquinaria de divisão (Figura 16).

Seguindo as análises, a próxima proteína retirada foi FtsA. Para isto usamos uma cepa nocaute *ftsA*⁻ contendo no locus de *amyE* o gene *ftsA* sob o controle de um promotor indutível. Após duas horas sem indutor, as células sem FtsA também ficam filamentosas e YpsB não era capaz de localizar no septo de divisão, indicando que a incorporação de YpsB acontece após FtsA. (Figura 16).

A próxima proteína retirada do sistema foi DivIC, que está ancorada na membrana e participa da ligação da região citoplasmática do divisomo com as proteínas da fábrica de peptidoglicano. O mutante temperatura-sensível *divIC(Ts)* analisado por microscopia apresentou YpsB totalmente espalhado pela célula (Figura 16). Da mesma forma que DivIC, caracterizamos também YpsB na ausência da proteína PBP2B. Para isso, utilizamos a cepa nocaute *pbpB*⁻ contendo o gene *pbpB* sob o controle do promotor indutível P_{spac}. Após duas

horas sem indutor, as células sem PBP2B ficam filamentosas e YpsB não era capaz de localizar no septo de divisão (Figura 16).

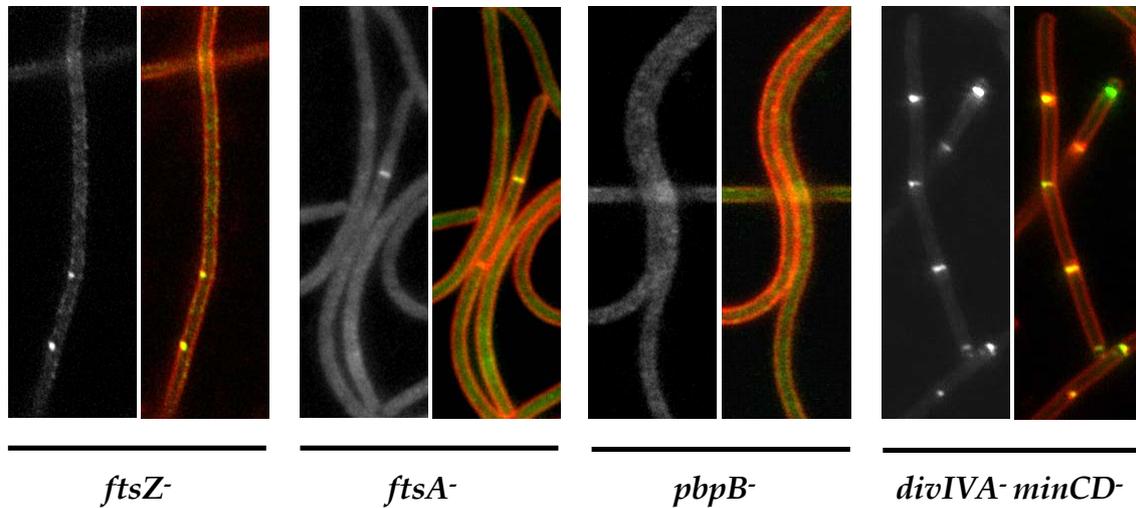


Figura 16: Recrutamento de YpsB para o divisomo de *B. subtilis*. Localização de YpsB-GFP e GFP-YpsB nas cepas mutantes. As fusões GFP no N ou C-terminais foram introduzidas em diferentes mutantes de divisão e analisadas durante crescimento vegetativo. Para mutantes de genes essenciais, alelos condicionais (depleção ou mutante termo sensível) foram usados. Neste caso, os mutantes cresceram por aproximadamente cinco gerações sob condições restritivas antes de ser analisadas por microscopia. Para cada mutante o painel da esquerda representa a localização de YpsB e o painel da direita a sobreposição de YpsB com a membrana contendo o corante FM4-64. Genótipos das cepas utilizadas nesta análise podem ser vistas na tabela 02 em materiais e métodos.

Estes resultados sobre dependência de YpsB sinalizam para uma localização tardia da proteína. Se imaginarmos o divisomo na ausência de DivIC, por exemplo, podemos assumir que parte do divisomo é montado, e que na ausência de DivIC, o restante do complexo não é recrutado culminando em filimentação (Figura 17). Para corroborar este modelo de montagem parcial do divisomo, co-localizamos FtsZ-mCherry e YpsB-GFP na cepa *divIC* (*Ts*). Como

pode ser visto na figura 17, a bactéria apresenta os anéis de FtsZ, confirmando o modelo anterior de estrutura mínima do complexo e reforça a idéia de que YpsB é recrutado tardiamente, pois ele não é capaz de se associar ao divisomo incompleto na ausência de DivIC, ficando por todo citoplasma (Figura 17).

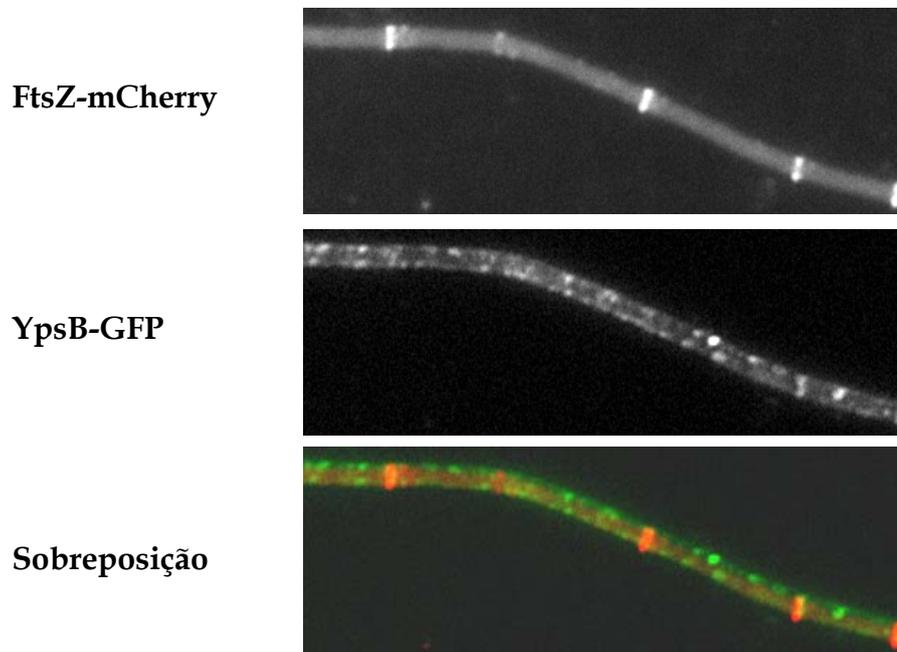


Figura 17: Localização de FtsZ-mCherry e YpsB-GFP na cepa *divIC* (*Ts*). O mutante cresceu por cinco gerações sob condições restritivas antes de ser analisadas por microscopia.

Finalmente, investigamos também se YpsB necessitava de DivIVA para localizar no septo. Desta forma, testamos se YpsB depende de DivIVA para ligar-se ao divisomo através da expressão de YpsB-GFP na cepa duplo mutante (*divIVA*⁻, *minCD*⁻). Este duplo mutante tem fenótipo de filamentação e mini-células, porém menos severo que o mutante *divIVA*⁻ simples, que é letal, por não ser mais capaz de reter os inibidores MinCD nos pólos e desestabilizar FtsZ culminando na morte da célula. O resultado mostrou que YpsB é capaz de se localizar nos septos mediais e nos septos assimétricos (que vão gerar futuramente as mini-células) (Figura 16).

Para monitorar a integridade da proteína YpsB nas cepas condicionais FtsZ, FtsA, DivIC e PBP2B fizemos um Western blot para detectar GFP-YpsB ou YpsB-GFP (figura 18). O resultado mostrou que a filamentação não afeta a estabilidade de GFP-YpsB ou YpsB-GFP e que a perda de localização era fruto da ausência das proteínas testadas, não da degradação de YpsB (Figura 18).

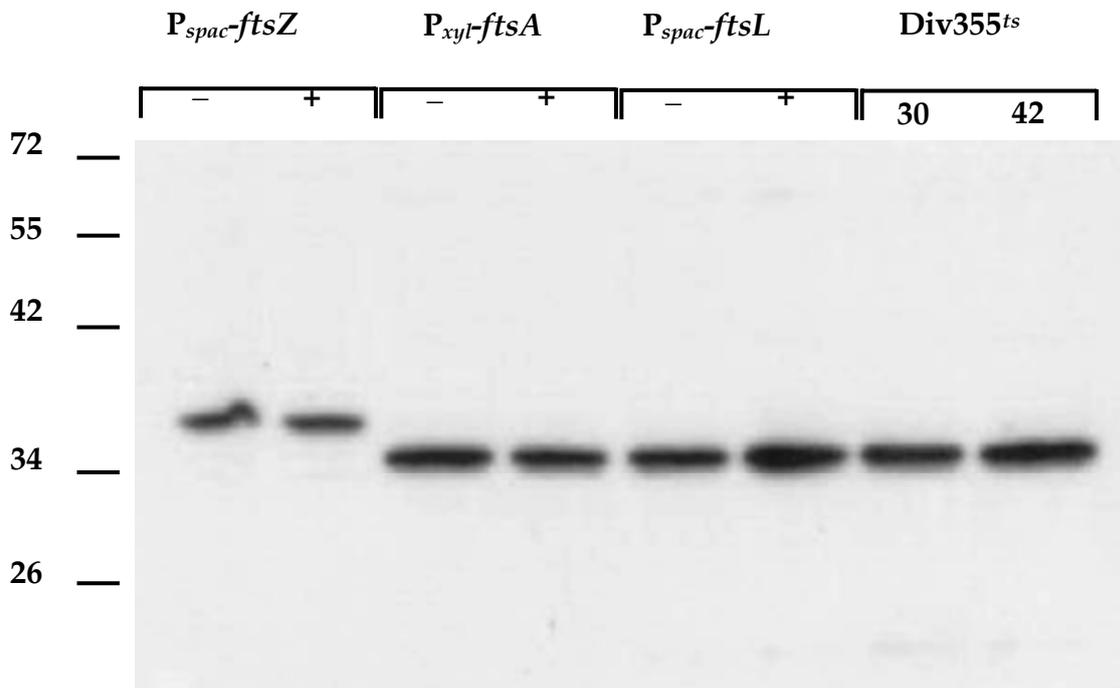


Figura 18: Western blot mostrando a estabilidade de YpsB durante a filamentação induzida pela ausência de diferentes proteínas de divisão. As cepas: *P_{spac}-ftsZ* (cepa JR64), *P_{xyl}-ftsA* (cepa JR128), *P_{spac}-ftsL* (cepa JR162), *Div355^{ts}* (cepa JR125) cresceram por duas horas, coletadas e após SDS-PAGE, analisadas por W. blot com anticorpo anti GFP (ver materiais e métodos).

4.7 Associação de YpsB com o divisomo.

Para definir a região (ou regiões) de YpsB importantes para sua associação ao divisomo, nós construímos uma série de deleções em YpsB. As deleções foram baseadas no alinhamento múltiplo feito com esta proteína (figura 06), que a divide em três regiões. A primeira região é a N-terminal e

envolve os aminoácidos entre 1 e 36. Já a segunda região, estende-se dos aminoácidos 37 a 70 e compreende o “coiled-coil” de YpsB. O C-terminal de YpsB ficou entre os aminoácidos 71 a 98 e foi determinado como a terceira região de YpsB. Todas as deleções foram fusionadas ao GFP na região N-terminal da proteína culminando nas seguintes deleções: GFP-N, que contém apenas o N-terminal, GFP-N-cc, que contém o N-terminal e o coiled-coil, GFP-C, fusão de GFP com o C-terminal de YpsB, GFP-cc-C, fusão que contém o coiled-coil e o C-terminal de YpsB e por fim GFP-cc, fusão que contém apenas o coiled coil. (Figura 19).

Para analisar estas deleções nós transformamos cada uma delas na cepa *ypsB*⁻ e na cepa PY79. Comparações destes resultados na presença ou ausência da proteína selvagem YpsB permitiriam distinguir entre deleções que são capazes de se associar ao divisomo e deleções que interagem com o divisomo indiretamente, via interação com a cópia endógena de YpsB.

Os resultados desta análise podem ser vistos na figura 19. As deleções GFP-N-cc, GFP-C e GFP-cc-C apresentaram localização, mesmo que parcial, quando são expressas na cepa selvagem. Já na cepa *ypsB*⁻, a fluorescência de GFP-C e de GFP-cc-C é totalmente difusa pelo citoplasma, não ligando mais ao septo de divisão. Este mesmo resultado é visto quando a fusão GFP-N e GFP-cc são analisadas na cepa selvagem e na cepa *ypsB*⁻.

Se compararmos as deleções GFP-N com GFP-N-cc e GFP-C com GFP-cc-C, vemos que o domínio N-terminal está envolvido na associação de YpsB com o divisomo, pois entre as cepas que contém estas deleções, a única capaz de se associar ao divisomo na cepa *ypsB*⁻ foi GFP-N-cc. Além disso, podemos concluir nestas comparações que, na presença do coiled-coil, a afinidade de YpsB pelo divisomo aumenta. Isso se deve, principalmente a capacidade de YpsB de oligomerizar, o que pode ser visto nas deleções GFP-C e GFP-cc-C em PY79, que contém uma cópia endógena de YpsB. Esta cópia endógena seria a responsável pelo recrutamento das deleções GFP-C e GFP-cc-C para o divisomo.

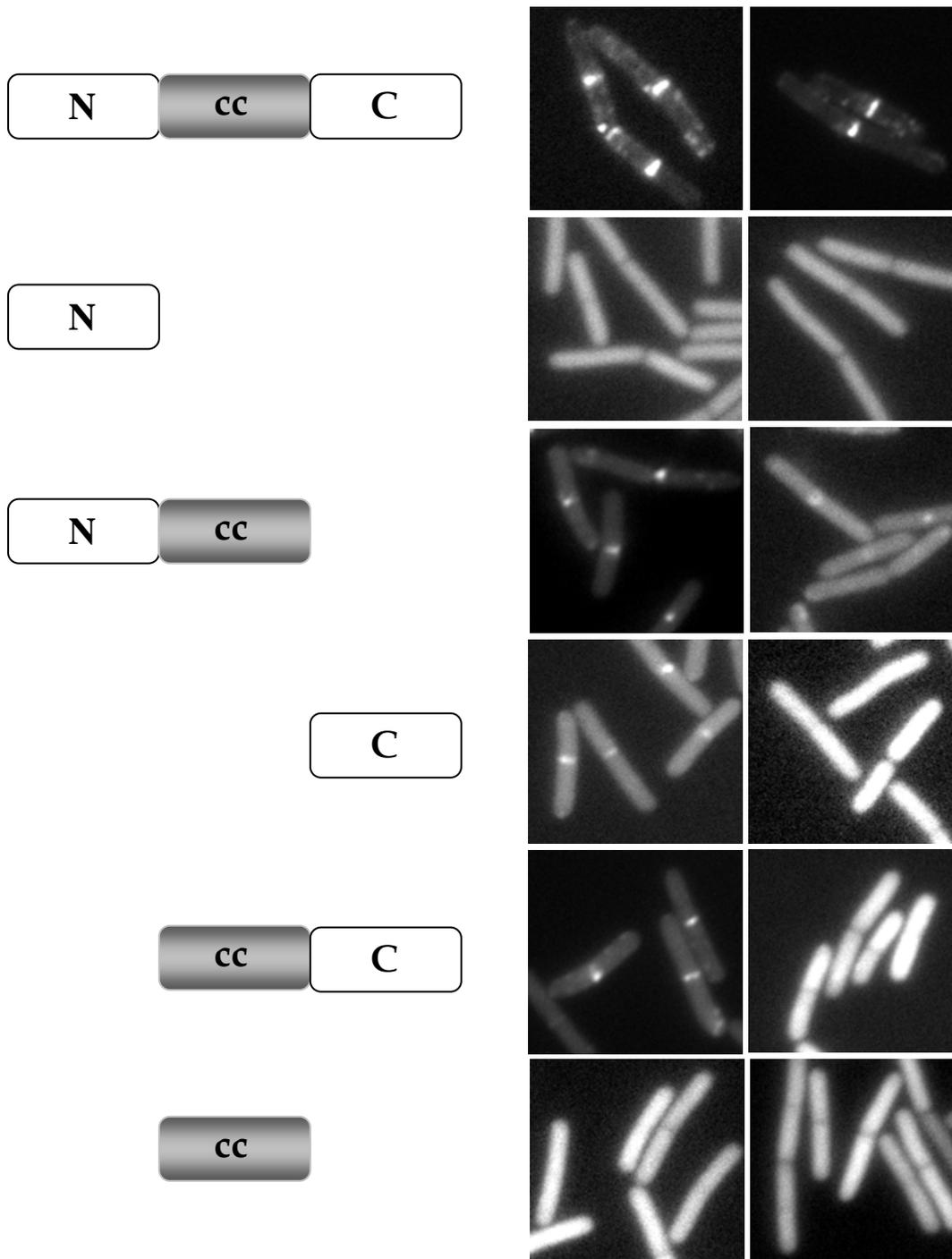


Figura 19: Localização dos nocautes de YpsB no mutante *ypsB⁻* e na cepa PY79. Fusão GFP-YpsB (JR22), GFP-N (JR133), GFP-N-cc (JR134), GFP-C (JR136), GFP-cc-C (JR135) e GFP-cc (JR137) foram transformadas na cepa *ypsB⁻* e na PY79 e analisados por microscopia de fluorescência.

As deleções em YpsB testadas acima são vistas no citoplasma e no septo de divisão. Para confirmar que as proteínas estão intactas na célula e que a perda da localização não é fruto de desestabilização destes mutantes, fizemos Western blot utilizando anticorpo anti-GFP. A figura 20 mostra que todas as fusões testadas são estáveis e produzidas ao mesmo nível que a selvagem na célula.

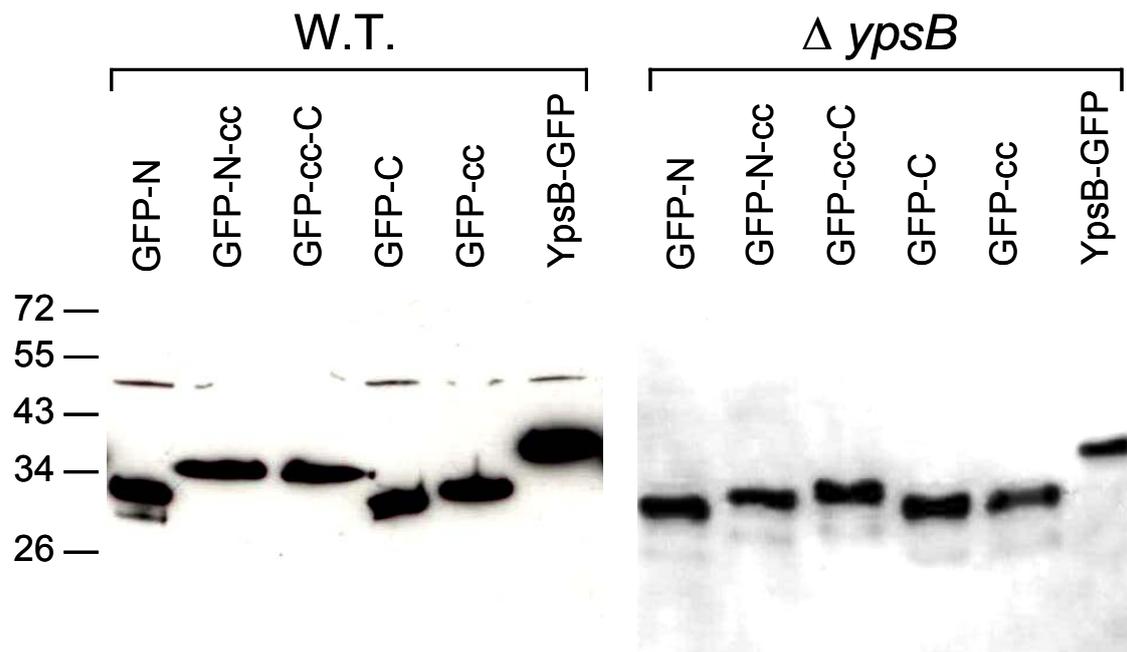


Figura 20. Western blot dos mutantes YpsB expressos na cepa *ypsB*⁻ e na PY79 confirmando a estabilidade desta proteína na célula.

4.8 YpsB não é essencial para a formação do septo de divisão em *B. subtilis*.

Para determinar o papel de YpsB durante a divisão, nós construímos um mutante *ypsB*⁻ substituindo o gene pelo cassete de resistência a canamicina

através do método “*long flanking homology PCR*” (Wach, 1996), como descrito em materiais e métodos (figura 21).

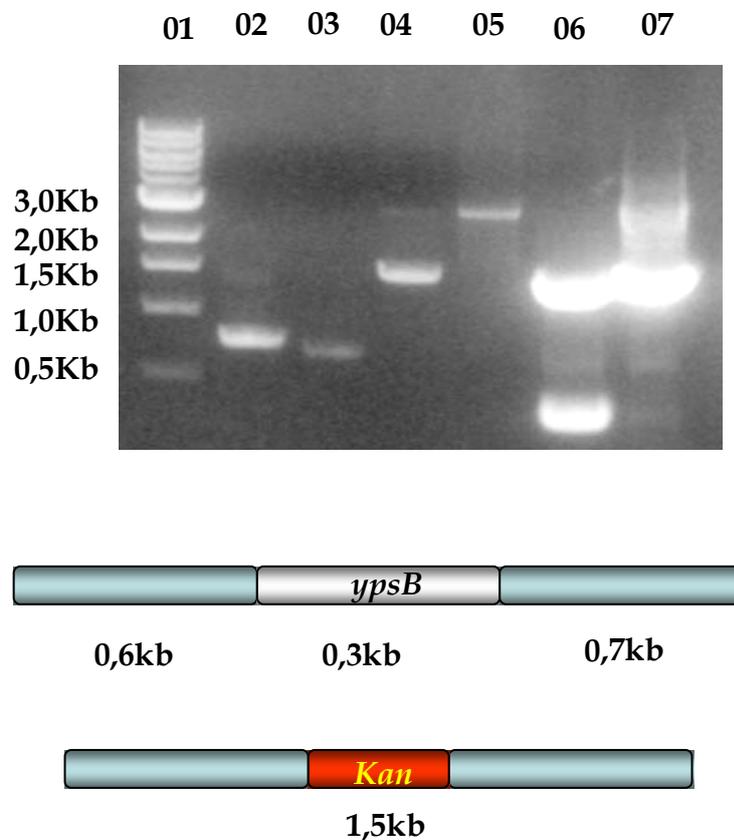


Figura 21: Nocaute de *ypsB* em *B. subtilis*. **A:** Gel de agarose mostrando as ampliações de PCR. **01:** Marcador; **2:** Fragmento PCR com oligos OFG160 e OFG161 (0,7kb); **3:** Fragmento PCR com oligos OFG159 e OFG160 (0,6kb); **4:** Fragmento do cassete de canamicina (1,5kb) **5:** Fragmento nocaute final, amplificado com os oligos OFG158 e OFG161 (2,8kb). **6 e 7:** PCRs confirmando o nocaute de *ypsB*⁻ com oligos para amplificar *ypsB* (0,3kb) e *minD* (1,3kb) na cepa selvagem (W.T) e nocaute (*ypsB*⁻) **B:** Esquema do método *long flanking homology PCR* mostrando o tamanho de cada fragmento obtido.

Análise por microscopia de fluorescência da cepa *ypsB*⁻ demonstrou que a divisão acontece da mesma forma que a vista na cepa selvagem (PY79) (Figura

22) indicando que YpsB não é essencial para a divisão. Da mesma forma, a cepa *ypsB*⁻ não apresentou mudança durante a esporulação. Este experimento mostra que o septo polar continua sendo montado e que a frequência de esporos não sofre mudanças (Figura 22).

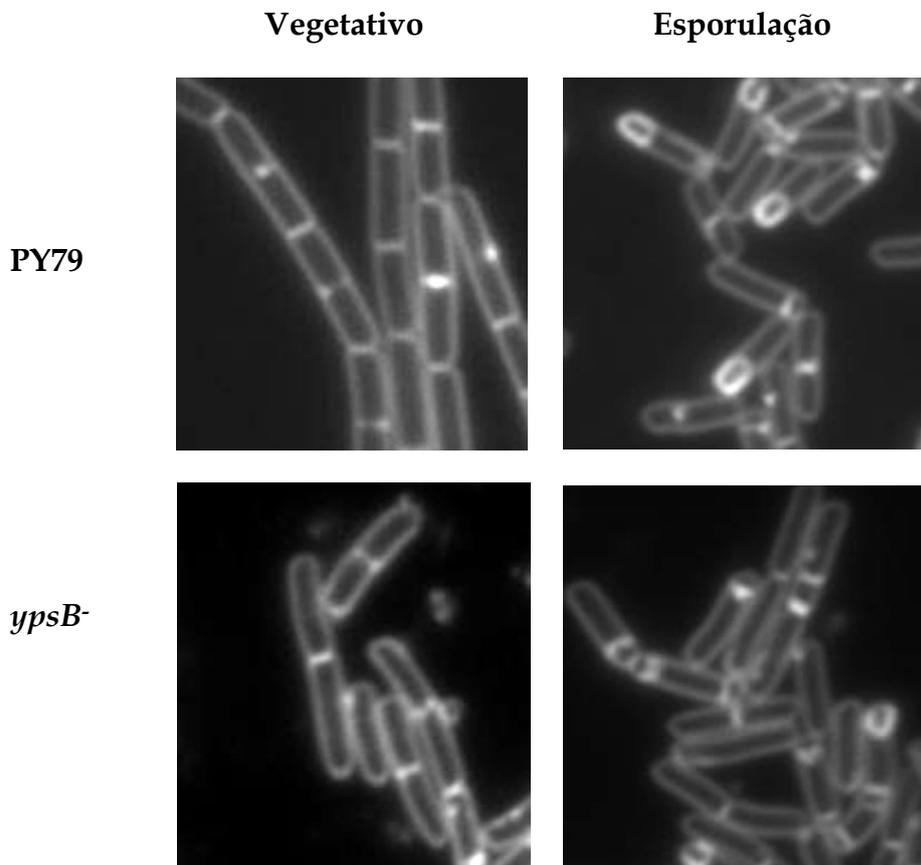


Figura 22: Análise de fenótipo do mutante *ypsB*⁻ durante o crescimento vegetativo e esporulação em *B. subtilis*.

4.9 YpsB como integrante da maquinaria de partição do cromossomo.

Em *Bacillus subtilis* o complexo SMC (*structural maintenance of chromosomes*) engloba a família de proteínas como ScpA e ScpB que estão envolvidas na organização e partição dos cromossomos (Lindow et al., 2002). Análises de duplo híbrido com ScpA mostraram que esta proteína seria capaz

de se ligar a YpsB (Dervyn et al., 2004). Testes de ScpA-YFP na cepa mutante *ypsB*⁻ não mudaram o perfil de localização na região do cromossomo esperado para ScpA (Figura 23).

Nesta mesma figura podemos ver que GFP-YpsB também não sofre mudanças no seu perfil de localização nas células *scpA*⁻. Estes resultados indicam que não existe dependência de localização entre estas proteínas, porém, não excluiu totalmente a chance delas interagirem. Caso isso ocorra, ela deve contemplar apenas uma pequena fração de moléculas de cada proteína em *B. subtilis* e que não foi possível detectar por este experimento.

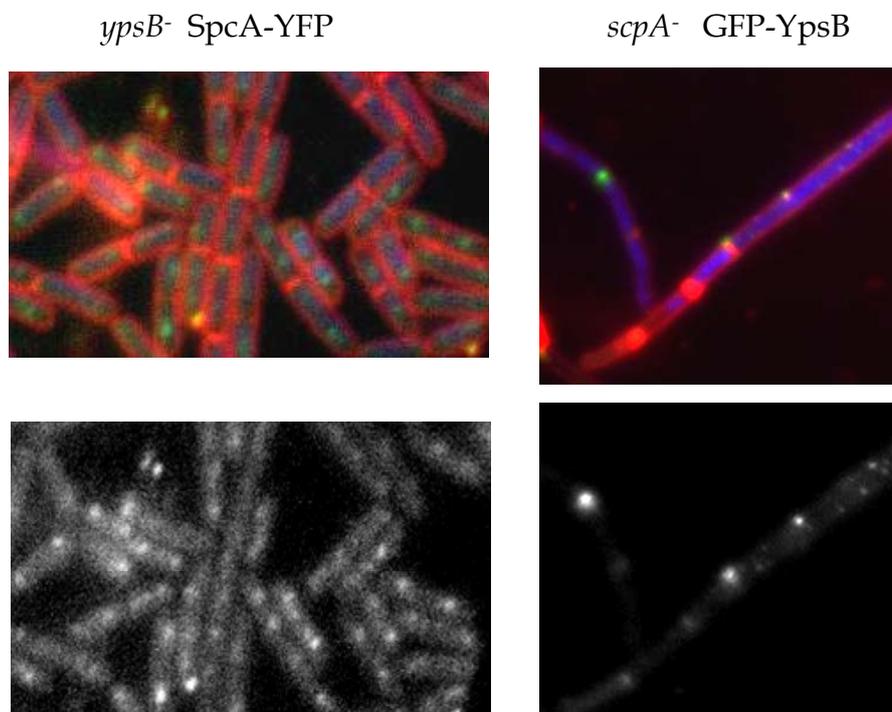


Figura 23: Cepa ScpA-YFP e a localização de GFP-YpsB na cepa *scpA*⁻ e ScpA-YFP na cepa *ypsB*⁻ mostrando que os perfis de localização destas proteínas não sofrem mudanças nas cepas nocautes.

Além desta análise com ScpA, combinamos o mutante *ypsB*⁻ com proteínas envolvidas na segregação de cromossomo, como *spoIIIIE*, um transportador de DNA (Errington, 2003) e *spoOJ*, que reconhece as origens de replicação e participa da segregação (Gruber e Jeff Errington, 2009).

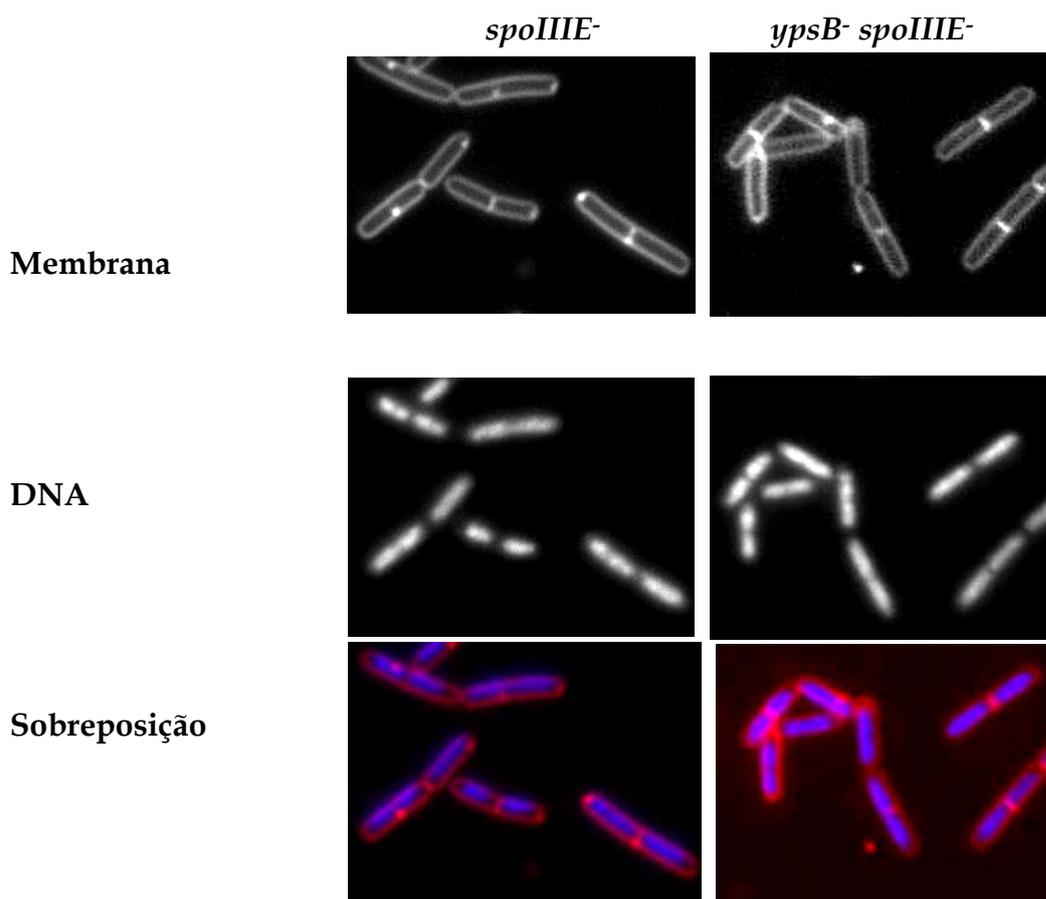


Figura 24: Análise do duplo mutante *ypsB*⁻ *spoIIIIE*⁻ por microscopia mostrando que a segregação ocorreu sem problemas, pois há cópias de cromossomos em todas as células, tanto na cepa *spoIIIIE*⁻ como no duplo mutante.

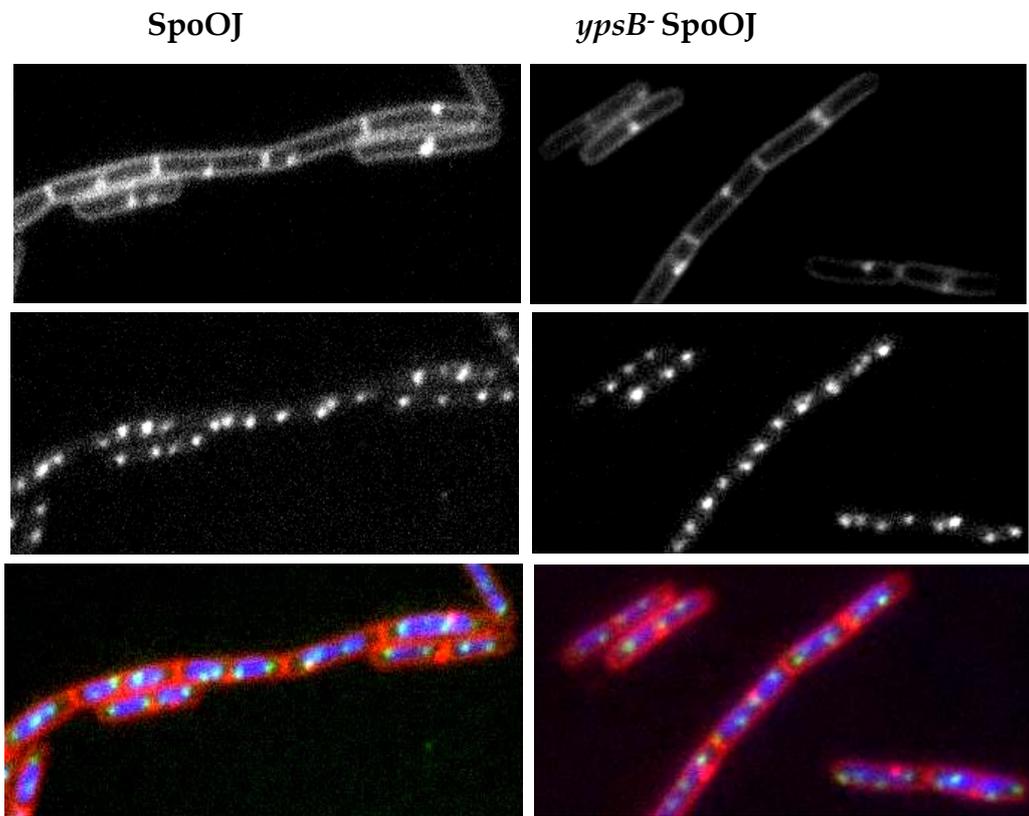


Figura 25: Análise de SpoOJ na ausência de YpsB. SpoOJ em fusão com GFP pode ser visto no cromossomo “marcando” as origens de replicação tanto na cepa selvagem como no mutante, sem alterações no padrão de localização da proteína.

4.10 Letalidade sintética de YpsB.

Nocautes das proteínas ZapA, Noc e SepF não apresentam fenótipo quando observados. Isso sugere que estas proteínas desempenham papéis redundantes ou que estão envolvidas em passos não essenciais durante a montagem do divisomo. Mutações nestes genes, contudo, exibem sinergismo ou fenótipo letal quando combinadas com outras mutações. São exemplos de

letalidade sintética os duplos mutantes *zapA⁻ ezrA⁻* (Hamoen e Errington, 2003), *noc⁻ minCD⁻* (Wu e Errington, 2004), *sepF⁻ ezrA⁻* (Hamoen et al., 2006) e *sepF⁻ ftsA⁻* (Ishikawa et al., 2006). Para testar a mesma possibilidade com YpsB, combinamos o mutante *ypsB⁻* com alelos mutantes de vários genes de divisão (*noc⁻*, *minCD⁻*, *divIVA⁻*, *racA⁻*, e *ftsA⁻*) e analisamos estes duplos mutantes tanto em fase vegetativa como em esporulação.

Os mutantes *ypsB⁻ zapA⁻* e *ypsB⁻ noc⁻* e *ypsB⁻ racA⁻*, não resultaram em efeito letal sintético (Figura 26).

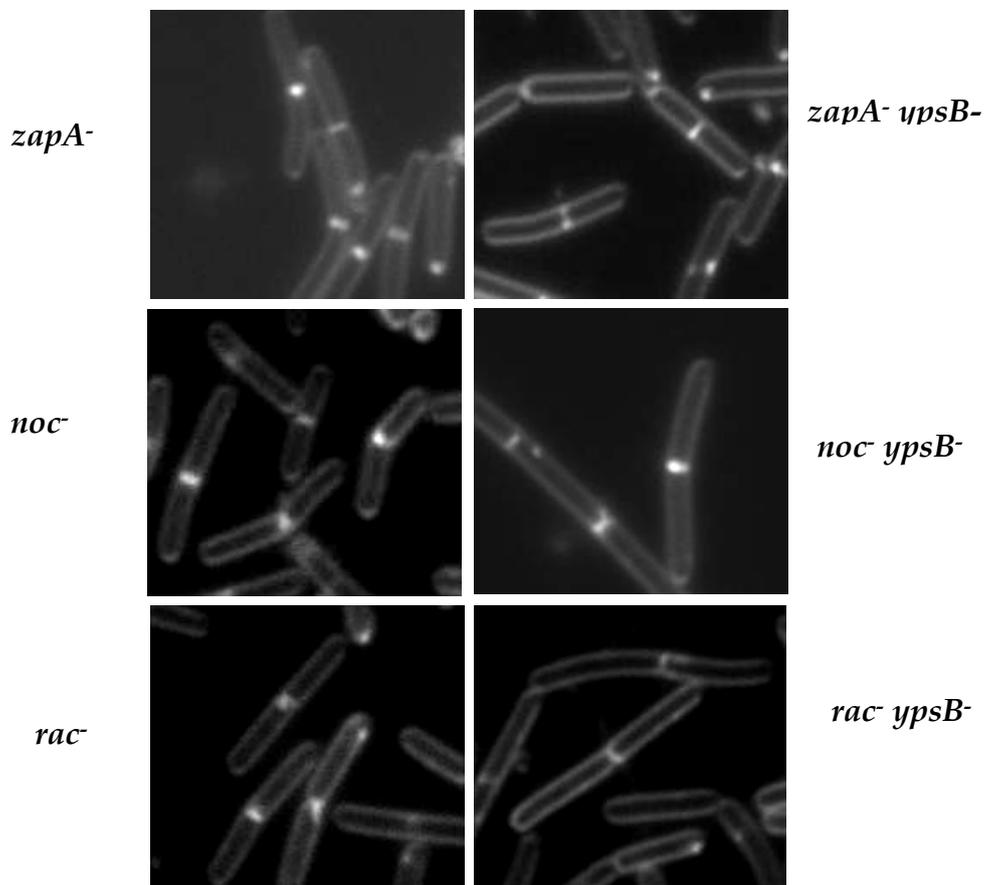


Figura 26: Análise dos duplos mutantes *ypsB⁻ zapA⁻*, *ypsB⁻ noc⁻*, *ypsB⁻ racA⁻* por microscopia.

Quando combinamos o mutante *ypsB*⁻ com FtsA observamos um efeito sinérgico das mutações. No mutante *ypsB*⁻ *ftsA*⁻ verificamos maior lise da célula que o mutante simples (Figura 27).

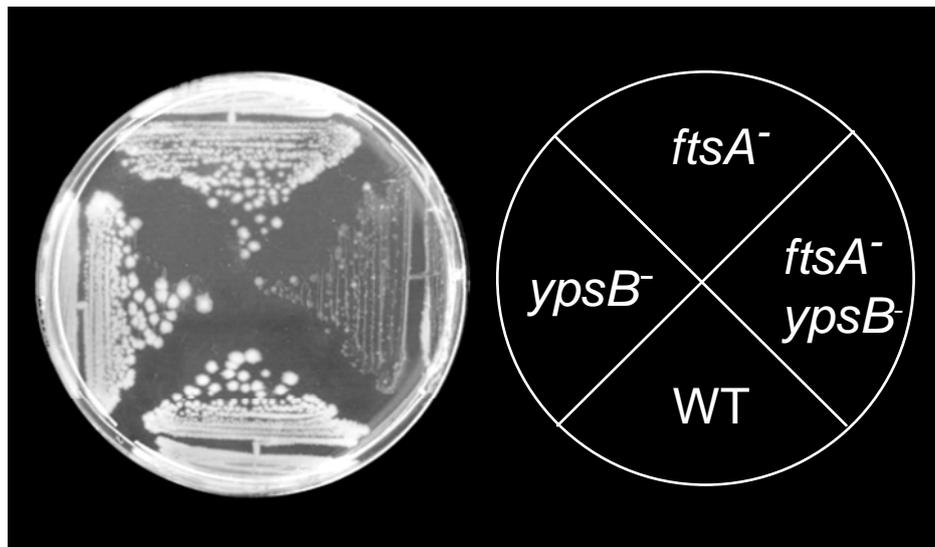


Figura 27: Letalidade sintética do duplo mutante *ypsB*⁻ *ftsA*⁻. Nesta figura vemos os mutantes simples de *ypsB*⁻ e de *ftsA*⁻ além do crescimento de PY79 (W.T).

Acompanhando o crescimento das cepas mutantes *ypsB*⁻ *ftsA*⁻ além dos mutantes simples, *ftsA*⁻ e *ypsB*⁻ encontramos que o mutante duplo não alcança a densidade vista nos mutantes simples (Figura 28). Uma das possibilidades é que o crescimento lento do mutante duplo é reflexo da morte celular que estaria acontecendo, provavelmente por lise celular.

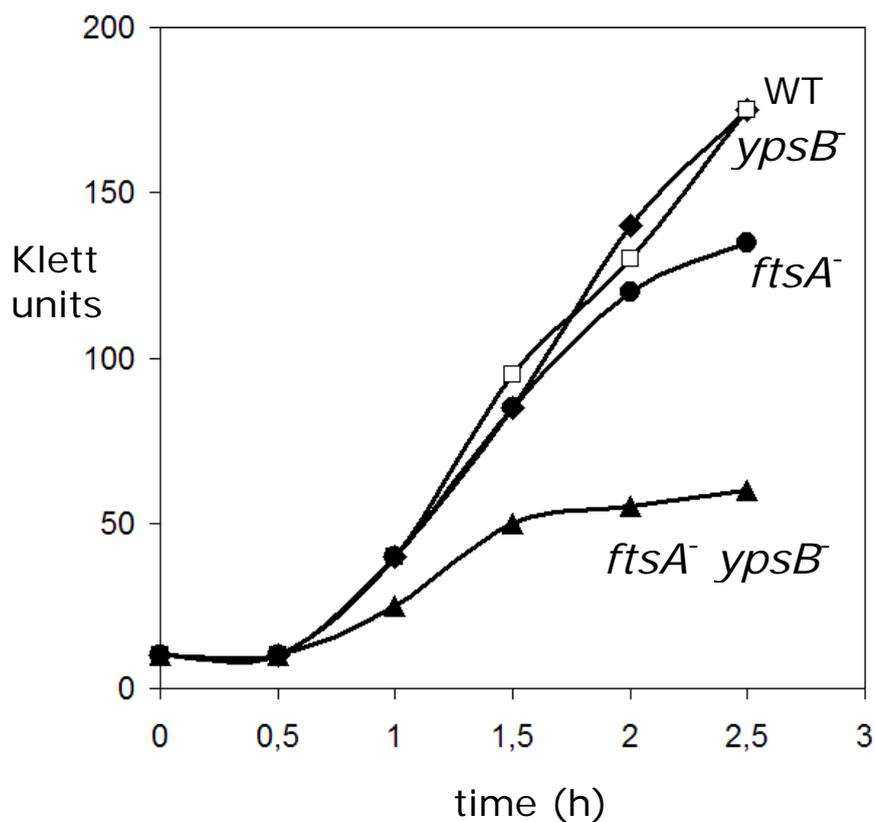


Figura 28: Crescimento das células *ftsA*⁻, *ypsB*⁻ e do duplo mutante (*ypsB*⁻ *ftsA*⁻) em meio líquido mostrando retardo do crescimento.

Para confirmar o fenótipo de lise celular, fizemos microscopia destes duplos mutantes e dos mutantes simples em *B. subtilis*. Os resultados apontam para células mais frágeis mostrando em alguns pontos o rompimento da membrana e lise da célula (Figura 29).

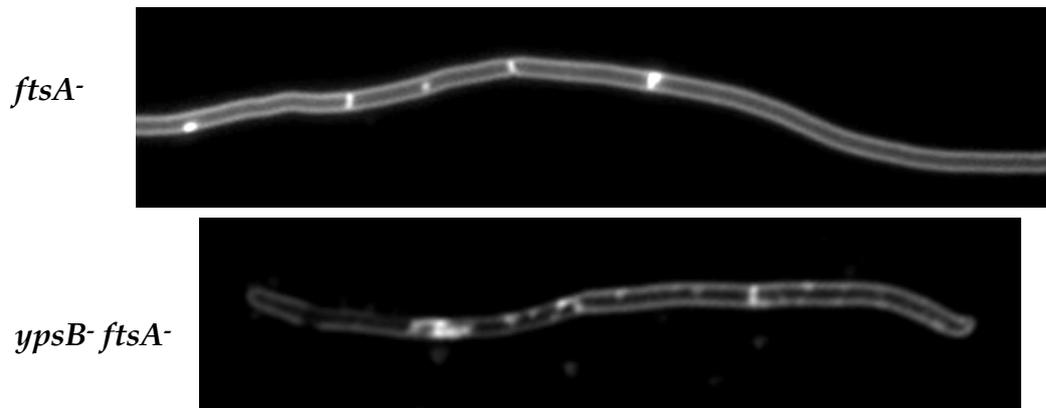


Figura 29: Microscopia de fluorescência dos duplos mutantes *ypsB⁻ ftsA⁻* em *B. subtilis* mostrando membranas mais frágeis e lise celular.

Além disso, analisamos o duplo mutante *ypsB⁻ ezrA⁻* em *B. subtilis*. Microscopias de fluorescência destas células indicam filimentação e lise após alguns dias de crescimento (Figura 30).

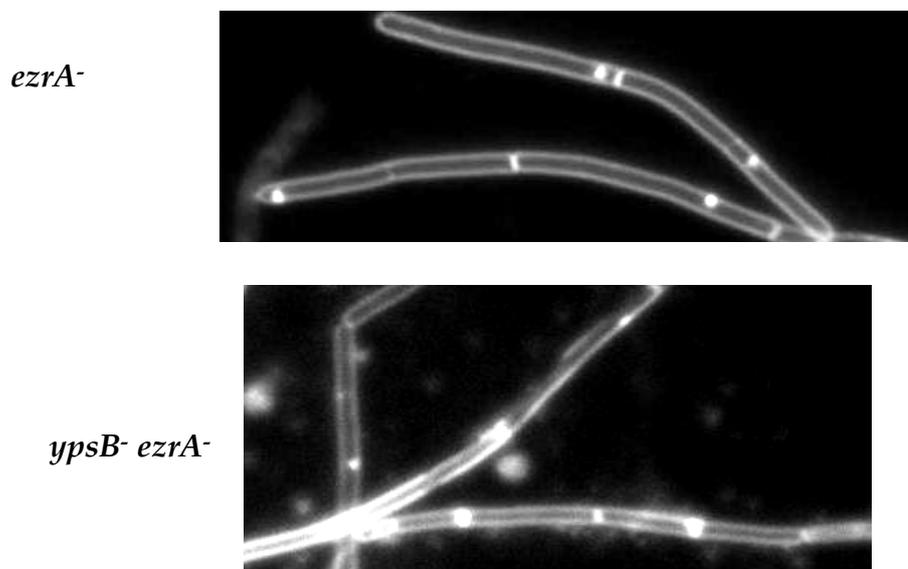
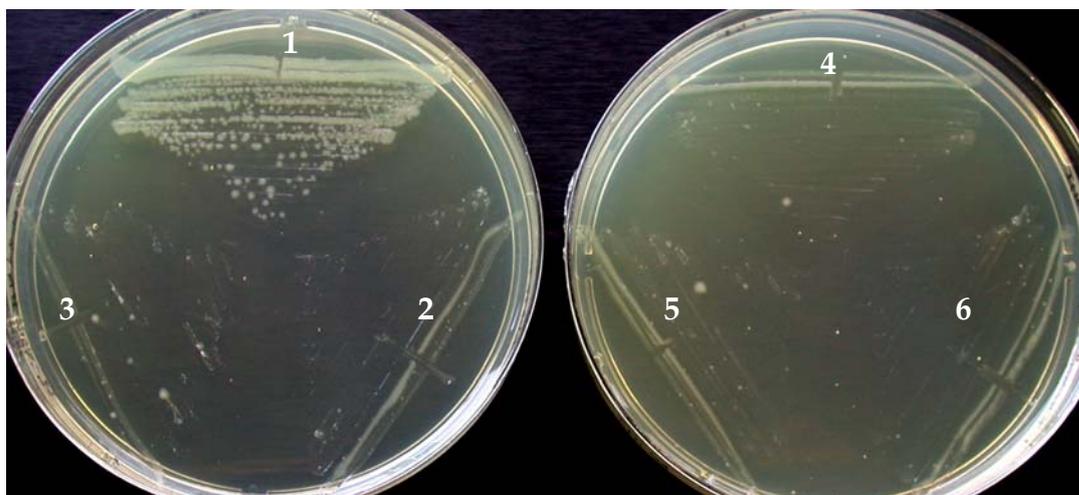


Figura 30: Mutante simples de *ezrA⁻* e do duplo mutante *ypsB⁻ ezrA⁻* mostrando lise maior da célula quando as mutações são combinadas.

4.11 Super-expressão de YpsB na presença do inibidor MinCD.

A proteína ZapA foi caracterizada como estabilizadora do anel Z na célula, atuando como um supressor de MinD e inibindo a filimentação causada pelo excesso deste inibidor em *B. subtilis* (Gueiros-Filho e Losick, 2002). Apesar de YpsB ser recrutado tardiamente para o divisomo, testamos a possibilidade desta proteína atuar como modulador positivo da divisão da mesma forma que ZapA. Para testar este modelo, a cepa contendo MinD foi super-expressa na presença de GFP-YpsB e analisada posteriormente para ver se o fenótipo de filimentação era suprimido. O resultado indicou que YpsB, ao contrário de ZapA, não consegue inibir a super-expressão de MinD na célula, resultando em filimentação e morte celular (figura 31).



Placa com 1% xilose
250 μ M de IPTG

250 μ M de IPTG

Figura 31: Análise de superexpressão de GFP-YpsB (com promotor de xilose) em presença de MinD superexpresso (com promotor induzido por IPTG). Nesta análise também foi utilizado ZapA (Também sob o controle de xilose) como controle positivo. Os números 1 e 4 indicam a superexpressão de ZapA em

células com excesso de MinD. Os números 2 e 5 a superexpressão de MinD e os números 3 e 6 a superexpressão de MinD e de YpsB.

Resultados

Capítulo 2

4.2.1 Outras buscas para novas proteínas de divisão em *B. subtilis*.

Durante a tese utilizamos outras abordagens de bioinformática para identificar novos candidatos envolvidos em divisão além de YpsB. A seguir estão descritas estas abordagens e uma caracterização preliminar de algumas das proteínas candidatas encontradas.

4.2.2 Identificação e caracterização de YpbR, uma provável dinamina de *B. subtilis*.

Como descrito na introdução, FtsZ e tubulina são ortólogos, sendo capazes de ligar a GTP e se auto-associarem (Margolin, 2000). Esta ortologia entre FtsZ e tubulina indica que em *B. subtilis* podem existir proteínas que interagem com FtsZ que são homólogas às proteínas que interagem com tubulina e microtúbulos. Para identificar estes homólogos, utilizamos o banco de dados Pfam, que contém coleções de domínios e famílias de proteínas de diferentes espécies (Bateman et al., 2004) buscando candidatos homólogos em *B. subtilis* capazes de interagir com tubulina.

Entre as proteínas encontradas na análise, uma delas apresentava homologia com a família das dinaminas. Esta proteína em *B. subtilis* é YpbR. O gene *ypbR* codifica uma proteína de 1193 aminoácidos anotada no banco de dados de *B. subtilis* (Subtilist: <http://genolist.pasteur.fr/SubtiList/>) como “proteína de função desconhecida”. O gene está localizado a 197° graus no

cromossomo, num operon com outro gene, *ypbS*, também anotado como de função desconhecida.

Dinamina é uma proteína que hidrolisa GTP e medeia, em conjunto com a clatrina, a endocitose da célula eucariótica. Ela associa-se numa estrutura parecida com um “colar” formando um estrangulamento que promove a fissão de vesículas. A formação do “colar”, que requer a auto associação de moléculas de dinamina, é estimulada pela sua atividade GTPásica que fornece a energia necessária para o estrangulamento e liberação das vesículas a partir da membrana plasmática (Erickson 2000). Além disso, a dinamina foi identificada como proteína capaz de interagir com microtúbulos (Shpetner e Vallee, 1989). Esta interação com os microtúbulos classificou a dinamina como uma MAP (*proteína associada a microtúbulos*) (De Camilli et al., 1995). Como FtsZ é um homólogo da tubulina, é razoável imaginar que YpbR, com dois domínios de dinamina, poderia ser mais uma proteína interagindo com FtsZ.

Além disso, em cloroplastos dois anéis estão envolvidos em divisão; o anel Z e o anel de dinamina (Miyagishima et al., 2003; Beech et al., 2000). Já em mitocôndrias, a principal estrutura envolvida na divisão é a dinamina (Miyagishima et al., 2003; Beech et al., 2000). A presença da dinamina nesta organela indica uma substituição de FtsZ como a principal responsável pela divisão.

Análises de seqüência no Pfam detectaram dois domínios de GTPase em YpbR que são característicos dos membros da família de dinamina. As dinaminas em humanos contém o domínio de GTPase, um domínio PH (*pleckstrin-homology*) e o PRD (*proline-rich domain*) (Alexander, 1999). Já em *C.elegans*, *A.thaliana* e *S. cerevisiae*, a proteína não contém todos estes domínios, sofrendo perdas, principalmente do domínio PH e do PRD. Tanto em humanos como nos outros organismos, o domínio de GTPase da dinamina é o mais conservado, sendo usado como referencial para encontrar novas proteínas relacionadas (Alexander, 1999).

Em *E. coli*, o gene *yjdA* contém o domínio de GTPase típico da família das dinaminas, porém não são encontrados os domínios PH e PRD. Em *M.*

tuberculosis e *H. pylori* também foram encontrados homólogos da dinamina também sem os domínios PH e PRD (Alexander, 1999). Em *Nostoc punctiforme* foi identificada uma possível dinamina, a BDLP (*bacterial dynamin-like protein*), com domínio GTPase e capacidade de formar vesículas (Low e Lowe, 2006) e como nos casos anteriores, sem os domínios PH e PRD.

Os dados sobre interação com microtúbulos, capacidade de hidrolisar GTP, além do fato de que a mitocôndria utiliza dinamina durante sua divisão estimularam nosso desejo de caracterizar a função de YpbR em *B. subtilis*.

Desta forma, nosso primeiro teste foi nocautear o gene *ypbR* e observar o fenótipo de *B. subtilis* durante as fases de crescimento e esporulação. Para o nocaute foi utilizado o protocolo “*long flanking homology PCR*” (Wach, 1996) que permitiu substituir o gene *ypbR* pelo cassete de canamicina. Mais detalhes desta metodologia estão em materiais e métodos.

A figura 32 mostra o resultado da microscopia do nocaute *ypbR*⁻ durante crescimento vegetativo e esporulação. Os resultados mostram que o nocaute consegue crescer e dividir com eficiência parecida com a cepa selvagem. Além disso, durante a esporulação, o mutante *ypbR*⁻ consegue formar septos assimétricos e esporular eficientemente.

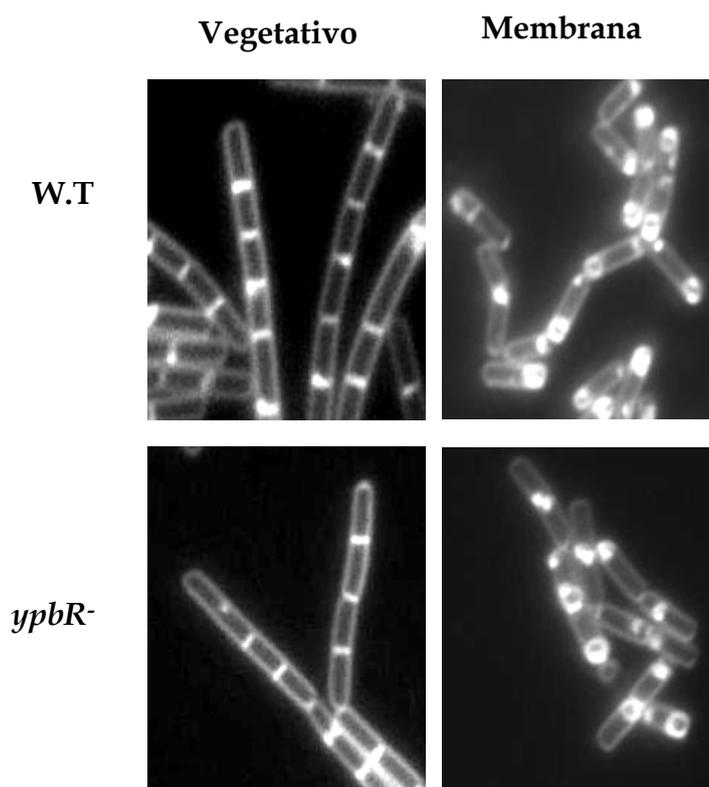


Figura 32: Microscopia de fluorescência do mutante *ypbR*⁻ visto durante fase vegetativa e esporulação. Células foram tratadas com corante FM4-64 (ver materiais e métodos), que permite a visualização da membrana plasmática. Na primeira coluna temos *B. subtilis* selvagem (W.T.) e o mutante *ypbR*⁻ (cepa JR03) durante crescimento vegetativo. Na segunda e terceira colunas W.T. e *ypbR*⁻ durante a esporulação.

Nem toda proteína de divisão gera um defeito quando eliminada, como visto no capítulo anterior sobre YpsB. Por isso, nosso próximo passo foi identificar o padrão de localização de YpbR. Para isso, fusionamos YpbR com a proteína verde fluorescente (GFP) em seu N-terminal. Esta fusão foi inserida no locus de *amyE*, um gene não essencial de *B. subtilis*, resultando numa célula merodiplóide, isto é, uma célula que contém a versão natural do gene (cópia selvagem) além da outra cópia inserida. A fusão foi analisada durante

crescimento vegetativo e o resultado indica a presença da proteína na região do septo e pólo da célula (Figura 33).

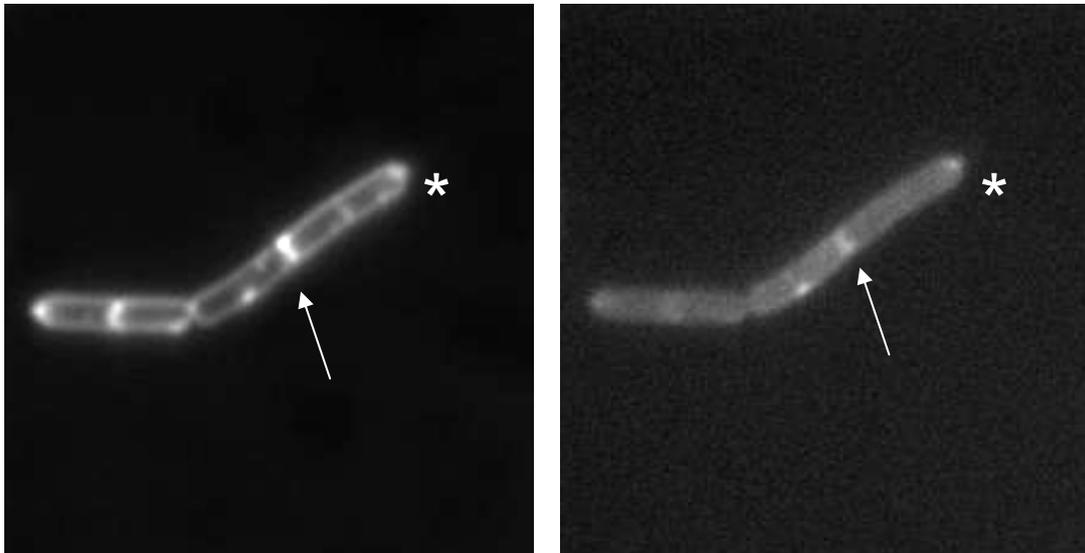


Figura 33: Microscopia de fluorescência de GFP-YpbR durante a fase vegetativa com 0,5% de xilose. YpbR está presente nos septos de divisão (indicado pela seta na figura) e também no pólo da bactéria (ver asterisco).

Testamos também uma fusão C-terminal YpbR-GFP, que foi inserida por crossing-over simples no operon *ypbRS*, ficando então a fusão sob o controle do promotor natural de *ypbR*. A análise desta fusão mostrou a proteína no septo e também compondo espirais.

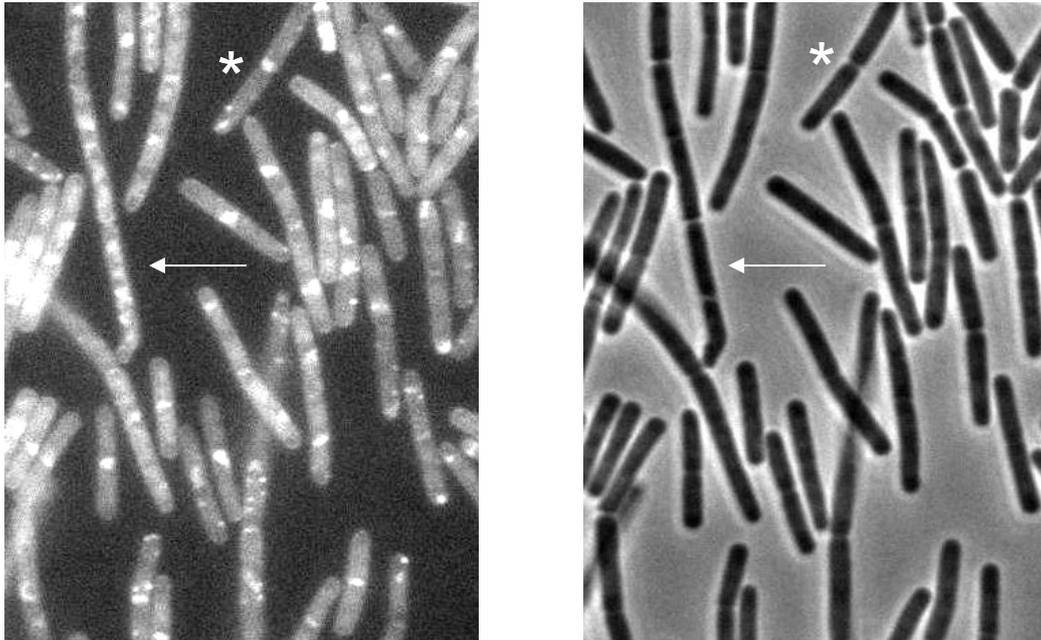


Figura 34: Na esquerda temos a microscopia de fluorescência de YpbR-GFP durante fase vegetativa e na direita a microscopia de contraste de fase da mesma amostra. YpbR-GFP está presente na região do septo (ver asterisco) e também compondo espirais pela célula (ver setas).

Como descrito anteriormente para YpsB, combinamos a mutação *ypbR* com mutações de genes codificando outras proteínas envolvidas em divisão, como ZapA, EzrA e YpsB, com o intuito de revelar um efeito da ausência de YpbR para a célula. Apesar destas combinações, até o momento não identificamos por microscopia variações no fenótipo destes duplos mutantes (figura 35).

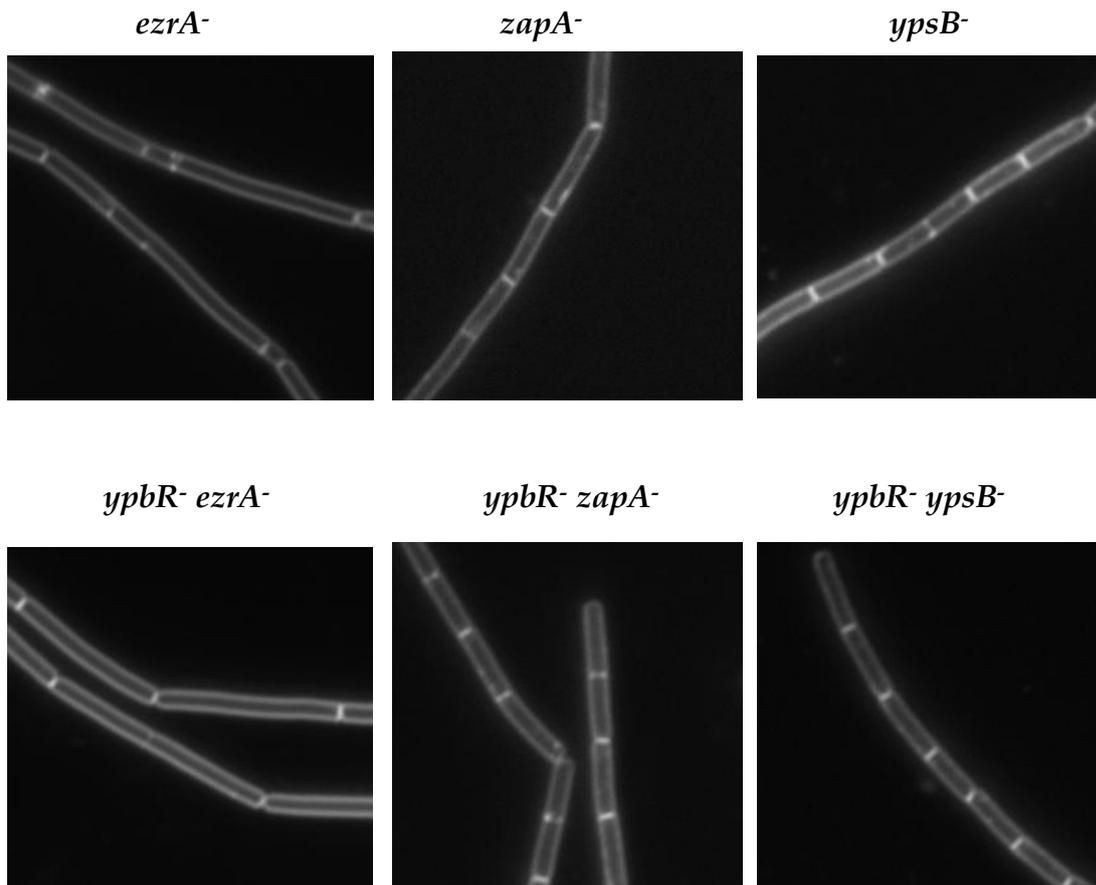


Figura 35: Análise dos mutantes *ypbR*⁻ com outras proteínas de divisão. Microscopia de fluorescência das células durante crescimento vegetativo, indicando que não há uma diferença de fenótipo entre os mutantes simples e o duplo.

Nossos resultados preliminares sobre YpbR mostram que ela está presente no septo de divisão e apresenta afinidade pela membrana e em algumas células, YpbR é capaz de formar espirais. Células sem YpbR conseguem dividir eficientemente durante a fase vegetativa e formar septos assimétricos durante a esporulação. Portanto, apesar de seu padrão de localização sugerir que YpbR possa interagir com o divisomo, neste momento ainda não podemos afirmar se esta proteína tem qualquer papel na divisão.

4.2.3 Uso de genômica comparativa.

Com a introdução das técnicas de seqüenciamento de DNA em larga escala e a subsequente disponibilização dos dados de genomas completos para vários organismos (von Mering et al., 2005), diversos grupos introduziram análises comparativas destes genomas, que permitiram elucidar como a evolução afeta a estrutura do genoma e quais as relações entre esta estrutura e as adaptações dos organismos (Wolf et al., 2009).

A tabulação de genes presentes em vários genomas revelou que o número de membros de cada família gênica variava consideravelmente, mesmo entre espécies relacionadas (Spencer et al., 2007). Processos como duplicação gênica (Karev et al., 2002), transferência horizontal e perda de genes (Spencer et al., 2007), são responsáveis por tais variações de conteúdo gênico e tem impacto profundo no fenótipo e, portanto no repertório de adaptações de um organismo.

Estudos posteriores revelaram que, sobreposta ao padrão de ausência e presença de genes individuais é possível detectar pares ou conjunto de genes cuja distribuição em vários genomas é dependente (Tamames, 2001). Esta dependência é, muitas vezes, conseqüência da existência de vínculos funcionais entre os genes e uma série de estudos e algoritmos foram desenvolvidos para detectar a presença de correlações nas distribuições de dois ou mais genes. Estas distribuições são conhecidas como perfis filogenéticos ou padrões de ocorrência (von Mering et al., 2005).

Tal correlação entre dois ou mais genes foi usada na busca de proteínas com potencial para interagir direta ou indiretamente (von Mering et al., 2005; Edward et al., 1999) com *zapA*, um modulador positivo da divisão (Gueiros-filho e Losick, 2002) e *ezrA*, um modulador negativo da divisão (Levin et al., 1999). Os candidatos obtidos foram listados na tabela 06 abaixo.

<i>ezrA</i>	Anotação Funcional	Evidência	Essencial	Tamanho - aa
<i>yknT</i>	Proteína esporulação	Co-ocorrência	Não	321
<i>yxdL</i>	Proteína transporte sistema ABC	Co-ocorrência	Não	257
<i>yutD</i>	Proteína hipotética	Co-ocorrência	Não	306
<i>yabA</i>	Proteína de início de replicação	Co-ocorrência	Não	119
<i>yhaN</i>	ATPase, homologia com domínio miosina	Co-ocorrência	Não	963
<i>yttA</i>	Proteína hipotética	Co-ocorrência	Não	248

<i>zapA</i>	Anotação Funcional	Evidência	Essencial	Tamanho - aa
<i>ylaN</i>	Proteína de função desconhecida.	Co-ocorrência	Sim	93
<i>ypbB</i>	Proteína de função desconhecida	Co-ocorrência	Não	352
<i>ypiB</i>	Proteína de função desconhecida	Co-ocorrência	Não	179
<i>yrzD</i>	Proteína de função desconhecida	Co-ocorrência	Não	98
<i>yxdM</i>	Permease do sistema de transporte ABC	Co-ocorrência	Não	622
<i>yqjA</i>	Proteína de Membrana	Co-ocorrência	Não	322

Tabela 06: Tabela dos genes que exibem co-ocorrência com ZapA e EzrA em diferentes genomas.

Uma vez obtida a lista de candidatos, analisamos por microscopia qual o perfil de localização destas proteínas na célula. As construções das fusões GFP e as análises de microscopia foram realizadas pela aluna Valquíria Santos. Entre as proteínas desta tabela foi testado o padrão de localização de três delas (YlaN, YutD e YrzD).

A fusão GFP-YutD não foi vista nos septos de divisão ou nos pólos da célula. Já YlaN revelou localização medial em *B. subtilis*, porém, recentemente saiu um artigo mostrando a estrutura do homólogo de YlaN em *S. aureus* (Xu et al., 2007). Apesar da localização de YlaN sugerir que ela se associe ao divisomo, o mutante *ylaN⁻* indica que ela não participa diretamente do processo de divisão.

Outra proteína testada foi YrzD. YrzD contém 98 aminoácidos e também é anotada no genoma de *B. subtilis* como “proteína de função desconhecida”.

Encontrada em gram-positivas, YrzD não contém nenhum domínio conhecido ou homologia com outras proteínas (Figura 36).

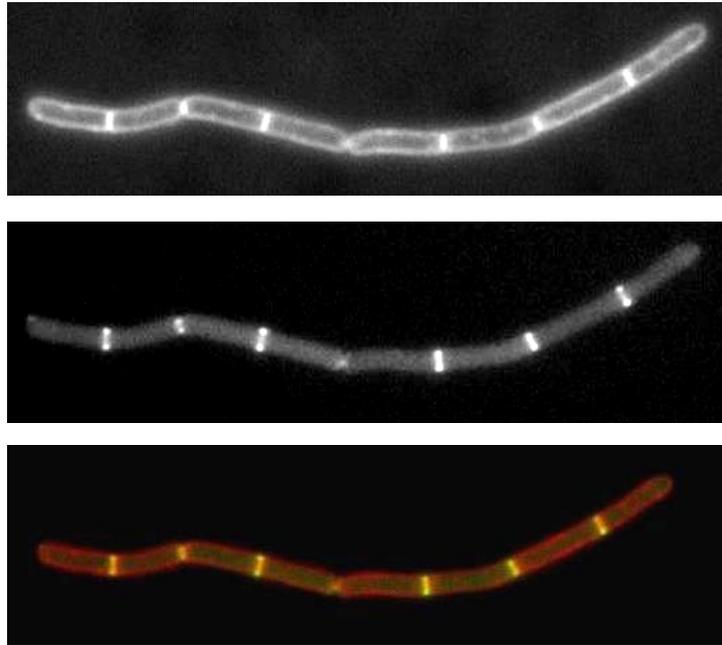


Figura 36: Microscopia de fluorescência de GFP-YrzD induzido com 0,5% de xilose, revelando sua localização nos septos de divisão durante a fase vegetativa na célula.

Resultados preliminares mostram que YrzD além de estar no divisomo depende de DivIVA para ser recrutada para o divisomo.

Neste momento a aluna está caracterizando funcionalmente a função desta proteína em *B. subtilis*.

Outros candidatos desta lista estão sendo analisados em nosso laboratório como possíveis integrantes da maquinaria de divisão. Uma limitação para as análises tem sido a construção das fusões. Para contornar este problema, foi desenvolvido um vetor que permite que fusões a GFP sejam construídas *in vitro* e inseridos diretamente no genoma de *B. subtilis*, sem necessidade de clonagem prévia em *E. coli*. Este plasmídeo, pJR74, (Figura 37) integraria a fusão N-terminal (GFP-gene) e foi derivado do vetor pEA-18

(Gueiros-Filho e Losick, 2002) com a inserção do gene de resistência ao antibiótico fleomicina (*ble*).

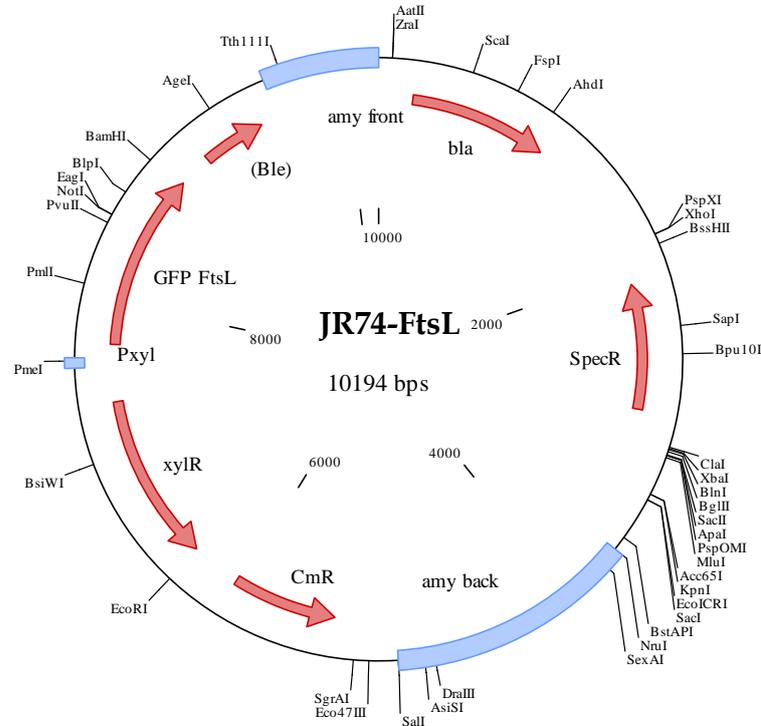


Figura 37: Esquema do vetor pJR74 de integração dupla no lócus de amilase em *B. subtilis*. Neste esquema é possível ver a fusão *gfp-ftsL*, o promotor de xilose além do seu repressor. pJR74 contém três marcadores de resistência (*bla*: ampicilina; *spec*: espectinomomicina; *ble*: fleomicina) e origem de replicação em *E. coli*.

Após a amplificação do gene candidato por PCR o material é purificado e clivado com as enzimas de restrição *NotI* e *BamHI* e ligado ao vetor pJR74 previamente clivado com as mesmas enzimas. Após ligação destes fragmentos, usamos oligos que reconhecem regiões do plasmídeo e do gene candidato para novo PCR. Os produtos, que são regiões de vetor mais o gene (Figura 38) são transformados diretamente na cepa de *B. subtilis* que contém o vetor pEA-18 integrado ao lócus de amilase que fornece os sítios necessários para a recombinação na célula.

Ligação JR74 mais gene candidato.

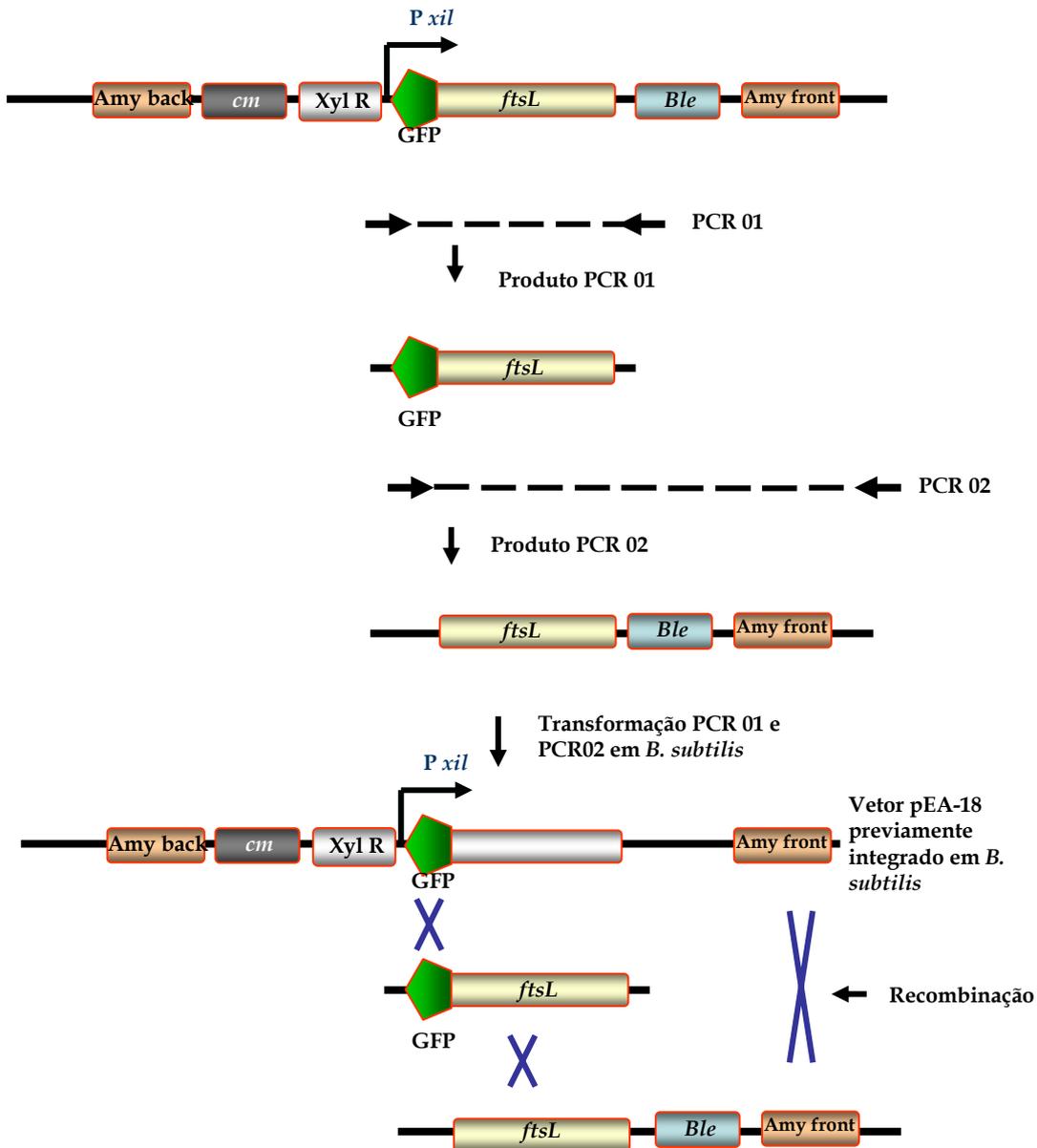


Figura 38: Estratégia de clonagem dos candidatos obtidos por bioinformática em *B. subtilis*. O produto da ligação do vetor JR74 mais o gene são amplificados por PCR (PCR 01 e PCR 02) gerando fragmentos que serão posteriormente transformados na cepa *B. subtilis* e integrados ao locus de amilase. O locus de amilase desta célula tem neste caso, o GFP integrado além da resistência a cloranfenicol (*cm*). Após recombinação dos fragmentos, GFP mais o gene candidato podem integrar no genoma da célula tornando-se resistente a marca de resistência fleomicina (*ble*).

Esta estratégia está sendo testada em nosso laboratório neste momento. Esperamos que ela facilite a validação dos candidatos a novos genes de divisão.

5. Discussão.

5.1 Uso de métodos *in silico* para identificar novas proteínas de divisão.

Desde o seqüenciamento do genoma de *B. subtilis* (Kunst et al., 1997), aproximadamente um terço dos genes ainda não tiveram sua função caracterizada. Um dos aspectos mais importantes no estudo da divisão bacteriana é identificar novas proteínas que participam deste processo. Esta busca por novas proteínas pode englobar análises genéticas, bioquímicas ou *in silico*.

Entre as abordagens genéticas, mutantes revelaram as principais proteínas envolvidas em divisão, porém não explicam todo o processo, sugerindo que há proteínas que desempenham papéis redundantes ou que estão envolvidas em passos não essenciais durante a montagem do divisomo. Mutações nestes genes não essenciais, no entanto, são difíceis de serem identificadas, pois em geral não produzem fenótipo.

Outra forma de encontrar novas proteínas de divisão é através de estudos de localização subcelular em escala genômica. Recentemente, quase todas as proteínas preditas de *Caulobacter* foram fusionadas a uma proteína fluorescente vermelha (mCherry) e sua localização foi determinada (Werner et al., 2009). Estas análises encontraram em *Caulobacter* mais de cem proteínas com localização medial, polar e bipolar que sugerem que possam participar de divisão. *Caulobacter crescentus* possui um genoma com tamanho parecido ao de *B. subtilis* o que nos sugere que ainda existam muitas proteínas de divisão em *Bacillus* que precisam ser identificadas e caracterizadas.

Além da genética, ensaios bioquímicos de interação e co-purificação em coluna usando, por exemplo, o Tap-Tag (Forler et al., 2002) podem isolar novas proteínas envolvidas em divisão por estarem associadas a componentes já conhecidos do divisomo.

Outra forma é utilizar métodos *in silico*. Aplicamos três abordagens *in silico* durante este trabalho e todas elas parecem ter sido bem sucedidas. A

primeira delas baseou-se na revisão cuidadosa da distribuição dos genes que codificam proteínas de divisão experimentalmente caracterizada em diferentes genomas (tabela 05). Em *B. subtilis*, por exemplo, além das proteínas conhecidas, foi visto uma proteína com semelhança significativa a DivIVA. Esta proteína semelhante a DivIVA não tinha ainda sido caracterizada e era anotada nos bancos de dados como “proteína de função desconhecida” chamada YpsB.

A segunda abordagem *in silico* tinha como objetivo encontrar proteínas em *B. subtilis* que fossem homólogas as proteínas de eucariotos que interagem com tubulina e microtúbulos. Como resultado, identificamos YpbR, um homólogo da dinamina que resultados preliminares de microscopia sugerem estar presente no divisomo (figura 32). Nossa outra abordagem baseou-se na tendência de genes próximos em vários organismos não aparentados de possuírem vínculos funcionais (Tamames, 2001). Tal correlação entre dois ou mais genes foi usada na busca de proteínas com potencial para interagir direta ou indiretamente (von Mering et al., 2005; Edward et al., 1999) com *zapA* e *erzA*.

Os resultados desta busca (Tabela 06) mostraram, entre outras proteínas, que *yrzD* parece ser um componente do divisomo de *B. subtilis* (Figura 36).

A rápida evolução dos estudos *in silico* alinhada às predições obtidas pelos alinhamentos, forneceram as informações para entender a evolução dos genomas dos organismos.

5.2 YpsB como integrante do divisomo em *B. subtilis*.

Os experimentos de localização de GFP-YpsB na célula, os de co-localização de YpsB-GFP com FtsZ-mCherry e os de dependência (Figuras 10, 15, 16) revelaram que YpsB é um componente do divisomo e que se associa tardiamente com este complexo.

Apesar desta caracterização citológica, ainda não está claro quem seria o alvo reconhecido por YpsB no divisomo. Tanto DivIVA (Marston et al., 1998) como YpsB (Figura 16) são recrutados para o septo durante os estágios finais da

divisão em um processo que depende de PBP2B ou outras proteínas tardias do divisomo como DivIC (Figura 17). Nossas análises mostraram também que YpsB e DivIVA localizam no septo de forma independente (Figura 16), sugerindo que elas possam estar reconhecendo o mesmo alvo no divisomo (assumindo que o alvo não seria limitante, pois se o alvo fosse limitante, a localização de uma competiria com a da outra) (Figura 16). Estes dados permitem imaginar algumas possibilidades de como YpsB se associa ao divisomo. A primeira delas é que YpsB interagiria diretamente com uma proteína do sub-complexo DivIB-DivIC-FtsL-PBP2B-FtsW para localizar. Quando retiramos DivIC, o sub-complexo DivIB-DivIC-FtsL-PBP2B-FtsW aparentemente é desfeito e YpsB não é mais visto no septo. Não sabemos qual proteína deste sub-complexo é a responsável por esta interação, porém, uma das maneiras de se identificá-la seria via duplo híbrido, usando YpsB como isca contra DivIB, DivIC, FtsL, PBP2B e FtsW.

A segunda possibilidade é de que YpsB dependa de ErzA para localizar no divisomo. Ensaios de duplo híbrido mostraram que YpsB e ErzA interagem. Além disso, foi relatado que o mutante *erzA⁻ ypsB⁻* é letal sintético para a célula (Claessen et al., 2008). Apesar destas evidências, testes de microscopia feitos em nosso laboratório mostraram que o padrão de localização de YpsB não muda na cepa *erzA⁻* (dados não mostrados) indicando que ErzA não é a responsável pela ligação de YpsB no divisomo. Outra interação vista neste trabalho foi entre YpsB e PBP1. Esta associação poderia ser importante para o recrutamento de YpsB, porém o mutante *ponA⁻* (que codifica PBP1) não influencia na localização de YpsB nos ensaios de microscopia (Claessen et al., 2008).

Outro possível alvo para YpsB no divisomo é MinJ. MinJ atua como “ponte” entre DivIVA e MinCD (Bramkamp et al., 2008; Patrick e Kearns, 2008). Como MinJ é recrutado tardiamente para o septo e interage com DivIVA, MinJ poderia participar do recrutamento de YpsB ao septo.

Por fim, podemos imaginar que o recrutamento de YpsB para o divisomo não dependa diretamente de uma interação proteína-proteína, mas de “modificações” da membrana e/ou parede no sítio de divisão promovida pela

septação. Esta idéia surgiu inicialmente para DivIVA em análises de gel nativo, onde foi verificado que a proteína era capaz de formar estruturas contendo entre 8 a 10 monômeros associados via coiled coil (Edwards, et al., 2000). Estes oligômeros poderiam sentir a curvatura na membrana, causada pela formação do septo. Recentemente, Lenarcic et al., 2009 demonstraram que DivIVA tem, de fato, afinidade por curvatura de membrana.

Dada a semelhança entre DivIVA e YpsB, é provável que YpsB também poderia utilizar este mecanismo para se localizar ao divisomo. No caso de YpsB, todas as predições de estrutura secundária mostraram que ela contém um coiled-coil. A presença deste tipo de alfa-hélice pode ser um indício que YpsB também é capaz de formar oligômeros. A formação de oligômeros por YpsB poderia ser determinante para esta reconhecer curvaturas de membrana como proposto para DivIVA.

Para testar se YpsB tem afinidade por curvatura de membrana uma das análises que podem ser feitas é a interação entre YpsB purificada e membranas modelo - neste caso lipossomos - *in vitro*. Desta forma, os testes seriam feitos com lipossomos de diferentes tamanhos e simulariam o efeito do raio de curvatura na interação da proteína com a membrana. Esta interação poderá ser medida por espectrofluorimetria e por titulação calorimétrica isotérmica. Testes iniciais feitos com a Dr. Kátia Regina P. Daghasanli, pós-doutora do laboratório da Dra. Iolanda Cuccovia mostraram YpsB é capaz de ligar a lipossomos. Os próximos testes vão medir se a afinidade de YpsB muda quando se varia a curvatura dos lipossomos.

Outro aspecto interessante da caracterização de uma nova proteína de divisão é determinar que porção desta proteína seja responsável pelo seu direcionamento. Isto pode ajudar a entender os princípios gerais de direcionamento de proteínas em bactérias que devem ser diferentes dos de eucariotos por não possuírem um sistema de membranas internas, (Tâm e Joshua, 2008). Neste sentido, foram feitos os experimentos de deleção (Figura 19), que, depois de interpretados, foram resumidos na forma de um esquema (figura 39).

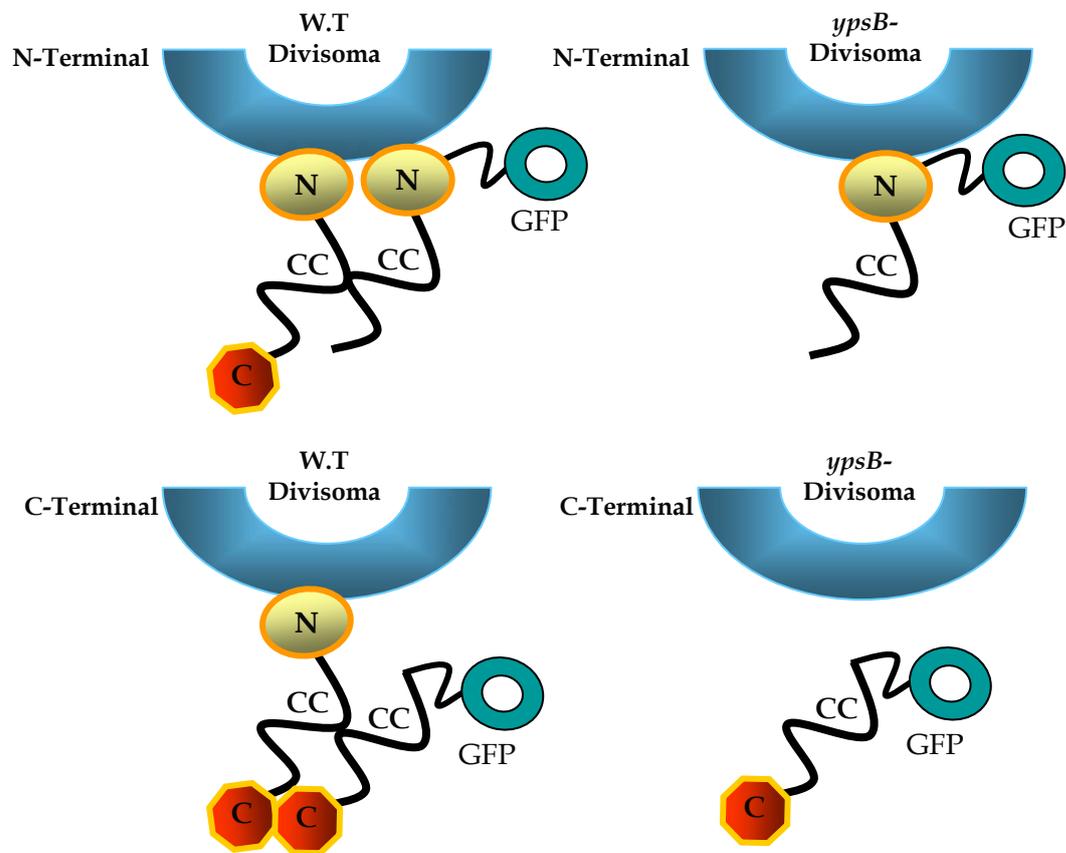


Figura 39: Esquema de localização de YpsB no complexo de divisão em *B. subtilis*. A figura mostra o resultado das deleções em YpsB que influenciam na localização ou não no septo de divisão tanto na cepa selvagem (PY79) como no mutante *ypsB*⁻.

De acordo com este esquema, mutantes com deleções na região N-terminal de YpsB são os mais eficientes para interagir com o divisoma e esta afinidade é aumentada quando a região coiled-coil da proteína estava presente. Sem a região N-terminal, YpsB aparentemente não é capaz de localizar no divisoma, ficando por todo o citoplasma. Além disso, YpsB apresenta afinidade por ela mesma, pois alguns destes mutantes (GFP-C, GFP-cc-C) conseguem

localizar no divisomo na presença da cópia selvagem da proteína, que mediará a esta localização mesmo sem o N-terminal da proteína.

Uma das explicações para a importância do domínio N-terminal vista nos mutantes de deleção remete a oligomerização que aumentaria a afinidade de YpsB pelo divisomo. Um dado que suporta esta explicação vem da localização do nocaute GFP-N que não é capaz de oligomerizar e portando de ligar ao divisomo.

Outra possibilidade remete a resíduos dentro do N-terminal importantes para a interação. Até o momento, não identificamos qual região dentro do N-terminal é a responsável por este recrutamento ao divisomo. No caso de DivIVA, existem duas mutações descritas que afetam a localização desta proteína (Perry e Edwards, 2004). A primeira, R18A em DivIVA (resíduo R23 em YpsB) e a segunda G19A em DivIVA (resíduo G24 em YpsB), são propostos como importantes para a interação com o divisomo e são bem conservados entre as proteínas da família DivIVA/YpsB (Figura 06).

Estes resíduos poderiam ser importantes para uma interação entre DivIVA/YpsB e o divisomo. Uma das formas de demonstrar a participação no recrutamento ao divisomo é através da mutação sítio dirigida seguida de microscopia de fluorescência. Neste caso, se os resíduos comuns entre YpsB/DivIVA afetarem a afinidade pelo divisomo, os mutantes vão perder a localização. Experimentos neste sentido já foram feitos para DivIVA (Perry e Edwards, 2004) e constataram que DivIVA não localizava mais, porém para YpsB estes mesmos testes ainda precisam ser realizados.

5.3 Função de YpsB em *B. subtilis*.

YpsB é encontrado nos estágios finais da montagem do complexo de divisão como DivIVA, contudo, YpsB não é essencial para a formação ou posicionamento do septo de divisão e não permanece nos pólos como DivIVA.

O sinergismo visto no mutante *ypsB⁻ftsA⁻* pode ser o resultado da ausência de YpsB que afetaria os últimos eventos da divisão influenciando a

síntese de peptídeoglicano. Como YpsB afeta a síntese de peptídeoglicano? Nós especulamos que YpsB module a atividade de PBP1 no divisomo. Assim, células sem FtsA ficam filamentosas, com apenas alguns septos ao longo da bactéria, mas, na ausência de YpsB, esta filamentação aliada ao fato que YpsB não poderia modular a atividade de PBP1, resultaria na morte da célula por não ser capaz de sintetizar a parede septal corretamente. PBP1, como visto anteriormente, tem atividade de transglicosilase e transpeptidase e localiza no septo durante a divisão (Scheffers e Errington 2004).

Esta hipótese para função de YpsB é apoiada por dois tipos de evidências *in silico*. Em primeiro lugar, análises de conservação de vizinhança mostraram que *ypsB* e *ponA* estão sempre muito próximos nos genomas em que estão presentes, sendo separados por dois ou três genes (Figura 07). Vários estudos demonstraram uma tendência dos genes permanecerem próximos a genes com os quais uma interação direta ou indireta é necessária para realização de uma função biológica (Tamames, 2001). Além disso, nós encontramos que ortólogos de PBP1 de algumas bactérias sem YpsB em seus genomas (enterobactérias) possuem uma região de homologia com seqüências de DivIVA/YpsB. Esta seqüência, ou assinatura, inclui apenas os resíduos conservados do N-terminal de YpsB e DivIVA (F-x[4,6]-RG-Y-x-x-x-x-x-x-F-L), identificados pelo programa

Programa	Pattern	Search
----------	---------	--------

 (<http://pir.georgetown.edu/pirwww/search/pattern.shtml>). Assumindo que a região N-terminal contém os aminoácidos importantes para a interação com o divisomo, a adição desta seqüência na proteína PBP1 de enterobactérias levaria esta a interagir com o divisomo na ausência de YpsB.

Em apoio a nossas hipóteses descritas acima, Claessen et al., 2008 mostrou recentemente que YpsB interage, em ensaios de duplo híbrido, com PBP1, EzrA e MreC. Ainda neste trabalho, PBP1 seria recrutada para o divisomo graças a ErzA com a participação de GpsB/YpsB (GpsB é o nome dado por estes autores para YpsB), o que levou os autores a propor o modelo onde EzrA e YpsB estariam envolvidas no direcionamento de PBP1 participando da sua alternância entre a parede lateral e o septo.

Apesar de elegante, há dados mostrados no artigo que não são compatíveis com este modelo de direcionamento. Um deles é justamente o fato da localização de PBP1 não parece ser afetada nos mutantes *ypsB*, diferentemente do proposto, que insinua que YpsB é importante para a localização de PBP1. PBP1 não localiza quando ErzA está ausente e mais recentemente Kawai et al., 2009 demonstrou que a localização de PBP1 também é dependente de MreB. A proteína MreB interage com MreC e esta interação é importante para sua localização, tanto que na ausência de MreC, a localização de MreB fica comprometida, deixando de formar espirais para concentrar-se em apenas alguns pontos ao longo da membrana (Defeu Soufo, H.J e Graumann, P.L, 2005). No trabalho de Claessen et al., 2008 a proteína PBP1 interage com MreC, porém em nenhum momento foi discutido a possível dependência de MreD, apenas de ErzA.

Desta forma, propomos que YpsB não é necessária para a correta localização de PBP1, mas que poderia ser necessária para regular a atividade da proteína.

Outro aspecto importante para compreender a função de YpsB é a descoberta, feita por, Macek et al., 2007, que identificou recentemente YpsB como uma provável fosfoproteína de *B. subtilis*. Os resultados obtidos por Macek et al., 2007 sugerem que YpsB é fosforilada nos resíduos de serina 217 e/ou treonina 223. Imaginamos que o estado de fosforilação de YpsB pode estar relacionado com a regulação da atividade de PBP1 e da síntese do septo.

A possibilidade de YpsB ser fosforilada levanta outra questão: Qual seria a proteína que reconheceria YpsB como substrato? Um candidato seria PrkC, uma quinase presente na membrana de *B. subtilis* com três domínios. O primeiro destes é um domínio ser/thr quinase citoplasmático, o segundo é uma região transmembrana (TMD) e o terceiro é extracelular, conhecido como PASTA. O domínio PASTA é conservado em várias proteínas que estão envolvidas na biogênese de peptídeoglicano (Yeats et al., 2002). No mesmo operon que encontramos o gene para *prkC* temos abaixo o gene *prpC* que codifica a proteína PrpC (Madedk et al., 2002). A proteína PrpC é uma fosfatase

que reconhece a forma fosforilada de PrkC, sugerindo que estas proteínas atuam em conjunto *in vivo* (Obuchowski M, et al., 2000, Madek et al., 2002). Em *E. faecalis* foi proposto que PrkC pode monitorar a integridade da parede celular e de alguma maneira regular a síntese de peptídeoglicano (Kristich et al., 2007).

Como YpsB parece ser fosforilada em ser/thr e está envolvida na regulação da síntese de peptídeoglicano é atraente imaginar que PrkC possa ser a quinase responsável por sua fosforilação. Outra evidência a favor desta hipótese é o achado de que em *Mycobacterium tuberculosis* uma quinase homóloga de PrkC, a proteína PknB, é capaz de fosforilar Wag31, um homólogo de DivIVA (Kang et al., 2008) que está relacionado com a regulação de crescimento, morfologia e síntese de parede em micobactérias. Estes dados sugerem que PrkC pode ser a quinase que fosforila YpsB. Para confirmar se PrkC é mesmo a quinase responsável, uma das maneiras é através da focalização isoelétrica, que analisaria numa cepa *prkC*⁻ se YpsB está fosforilada ou não.

5.4 YpsB na segregação cromossômica.

A conservação de vizinhança de YpsB abrange as proteínas YpsA, RecU e PBP1. YpsA contém 180 aminoácidos e é anotada como “proteína de função desconhecida” no Subtilist (<http://genolist.pasteur.fr/SubtiList/>) e BSORF (<http://bacillus.genome.jp/>). YpsA é o primeiro gene do operon com YpsB e apesar de não ter a função caracterizada, já teve a sua estrutura resolvida (<http://www.topsan.org/Proteins/NYSGXRC/2nx2>). A outra proteína de vizinhança conservada é RecU, a primeira proteína do operon com *ponA*, a *penicillin binding protein* (PBP1), envolvida em síntese de peptídeoglicano. RecU, também conhecida como PrfA, participa da segregação cromossômica, recombinação de DNA e reparo (Carrasco et al., 2004; Petersen e Setlow, 2000). Além disso, inativação de *prfA* diminui a velocidade de crescimento da bactéria afetando principalmente a esporulação. Já os resultados do STRING apontam para uma possível conexão entre YpsA e RecU. YpsA, segundo a estrutura que

foi determinada, contém o domínio “Rossmann”, encontrado em um grande número de proteínas que ligam a nucleotídeos, aminoácidos fosforilados e outras moléculas orgânicas (Berger et al., 1998).

Ainda sobre o processo de segregação, Dervyn et al., 2004 encontrou YpsB numa triagem de duplo híbrido para proteínas capazes de interagir com ScpA, que participa junto com RecU do complexo de condensação do cromossomo em bactéria, o SMC (*structural maintenance of chromosomes*). Nossos testes de microscopia mostraram que ScpA e YpsB possuem localização distintas porém, não podemos descartar a possibilidade que elas possam interagir, por exemplo, numa concentração muito baixa e que não foi vista por microscopia.

Desta forma, podemos vislumbrar a possibilidade que o sistema de divisão em bacilos pode estar conectado com a maquinaria de segregação através de YpsB e PBP1, durante a síntese de parede septal e RecU/YpsA, na partição dos cromossomos para as células filhas.

6. Conclusões.

Neste trabalho nós caracterizamos citologicamente YpsB, mais uma proteína envolvida na divisão em *B. subtilis*. YpsB está relacionada evolutivamente com outras proteínas de divisão, DivIVA e de fato, mostra propriedades parecidas com esta proteína. YpsB é encontrado nos estágios finais de montagem do complexo de divisão, aparentando dependência do sub-complexo DivIB-DivIC-FtsL-FtsW-PBP2B para o recrutamento. O mecanismo molecular de YpsB, contudo, é diferente de DivIVA. YpsB não é essencial para a formação ou posicionamento do septo de divisão e não é encontrada nos pólos como DivIVA. Além disso, os resultados de letalidade sintética entre *ftsA*⁻ *ypsB*⁻ sugerem que YpsB contribua para a correta e eficiente formação do septo,

possivelmente modulando a atividade de PBP1 durante a síntese da parede septal.

Além de YpsB, nossas análises de bioinformática encontraram YpbR, um homólogo da dinamina em *B. subtilis*. Dados preliminares sobre YpbR mostram que ela está presente no septo de divisão e apresenta afinidade pela membrana e em algumas células, YpbR é capaz de formar espirais. Células sem YpbR conseguem dividir eficientemente durante a fase vegetativa e formar septos assimétricos durante a esporulação. Portanto, apesar de seu padrão de localização sugerir que YpbR possa interagir com o divisomo, neste momento ainda não podemos afirmar se esta proteína tem qualquer papel na divisão.

Outra proteína encontrada foi YrzD, que está no divisomo e depende de DivIVA para localizar. Dados preliminares mostraram que YrzD localiza no septo não só durante a fase vegetativa, mas também durante a esporulação.

A identificação de outras proteínas de divisão mostra a incrível complexidade do divisomo e de seus componentes. Até o momento dezesseis proteínas foram caracterizadas como integrantes do complexo em *B. subtilis* e futuras descobertas vão colaborar para a compreensão do papel de cada um destes componentes durante a citocinese bacteriana.