UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUIMICA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas

(Bioquímica)

GUILHERME LOUZADA SILVA MEIRA

Estudo do Processo de Divisão em *Bacillus subtilis* por Microscopia de Fluorescência

São Paulo
2010

Data de depósito da tese:
26/02/2010

GUILHERME LOUZADA SILVA MEIRA

Estudo do Processo de Divisão em *Bacillus subtilis* por Microscopia de Fluorescência

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
2010

GUILHERME LOUZADA SILVA MEIRA

Estudo do Processo de Divisão em *Bacillus subtilis* por Microscopia de Fluorescência

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: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Assinatura:_____

Ao meu avô Mucio Gomes de Meira, pela saudosa companhia após os jogos do Flamengo no Maracanã. (*In memorian*)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que me acompanharam nesta jornada de cinco anos de doutorado.

Ao Fredy, pela paciência, orientação e por ter contribuído de forma significativa para o meu amadurecimento cientifico e pessoal.

Aos membros do laboratório: JR, Bisson, Valdir, Valquíria, Theopi, Camila, Rodrigo e Felipe pelo convívio durante os momentos de alegria e de dificuldade.

A minha querida Alessandra, rainha Bacilar e ao Robson, membros antigos do laboratório.

Ao pessoal do bloco zero, membros do laboratório do Prof. Chuck e da Profa. Carla Columbano.

Aos membros do laboratório da Profa. Maria Julia e do Prof. Walter Colli por nos acolher durante o início do doutorado.

Aos meus amigos que moram comigo, Rodrigo e Eliezer por compartilhar a vida comigo durante todo este processo.

Ao meu amigo Júlio que morou comigo e agora está em Nova York, fazendo pós-doc.

Aos amigos do fute chuva que rola toda semana.

A minha família, minha avó e meus tios e primos.

Aos meus pais Nelma e Luis, pelo amor e carinho incondicional, são as jóias raras da minha vida.

Aos meus irmãos Felipe e Leonardo, com quem compartilhei a vida desde que vim ao mundo, são meus amigos e confidentes.

A Daniela e a Marcela que compartilharam sua vida comigo durante este período.

Ao pessoal da secretária de pós-graduação pelo carinho no atendimento e por toda ajuda que prestam sempre quando solicitados.

A todas as pessoas que contribuíram de alguma forma para o meu amadurecimento, me ensinando valiosas lições de vida.

A FAPESP pelo apoio financeiro.

RESUMO

Meira, GLS. Estudo do processo de divisão em *Bacillus subtilis* por microscopia de fluorescência. (2010). 141 p. Tese de doutorado, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A divisão celular em *B. subtilis* inicia-se pela formação de um complexo multiprotéico, o divisomo, no sítio onde a bactéria irá se dividir. FtsZ é a primeira proteína a se localizar no futuro sitio de divisão, formando uma estrutura em anel (anel Z) que se estende por toda a circunferência da célula. O anel Z funciona como um arcabouço responsável por recrutar outras quinze proteínas de divisão que irão participar da montagem do divisomo. Nesta tese, utilizamos abordagens quantitativas e qualitativas de microscopia de fluorescência vital para estudarmos duas questões ainda não esclarecidas sobre o funcionamento do divisomo. A primeira delas é como o divisomo é montado. Para estudarmos a montagem do divisomo nós realizamos ensaios de co-localização entre o anel Z (FtsZ-mCherry) e as proteínas ZapA, EzrA, FtsW, FtsL, YpsB , DivIVA, e MinC fusionadas a GFP. Quanto maior a freqüência de co-localização entre FtsZ e outra proteína de divisão, mais inicial é a participação da proteína na formação do divisomo. Portanto, a medida da freqüência de co-localização entre o anel Z e as proteínas componentes do divisomo permite que se deduza uma cinética da montagem deste complexo. Estes ensaios demonstraram uma freqüência de co-localização de 97,33% para ZapA; 98,31% para EzrA; 83,90% para FtsW; 78,43% para FtsL; 50% para YpsB; 41,7% para DivIVA e 31,64% para MinC. Estes resultados sugerem que o divisomo seja formado em três etapas. ZapA e EzrA se associam ao divisomo imediatamente após a formação do anel Z, em seguida FtsW e FtsL são recrutados para o divisomo, e por último YpsB, DivIVA, MinC associam-se ao divisomo.

A segunda questão que investigamos nesta tese foi o mecanismo da mudança de posição do divisomo que ocorre durante a esporulação em *B. subtilis*. Na fase de esporulação a célula divide-se assimetricamente, com a formação do septo próxima a um dos pólos. Durante o crescimento vegetativo a divisão não ocorre próxima aos pólos por causa da ação das proteínas MinC, MinD e DivIVA, importantes reguladores espaciais da divisão. MinCD e DivIVA são inibidores da formação do anel Z que durante o crescimento vegetativo se localizam nos pólos das células.. Uma hipótese para

explicar o uso dos sítios polares para a divisão durante a esporulação seria que as proteínas MinCD e DivIVA seriam removidas dos pólos celulares. Para testarmos esta hipótese, estudamos a localização das proteínas MinCD e DivIVA durante a esporulação. Nossos resultados demonstraram que MinCD e DivIVA se re-localizam e saem dos pólos celulares durante a esporulação. Porém esta dinâmica ocorre após a formação do anel Z assimétrico, sugerindo que o anel Z seja insensível a estes inibidores durante a esporulação. Por ensaios genéticos em *B. subtilis* demonstramos que a proteína SpoIIE, conhecida como provável proteína responsável por promover a formação do septo assimétrico, seja capaz de contrapor a ação de MinC no início da esporulação. Dessa maneira nós propomos um novo modelo de mudança da divisão simétrica para assimétrica durante a esporulação, diferentemente da simples saída do complexo MinCD dos pólos como é proposto na literatura.

Palavras-chave: Divisão celular, *Bacillus subtilis*, divisomo, esporulação, FtsZ, complexo MinCD, SpoIIE.

ABSTRACT

Meira, GLS. Study of cell division in *Bacillus subtilis* by fluorescence microscopy. (2010). 141 p. Tese de doutorado, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Bacillus subtilis division begins through the formation of a multiprotein complex, the divisome, at the site of division. FtsZ is the earliest known protein to localize to the future division site where the protein forms a ring-like structure (Z-ring) that extends around the circumference of the cell. The Z-ring functions as a scaffold and recruits about fifteen other division proteins that compose the divisome. In this work, we used quantitative and qualitative methods of vital fluorescence microscopy to study two questions that have not been elucidated about the divisome dynamics. The first is how divisome is assembled. To address that problem, we made co-localization between Z-ring (FtsZ-mCherry) and proteins ZapA, EzrA, FtsW, FtsL, YpsB, DivIVA, and MinC fused to GFP. Higher is the match between GFP fusions to Z-ring, earlier is the assembly of division proteins to divisome. Therefore, the co-localization frequency between Z ring and divisome proteins will allow us to deduce the assemble kinetics of the divisome. This assays showed a co-localization frequency of 97,33% for ZapA; 98,31% for EzrA; 83,90 for FtsW; 78,43% for FtsL; 50% for YpsB; 41,7% for DivIVA and 31,64% for MinC. This data suggests that the divisome does not assemble in two but in three steps. ZapA and EzrA assemble into the divisome immediately after Z ring formation, secondly FtsW and FtsL were recruited to the divisome, and finally YpsB, DivIVA, MinC associated with the divisome.

The second question that we investigated in this work is the mechanism responsible for change the divisome position that occurs during sporulation in *B. subtilis*. In sporulation the cell divides asymmetrically, with a septum formation near poles. During vegetative grown the divisiome does not occur near poles because of MinC, MinD and DivIVA action, relevant for spatial regulation of division. MinCD and DivIVA are inhibitors of Z ring formation that during vegetative growth are located at poles. A hypothesis to explain the use of polar sites for division during sporulation would be that MinCD and DivIVA would be removed from cellular poles. To test this hypothesis, we studied the location of MinCD and DivIVA proteins during sporulation. Our results demonstrated that MinCD and DivIVA re-localize and leave to cell poles

during sporulation. However this process occurs after asymmetric Z ring formation, suggesting that Z ring would be unresponsive to this inhibitors during sporulation. Through genetics assays in *B. subtilis* we demonstrated that SpoIIE protein, known to probably play a role in asymmetric septum formation, would be able to contrapose MinC action during early sporulation. Therefore, we propose a novel model for change the symmetric to asymmetric division during sporulation, unlike the release of MinCD from pole proposed in the literature.

Keywords: Cell division, *Bacillus subtilis*, divisome, sporulation, FtsZ, MinCD complex, SpoIIE.

Abreviaturas

ATP	Adenosina Trifosfato
CFP	Proteína fluorescente ciano
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTPs	desoxi-ribonucleotídeos (dATP, dCTP, dTTP e dGTP)
FRAP	Recuperação da fluorescência após a "queima"
GFP	Proteína fluorescente verde
IPTG	Isopropil β-D-tiogalactopiranosídeo
Kb	quilobase
LB	Meio lisogênico
mCherry	Proteína fluorescente vermelha
OD	densidade óptica
OriC	Origem de replicação
ORF	*open reading frame*
pb	pares de bases
PBS	solução salina tamponada com fosfato
PCR	reação de polimerase em cadeia
RPM	rotações por minuto
Taq	*Thermus aquaticus*
TAE	Tampão contendo Tris, acetato e EDTA
TE	Tampão contendo Tris e EDTA
YFP	Proteína fluorescente amarela

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.

1.1 Divisão celular em *B. subtilis* 01
1.2 Início da construção do divisomo 04
1.3 Componentes do divisomo 06
1.4 Montagem do divisomo 10
1.5 Regulação espacial da divisão celular 14

1.6 Esporulação 17
1.7 O uso de GFP fusionado à proteínas como ferramenta para compreender fenômenos biológicos em procariotos 23

2. OBJETIVOS. 26

3. MATERIAIS E MÉTODOS.

3.1 Cepa *E. coli* 27
3.2 Cepas de *Bacillus subtilis* 28
3.2.1 Construção das cepas de *Bacillus subtilis* 29
3.3 Plasmídeos 33
3.3.1 Construção dos plasmídeos 33
3.4 Oligonucleotídeos 35
3.5 Meios e soluções utilizados 35
3.5.1 Meios para esporulação 35
3.6 Esporulação de *Bacillus subtilis* 36
3.7 Transformação das células competentes de DH5α 36
3.8 Preparação das células competentes em *Bacillus subtilis* 37
3.9 Transformação das células competentes de *Bacillus subtilis* 37
3.10 Extração de DNA plasmidial de *E. coli* 37
3.11 Purificação de DNA de gel de agarose 37
3.12 Amplificação de DNA por PCR 38
3.13 Análise de restrição 38
3.14 Seqüenciamento de plasmídeos 38
3.15 Ensaio de co-localização 39
3.16 Microscopia de fluorescência 39
3.16.1 Filmagem da fusão GFP-MinD utilizando câmaras 40

4. RESULTADOS.

Capítulo 1.

4.1. Análise da cinética de montagem do divisomo durante o crescimento vegetativo em *B. subtilis* 42

4.2 Análise da co-localização entre o anel Z e as sete proteínas que participam da formação do divisomo (ZapA, EzrA, FtsL, FtsW, YpsB, DivIVA, MinC) 46

Capítulo 2.

4.3 Localização das proteínas do sistema Min (MinC, MinD e DivIVA) durante a esporulação 59
4.3.1 Análise de MinC durante a esporulação 59
4.3.1.1 Construção de uma linhagem de *B. subtilis* (FG 672) contendo a fusão *gfp-minC* 59
4.3.1.2 Ensaio de complementação da cepa FG 672 62
4.3.1.3 Localização da fusão GFP-MinC durante a esporulação 67
4.3.2 As proteínas MinD e DivIVA também deixam os pólos durante a esporulação 71
4.3.3 Microscopia de série temporal demonstra a dinâmica da re-localização de MinD durante a esporulação 73

4.3.4 A re-localização de MinC durante a esporulação ocorre de independentemente de RacA 78
4.4 Co-localização de *gfp-minC* e *ftsZ-mCherry* durante a etapa inicial de esporulação 80
4.5 SpoIIIE é capaz de suprimir a letalidade causada pela super expressão de *minD* em células vegetativas de *B. subtilis*. 82
4.5.1 O domínio fosfatase não é essencial para SpoIIE suprimir a letalidade causada por minD em células vegetativas de *B. subtilis* 86

5. DISCUSSÃO.

Capitulo 1

5.1 Análise da cinética da montagem do divisomo durante o crescimento vegetativo em *B. subtilis* 90

Capitulo 2

5.2 Novo modelo proposto para a re-localização de MinC durante a esporulação 98
5.3 A atividade de MinC parece não afetar a formação do anel Z assimétrico durante a esporulação 103

6. CONCLUSÕES. 107

7. REFERÊNCIAS. 108

1. INTRODUÇÃO

1.1 Divisão Celular em *B. subtilis*

As bactérias estão entre os organismos mais bem adaptados da Terra. Em bilhões de anos de evolução, elas tornaram-se capazes de se adaptar a qualquer nicho biológico. Uma das vantagens evolutivas das bactérias frente a outros organismos é a sua capacidade de dividir rapidamente (Thanbichler & Shapiro, 2008). A maioria dos procariotos divide-se por fissão binária, originando duas células-filhas idênticas tanto do ponto de vista genético quanto morfológico (Angert, 2005). A divisão bacteriana é caracterizada pela duplicação do material genético, pelo aumento do tamanho e posteriormente formação do septo de divisão no meio da célula (Figura 1)

A divisão celular define o último estágio no ciclo celular bacteriano (de Boer et al., 1992). Em contraste com o ciclo celular eucariótico, onde os "checkpoints" asseguram que a iniciação de uma etapa só ocorre após o término da etapa anterior (Elledge, 1996), o ciclo celular bacteriano consiste da sobreposição de passos que seguem em paralelo, sem uma dependência evidente entre elas (Figura 2) (Hausser & Levin, 2008; Wang & Levin, 2009).

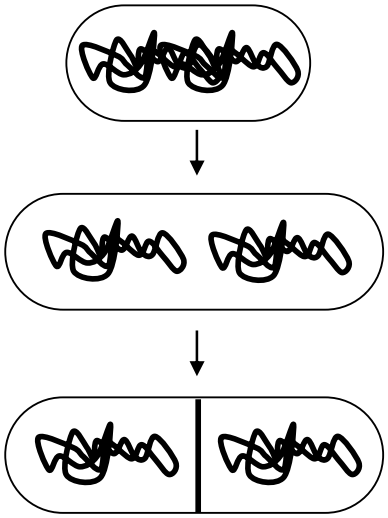


Figura 1: Representação da divisão celular em *B. subtilis*. As células duplicam seu material genético, crescem em tamanho e posteriormente a célula mãe se divide em duas células-filhas idênticas a partir de um septo de divisão formado exatamente no meio da célula mãe.

A citocinese consiste basicamente no processo de separação das células, resultando na divisão da célula mãe em células filhas semelhantes. O princípio é comum para procariotos e eucariotos. Entretanto os mecanismos macromoleculares que estes organismos utilizam para alcançar este objetivo são diferentes (Nanninga, 2001). 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 & Jacobs-Wagner, 2005). Além disso, o anel de actinomiosina, 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.

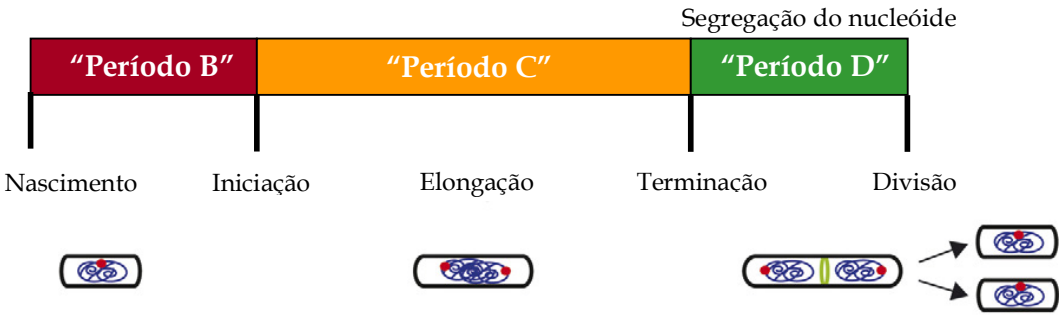


Figura 2: Ciclo celular bacteriano**.** Células dividem lentamente (por exemplo, durante o crescimento em meio mínimo), o ciclo celular ocorre em três períodos bem definidos: Período-B, nascimento; Período-C, início da replicação até a terminação; Período-D, divisão ou citocinese. A separação dos cromossomos ocorre juntamente com a replicação do DNA. A origem de replicação é indicada por um ponto vermelho. O anel citocinético (verde) é formado em algum momento após o início da replicação do DNA, entretanto a divisão não ocorre até que a segregação do nucleóide esteja completa. O período-B não existe em células que dividem rapidamente (por exemplo, crescimento bacteriano em meio rico), pois o tempo de geração é menor ou igual ao tempo requerido para a replicação e divisão. Figura adaptada de Haeusser, D. P., Levin P. A. 2008.

Em procariotos, é postulado que a proteína MreB, proteína homóloga da actina de eucarioto (van den Ent et. al., 2001; Esue et. al., 2006) auxilia na segregação do cromossomo, pois foi visto em várias bactérias que a sua super-expressão, depleção ou inativação por antibiótico resulta na localização randômica da OriC, bem como de outros defeitos na segregação cromossômica (Gitai et. al., 2005; Kruse et al., 2006). As proteínas ParA e ParB também desempenham um papel importante na segregação cromossômica (Thanbichler & Shapiro, 2008). Par A é uma ATPase e ParB, um cognato da proteína ligadora de centrômero eucariótica que se associa a sequências ParS (sequências conservadas de ligação a ParB), distribuídas próximo a OriC (Bartosik & Jagura-Burdzy, 2005). Células vegetativas de *B. subtilis* que são deficientes em ParA ou

ParB, foram incapazes de separar as OriC após a replicação (Lee & Grossman, 2006).

A divisão celular inicia-se pela formação de um anel contrátil aproximadamente cem vezes menor do que o anel eucariótico que se estende pela circunferência celular. Sua composição macromolecular é diferente, mas contem proteínas homólogas as proteínas presentes no citoesqueleto eucariótico (Nanninga, 2001). Esta estrutura responsável pela constrição e invaginação do envelope bacteriano é denominada de divisomo (Margolin, 2000). A primeira vista, a divisão bacteriana pode parecer simples, mas este processo é muito bem regulado no tempo e espaço (Margolin, 2001). Na ausência destes mecanismos regulatórios, as células poderiam se dividir antes de completarem a segregação cromossômica, possivelmente originando células-filhas não viáveis, devido à septação sobre o DNA, podendo provocar danos, ou quebras cromossômicas. Outro tipo de fenótipo poderia ser a ocorrência da divisão celular não só no meio da célula, mas também nos pólos, originando células menores sem DNA, como as minicélulas descritas no tópico Regulação Espacial da Divisão Celular.

1.2 Início da Construção do Divisomo:

A identificação da estrutura responsável pelo processo de divisão em bactérias (divisomo) começou a ser desvendada pelo isolamento de mutantes condicionais em *E. coli* que eram incapazes de se dividir quando crescidos em condições não permissivas (Hirota et al., 1968; Rothfield et al., 1999). O estudo destes mutantes permitiu identificar um grupo de genes denominados *fts* (*filamentation thermo sensitive)* cujos produtos eram essenciais para a divisão da bactéria. Na ausência destes genes, as células eram capazes de crescer, porém, incapazes de se dividir, apresentando um aspecto morfológico diferente das células selvagens (Hirota et al., 1968).

Com o passar dos anos, vários laboratórios utilizaram diversas técnicas como a genética clássica, bioinformática e microscopia de fluorescência,

identificaram aproximadamente quinze proteínas que foram caracterizadas como componentes do divisomo (Errington et al., 2003). A mais importante entre as proteínas que compõe o divisomo é FtsZ, pois em sua ausência o divisomo não é formado, indicando que todas as proteínas do divisomo dependem de FtsZ para localizar- se corretamente (Goehring & Beckwith, 2005). FtsZ é amplamente distribuída nos procariotos sendo encontrada em eubactérias, arqueas e em algumas organelas eucarióticas, como mitocôndrias e cloroplastos (Margolin, 2000; Miyagishima et al., 2003). Essa ampla distribuição indica que FtsZ é uma proteína importante para a divisão celular em procariotos. FtsZ é homóloga à tubulina eucariótica (Erickson et al., 1996; Rothfield et al., 1999) e se auto-associa em uma estrutura chamada "anel Z" que circunda toda a face interna da membrana citoplasmática (Bi & Lutkenhaus, 1991). Análises de FRAP (f*luorescence 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).

O anel Z é formado durante o período D, geralmente no espaço entre os dois nucleóides segregados (Hausser & Levin, 2008; Wang & Levin, 2009) e serve como um arcabouço responsável direta e indiretamente pelo recrutamento de todas as proteínas do divisomo (Goehring & Beckwith, 2005; Harry et al., 2006) (Figura 3). FtsZ atua desde o início da formação do divisomo até o final da citocinese (Weart e Levin, 2003).

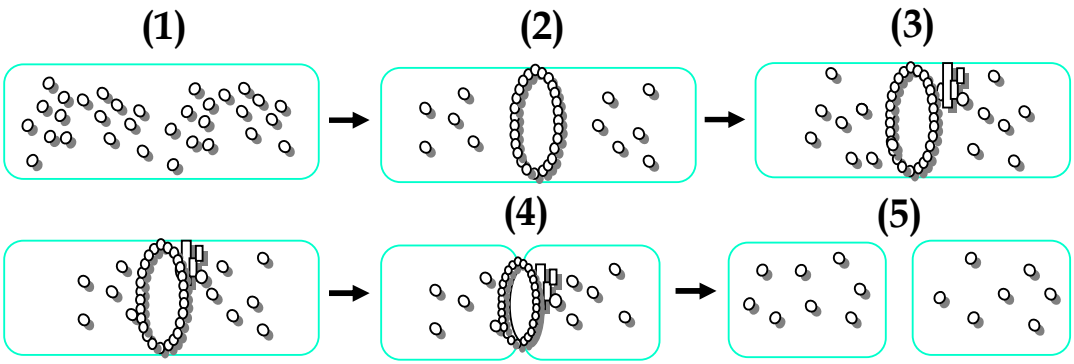


Figura 3: Esquema representando a citocinese bacteriana**.** (1) No estágio inicial as moléculas de FtsZ (representado pelos círculos pretos) estão presentes por todo citoplasma na célula. (2) Durante a divisão, FtsZ polimeriza na região central da célula (anel Z) com constantes trocas de FtsZ entre as moléculas do anel e do citoplasma. (3) O anel Z recruta as proteínas que compõem o divisomo (representado pelos retângulos), tornando-o maduro. (4) Conforme a constrição do divisomo vai acontecendo, as subunidades do anel Z vão se dissociando e voltando ao citoplasma. (5) Quando a síntese do septo de divisão termina, ocorre a separação da célula mãe em duas células filhas.

1.3 Componentes do Divisomo:

Em *B. subtilis*, a polimerização de FtsZ em anel Z é modulada de maneira positiva por FstA e ZapA (Goehring and Beckwith, 2005). 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). Portanto, FtsA é uma proteína que parece exercer duas funções: promover a formação do anel Z e servir como ponte entre a associação das proteínas tardias do divisomo ao anel Z (Gueiros-Filho 2007). A proteína ZapA promove a formação de ligações cruzadas entre polímeros de FtsZ, estabilizando a formação do anel Z (Gueiros-

Filho & Losick, 2002). Em *E. coli*, existe a presença de uma terceira proteína, ZipA, que é essencial para a montagem do divisomo e associação da proteína FtsZ com a membrana da bactéria (Hale & de Boer, 2002; Pichoff & Lutkenhaus, 2002; Goehring e Beckwith, 2005).

Além de moduladores que auxiliam a formação do anel Z, também há inibidores que desestabilizam este anel. Este é o caso de EzrA, uma proteína que inibe a polimerização de FtsZ. 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). Cepas deletadas de *erzA* apresentam múltiplos anéis ao longo da célula, indicando que EzrA deve atuar garantindo à bactéria que apenas um anel será formado por ciclo celular (Levin et. al., 1999).

SepF foi descoberta recentemente em *B. subtilis* como uma nova proteína componente do divisomo, por interagir com FtsZ e ser dependente deste para se localizar no divisomo e desempenhar uma função complementar a proteína FtsA (Hamoen et al., 2006; Ishikawa et al., 2006). Hamoen et al., 2006 sugere que SepF desempenhe um papel importante na síntese do septo de divisão, pois há alterações na morfologia do septo na ausência de *sepF*.

O complexo ternário formado pelas proteínas DivIB (FtsQ em *E. coli*), DivIC (FtsB em *E.coli*) e FtsL exercem função estrutural de conectar as proteínas que se associam diretamente ao anel Z com as proteínas responsáveis pela síntese de peptideoglicano (Errington et al., 2003; Gueiros-Filho 2007). Estas proteínas são essenciais para a divisão e apresentam interdependências para a sua estabilidade e recrutamento para o divisomo (Bramkamp et al., 2006). É sugerido na literatura que FtsL regule a presença deste complexo no divisomo, pois é uma proteína instável que apresenta uma rápida taxa de degradação logo que sua expressão é interrompida (Daniel et al., 1998; Daniel & Errington, 2000; Daniel et. al., 2006; Bramkamp et al., 2006).

As proteínas responsáveis pela síntese de peptideoglicano fazem parte de uma ampla família de proteínas e foram identificadas pela capacidade de se ligarem a penicilinas, as Penicillin-Binding Proteins (Goffin & Ghuysen, 1998).

Esta "fábrica de peptideoglicano" é responsável pelo início da formação da parede celular que separa fisicamente as duas células filhas. O peptídeoglicano é composto por longas cadeias de glicanos unidas lateralmente por peptídeos (Goffin & Ghuysen, 1998). Em *B. subtilis*, a PBP-1 (*penicillin-binding proteins*), codificada pelo gene *ponA*, possui a atividade de transpeptidação e transglicosilação envolvidas na síntese geral do peptideoglicano na bactéria e participa tanto da síntese do septo de divisão como do alongamento lateral da parede que ocorre durante o crescimento da bactéria (Errington et. al., 2003). 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). Outra classe de proteínas responsáveis pela síntese de precursores de peptídeoglicano em *B. subtilis* são as proteínas PBP-2A e PBP-2B que possuem somente atividade de transpeptidação dos precursores de peptideoglicano. A primeira atua na construção da parede lateral e a segunda na síntese do septo de divisão (Margolin, 2000; Scheffers & Pinho, 2005). PBP2B depende do trímero DivIB, DivIC e FtsL para se localizar no divisomo, indicando que estas proteínas associam-se cooperativamente formando um subcomplexo (Errington et al., 2003). Em *E. coli*, as proteínas homólogas a PBP-1 e PBP-2B de *B. subtilis* são as proteínas PBP-1a e PBP-3, respectivamente (Errington et al., 2003).

Além das PBPs, outras proteínas estão envolvidas com a síntese de parede do septo. Uma delas é FtsW, uma proteína membro da família SEDS (*shape, elongation, division and sporulation*) que contém dez domínios transmembrana. Esta família exerce a função de translocar precursores de peptídeoglicano da parte interna para a externa da membrana da bactéria (Holtje, 1998; Errington et al., 2003).

YpsB, foi descoberta por bioinformática como sendo parálogo da proteína DivIVA, uma proteína envolvida no controle espacial da divisão e que será descrita adiante. Análises citológicas demonstraram que YpsB depende do sub-complexo DivIB-DivIC-FtsL-FtsW-PBP2B para localizar-se corretamente no divisomo (Tavares et al, 2008). É sugerido que YpsB contribua para a correta e

eficiente formação do septo, possivelmente modulando a atividade de PBP1 durante a síntese da parede celular do septo de divisão (Tavares et al, 2008; Claessen et al., 2008).

As proteínas MinCD e DivIVA que também são componentes do divisomo serão descritas no tópico Seleção Espacial da Divisão Celular.

Todas as proteínas componentes do divisomo em *B. subtilis* estão representadas na Figura 4.

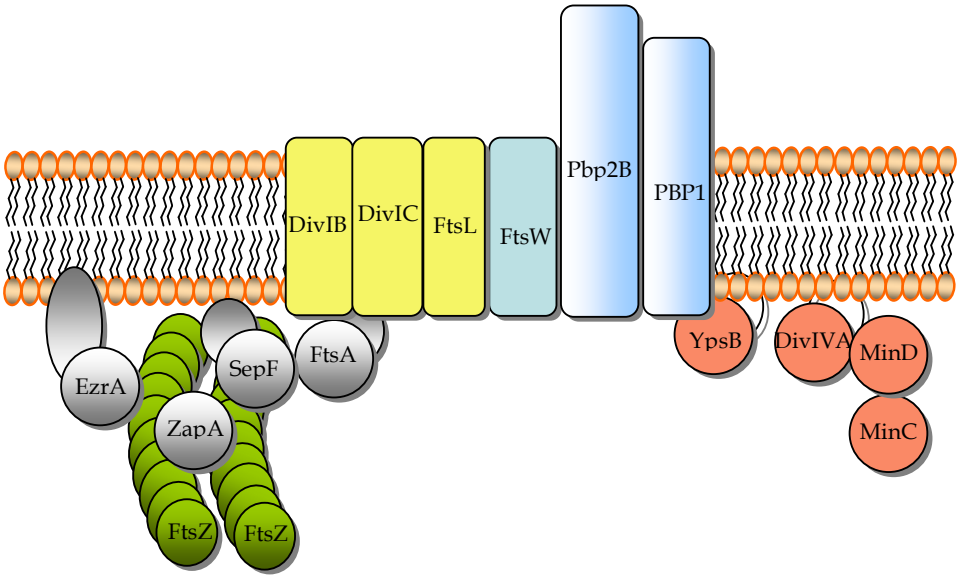


Figura 4: Esquema da maquinaria de divisão *B. subtilis*. A formação do divisomo inicia-se com a polimerização de FtsZ na região central da bactéria formando o anel Z. O anel Z é responsável pelo recrutamento das proteínas ZapA, FtsA e SepF que ajudam a estabilizar o anel. DivIB, DivIC e FtsL compõem um trímero que se conecta com as proteínas FtsW, Pbp2B e PBP1, importantes na síntese de parede. Neste esquema vemos também outros componentes que fazem parte do divisomo como ErzA, YpsB, DivIVA e MinCD. Figura adaptada de Tavares, 2009. As proteínas citoplasmáticas são: FtsZ, ZapA, MinC e MinD; as proteínas periféricas de membrana são: EzrA, FtsA, SepF, YpsB e DivIVA; as proteínas integrais de membrana são: DivIB, DivIC, FtsL, FtsW, Pbp2B e PBP1.

1.4 Montagem do Divisomo

Estudos de localização de proteínas de divisão celular realizadas em mutantes condicionais em *E. coli* e *B. subtilis* revelaram que estas proteínas se localizam no sitio de divisão em uma ordem bem definida hierarquicamente (Daniel & Errington, 2000; Katis et al. 2000, Feucht et al., 2001; Errington et al, 2003). Esta hierarquia foi baseada em estudos de co-dependência de localização observada entre as proteínas de divisão. Nestes estudos foi analisada a localização de uma determinada proteína de divisão fusionada a GFP, na ausência de um dos componentes do divisomo. Caso esta proteína permaneça corretamente localizada no sitio de divisão, isto significa que a proteína não depende do outro componente do divisomo para localizar. Caso isso não aconteça a proteína apresenta-se localizada por todo cilindro bacteriano, indicando a dependência de localização por outro componente do divisomo. Desta maneira foi possível montar uma ordem hierárquica de co-dependência de localização entre as proteínas que compõe o divisomo (BuddelMeijer & Beckwith, 2002; Errington et al, 2003; Goehring and Beckwith, 2005) (Figura 5).

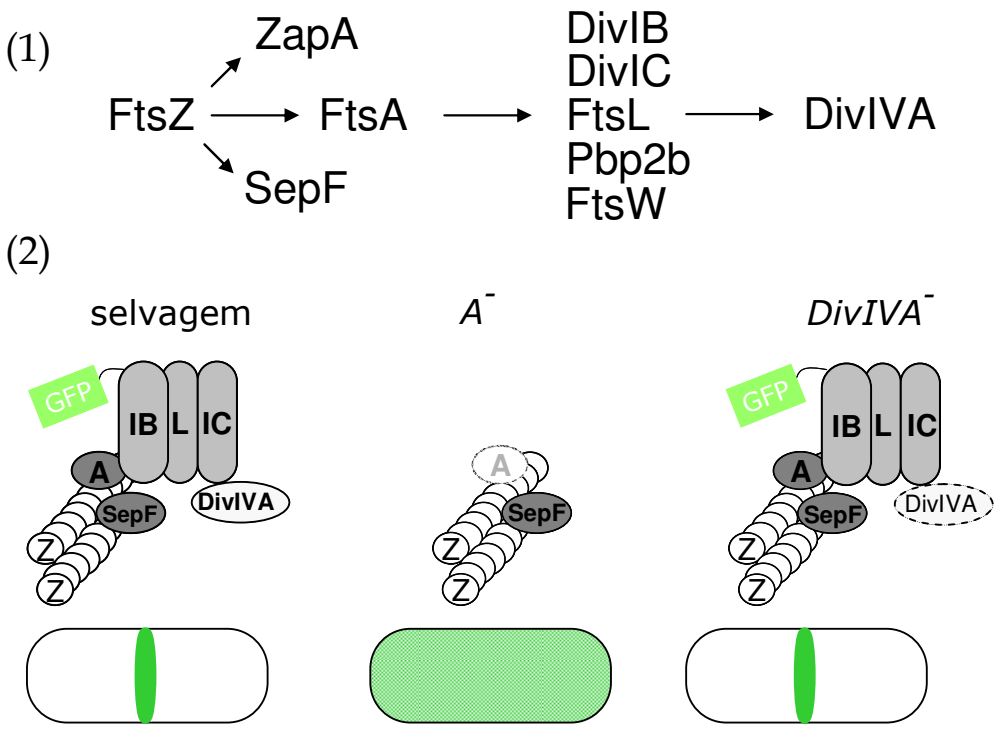


Figura 5: Hierarquia de montagem do divisomo em *B. subtilis* estabelecida por estudos que revelaram a co-dependência entre as proteínas de divisão celular. (1) Ordem hierárquica da montagem do divisomo em *B. subtilis*. (2) Esquema representativo de como foram realizados os ensaios de co-dependência entre os componentes do divisomo em *B. subtilis* e *E. coli*. Primeiro, uma proteína é fusionada a GFP (neste exemplo, DivIB-GFP) e observada sua localização no sitio de divisão (selvagem). Depois foi analisada a localização desta mesma proteína na ausência de algum outro componente do divisomo, como, por exemplo, FtsA. Se DivIB-GFP deixar de apresentar a localização em forma de anel, isto significa que esta depende de FtsA para se localizar corretamente ao sitio de divisão (A-). Em seguida a mesma fusão é analisada na ausência de outra proteína, por exemplo, DivIVA. Caso DivIB-GFP se localize de maneira correta no sítio de divisão, a localização desta independe da proteína DivIVA (DivIVA^{-}).

Entretanto é importante ressaltar que a ordem hierárquica reflete a relação de dependência entre as proteínas de divisão e não reflete a ordem temporal em que estas proteínas se associam ao divisomo (Goehring and Beckwith, 2005; Gueiros-Filho 2007). Isto indica, por exemplo, que o estudo da ordem hierárquica não fornece informações se as proteínas de divisão associam-se ao divisomo de maneira seqüencial ou se o complexo de proteínas que compõem o divisomo existe de maneira pré-montada na célula a partir da formação do anel Z, o complexo é inteiramente montado (Figura 6).

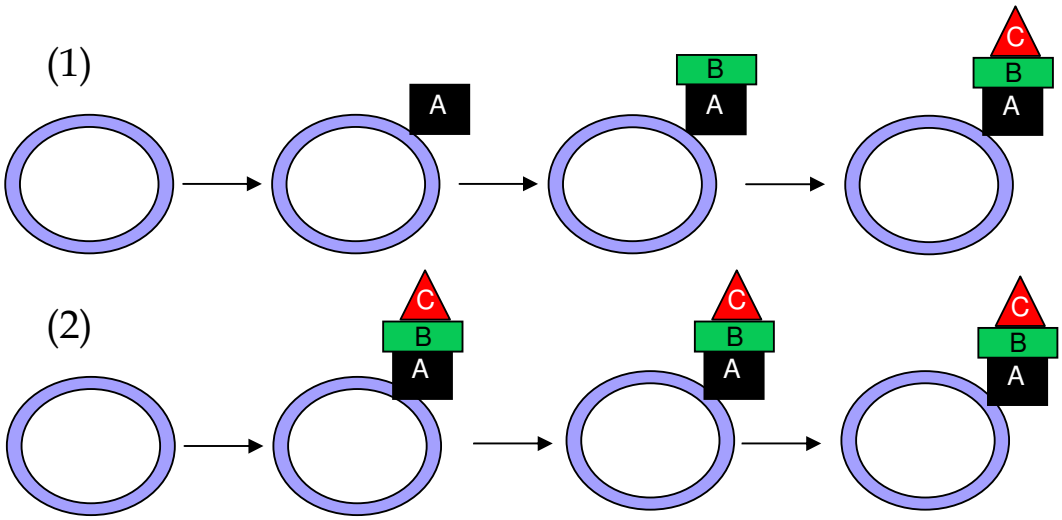


Figura 6: Representação esquemática de duas possíveis cinéticas de associação de proteínas que co-dependem entre si para localizar-se no divisomo. (1) As proteínas se associam ao divisomo de maneira seqüencial ou (2) o complexo de proteínas que compõe o divisomo existe de maneira pré-montada na célula e a partir da formação do anel Z, o complexo é inteiramente montado. O circulo em azul representa o anel Z; as proteínas A, B, C são exemplos de proteínas componentes do divisomo.

Em *E. coli* foi demonstrado que a maturação do divisomo ocorre em duas etapas: a primeira etapa é caracterizada pela associação das proteínas que não dependem de FtsQ para se associarem ao anel Z. Após um intervalo de dezessete minutos, FtsQ e outras proteínas envolvidas na síntese de peptideoglicano são recrutadas para o divisomo (Aarsman et al., 2005). Para investigar a sequência temporal de associação das proteínas de divisão celular de *E. coli* ao divisomo, os autores estudaram o tempo que FtsZ e as proteínas tardias como PBP3 e FtsN levam para se associar ao sítio de divisão. Para isso eles observaram a localização das proteínas por imunofluorescência e analisaram a freqüência de células que apresentaram as proteínas de divisão localizadas no meio da célula. Inferindo que a freqüência de células com a localização medial de FtsZ representa a porcentagem de células que estão no estágio inicial da construção do divisomo, eles estudaram esta mesma freqüência para outros componentes do divisomo e estabeleceram a cinética de montagem do divisomo em *E. coli*. Para estudar uma população de células em condições fisiológicas comparáveis, ou seja, numa condição em que as células apresentem os parâmetros do ciclo celular como: replicação do DNA, segregação do nucleóide e constrição/septação celular, correlacionados, os autores submeteram a população de células de *E. coli* ao crescimento balanceado (steady state) (Fishov *et al.*, 1995), ou seja, o crescimento bacteriano foi realizado numa condição onde o meio se manteve constante de nutrientes. Neste tipo de condição, a taxa de crescimento em massa das células é proporcional a taxa de divisão celular.. Dessa maneira, as células na cultura terão uma distribuição constante de idade e a freqüência relativa das células numa certa idade também será constante, para um tempo no ciclo.

No início deste projeto não havia qualquer informação sobre a cinética de montagem do divisomo para *B. subtilis*. Durante a execução deste trabalho, foi publicado um estudo neste organismo que sugeria que o divisomo também era montado em duas etapas: primeiro o anel Z é formado no meio da célula concomitante com FtsA, ZapA e EzrA. Em seguida, um segundo grupo de

proteínas, incluindo YpsB, FtsL, DivIB, FtsW, Pbp2B e DivIVA, são recrutadas para o complexo de divisão após 20% do ciclo celular (Gamba et al., 2009).

1.5 Regulação Espacial da Divisão Celular

A formação do septo de divisão ocorre de uma maneira precisa no meio da célula durante a fase vegetativa, originando células-filhas com tamanhos semelhantes. Existem dois fatores chaves responsáveis por manter esta regulação espacial precisa no meio da célula: o sistema Min e a proteína Noc (*B. subtilis*)/ SlmA (*E.coli*) (Errington et. al., 2003).

O sistema Min é um dos principais fatores que fazem com que a divisão seja simétrica, pois ele impede a polimerização do anel Z nos pólos da célula, mas permite que isto aconteça na sua região central. O sistema Min é constituído por complexos das proteínas MinC e MinD (MinCD). MinC é o inibidor propriamente dito da polimerização da FtsZ (Hu et al., 1999), sendo responsável por impedir as ligações laterais entre os protofilamentos de FtsZ (Scheffers, 2008). MinD é uma ATPase que recruta MinC para a face interna da membrana plasmática (Marston & Errington, 1999), aumentando sua concentração local, o que é determinante para a sua atividade nos pólos (Hu et al., 2003).

Na ausência do complexo MinCD, a divisão ocorre também de maneira assimétrica em 16% das células, levando à formação de mini-células sem DNA, não funcionais (Rothfield & Zhao, 1996; Levin *et al.*, 1998). A super-expressao do complexo MinCD inibe a formação de anéis Z em qualquer parte da célula, levando a célula ao fenótipo de filamentacão branda ou severa, podendo resultar em morte celular (Marston & Errington, 1999).

Em *B. subtilis* o complexo MinCD se localiza nos pólos celulares. Isto ocorre devido a presença da proteína DivIVA que é responsável por confinar o complexo MinCD, delimitando a área onde MinC poderá interagir com FtsZ (Edwards & Errington, 1997; Marston, 1998). É sugerido que DivIVA se associe

aos pólos por ser capaz de reconhecer curvatura negativa das membranas e por isso seja recrutado para os pólos em vez de se ligar a membrana presente em todo cilindro bacteriano (Ramamurthi & Losick, 2009; Lenarcic et al., 2009). Em *E.coli* o complexo MinCD não fica retido aos pólos celulares como em *B. subtilis*, pelo contrário, este complexo é dinâmico com um comportamento peculiar de oscilação de um pólo a outro da célula num período de aproximadamente 40 segundos. Esta oscilação é dependente de MinE, que também oscila desfazendo a acumulação do complexo MinCD em um dos pólos. Dessa maneira, a presença de MinCD oscilando nos pólos impede a formação do anel Z nestes locais (Huang et al., 2003; Lutkenhaus, 2007).

As regiões entre os pólos e o meio da célula são locais onde poderia ocorrer a citocinese, porém isto não ocorre já que esta região é ocupada pelo nucleóide. O modelo que mostra que o nucleóide pode impedir a divisão celular é chamado de "oclusão do nucleóide" e foi postulada por Woldringh et al., 1991. Os autores observaram que o nucleióde suprimia a divisão em sua redondeza e propuseram que a oclusão ocorria pela atividade de transcrição e tradução existente em volta do nucleóide. Anos mais tarde, foi identificado o gene *yyaA* perto da OriC (Sievers et. al., 2002), cujo produto é uma proteína semelhante a Spo0J, responsável pela segregação do cromossomo (Williams & Thomas, 1992). Este gene foi rebatizado de *noc* (*nucleoid occlusion*) e codifica a proteína Noc que foi caracterizada por se associar ao DNA, evitando que o divisomo seja montado sobre os cromossomos antes que eles tenham sido replicados e segregados para as células filhas (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).

A regulação espacial da divisão em *B. subtilis* é demonstrada na Figura 7.

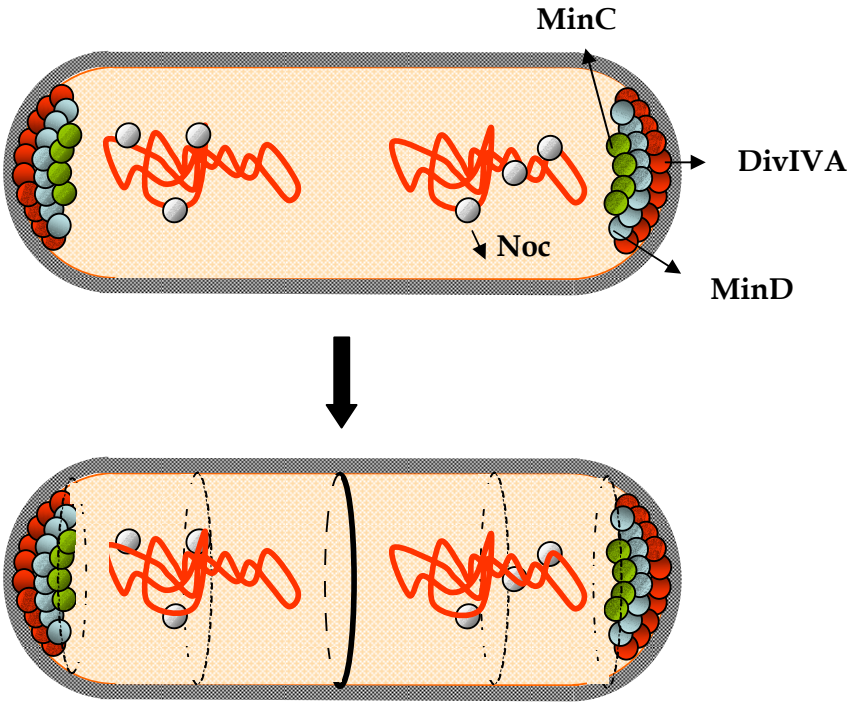


Figura 7: Esquema geral da inibição da divisão nos pólos da célula através do sistema MinCD e DivIVA e o mecanismo da oclusão do nucleóide (Noc), que evita que o divisomo seja montado sobre o cromossomo em *B. subtilis*. Estes sistemas condicionam a divisão à região central da bactéria, único local da célula onde não há inibição da montagem do anel Z. Figura adaptada de Tavares, 2009.

1.6 Esporulação:

B. subtilis é um organismo que sofre um processo de diferenciação genética e morfológica quando se encontra em carência nutricional, como ausência de carbono, nitrogênio ou em algumas circunstâncias, fósforo (Piggot & Hilbert, 2004). Este processo é chamado de esporulação e ocorre em sete etapas até a formação do esporo (Figura 8) (Hilbert & Piggot, 2004).

A esporulação inicia-se em resposta a inúmeros sinais externos e internos, incluindo sinais de carência nutricional, densidade celular e progressão do ciclo celular (Trach & Hoch, 1993; Perego et. al., 1994; Burholder & Grossman, 2000). Estes sinais ativam diferentes tipos de quinases (KinA, KinB, KinC, KinD and KinE) que promovem a fosforilação da proteína Spo0A (Jiang et al., 2000). A Spo0A fosforilada é essencial para a regulação da transcrição gênica durante a esporulação, já que ela é a responsável pela ativação de genes específicos de esporulação como, por exemplo, genes codificantes dos fatores σ^F e σ^E (Fujita & Losick, 2003). Outro fator importante na regulação da esporulação é o fator sigma da fase estacionária, σ^H, que dirige a transcrição de mais de 87 genes durante o processo de esporulação (Britton et. al., 2002).

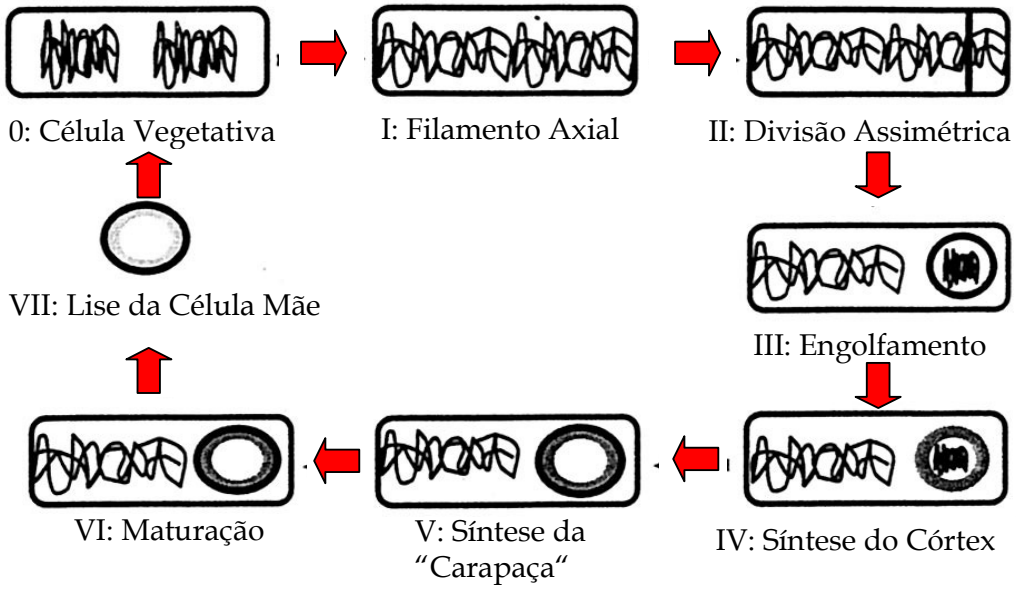


Figura 8: Representação esquemática dos estágios da formação do esporo. A fase vegetativa é definida como estágio 0. Nesta fase as células contém os dois cromossomos replicados. Durante a formação do filamento axial, os cromossomos formam uma estrutura esticada ao longo da célula, definindo o estágio I. A divisão assimétrica ocorre no estágio II, o pré-esporângio divide-se em dois compartimentos denominados: célula mãe e pré-esporo. No momento da divisão, aproximadamente 30% do cromossomo fica no pré-esporo, o restante do DNA é translocado pela proteína SpoIIIE. O estágio III é definido pelo engolfamento, um processo no qual o pré-esporo é "fagocitado" pela célula-mãe e termina livre como um protoplasto dentro desta, envolvido por duas membranas. A síntese da parede celular e do "córtex", um tipo de peptideoglicano, entre as duas membranas que envolvem o pré-esporo define o estágio IV. A deposição da "carapaça", camadas protetoras de proteínas em volta do presporo, define o estágio V. Juntamente com a formação da "carapaça" e do "córtex", o pré-esporo é desidratado, tendo uma aparência brilhante quando visualizado por contraste de fase no microscópio. O estágio VI é a maturação, quando o esporo adquire sua resistência máxima, entretanto, nenhuma mudança morfológica é detectada. O estágio VII representa a lise da célula mãe e a liberação do esporo para o meio ambiente. Figura adaptada de Hilbert & Piggot, 2004.

Um dos primeiros eventos na célula pré-divisional é a conformação do cromossomo em uma estrutura denominada filamento axial, que é constituído pelo cromossomo na conformação de um filamento que se estende por toda célula até os pólos (Bylund et. al., 1993; Webb et al., 1997). É sugerido que esta conformação do DNA seja regulada pelas proteínas da família SMC (*structural maintenance of chromosomes*) que são responsáveis pela compactação e segregação dos cromossomos (Britton et al., 1998; Lindow et al., 2002). Os mutantes smcΔ são capazes de ativar Spo0A, mas são incapazes de formar o filamento axial (Graumann & Losick, 2001), sugerindo que estas proteínas sejam mesmo os efetores da formação dos filamentos axial (Hilbert & Piggot, 2004). Também foi postulado na literatura que a divisão assimétrica não ocorre na ausência do filamento axial, sugerindo a existência de um mecanismo que acopla os dois eventos (Graumann & Losick, 2001). Este mecanismo deve assegurar que a divisão assimétrica só ocorra quando a origem de replicação está na extremidade polar do pré-esporo, possibilitando que seja um molde para a ação da E-σ^F (núcleo da RNA polimerase associada ao σ^F) e para a correta translocação do cromossomo dentro deste compartimento (Hilbert & Piggot, 2004). DivIVA surgiu como um possível alvo para a busca de controles genéticos na formação do filamento axial, pois o isolamento de mutantes divIVAΔ defeituosos especificamente na esporulação sugeriram que DivIVA podia participar no desenvolvimento do filamento axial (Hilbert & Piggot, 2004). Estes mutantes frequentemente formavam pré-esporos anucleados (Thomaides et. al., 2001), indicando que o mecanismo responsável pelo acoplamento entre a formação do filamento axial e a divisão assimétrica foi rompido (Graumann & Losick, 2001). A proteína RacA (*remodeling and anchoring of the chromosome A*) foi encontrada associada a regiões não específicas do cromossomo e também nos pólos celulares, conectando o DNA aos pólos celulares como uma ponte. Esta localização de RacA ao pólo celular é dependente de DivIVA (Wu & Errington, 2003; Ben-Yehuda et. al., 2003).

Após a formação do filamento axial, o próximo evento da esporulação é a formação do septo assimétrico. Na fase vegetativa, o divisomo forma-se no meio da célula com extrema acurácia (Migocki et. al., 2002), entretanto na esporulação o aparato de divisão desloca-se para os pólos resultando na formação do septo assimétrico de divisão (Errington et. al., 2003). Este processo resulta na mudança total de preferência espacial da divisão, do meio da célula para os pólos. Os mecanismos que levam a esta inversão ainda são desconhecidos. Ben-Yehuda *et al.*, 2003 sugerem que a divisão assimétrica ocorre porque RacA desfaz a interação de MinCD com DivIVA, liberando MinCD dos pólos e facilitando a formação do septo assimétrico (Figura 9). Entretanto, nunca foi demonstrado a exata localização do complexo MinCD durante a esporulação.

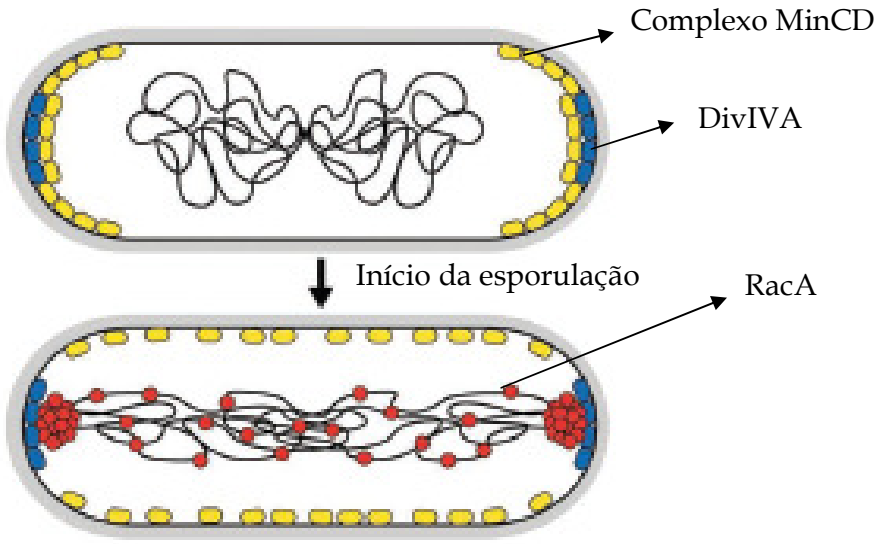


Figura 9: Modelo de re-localização do complexo MinCD durante a esporulação. Durante a formação do filamento axial, RacA interage com DivIVA, liberando as proteínas MinC e MinD para todo o cilindro bacteriano. Esta liberação do complexo MinCD dos pólos permite a formação do septo assimétrico. Figura retirada do trabalho de Ben-Yehuda e colaboradores, 2003.

A divisão assimétrica permite que as células se tornem diferentes do ponto de vista genético e morfológico (Errington et al., 2003). A mudança de localização da maquinaria de divisão tem início pela redistribuição do anel Z do meio da célula na direção de ambos os pólos (Bem-Yehuda & Losick, 2002), através de uma estrutura que se parece com as espirais das proteínas homólogas de actina, Mbl e MreB (Jones et al., 2001). É relatado na literatura que a mudança do anel Z para os pólos durante a esporulação depende de um aumento na expressão de *ftsZ* e da presença de SpoIIE (Gonzy-Treboul et al., 1992; Gholamhoseinian et al., 1992; Khvorova et al., 1998; Ben-Yehuda & Losick, 2002). A ausência de *spoIIE* e do aumento de expressão de *ftsZ* , resulta na má formação do anel Z e no bloqueio da divisão assimétrica. Simultaneamente, a super-expressão de *ftsZ* quando combinada com a expressão de SpoIIE, leva a divisão assimétrica durante a fase vegetativa (Ben-Yehuda & Losick, 2002). SpoIIE é uma proteína sintetizada somente durante a esporulação (Levin et al., 1997), interage com FtsZ (Lucet et al., 2000) e localiza-se de maneira semelhante ao anel Z no início da esporulação (Arigoni et al., 1995). Entretanto, ainda não é conhecido como SpoIIE auxilia molecularmente na formação do anel Z polar e na divisão assimétrica. Existe o modelo que SpoIIE ancora o anel Z na membrana celular e antagoniza o efeito inibitório exercido pelo complexo MinCD presente nos pólos (Bem-Yehuda & Losick, 2002; Hilbert & Piggot, 2004).

O anel Z é formado nos dois pólos celulares (Levin & Losick, 1996; Ben-Yehuda & Losick, 2002), indicando que a célula tem dois sítios onde pode ocorrer a divisão assimétrica. Entretanto, o septo de divisão só é formado em um destes sítios (Hilbert & Piggot, 2004). Recentemente, foi identificado em *B. subtilis*, a proteína MciZ (*mother cell inhibitor of FtsZ*), que é responsável por impedir a maturação do anel Z formado na célula mãe (Handler et al., 2008).

No momento da divisão assimétrica, o pré-esporo captura somente um terço do cromossomo (Errington, 2003). Em mutantes spoIIIE, dois terços do cromossomo continua retido na célula mãe (Wu & Errington, 1998). SpoIIIE foi identificado como uma translocase que localiza no centro do septo assimétrico

(Wu & Errington, 1997; Sharp & Pogliano, 1999) e utiliza ATP para transportar o cromossomo até o pré-esporo (Bath et. al., 2000).

Após a divisão do esporângio em célula mãe e pré-esporo, os dois compartimentos são submetidos a diferentes programas de expressão gênica. Isso ocorre devido à ação de fatores sigmas específicos para cada compartimento: σ^F no pré-esporo e σ^E na célula mãe. Em momentos mais avançados da esporulação, o engolfamento completo do pré-esporo pela célula mãe levará a ativação do σ^G no pré-esporo e do σ^K na célula mãe (Hilbert & Piggot, 2004).

Apesar da expressão de σ^F no esporângio, este só se torna ativo após a divisão assimétrica (Gholamhoseinian & Piggot, 1989). Sigma F está sujeito a regulação pós-traducional de dois produtos do operon *spoIIA*: as proteínas SpoIIAA e SpoIIAB. A superexpressão de SpoIIAB inibe a atividade de σ^F e o mutante *spoIIABΔ* apresenta a atividade aumentada de σ^F. A mutação em *spoIIAA* bloqueia a atividade de σ^F, mas a atividade é restaurada no duplo mutante *spoIIABΔ* e *spoIIAAΔ*. Estes resultados indicam que SpoIIAB antogoniza σ^F e SpoIIAA antogoniza SpoIIAB (Schmidt et al., 1990). Análises bioquímicas demonstraram que SpoIIAB atua como um fator anti-sigma e SpoIIA antagoniza a ação de SpoIIAB, atuando como um fator anti-anti-sigma (Duncan & Losick, 1993; Min et. al., 1993). SpoIIAB inibe σ^F diretamente, atuando com um fator anti-sigma e indiretamente por fosforilar o fator anti-anti-sigma SpoIIA, inativando-o (Min et. al., 1993; Najafi et al., 1995). A ativação de σ^F ocorre pela presença de SpoIIE no pré-esporo, sua atividade fosfatase, desfosforila e ativa SpoIIA que interage com SpoIIAB, liberando σ^F no pre-esporo (Duncan et. al., 1995; Arigoni et al., 1996).

O nosso foco neste tema foi abranger o início da esporulação em *B. subtilis*, mais precisamente até o estágio II, porque é nesta faixa inicial da esporulação que ocorre a mudança de preferência espacial da divisão e desta forma, nosso objetivo foi estudar os mecanismos que levam a esta inversão. Os estágios posteriores estão resumidos na Figura 8, mas nós não iremos entrar em detalhes neste tópico.

1.7 O Uso de GFP Fusionado a Proteínas como Ferramenta para Compreender Fenômenos Biológicos em Procariotos.

Uma das vantagens de se utilizar como ferramenta o GFP é a possibilidade de estudar o comportamento dinâmico de uma determinada proteína dentro da célula. Diferentemente da metodologia de imunofluorescência, a célula pode ser observada no microscópio de fluorescência sem ser fixada, permitindo a microscopia de série temporal de uma única célula. Este método foi utilizado com sucesso para desvendar a regulação espacial da divisão em *E. coli*. Como explicado anteriormente, em *E.coli* o complexo MinCD não fica retido aos pólos celulares como em *B. subtilis*, este complexo é dinâmico, com um comportamento peculiar de oscilação de um pólo a outro da célula num período de aproximadamente 40 segundos. (Huang et al., 2003; Lutkenhaus, 2007). Este mecanismo começou a ser desvendado com a observação da fusão GFP-MinD dentro da célula que revelou o comportamento de oscilação da fusão GFP-MinD (Raskin & de Boer, 1999a). A fusão GFP-MinD re-localiza de um pólo ao outro da célula a cada 10-30s. Este mesmo comportamento oscilante foi observado para GFP-MinC (Hu and Lutkenhaus, 1999; Raskin and de Boer, 1999b) e para MinE-GFP (Fu et al., 2001; Hale et al., 2001).

Outra estratégia utilizando GFP foi observada em *B. subtilis*. Em vez de fusionar GFP a uma proteína, Webb *et al* ., 1997 inseriram um cassete contendo repetições em tandem de operadores *lac* (*lacO*) no cromossomo. Os autores tinham o objetivo de analisar a dinâmica de segregação do cromossomo em *B. subtilis*. Para isso, fusionaram o repressor lac (LacI) a GFP (GFP-LacI) e visualizaram o DNA a partir da associação de GFP-LacI aos operadores *lacO* inseridos no cromossomo. O microscópio de fluorescência foi utilizado para capturar movimentos do complexo GFP-LacI-DNA durante o processo de segregação. Os autores sugerem que a segregação em *B. subtilis* ocorre por um processo ativo, pois a distância medida entre a OriC (~1,4μm) é maior do que a

distância que o processo de segregação sem gasto de energia poderia proporcionar (Webb *et al.*,1998).

Um exemplo de como a localização de proteínas pode ser utilizado para entender processos biológicos foi demonstrada em *B. subtilis*. A localização de SpoIIE foi importante para começar a desvendar o mecanismo de ação desta proteína na esporulação (Arigoni et. al.1995). Antes deste trabalho, era postulado na literatura que SpoIIE participava da ativação de σ^F, entretanto, não se sabia como isto poderia ser feito (Duncan et. al., 1995). Arigoni e colaboradores (1995), demonstraram que SpoIIE localizava em possíveis sítios perto dos pólos onde provavelmente o septo assimétrico seria formado. Estes resultados, foram vistos por imunofluorescência e pela fluorescência de SpoIIE fusionado a GFP. A partir destas observações foi possível estabelecer o modelo de como SpoIIE ativaria σ^F somente no pré-esporo.

A localização temporal e espacial das proteínas de transdução de sinal em *Caulobacter crescentus* foi demonstrada utilizando fusões GFP. *Caulobacter crescentus* divide assimetricamente produzindo uma célula séssil e outra célula móvel. A coordenação entre a progressão do ciclo celular e a diferenciação celular é mediada por um grande número de proteínas de transdução de sinal. Muitas proteínas de transdução de sinal fusionadas a GFP demonstraram ter um padrão de localização dependente do estágio do ciclo celular. CckA, uma proteína quinase essencial, localiza-se nos pólos em células pré-divisionais, mas encontra-se dispersa na membrana celular antes da divisão celular (Jacobs et. al., 1999). A localização de PleC e DivJ, quinases com papel no desenvolvimento polar e divisão celular, foram examinadas concomitantemente nas mesmas células, fusionadas a CFP (repórter azul) e YFP (repórter amarelo), respectivamente. PleC-YFP localizou-se no pólo do flagelo e DivJ-CFP foi localizada no pólo séssil demonstrando que a posição das proteínas dependem do estágio do ciclo celular (Wheeler and Shapiro, 1999). Os dados de integração e distribuição espacial das proteínas importantes para a transdução de sinal foram importantes para entender como *C. crescentus* mantém essa regulação durante o ciclo celular. Estes resultados sugerem que o processo celular em

bactéria pode ser regulado em parte pela localização diferencial de seus componentes que participam da rede de transdução de sinal (Jacobs *et al* .,2001).

Nosso grupo tem utilizado com sucesso a microscopia de fluorescência como ferramenta para caracterizar novas proteínas de divisão e para aumentar a nossa compreensão sobre o funcionamento do divisomo em *B. subtilis*.

2. OBJETIVOS:

Geral: Utilizar a microscopia vital de proteínas marcadas com GFP como ferramenta para compreender o funcionamento do divisomo de *Bacillus subtilis*

Específicos:

- Desvendar a cinética da montagem do divisomo durante o crescimento vegetativo em *B. subtilis*.

- Analisar a localização e a função do complexo MinCD e DivIVA no estágio de esporulação em *B. subtilis*.

- Compreender a atuação molecular da proteína SpoIIE na formação do septo polar em *B. subtilis*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cepas de *E. coli*:

Cepa	*Característica*	*Referência*
Dh5α	*supE44 DlacU169 (f80 lacZDM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi1 relA1*	Hanahan, 1983
KM 32	*Δ(recC ptr recB recD)* ::P_{tac}-*gam-red cat*	Poteete et al., 1999

Tabela 01: Cepas de *E. coli* usadas e seus genótipos.

3.2 Cepas de *Bacillus subtilis*:

Cepas	*Características*	*Referências*
PY79	Prototrófica	Youngman et al., 1983
FG203	*minCD*Δ::*cat (cat)*	Lee & Price, 1993
FG672	*minCD*Δ::*cat thrC*::P_{spac}-*gfp-minC,minD (cat) (spc)*	Este trabalho
FG710	*amyE::Pspac-ftsZ-mCherry(BS) (spc) (cat)*	Este trabalho
FG658	*racA*Δ*::tet (tet)*	Ben-Yehuda, et al., 2003
FG688	*racA*Δ*::tet thrC*::P_{spac}-*gfp-minC,minD (tet) (spc)*	Este trabalho
FG145	*amyE*::P_{xil}-*gfp-MinD (cat)*	Laboratório
FG96	*amyE*::P_{xil}-*divIVA-gfp (cat)*	Laboratório
FG100	*divIVA*Ω*divIVA-gfp (kan)*	Laboratório
FG708	*amyE*::P_{spoIIQ}-*mCherry (cat)*	J. Dworkin Lab
FG135	*amyE*::P_{spac}-*ftsZ-gfp (cat)*	Laboratório
FG710	*amyE*::P_{spac}-*ftsZ-mCherry (cat) (spc)*	Este trabalho
FG714	*minCD*Δ::*cat thrC*::P_{spac}-*gfp-minC,minD*	Este trabalho
	amyE::P_{spac}-*ftsZ-mCherry (cat) (spc)*	Este trabalho
FG725	*amyE*::*ftsZ-mCherry*, chrΩ*divIVA-gfp (spc) (cat) (kan)*	Este trabalho
FG731	*amyE*::P_{spac}-*ftsZ-mCherry*, chrΩ*ezrA-gfp (spc) (cat) (kan)*	Este trabalho
FG740	*amyE*::P_{spac}-*ftsZ-mCherry*, chrΩ*zapA-gfp(spc) (cat) (kan)*	Este trabalho
JR104	chrΩ*ypsB-gfp amyE*:: P_{spac}-*ftsZ-mcherry(spc) (cat) (kan)*	Este trabalho
FG871	*thrC*::$P_{hiperspac}$-*minD (erm)*	Este trabalho
FG877	*thrC*::$P_{hiperspac}$-*minD amyE*::P_{spank}-*spoIIE (erm) (spc) (cat)*	Este trabalho
FG873	*thrC*::$P_{hiperspac}$-*minD amyE*::P_{spank}-*spoIIE*-D746A *(erm) (spc) (cat)*	Este trabalho
FG875	*thrC*::$P_{hiperspac}$-*minD amyE*::P_{spank}-*spoIIE* -Q483A *(erm) (spc) (cat)*	Este trabalho
FG879	*thrC*::$P_{hiperspac}$-*minD amyE*::P_{spank}-*spoIIE* -S361F *(erm) (spc) (cat)*	Este trabalho
FG881	*thrC*::$P_{hiperspac}$-*minD amyE*::P_{spank}-*spoIIE* -ΔdomII *(erm) (spc) (cat)*	Este trabalho
FG883	*thrC*::$P_{hiperspac}$-*minD amyE*::P_{spank}-*spoIIE -ΔregI (erm) (spc) (cat)*	Este trabalho
FG912	*thrC*::$P_{hiperspac}$-*minD amyE*::P_{spank}-*spoIIE –malFspoIIE (erm) (spc) (cat)*	Este trabalho
FG755	*amyE* ::P_{spac}-*ftsZ-mCherry thrC*::P_{spac}-*yfp-ftsZ (erm) (spc) (cat)*	Este trabalho
FG491	*thrC*::P_{spac}-*yfp-ftsZ (erm)*	Laboratório

Continuação

Cepas	*Características*	*Referências*
FG300	chrΩ*ezrA-gfp (spc)*	Laboratório
FG188	chrΩ*divIVA-gfp (kan)*	Laboratório
FG445	chrΩ*zapA-gfp (kan)*	Laboratório
JR47	chrΩ*ypsB-gfp (kan)*	Laboratório
FG960	*ftsL::neo amyE::Pxyl-gfp-ftsL (spec)*	Liz Lab
FG957	*Δ ponA*P_{xil}*-gfp-ponA (cat)*	Claessen et al., 2008
FG1014	chrΩ *ftsW-gfp (spc)*	Laboratório
FG1032	*pbp2B::*P_{xil}*-gfp-pbp2B (cat)*	Scheffers et al., 2004
FG1022	*thrC::*P_{spac}*-ftsZ-mCherry amyE::Pxil-gfp-ftsL (erm) (spc)*	Este trabalho
FG1036	*thrC::*P_{spac}*-ftsZ-mCherry ftsW-gfp (erm) (spc)*	Este trabalho
KC255	*amyE::*P_{spank}*-spoIIE (spc) (cat)*	Carniol et al, 2005
KC284	*amyE::*P_{spank}*-spoIIE-S361F (spc) (cat)*	Carniol et al, 2005
KC283	*amyE::*P_{spank}*-spoIIE-ΔdomII (spc) (cat)*	Carniol et al, 2005
KC540	*amyE::*P_{spank}*-spoIIE-ΔregI (spc) (cat)*	Carniol et al, 2005
KC259	*amyE::*P_{spank}*-spoIIE-D746A (spc) (cat)*	Carniol et al, 2005
KC497	*amyE::*P_{spank}*-spoIIE-Q483A (spc) (cat)*	Carniol et al, 2005
KC255	*amyE::*P_{spank}*-spoIIE (spc) (cat)*	Carniol et al, 2005

Tabela 02: Cepas de *B. subtilis* utilizadas e seus genótipos.

3.2.1 Construção das cepas de *Bacillus subtilis*:

- **FG672**: O plasmídeo pGui2 foi introduzido por recombinação homóloga no genoma de uma cepa mutante (*minCDΔ::cat*) de *B. subtilis* (FG203). A cepa

transformante de *B. subtilis* foi selecionada em meio LB contendo eritromicina e lincomicina (MLS).

- **FG688**: A cepa FG672 de *B. subtilis* foi transformada com o DNA genômico da cepa FG658 (*racA*::*tet*). Os transformantes foram selecionados em meio LB contendo tetraciclina e estas mesmas colônias foram testadas para resistência a eritromicina e lincomicina (MLS) para a confirmação da presença da fusão *gfp-minC*. O fenótipo da ausência de *racA* na cepa construída (FG688) foi confirmado pelo ensaio de resistência ao calor. Neste ensaio uma cultura submetida à esporulação é aquecida por 20 minutos a 80ºC. Este tratamento mata as células que não esporularam, mas não afeta a viabilidade dos esporos presentes na cultura. Estes esporos são então quantificados pelo plaqueamento de diluições seriadas e contagem do número de colônias formadas. A cepa FG688 apresentou 50% de freqüência de esporulação comparado com a selvagem, resultado semelhante ao obtido na literatura para a mutação racAΔ (Ben-Yehuda *et al.*, 2003).

- **FG710**: A cepa FG135 foi transformada com pGui6 (*ftsZ-mCherry*) e os transformantes foram selecionados em placa LB contendo espectinomicina. Esta cepa contém *ftsZ-gfp* no lócus de amilase (*amyE*). A fusão *ftsZ-mCherry* demonstrou-se fluorescente no filtro de mCherry e não no de GFP, e somente na presença de IPTG (0,1mM), confirmando a presença *ftsZ-mCherry* no lócus heterólogo (a*myE*) de FG710.

- **FG714**: A cepa FG672 de *B. subtilis* foi transformada com o DNA genômico da cepa FG710 (*amyE*::P_{spac}-*ftsZ-mcherry* spc). Os transformantes foram selecionados em meio LB contendo espectinomicina e estas mesmas colônias foram testadas na presença de eritromicina e lincomicina (MLS) para a confirmação da presença da fusão *gfp-minC*, originando a cepa FG714.

- **FG755**: Para a construção de FG755 nós extraímos o DNA genômico da cepa FG710, que possui a fusão P_{spac}-*ftsZ-mCherry* no locus de amilase (*amyE*) e transformamos este DNA na cepa FG491 que contém a fusão P_{spac}-*yfp-ftsZ* no locus (*thrC*). Os transformantes foram selecionado em placa de LB agar contendo espectinomicina, originando a cepa FG755.

- **FG 731**: Para a obtenção da cepa contendo P_{spac}-*ftsZ-mCherry e ezrA-gfp*, o DNA genômico de FG 710 foi transformado na cepa FG300. A seleção dos transformantes ocorreu em placa de LB agar com cloramfenicol.

- **FG725**: Cepa formada a partir da transformação da cepa FG710 com o DNA genômico de FG188 (*divIVA-gfp*). Os transformantes foram selecionados em placa LB agar contendo canamicina.

- **FG740**: Cepa formada a partir da transformação da cepa FG710 com o DNA genômico de FG445 (*zapA-gfp*). Os transformantes foram selecionados em placa LB agar contendo canamicina.

- **JR104**: Cepa formada a partir da transformação da cepa FG710 com o DNA genômico de JR47 (*ypsB-gfp*). Os transformantes foram selecionados em placa LB agar contendo canamicina.

- **FG871:** Para a construção da cepa FG871 a linhagem PY79 foi transformada com o plasmideo pFG19. As colônias resultantes foram selecionadas em placa de LB com eritromicina e lincomicina e depois testadas para sensibilidade a espectinomicina para comprovar a inserção por crossing over duplo de *thrC*:: $P_{hiperspac}$-*minD* no locus (*thrC*).

- **FG877:** Nós transformamos a cepa FG871 com o DNA genômico da cepa KC255, contendo *amyE*::P_{spank}-*spoIIE* (Carniol et al, 2005). A seleção foi feita em placa LB contendo espectinomicina.

- **FG873:** Nós transformamos a cepa FG871 com o DNA genômico da cepa KC259, contendo *amyE*::P_{spank}-*spoIIE*-D746A (Carniol et al, 2005). A seleção foi feita em placa LB contendo espectinomicina.

- **FG875:** Nós transformamos a cepa FG871 com o DNA genômico da cepa KC497, contendo *amyE*::P_{spank}-*spoIIE*-Q483A (Carniol et al, 2005). A seleção foi feita em placa LB contendo espectinomicina.

- **FG879:** Nós transformamos a cepa FG871 com o DNA genômico da cepa KC284, contendo *amyE*::P_{spank}-*spoIIE*-S361F (Carniol et al, 2005). A seleção foi feita em placa LB contendo espectinomicina.

- **FG881:** Nós transformamos a cepa FG871 com o DNA genômico da cepa KC283, contendo *amyE*::P_{spank}-*spoIIE*ΔdomII (Carniol et al, 2005). A seleção foi feita em placa LB contendo espectinomicina.

- **FG883:** Nós transformamos a cepa FG871 com o DNA genômico da cepa KC540, contendo *amyE*::P_{spank}-*spoIIE*ΔregI (Carniol et al, 2005). A seleção foi feita em placa LB contendo espectinomicina.

- **FG912:** Nós transformamos a cepa FG871 com o DNA genômico do plasmídeo pKC64, contendo *amyE*::P_{spank}-*malF*-*spoIIE* (Carniol et al, 2005). A seleção foi feita em placa LB contendo espectinomicina.

- **FG1010:** PY79 foi transformada diretamente com a ligação do fragmento *ftsZ-mCherry* com o plasmídeo pFG16 (*thrC*::P_{spac}-*ftsZ-mCherry erm*). Foi feito um replaqueamento (ou estrias) de 200 colônias em placas de LB + 500μM IPTG contendo eritromicina e espectinomicina. Apenas duas colônias demonstraram coloração vermelha (emissão 640nm) ao serem excitadas por luz de 515nm (excitação) quando analisadas no microscópio de fluorescência com objetiva de 40x.

- **FG1022:** FG1010 transformada com DNA genômico de FG960 (*ftsL::neo amyE::P_{xil}-gfp-ftsL*) e selecionada em placas LB + 0,5% de xilose contendo espectinomicina.

- **FG1036:** FG1010 transformada com DNA genômico de FG1014 (ΩftsW-*gfp*) e selecionada em placas LB contendo espectinomicina.

3.3 Plasmídeos:

Plasmídeos	*Características*	*Referência*
pEA18	*amyE::P_{xil}-gfp (cat)* Vetor de integração	Laboratório
pGUI6	*ftsZ-mCherry(BS) (spc)* Vetor de integração	Este Trabalho
pFG23	*thrC::P_{spac}-yfp-minD(erm)* Vetor de integração	Laboratório
pGUI1	*amyE::P_{xil}-gfp-minCD(cat)* Vetor de integração	Este Trabalho
pGUI2	*thrC::P_{spac}-gfp-minCD(erm)*Vetor de integração	Este Trabalho
pGUI4	*ftsZ-cfp(BS) (spc)* Vetor de integração	Trabalho
pFG16	*thrC::P_{spac} (erm)* Vetor de integração	Laboratório
pFG19	*thrC::$P_{hiperspac}$-minCD(erm)* Vetor de integração	Laboratório
pKC64	*amyE::Pspank-malFspoIIE spc cat* Vetor de integração	Carniol et al, 2005

Tabela 03: Lista dos plasmídeos utilizados e suas principais características.

3.3.1 Construção dos Plasmídeos:

Construção do plasmídeo pGui2 (contém a fusão GFP-MinC): O plasmídeo contendo a fusão GFP-*minC* foi construído da seguinte maneira: a região referente ao gene *minCD* foi amplificada do cromossomo de *B. subtilis* através de PCR utilizando os oligonucleotideos OL1315 e MinD3´. A região amplificada compreende o gene *minCD* com os sítios de restrição *NotI* e *BamHI* nas extremidades. Este fragmento foi então ligado nos mesmos sítios de restrição (*NotI* e *BamHI*) do plasmídeo pEA18 que contém o marcador conferindo

resistência a ampicilina e possui o promotor regulado por xilose (P_{xil}). A ligação foi transformada em *E. coli* e selecionada em meio de LB contendo ampicilina. O DNA plasmidial extraído dos transformantes foi analisado por dupla digestão utilizando as enzimas *NotI* e *BamHI*. A análise da dupla digestão demonstrou bandas diferentes das esperadas, não confirmando a presença do plasmídeo esperado (pGui1) nos transformantes. A ligação foi utilizada como molde para uma reação de PCR com os oligonucleotídeos OFG44 e MinD3´ gerando o produto amplificado *gfp-minCD*. O produto amplificado correspondente à fusão GFP-MinCD e mais o plasmídeo pFG23 digerido com *NotI* foram transformados na cepa KM32, uma cepa de *E.coli* que exibe uma alta taxa de recombinação (Poteete et al., 1999). Nesta situação esperava-se que ocorresse recombinação entre o produto de PCR e o plasmídeo linearizado. O evento de recombinação pode ser selecionado em meio de LB contendo ampicilina, pois bactérias nas quais não houve recombinação o plasmídeo pFG23 não é circularizado e acaba sendo perdido fazendo com que as bactérias continuem sensíveis ao antibiótico. A fusão *gfp-minCD* presente no DNA plasmidial extraído das colônias transformantes foi confirmada por PCR e por digestão utilizando as enzimas *SphI* e *KpnI*, originando o pGui2.

Construção do plasmídeo pGui6 (contém a fusão FtsZ-mCherry): O DNA genômico da cepa FG 708 de *B. subtilis* que contém o gene *mCherry* foi utilizado como molde numa reação de PCR com os oligonucleotídeos OFG181 e OFG182 para amplificar *mCherry*. A região amplificada compreende o gene *mCherry* com os sítios de restrição *XhoI* e *SphI* nas extremidades. O plasmídeo pGui4 foi tratado com XhoI e SphI e o fragmento referente ao *mCherry* amplificado foi ligado no lugar do *cfp* nos mesmos sítios de restrição (*XhoI* e *SphI*). A ligação foi então transformada em *E. coli* e selecionada em meio LB contendo ampicilina. O DNA plasmidial extraído dos transformantes foi analisado por dupla digestão utilizando as enzimas *EcoRI* e *EcoRV*. A análise da dupla digestão demonstrou a presença de pGui6 nos transformantes.

3.4 Oligonucleotídeos:

Nome	*Seqüência*
OL1315	5´ AAGCTAGCGGCCGCGTGAAGACCAAAAAG 3´
MinD3´	5´ CCCGGATCCTTAAGATCTTACTCCGAA 3´
OFG44	5´AAACCAGATGCTGGGAATGAGTAAAGGAGAAGAA 3´
OFG181	5´CGGAGCTCCTCGAGGGATCCGGTGGAATGGTTTCCAAGGGCGA3´
OFG182	5´ ACATCCGCGGGCATGCTTATTTGTACAGCTCATC 3´

Tabela 04: Lista dos oligonucleotídeos utilizados nas amplificações por PCR e seqüenciamento dos genes.

3.5 Meios e Soluções Utilizados:

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

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

Meio MC (*modified competence medium*): 100mM K_3PO_4 pH 7,0, 3mM de Citrato de Sódio $Na_3C_6H_5O_7$, 3mM de $MgSO_4$, 2% glicose, 22mg/L citrato férrico amoniacal, 0,1% caseína hidrolisada, 0,2% glutamato de potássio.

3.5.1 Meios para Esporulação:

CH completo: 938ml de CH I + II; 50ml de CH III; 2ml de CH IV; 10ml de CHV.

CH I+ II:

10g/L de Caseína Hidrolisada; 3,68g/L de L-Acido Glutâmico; 1,25g/L de L-Alanina;1,39g/L de L-Asparagina; 1,36g/L de Fosfato de Potássio Monobásico (KH_2PO_4); 1,34g/L de Cloreto de Amônio (NH_4Cl); 0,11g/L de Sulfato de Sódio (Na_2SO_4); 0,1g/L de Nitrato de Amônio (NH_4NO_3); 1mg/L de Cloreto de Ferro ($FeCl_3$).

CH III:

2g/L de Sulfato de Magnésio ($MgSO_4.7H_2O$); 4ml/L de 10% Cloreto de Cálcio ($CaCl_2$).

CHIV:

10g/L de Sulfato de Manganês ($MnSO_4$. $4H_2O$).

CHV – L-Triptofano (2mg/ml).

Meio de Ressuspensão- 1L = 900ml de A+B; 20ml/L de 10% L-glutamato; 10ml/L de 0.1M de Cloreto de Cálcio ($CaCl_2$); 40ml/L de 1M Sulfato de Magnésio ($MgSO_4.7H_2O$).

Solução A+B- 1L = 10ml de solução A; 100ml de solução B.

Solução A:

0,98g/L de Cloreto de Ferro ($FeCl_3.6H_2O$); 8,3g/L de Cloreto de Magnésio ($MgCl_2.6H_2O$); 11,8g/L de Cloreto de Manganês ($MnCl_2.4H_2O$).

Solução B:

50,35g/L de Cloreto de Amônio (NH_4Cl); 10,06g/L de Sulfato de Sódio (Na_2SO_4); 6,8g/L Fosfato de Potássio Monobásico (KH2PO4); 9,7g/L Nitrato de Amônio (NH_4NO_3).

3.6 Esporulação de *Bacillus subtilis*:

Esporulação foi induzida pelo método de ressuspensão de Sterlini e Mandelstam (1969). As células de *B. subtilis* foram crescidas em meio de crescimento de caseína hidrolisada (CH) por 12 horas. No dia seguinte, as células foram diluídas para uma OD600=0,1 e então incubadas a 37°C com agitação até atingirem OD600=0,6-0,8. Em seguida, as células foram centrifugadas e transferidas para o meio de ressuspensão (A+B) por 1h30 a 37ºC com agitação e então coletadas. Após coletadas, as células foram observadas no microscópio. O tempo de esporulação foi medido a partir do momento de ressuspensão em meio de esporulação (T0).

3.7 Transformação das Células Competentes de DH5α:

Utilizamos o protocolo descrito no "TransformAID Bacterial Transformation Kit" (K2711 - Fermentas) para obter células competentes e em seguida transformá-las com DNA de interesse.

3.8 Preparação das Células Competentes de *Bacillus subtilis*:

Células competentes de *B. subtilis* foram preparadas pelo método de Kunst & Rappoport, 1995. 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 ressuspendidas em meio MC contendo 300mM de $MgSO_4$. A cultura foi então transferida para constante agitação a 37°C e durante a transição da fase exponencial até a estacionária foram tomadas medidas de crescimento. Durante a fase estacionária, as células foram coletadas, divididas em alíquotas de 500µl, e então congeladas em nitrogênio liquido e armazenadas a -80°C.

3.9 Transformação das Células Competentes de *Bacillus subtilis*:

A transformação de *B. subtilis* processou-se com a mistura de 1µg de DNA às células competentes, seguida de incubação a 37°C por 1h. Em seguida, as células foram centrifugadas por 1 minuto a 10.000rpm e semeadas em meio contendo o antibiótico apropriado para a marca de resistência.

3.10 Extração de DNA Plasmidial de *E. coli*:

Os plasmídeos foram extraídos pelo método QIAprep Spin Miniprep Kit (250) ou QIAprep Spin Midiprep Kit (100) (QIAGEN), conforme instruções do fabricante.

3.11 Purificação de DNA de Gel de Agarose:

Os fragmentos de DNA obtidos por PCR ou clivagens com enzimas de restrição foram recuperados do gel de agarose utilizando o *Qiaquick Gel*

Extraction Kit (*QIAGEN*, purificação do DNA por imobilização em coluna de troca iônica) conforme instruções do 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 $MgCl_2$, 0,2mM de dNTPs (desoxi-ribonucleotídeos), 0,4µM de oligonucleotídeos e 1,25U/mL de "*Phusion*" DNA polimerase *(New England Biolabs)* em reações de volume final de 100µL.

Para amplificar *minCD* e *gfp-minCD* o ciclo utilizado foi: Desnaturação a 93°C por quatro minutos; 35 ciclos de desnaturação a 93°C por 1 minuto, anelamento a 50°C por 1 minuto; extensão a 72°C por 4 minutos e extensão final a 72°C por 7 minutos. O produto obtido desta reação foi separado por eletroforese em gel de agarose e purificado seguindo o protocolo do *Qiaquick Gel Extraction Kit* conforme instruções do fabricante.

Já para amplificar *mCherry* o ciclo utilizado foi: Desnaturação a 93°C por um minuto; 35 ciclos de desnaturação a 93°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 1 minuto; extensão a 72°C por 2 minutos e extensão final a 72°C por 7 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 de que o inserto correto foi clonado 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 ρmol 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 Ensaio de Co-Localização:

As cepas de *B. subtilis* utilizadas nos ensaios de co-localização foram inoculadas em meio rico CH por 12h a 37ºC com agitação. No dia seguinte foi realizada uma diluição para a DO_{600} igual a 0,05 e as células foram crescidas no agitador a 37ºC até alcançar a faixa de DO_{600} 0,2-0,4. A seguir as células foram novamente diluídas para a DO_{600} igual a 0,05, crescidas no agitador a 37ºC até alcançar a DO_{600} 0,3 e analisadas no microscópio de fluorescência. Os experimentos foram realizados em triplicata, em diferentes dias. Todas as cepas foram induzidas após a primeira diluição com 100µM de IPTG para expressão da fusão *ftsZ*-mCherry e da fusão *gfp-minC* (no caso da cepa FG714), com 0,5% de xilose no caso das fusões P_{xil}-*gfp-ftsL* (FG1022); P_{xil}-*gfp-pbp2B* (FG1034); P_{xil}-*gfp-ponA* (FG1038). As outras fusões GFP são expressas pelos promotores naturais e não requerem indução.

3.16 Microscopia de Fluorescência:

A microscopia de fluorescência foi realizada em microscópio invertido Nikon TE 300, contendo os filtros necessários para as proteínas GFP e mCherry e para os corantes: de mebrana FM4-64 (*Molecular Probes-Invitrogen*) e de DNA Hoechst 33342 (*Molecular Probes-Invitrogen*). As proteínas de fusão com GFP e/ou mCherry foram visualizadas em células vivas, montadas em lâminas contendo uma camada sólida de meio de cultura com agarose, tornando as células imóveis sem a necessidade de fixá-las, e permitindo o crescimento durante o período de observação. Os corantes de membrana citoplasmática utilizados foram FM1-43 ou FM4-64 (*Molecular Probes-Invitrogen*). O primeiro

emite luz de 598nm quando excitado com um comprimento de onda de 480nm e o segundo emite luz de 640nm quando excitado com um comprimento de onde de 515nm. As imagens foram captadas com uma câmera Roper CoolSnap HQ, utilizando exposições entre 1 e 3 segundos com binning 1 ou 2. Todas as imagens capturadas foram processadas utilizando-se o software Metamorph (Universal Imaging, Media, PA) ou ImageJ (http://rsb.info.nih.gov/ij/).

3.16.1 Filmagem da Fusão GFP-MinD Utilizando Câmaras:

Para o experimento de filmagem, nós crescemos a cepa FG145 em meio de crescimento de caseína hidrolisada (CH) até alcançar a DO_{600}= 0,7, então centrifugamos estas células a 14.000g por cinco minutos, o "pellet" foi ressuspendido em meio de ressuspensão A + B (Sterlini & Mandelstam, 1969), crescido no frasco "erlenmayer" por trinta minutos a 37ºC com agitação e então 2 µl de cultura foram transferidas do frasco em um quadrado (dimensão ~5 x 5 x 1 mm) de meio de ressuspensão solidificado com 1,5 % de agarose. A seguir, colamos por aderência este quadrado com bactéria a uma lamínula (dimensão 24 mm x 24 mm). Para ter certeza que o quadrado ficaria preso à lamínula, 1% de agarose "low melting" em meio de ressuspensão foi utilizada para colar as extremidades do quadrado na lamínula. Finalmente, a lamínula foi colada com graxa de vácuo em uma câmara de silicone (*CoverWeel perfusion chambers*, fabricante Grace Bio-Labs, site: http://www.gracebio.com/Products/Imaging__Microscopy/CoverWell_Perfusion_Chambers/). Esta câmara de um lado possui a lamínula colada e o outro lado é vedado possuindo apenas dois orifícios. A espessura da câmara permite que cerca de 200 µl de meio seja adicionado. Nesta montagem, as células permanecem fixas no quadrado de agarose, permitindo a captura de fotos em seqüência de um mesmo campo. Nós adicionamos 200 µl de meio de ressuspensão condicionado com corante de membrana FM4-64 (0.5 µg/mL)

pelos orifícios da câmara. Para preparar o meio condicionado, nós filtramos 1 ml de bactérias que cresceram no meio de ressuspensão por trinta minutos no frasco a 37ºC, com agitação. O meio condicionado proporciona a presença do peptídeo CSF ("competence and sporulation factor") expresso pelas células que iniciaram a esporulação no frasco. Este peptídeo em alta concentração estimula a esporulação (Lazazzera, 2000). Posteriormente, nós selamos este orifício da câmara com graxa para evitar a evaporação. Nós incubamos esta montagem contendo nossas bactérias no microscópio de fluorescência. A montagem fica em contato com uma objetiva de imersão com aumento de 100x e esta possui um aquecedor que a mantém a 37ºC. Isto é suficiente para aquecer o campo da lamínula enquanto este é observado.

4. RESULTADOS

Capítulo 1

4.1 Análise da Cinética da Montagem do Divisomo Durante o Crescimento Vegetativo em *B. subtilis*.

Para desvendar a cinética de montagem do divisomo nós expressamos FtsZ fusionado à proteína mCherry (vermelha) e co-localizamos o anel Z com outras proteínas que participam da formação do divisomo, fusionadas à GFP (ver material e métodos). Desta maneira, quanto maior a porcentagem de co-localização menos tempo leva para que a proteína se associe ao divisomo. Nossos experimentos foram realizados após duas diluições iniciais de DO_{600}=0,05 e as células foram analisadas na fase log (DO_{600}= 0,3), pois este período é caracterizado por apresentar as células em crescimento balanceado, ou seja, as células são uniformes em termos de composição química e atividades metabólicas e fisiológicas.

O crescimento de uma população de *B. subtilis* é assíncrono, apresentando células em diferentes estágios da montagem do divisomo (Figura 10). Nós estudamos as células de *B. subtilis* numa mesma DO (DO_{600}= 0,3) em três dias diferentes com o objetivo de demonstrar que apesar da assíncronia característica do crescimento de *B. subtilis*, nossas condições experimentais exibiram a mesma proporção de células em diferentes estágios de montagem do divisomo. Esta hipótese é confirmada pelo baixo valor de desvio padrão encontrado em nossas análises de co-localização entre o anel Z e as proteínas de divisão (Tabela 05). Os ensaios de co-localização foram realizados em meio rico (CH), pois neste meio de cultura o ciclo celular de *B. subtilis* foi muito bem caracterizado, sendo o tempo de geração de aproximadamente quarenta minutos (Sharpe et al., 1998).

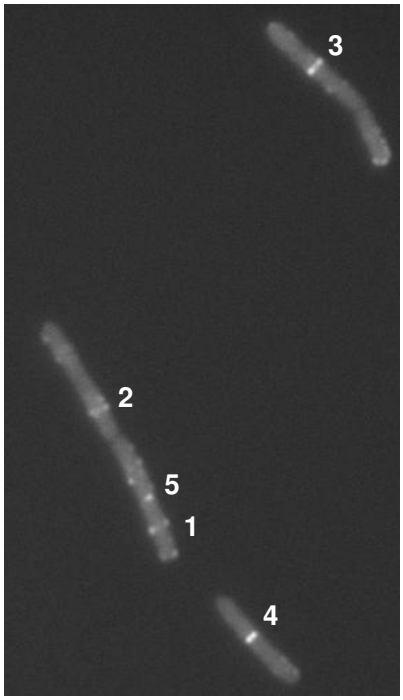


Figura 10: Microscopia de fluorescência do anel Z revelando células em diferentes estágios da montagem do divisomo. Nós enumeramos os anéis Z numa ordem crescente de 1 a 5 com o objetivo de demonstrar que as células se encontram em diferentes estágios da montagem do divisomo. Os estágios iniciais da montagem do divisomo podem ser analisados pela ausência de constrição do anel Z como visto em 1, 2 e 3 e os estágios mais tardios pela presença da constrição do anel Z como observados em 4 e 5. Essa constrição pode ser visualidade pela diminuição do diâmetro do anel Z. Nós expressamos a fusão *ftsZ-mCherry* com 100µM de IPTG. As células da cepa FG710 (*amyE::*P_{spac}*-ftsZ-mCherry cat spc*) foram crescidas em meio CH até a DO_{600}= 0,3 e analisadas em seguida no microscópio de fluorescência.

Para a realização destes experimentos, nós primeiramente detectamos se poderia ocorrer o fenômeno de interferência da emissão de fluorescência verde (GFP) no filtro de emissão vermelho (mCherry) e vice-versa. Nós não realizamos este ensaio entre GFP e mCherry, pois as fusões *ftsZ-gfp* e *ftsZ-mCherry* possuem como alvo o locus (*amyE*), sendo incompatíveis para serem transformadas na mesma cepa de *B.subtilis*. Dessa maneira, utilizamos neste

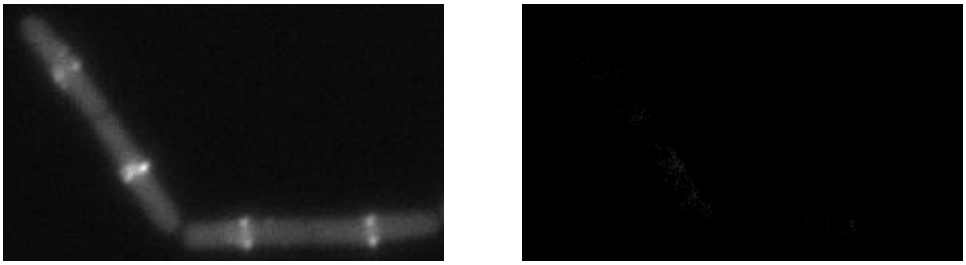
ensaio a fusão YFP-FtsZ no lugar de FtsZ-GFP. Como o espectro do YFP é mais próximo do mCherry do que GFP, se não houver ruído de interferência entre YFP e mCherry, não haverá entre GFP e mCherry.

Para averiguar se há interferência da fluorescência de FtsZ-mCherry no filtro YFP e de YFP-FtsZ no filtro de mCherry, induzimos com 100 µM de IPTG a expressão das fusões P_{spac}-*ftsZ-mCherry* e P_{spac}-*yfp-ftsZ* referentes às cepas FG710 e FG491 respectivamente, da nossa coleção. As fusões P_{spac}-*ftsZ-mCherry* e P_{spac}-*yfp-ftsZ* só apresentaram fluorescência quando visualizadas com o filtro específico para cada uma delas. Não detectamos qualquer sinal quando YFP-FtsZ foi visualizada com um filtro para mCherry ou quando FtsZ-mCherry foi visualizada com um filtro YFP (Figura 11).

Como controle positivo do ensaio de co-localização, construímos uma cepa capaz de expressar FtsZ marcado com duas cores diferentes (FG755 *amyE*::P_{spac}-*ftsZ-mCherry* *thrC*::P_{spac}-*yfp-ftsZ* erm spc cat) (ver materiais e métodos). Quando induzimos a expressão de FtsZ-mCherry e YFP-FtsZ com 100µM de IPTG, nós observamos 100% de co-localização entre os anéis Z referentes às duas fusões (Figura 12).

A)

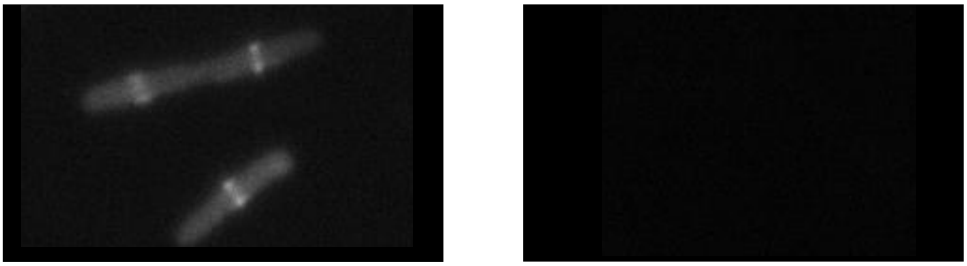
Fusão YFP-FtsZ



Filtro YFP Filtro mCherry

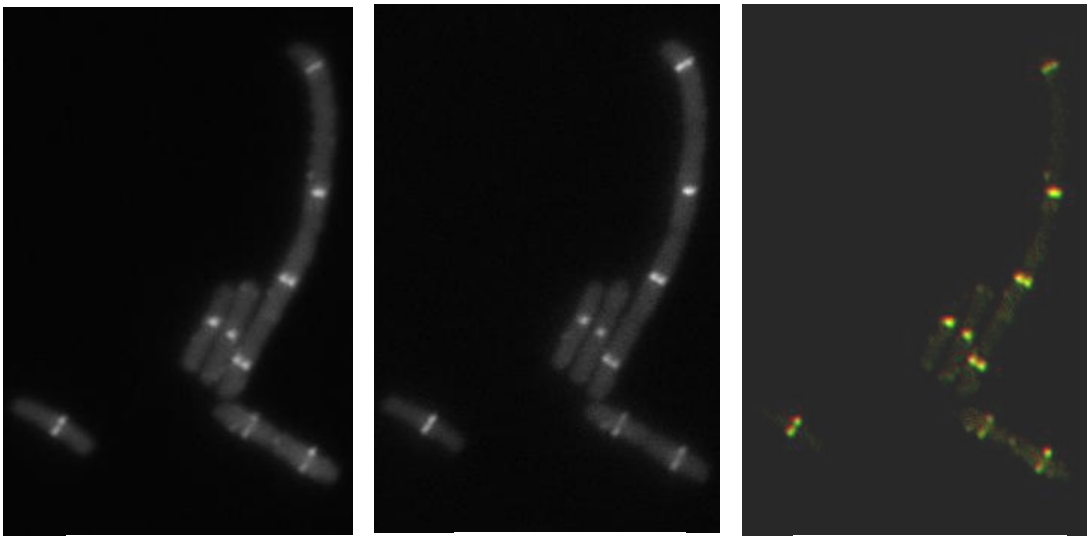
B)

Fusão FtsZ-mCherry



Filtro mCherry Filtro YFP

Figura 11. YFP e mCherry não apresentam interferência. As duas fusões, YFP-FtsZ e FtsZ-mCherry, só apresentaram fluorescência (anéis Z) quando visualizadas com seus respectivos filtros de fluorescência**.** A) YFP-FtsZ apresenta fluorescência no filtro de YFP e não no mCherry. B) FtsZ-mCherry apresenta fluorescência no filtro de mCherry mas não no filtro de YFP. Neste ensaio induzimos a fusão YFP-FtsZ da cepa FG491 (*thrC*::P_{spac}-*yfp-ftsZ erm*) e a fusão FtsZ-mCherry da cepa FG710 (*amyE::*P_{spac}*-ftsZ-mCherry cat spc)*. Ambas fusões foram induzidas com 100µM de IPTG e analisadas em DO_{600}=0,3 em meio CH.



FtsZ-mCherry YFP-FtsZ Sobreposição

Figura 12. Análise da co-localização de FtsZ marcado com duas cores diferentes. A cepa FG 755 (*amyE*::P_{spac}-*ftsZ-mCherry thrC*::P_{spac}-*yfp-ftsZ* erm spc cat) foi crescida em meio CH com 100µM de IPTG até atingir a DO_{600}=0,3. Os resultados mostraram 100% de co-localização entre os anéis Z referente às fusões FtsZ-mCherry e YFP-FtsZ da cepa FG 755.

4.2 Análise da Co-localização entre o Anel Z e Sete Proteínas que Participam da Formação do divisomo (ZapA, EzrA, FtsL, FtsW, YpsB, DivIVA, MinC).

Para realizar os ensaios de co-localização utilizamos a fusão FtsZ-mCherry como uma maneira de identificarmos os diferentes estágios da montagem do divisomo. Desta forma, foram construídas duas linhagens para expressar a fusão FtsZ-mCherry em *B. subtilis*: a cepa FG710 e a cepa FG1010.

Para evitar que a única fonte da proteína FtsZ na célula seja a fusão FtsZ-mCherry, foi construída a cepa F710 a partir da transformação da cepa FG135 com o plasmídeo pGui6 (*ftsZ-mCherry*, ver construção em Materiais e Métodos) (Figura 13). A fusão *ftsZ-mCherry* da cepa FG710 demonstrou-se fluorescente no filtro de mCherry e não no de GFP, e somente na presença de IPTG (100µM),

confirmando a presença da fusão *ftsZ-mCherry* no lócus heterólogo (a*myE*) de FG710. A partir desta cepa, foram construídas quase todas as cepas utilizadas nos ensaios de co-localização (ver Materiais e Métodos). Entretanto esta cepa é incompatível para ser utilizada com outras fusões que também possuem as marcas de seleção para espectinomicina ou cloranfenicol. Dessa maneira foi construída uma nova cepa, a FG1010, transformando *B. subtilis* selvagem (PY79) diretamente com a ligação do fragmento *ftsZ-mCherry* no plasmídeo pFG16 (*thrC::Pspac-ftsZ-mCherry erm*) (Figura 14). As colônias foram selecionadas em meio LB contendo eritromicina e lincomicina após dois dias a 37ºC. Aproximadamente 200 colônias foram re-plaqueadas em placas de LB com 500µM IPTG e analisadas no microscópio de fluorescência com objetiva de 40x. Apenas duas colônias demonstraram coloração vermelha (640nm de emissão) ao serem excitadas por luz de 515nm. Observadas com a objetiva de 100x, as duas colônias apresentaram a fusão FtsZ-mCherry corretamente localizadas no meio da célula , na presença de 100µM de IPTG.

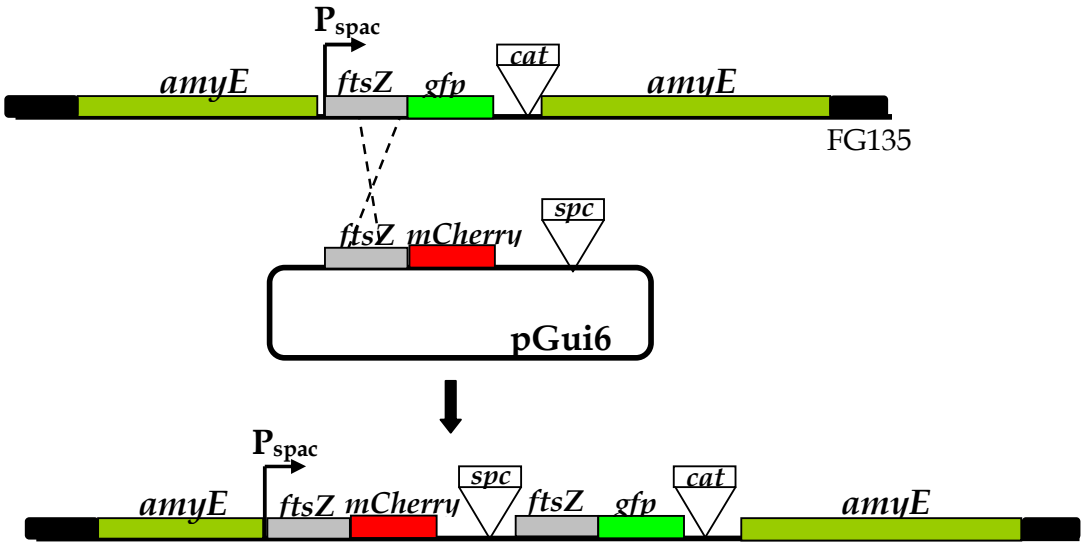


Figura 13. Construção da cepa FG710 por recombinação homóloga simples entre a cepa FG135 e o plasmídeo pGui6**.** A cepa FG710 contém duas cópias de FtsZ no lócus (*amyE*). A primeira é a fusão *ftsZ-mCherry* expressa sob a regulação de IPTG e a segunda é a fusão *ftsZ-gfp* que não é funcional devido a ausência de um promotor.

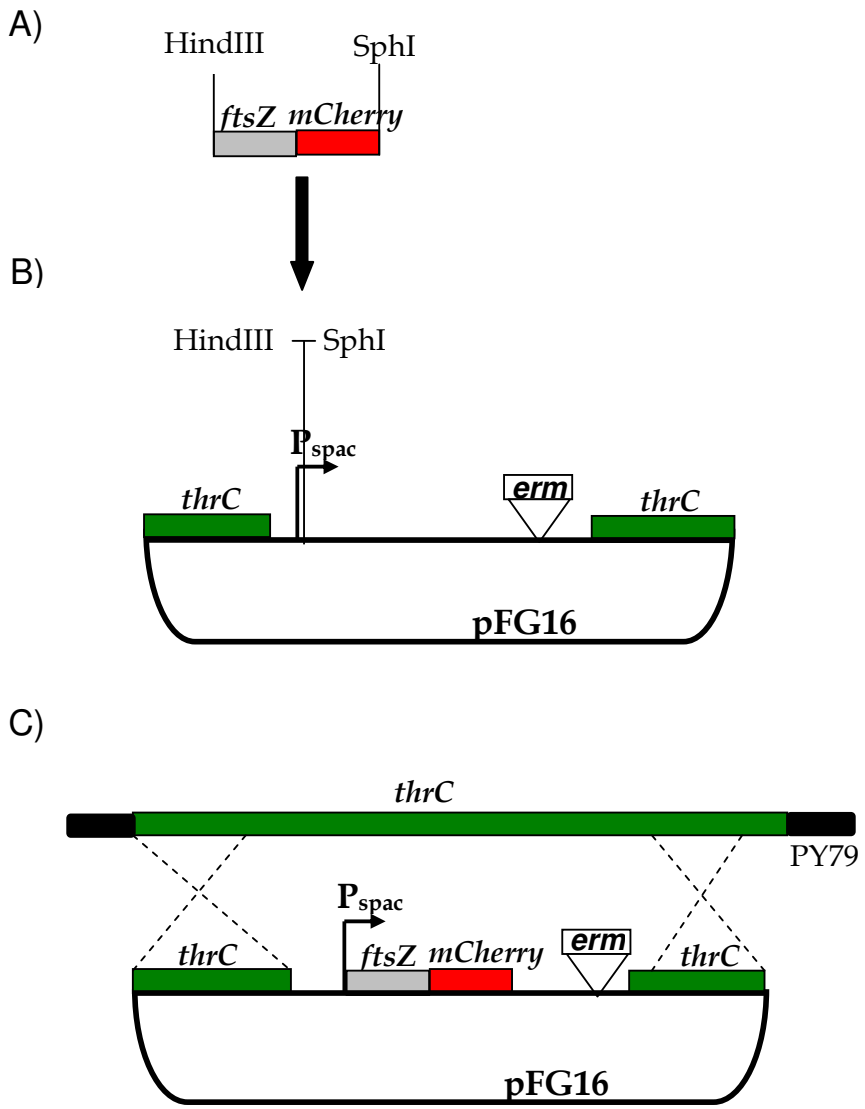


Figura 14. Construção da cepa FG1010 por recombinação homóloga dupla entre *B. subtilis* selvagem (PY79) e a ligação da fusão *ftsZ-mCherry* no plasmídeo pFG16. A fusão FtsZ-mCherry foi amplificada por PCR (A), ligada no vetor pFG16 (B) e recombinada no locus (*thrC*) da cepa PY79 (C). A cepa FG1010 contém a fusão FtsZ-mCherry no lócus (*thrC*) sob regulação do promotor de IPTG.

Combinamos então a fusão FtsZ-mCherry com as fusões ZapA-GFP, EzrA-GFP, GFP-FtsL, FtsW-GFP, YpsB-GFP, DivIVA-GFP, GFP-MinC para

gerar as cepas FG740, FG731, FG1022, FG1036, JR104, FG725, FG714, respectivamente (ver Materiais e Métodos). Os ensaios foram realizados como descrito anteriormente, com indução de 100µM de IPTG para a expressão da fusão FtsZ-mCherry e todas as fusões foram vistas no microscópio de fluorescência. Nestes experimentos nós observamos a localização de cada proteína de divisão em relação ao anel Z e quantificamos a freqüência que isto ocorre (Figura 15).

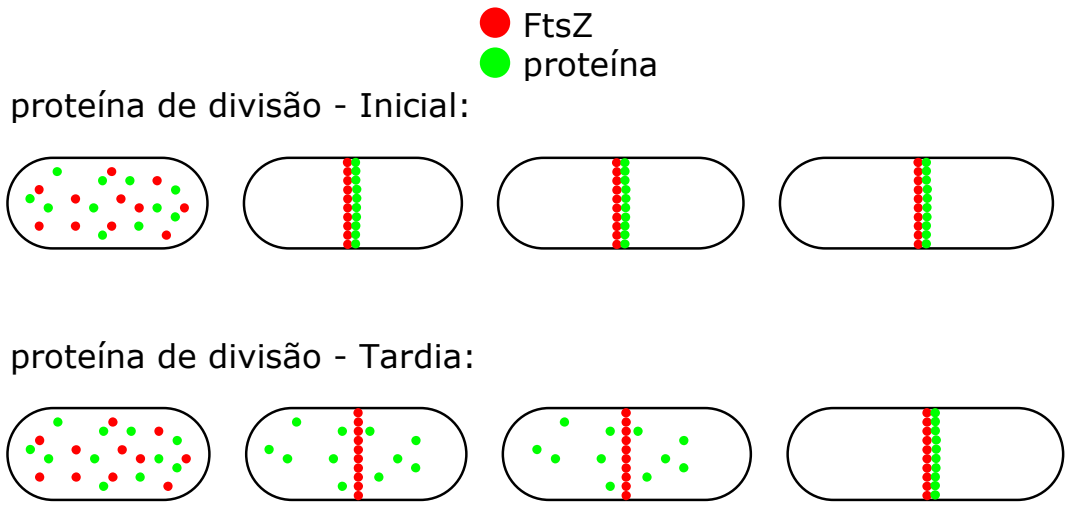


Figura 15: Esquema representando o método que utilizamos para estudar a cinética de montagem do divisomo. Neste caso estão representados duas proteínas com diferentes porcentagens de associação ao anel Z. Quanto maior a freqüência de co-localização da proteína de divisão e o anel Z, mas inicial é o recrutamento desta proteína para o divisomo.

Caso a proteína de dvisião tenha uma freqüência de 100% de co-localização com o anel Z, postulamos que ela seja uma proteína "inicial", pois está associada ao anel desde o início de sua formação. Se a proteína apresentar

baixa freqüência , como por exemplo, 30% de co-localização com o anel Z ela possivelmente será vista nas etapas mais tardias da divisão celular.

A proteína ZapA, que auxilia na polimerização do anel Z (Gueiros-Filho & Losick, 2002) e a proteína EzrA, que inibe a polimerização do anel Z (Haeusser et al., 2004) (Levin et al., 1999) demonstraram-se associadas com o anel Z em 97% e 98% das células, respectivamente (Figura 16 e 17, Tabela 05). A alta taxa de co-localização indica que as duas proteínas estão associadas ao anel Z logo que ele se forma.

FtsW e FtsL apresentam uma freqüência de co-localização com o anel Z de 83,90% e 78,43%, respectivamente (Figura 18 e 19, Tabela 05). Estas duas proteínas parecem localizar-se no divisomo após a associação de ZapA e EzrA ao anel Z.

YpsB, uma nova proteína envolvida em divisão (Tavares et al, 2008), demonstrou-se associada com o anel Z em cerca de 50% das células (Figura 20, Tabela 05). A proteína DivIVA, responsável pela localização polar de MinCD (Marston et al., 1998) e MinC, inibidor da polimerização do anel Z, demonstraram-se associadas com o anel Z em cerca de 41,7% e 32% das células, respectivamente (Figura 21 e 22, Tabela). YpsB, DivIVA e MinC parecem se associar ao divisomo numa etapa posterior a FtsL e FtsW.

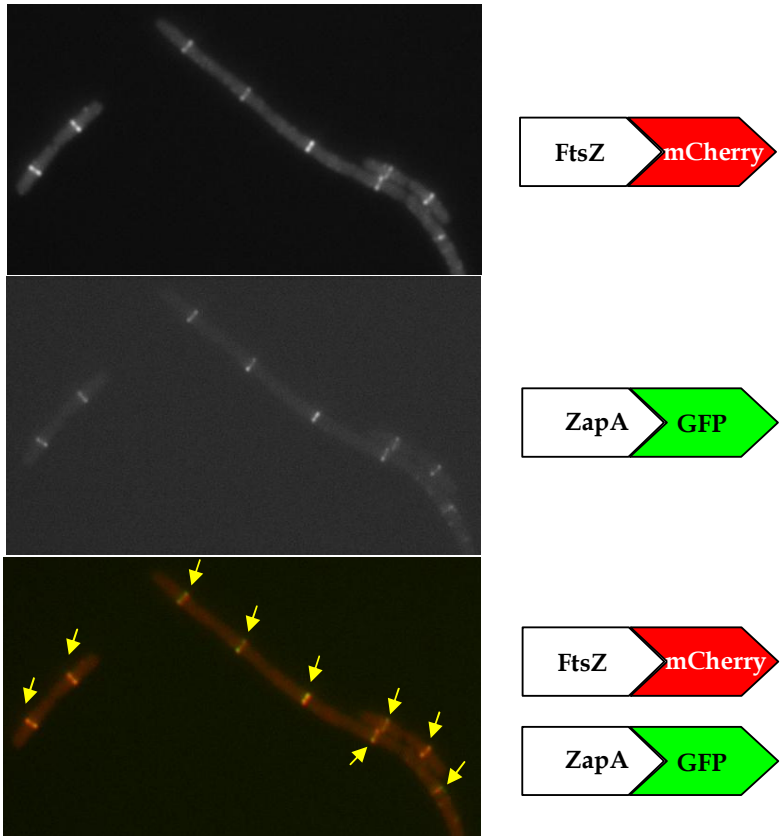


Figura 16: Co-localização de FtsZ-mCherry com ZapA-GFP**.** A cepa FG 740 (*amyE*::P_{spac}-*ftsZ-mCherry* chrΩ*zapA-gfp spc cat kan)* foi crescida em meio CH com 100µM de IPTG até atingir a Do_{600}=0,3. A fusão *zapA-gfp* foi expressa por seu promotor natural. As setas amarelas representam a co-localização entre FtsZ-mCherry e ZapA-GFP.

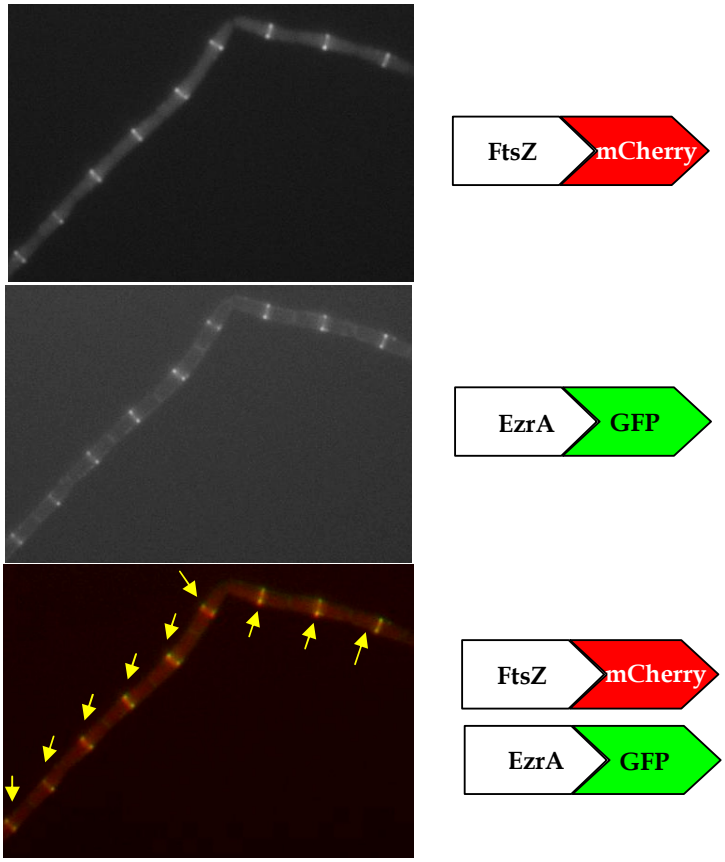


Figura 17: Co-localização de FtsZ-mCherry com EzrA-GFP**.** A cepa FG 731 (*amyE*::P_{spac}-*ftsZ-mCherry*, chrΩ*ezrA-gfp spc cat kan)* foi crescida em meio CH com 100µM de IPTG até atingir a Do_{600}=0,3. A fusão *ezrA–gfp* foi expressa por seu promotor natural. As setas amarelas representam a co-localização entre FtsZ-mCherry e EzrA-GFP.

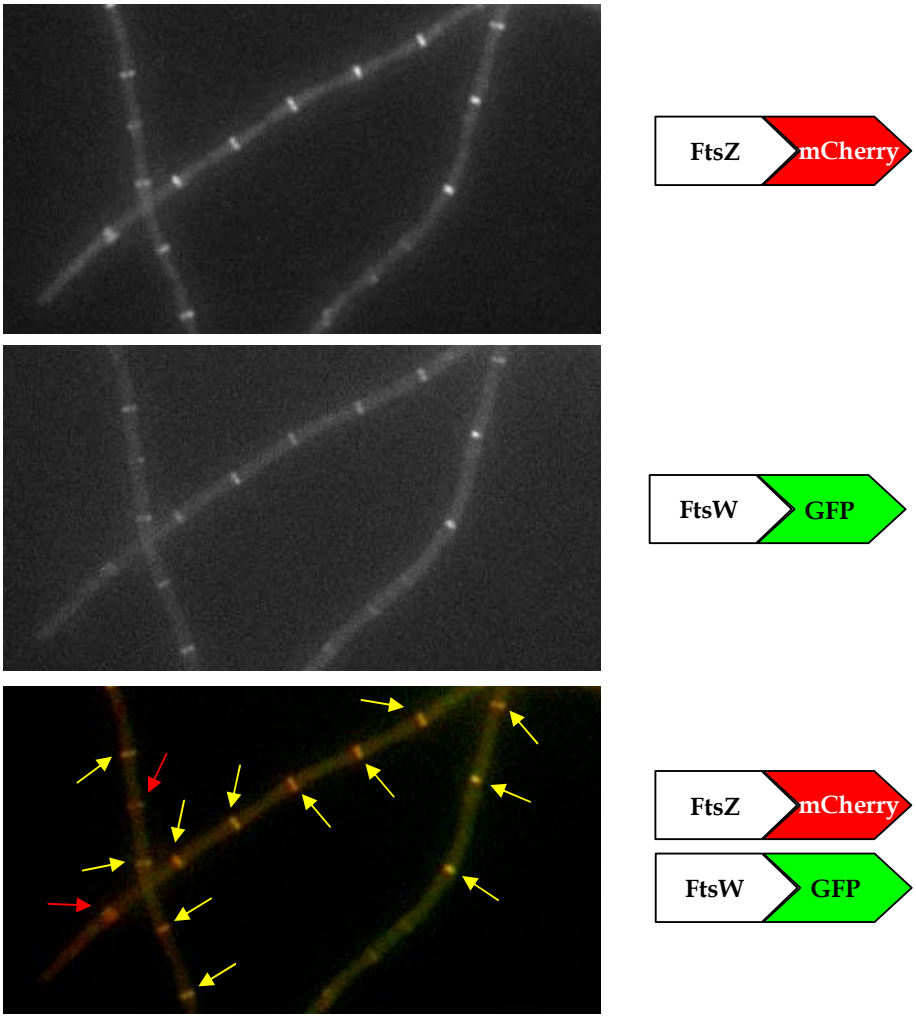


Figura 18: Co-localização de FtsZ-mCherry com FtsW-GFP**.** A cepa FG1036 **(***thrC::P_{spac}-ftsZ-mCherry ftsW-gfp erm spc)* foi crescida em meio CH com 100µM de IPTG até atingir a DO_{600}=0,3. A fusão *ftsW-gfp* foi expressa por seu promotor natural. As setas representam exemplos em que FtsZ-mCherry não co-localiza com FtsW-GFP (seta vermelha) ou co-localização entre FtsZ-mCherry e FtsW-GFP (seta amarela).

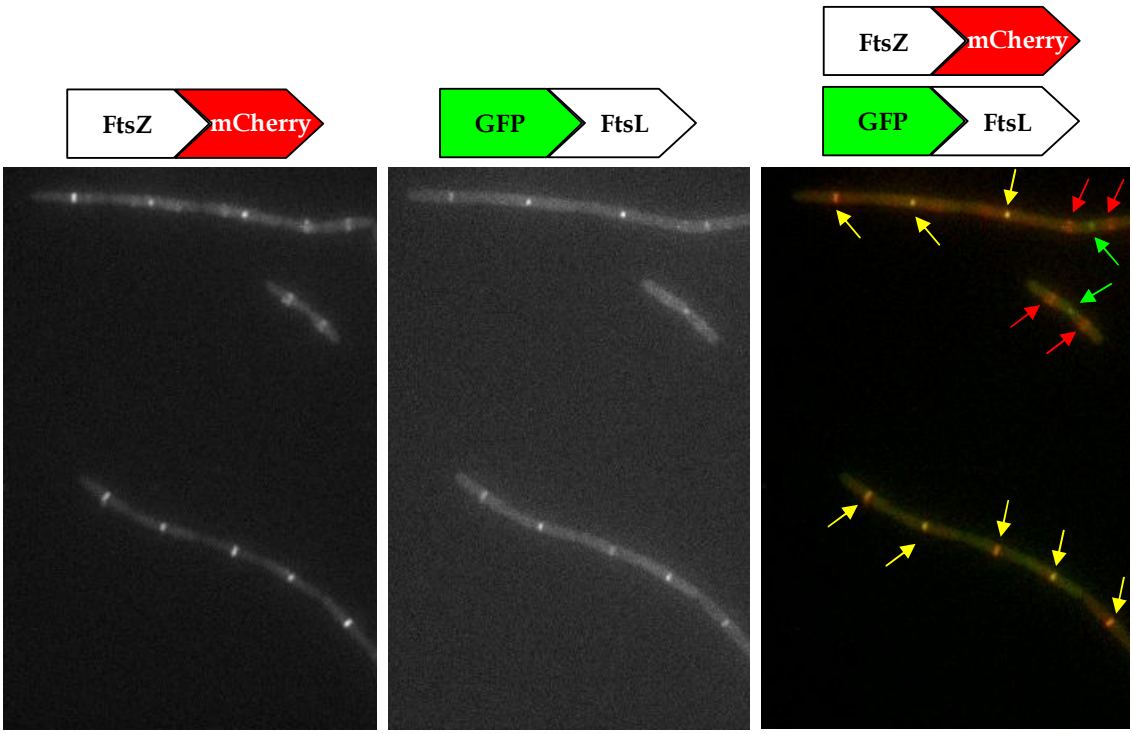


Figura 19: Co-localização de FtsZ-mCherry com GFP-FtsL**.** A cepa FG1022 **(***thrC::P_{spac}-ftsZ-mCherry amyE::Pxil-gfp-ftsL erm spc)* foi crescida em meio CH com 100µM de IPTG até atingir a Do_{600}=0,3. A fusão *gfp-ftsL* foi expressa com 0,5% de xilose. As setas representam exemplos em que a GFP-FtsL não co-localiza (setas verdes); FtsZ-mCherry não co-localiza (seta vermelha) ou co-localização entre FtsZ-mCherry e GFP-FtsL (seta amarela).

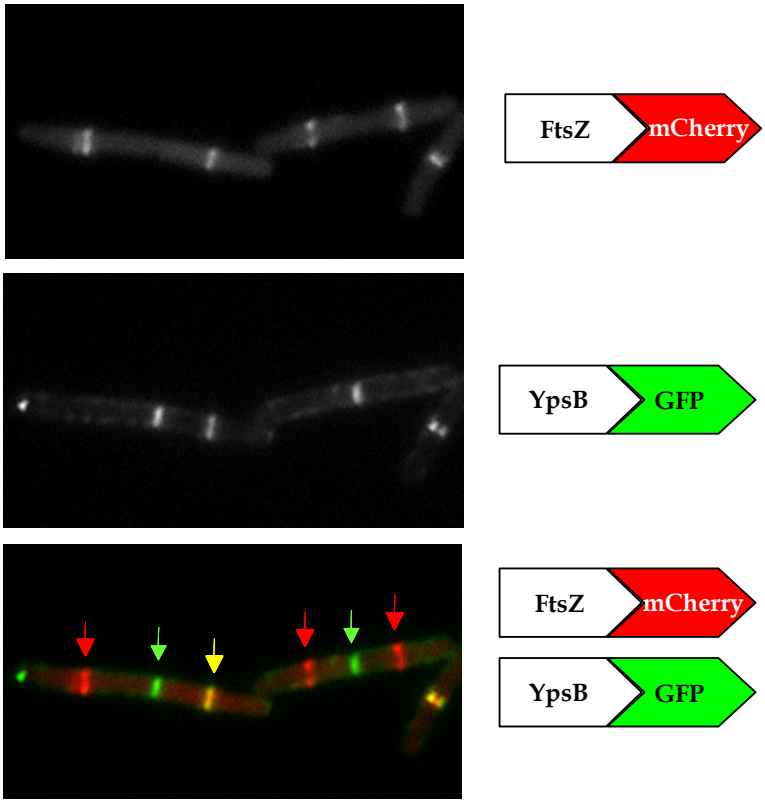


Figura 20: Co-localização de FtsZ-mCherry com YpsB-GFP**.** A cepa JR104 (*amyE:: P_{spac}-ftsZ-mcherry* chrΩ*ypsB-gfp spc cat kan)* foi crescida em meio CH com 100µM de IPTG até atingir a Do_{600}=0,3. A fusão *ypsB-gfp* foi expressa por seu promotor natural. As setas representam exemplos em que a YpsB-GFP não colocaliza (setas verdes); FtsZ-mCherry não co-localiza (seta vermelha) ou co-localização entre FtsZ-mCherry e YpsB-GFP (seta amarela).

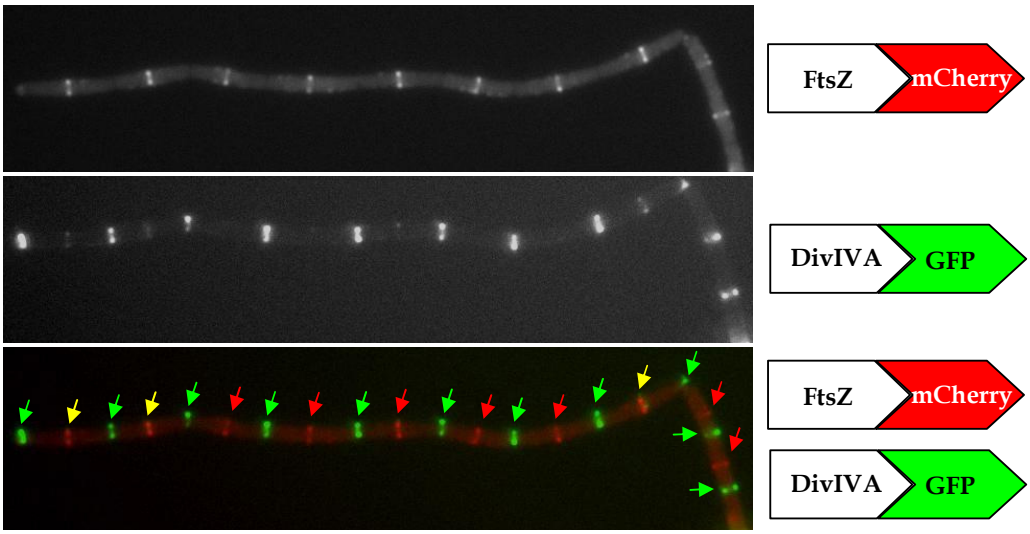


Figura 21: Co-localização de FtsZ-mCherry com DivIVA-GFP**.** A cepa 725 (*amyE*::*ftsZ-mCherry*, chrΩ*divIVA-gfp spc cat kan)* foi crescida em meio CH com 100µM de IPTG até atingir a Do_{600}=0,3. A fusão *divIVA-gfp* foi expressa por seu promotor natural. As setas representam exemplos em que a DivIVA-GFP não co-localiza (setas verdes); FtsZ-mCherry não co-localiza (seta vermelha) ou co-localização entre FtsZ-mCherry e DivIVA-GFP (seta amarela).

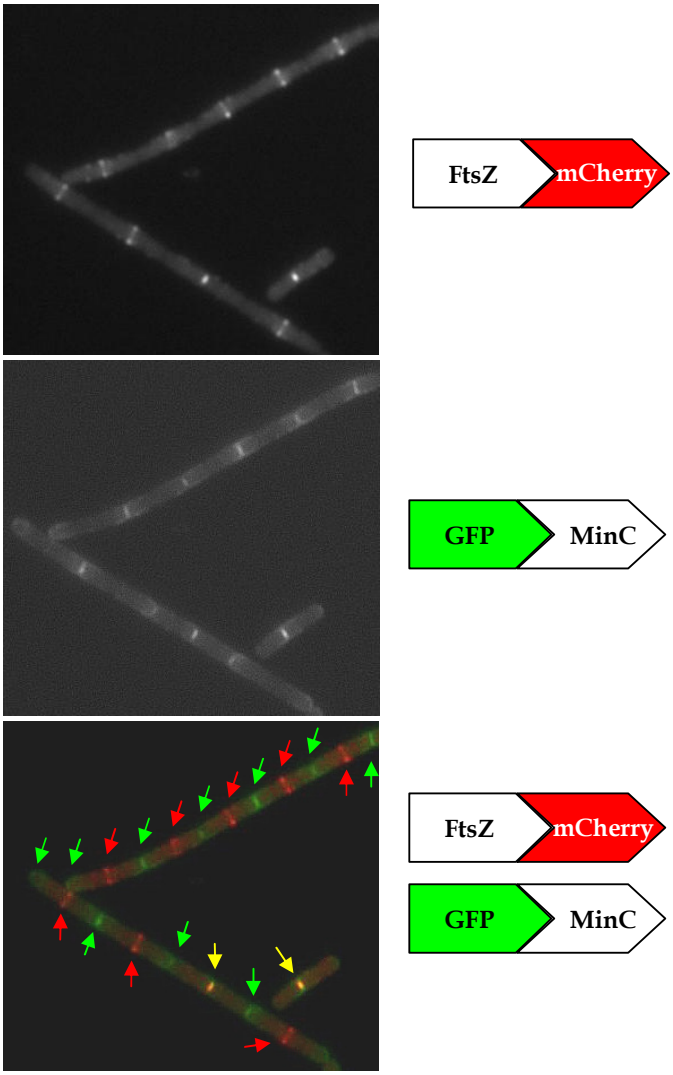


Figura 22: Co-localização de FtsZ-mCherry com GFP-MinC. A cepa 714 (*minCD*Δ::*cat thrC*::P_{spac}-*gfp-minC,minD amyE*::P_{spac}-*ftsZ-mCherry cat spc)* foi crescida em meio CH com 100µM de IPTG até atingir a Do_{600}=0,3. A fusão *gfp-minC* foi expressa com 100µM de IPTG. As setas representam exemplos em que a GFP-MinC não colocaliza (setas verdes); FtsZ-mCherry não co-localiza (seta vermelha) ou co-localização entre FtsZ-mCherry e GFP-MinC (seta amarela).

Fusões	Freqüência de co-localizacão com Z-mCherry	Anéis Z Totais
ZapA-GFP	97,33% ±1,1	3648
EzrA-GFP	98,31% ±0,44	2419
FtsW-GFP	83,90% ±1,45	1287
GFP-FtsL	78,43% ± 2,02	1611
YpsB-GFP	50%	449
DivIVA-GFP	41,7% ±3,34	2085
GFP-MinC	31,64% ±1,16	1667

Tabela 05: Freqüência de co-localização entre o anel Z e as proteínas componentes do divisomo. Os ensaios foram realizados em três dias diferentes.

Capítulo 2

4.3 Localização das Proteínas do Sistema Min (MinC, MinD e DivIVA) Durante a Esporulação.

4.3.1 Análise da Localização de MinC Durante a Esporulação.

4.3.1.1 Construção de uma Linhagem de *B. subtilis* (FG672) contendo a Fusão *gfp-minC*:

Para localizar MinC na célula, construímos uma cepa que expressa MinC fusionada a GFP no N-terminal (GFP-MinC). O primeiro passo para a construção de GFP-MinC foi amplificar os genes *minC* e *minD* por PCR. Para construirmos a fusão *gfp-minC* foi necessário a amplificação dos genes *minCD* e não somente de *minC* pois este depende da expressão de *minD* para se localizar corretamente nos pólos celulares (Marston & Errington., 1999). Para a expressão correta de *minC* é necessário também que *minC* e *minD* estejam presentes no mesmo RNA mensageiro, provavelmente porque é importante manter o acoplamento traducional das duas proteínas (Varley and Stewart, 1992). O produto amplificado referente à *minCD* foi então ligado ao plasmídeo (pEA18) que permite a expressão de MinC fusionado a GFP e posteriormente transformado em *E. coli* (para detalhes experimentais ver materiais e métodos). Como não obtivemos colônias de *E. coli* contendo o pGui1, nós amplificamos a ligação entre o inserto *minCD* e o pEA18 originando o produto amplificado *gfp-minCD*. Este produto e mais o plasmídeo pFG23 digerido com *NotI* foram transformados na cepa KM32, uma cepa de *E.coli* que promove uma alta taxa de recombinação (Poteete et al., 1999). Nesta situação ocorreu a recombinação entre a fusão *gfp-minCD* e o plasmídeo linearizado como demonstrado na Figura 23A, originando o plasmídeo pGui2 (Figura 23B). O evento de recombinação pôde ser selecionado em meio de LB contendo ampicilina, pois bactérias nas quais não houve recombinação não mantêm o plasmídeo

linearizado e continuam sensíveis ao antibiótico. O pGui2 foi transformado na cepa FG203 (*minCD*Δ *cat*) (Figura 23C), originando a cepa FG672 que foi selecionada em meio LB contendo eritromicina e lincomicina. Esta nova cepa (FG672) não expressa *minCD* selvagem e expressa a fusão *gfp-minCD* no locus *thrC* sob o controle de IPTG.

Nós resolvemos utilizar uma cepa com uma única cópia de *minCD* (FG672) afim de evitar o fenótipo de filamentação provocado por uma superexpressão de MinCD. Com 100μM de IPTG nós observamos células com tamanhos semelhantes à selvagem, descartando que nossa indução cause o fenótipo de filamentação.

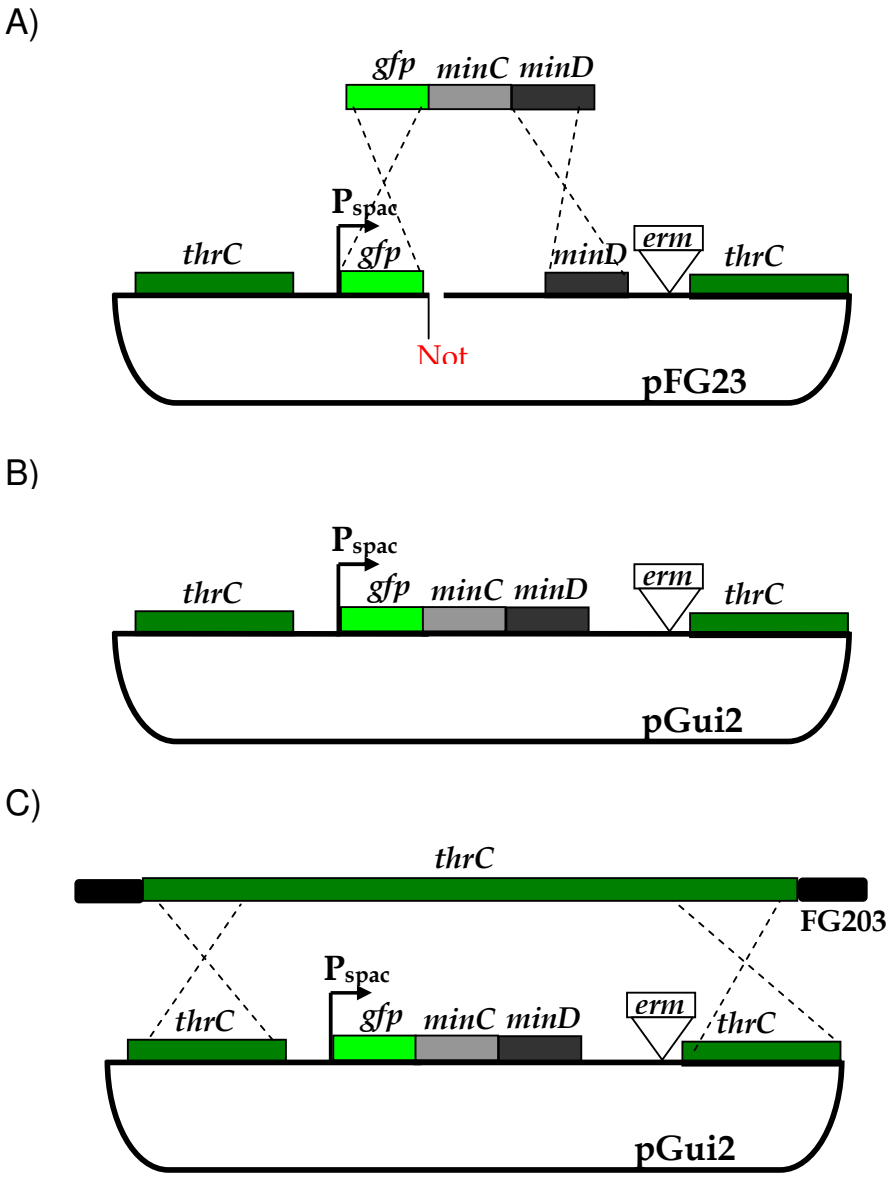


Figura 23: Construção da cepa FG672 (*minCD*Δ *thrC*::P_{spac}-*gfp-minC,minD cat spc*). A) Esquema representando a recombinação homóloga entre a fusão *gfp-minC* e o plasmídeo pFG23, digerido com *NotI* (em vermelho); **B)** Mapa do plasmídeo pGui2, contendo a fusão GFP-MinC sob a regulação de um promotor induzido por IPTG, o P_{spac}; **C)** A fusão *gfp-minC* (pGui2) foi introduzida por recombinação homóloga no locus (*thrC*) da cepa FG203 (*minCD*Δ *cat*), originando a cepa FG672.

4.3.1.2 Ensaio de Complementação da Cepa FG672:

Para comprovar a funcionalidade da fusão *gfp-minC* nós comparamos o fenótipo da cepa FG672 (*minCD*Δ *thrC::*P_{spac}*-gfp-minC,minD cat spc*) na presença e na ausência de IPTG (Figura 24 e 25). Como observado na Figura 24C e Tabela 06, na ausência de IPTG as células da cepa FG672 de *B. subtilis* apresentam o típico fenótipo *min*, com aproximadamente 5,1% de minicélulas (células com tamanho menor do que 1µM), semelhante ao visto na literatura (Levin et al., 1998). Já na presença de 100µM de IPTG (Figura 24B) detectamos menos de 1% de minicélulas, mesma freqüência encontrada nas células selvagem (Levin et al., 1998) (Figura 24A). Estes resultados comprovam que a fusão GFP-MinC é funcional e sugere que na presença de 100µM de IPTG, a expressão de *gfp-minC* e *minD* é suficiente para retomar o fenótipo selvagem na cepa mutante *minCD*Δ. A fusão GFP-MinC também se localizou corretamente nos pólos das células durante a fase vegetativa (Figura 26), semelhantemente ao descrito na literatura (Marston & Errington, 1999).

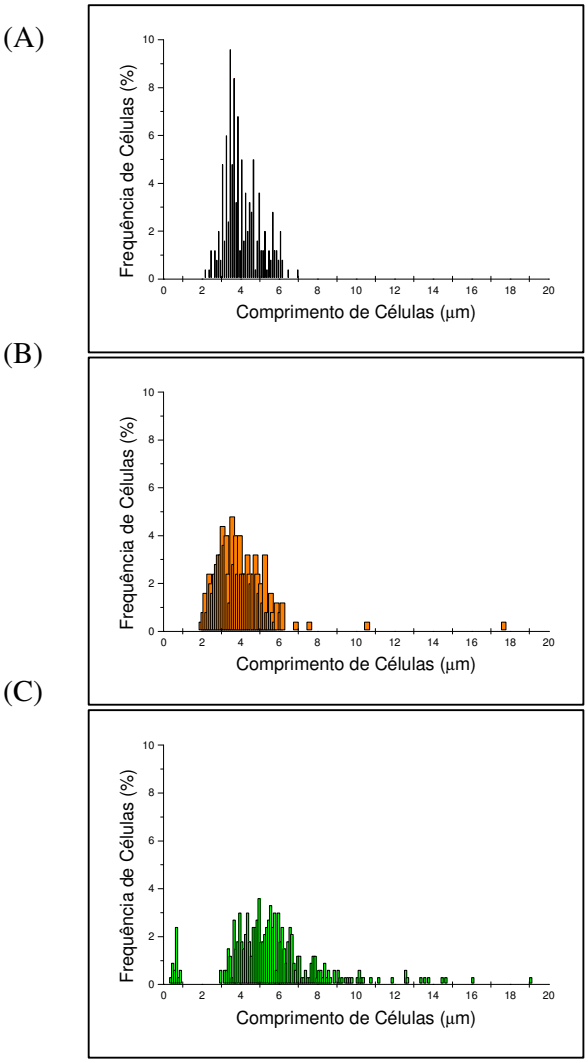


Figura 24: Histograma de tamanho (μM) das células da cepa PY79 (selvagem) e da cepa FG672 (*minCD*Δ *thrC::P*$_{spac}$*-gfp-minC,minD cat spc*) durante a fase vegetativa. A cepa FG672 foi analisada na ausência e na presença de 100μM de IPTG. Célula selvagem (PY79) (A); FG672 na presença de 100μM de IPTG (B); e na ausência de IPTG (C). As células foram crescidas em meio CH até alcançar a DO_{600}= 0,5 à 37ºC. As células foram medidas utilizando o programa ImageJ. O histograma da célula selvagem (PY79) foi cedido gentilmente pelo aluno de doutorado Alexandre Wilson Bisson Filho (dados não publicados).

Cepas	Média(µM)	Desvio Padrão	Minicélulas(%)	Total(cels)
Selvagem(PY79)	4,1	0,9	0	256
FG672 +IPTG	4,0	1,5	0	236
FG672 - IPTG	5,7	2,5	5,1	328

Tabela 06: Análise dos dados do Histograma acima. Na ausência de IPTG, a cepa FG672 (*minCD*Δ *thrC::*P_{spac}*-gfp-minC,minD cat spc*) apresentou o fenótipo esperado de minCDΔ com 5,1% de minicélulas (células com tamanho <1µM), enquanto que a mesma cepa mostrou se complementada pela fusão P_{spac}*-gfp-minC* quando induzida com 100µM de IPTG, não apresentando minicélulas. Além disso, a cepa FG672 na ausência de IPTG tem uma média de células maiores do que a selvagem ou das complementadas com IPTG, indicando que a maioria das células divide-se de maneira assimétrica.

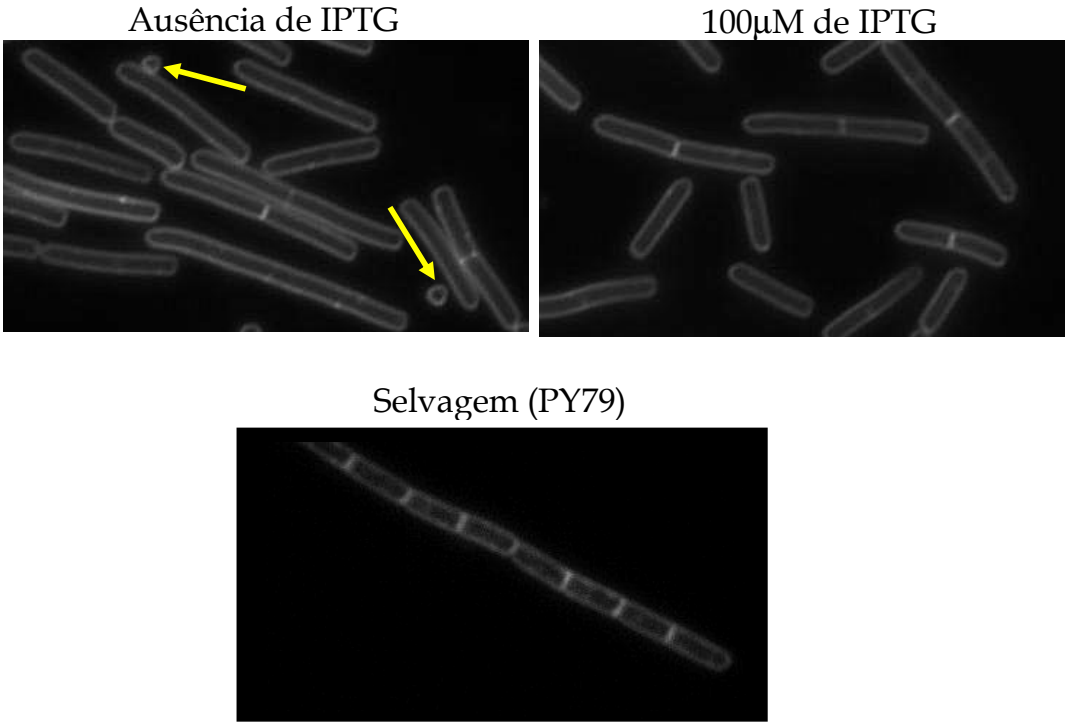


Figura 25: Microscopia de fluorescência da cepa FG672 (*minCD*Δ *thrC*::P_{spac}-*gfp-minC,minD cat spc*) na ausência e na presença de 100µM de IPTG. Na ausência de IPTG nós observamos a presença de minicélulas (setas amarelas), e células mais alongadas, como conseqüência da divisão polar. Na presença de 100µM de IPTG nós observamos células com freqüência de divisão semelhante às células selvagens. As células foram crescidas em meio CH até alcançar a DO_{600}= 0,5 à 37ºC com agitação. A membrana foi corada com o corante FM4-64 (1µg/ml).

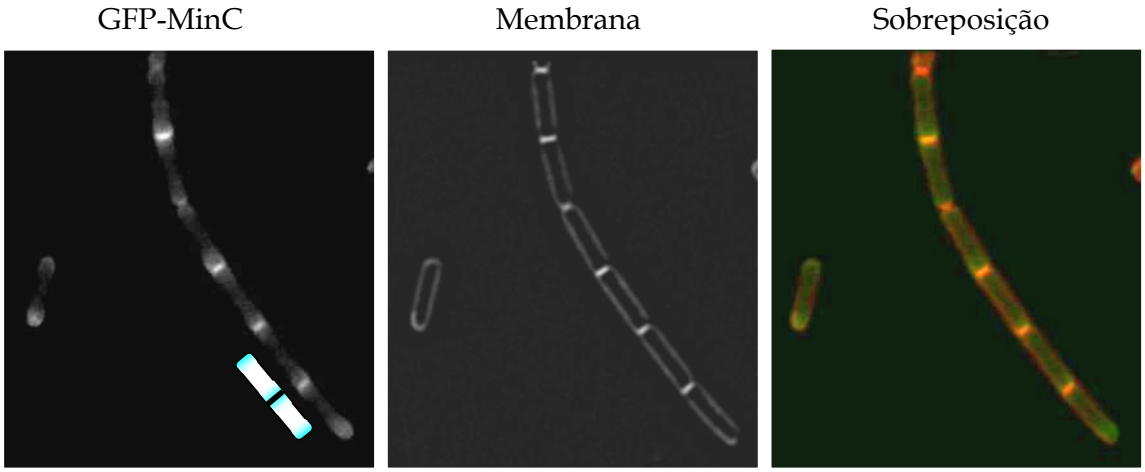


Figura 26. Localização polar da fusão *gfp-minC* durante a fase vegetativa. A cepa FG672 cresceu em meio CH até alcançar a DO_{600}= 0,5 na presença de 100µM de IPTG a 37ºC, tratada com o corante de membrana FM4-64 (1µg/ml) e observada no microscópio de fluorescência. Na sobreposição, GFP-MinC e membrana foram pseudocoloridas nas cores verde e vermelho, respectivamente.

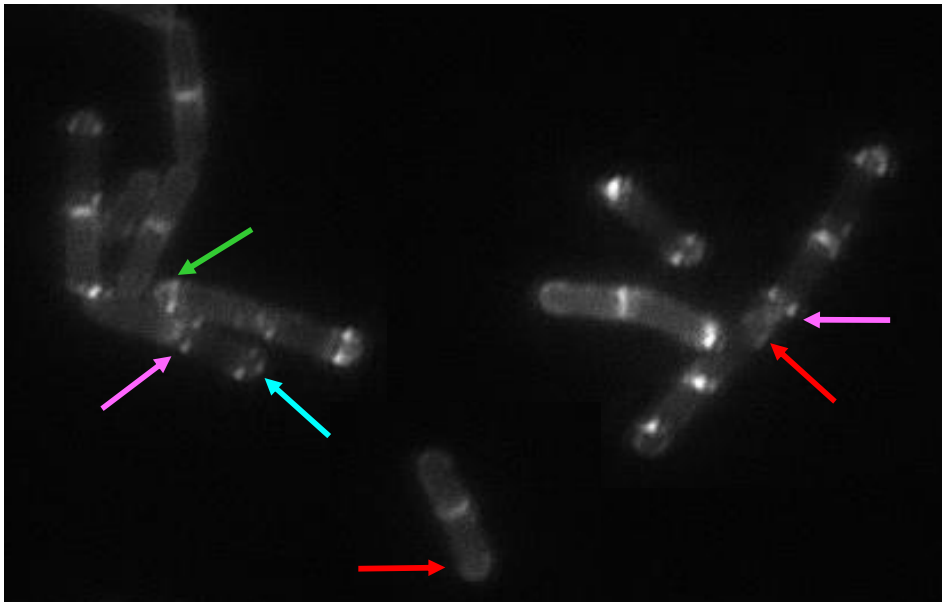
4.3.1.3 Localização da Fusão GFP-MinC durante a Esporulação.

A cepa FG672 (*minCD*Δ:: *thrC*::P_{spac}-*gfp-minC,minD cat spc*) foi submetida à esporulação pela metodologia de ressupensão (Sterlini e Mandelstam, 1969), de acordo com o protocolo descrito em Materiais e Métodos. A seguir, alíquotas de células foram removidas após noventa minutos de esporulação e submetidas à microscopia de fluorescência para determinarmos se a localização de GFP-MinC sofre alteração durante a esporulação. Como visto na Figura 8, a esporulação abrange sete estágios diferentes até a formação do esporo. Nós estamos interessados em analisar o comportamento de MinC no intervalo entre o início da esporulação até o estágio II (formação do septo assimétrico), este período dura aproximadamente noventa minutos.

Após noventa minutos de esporulação da cepa FG672, nós observamos uma clara modificação no padrão da fusão GFP-MinC em diversas células da população (Figura 27). Enquanto que em células vegetativas a fusão GFP-MinC apresenta uma acumulação relativamente difusa em forma de "crescente" no pólo das células (Figura 27, setas vermelhas). Nas células que iniciaram a esporulação a fusão GFP-MinC parece estar enriquecida no formato de pontos ou então com o mesmo padrão observado para o septo assimétrico (observado em células coradas com corante de membrana FM4-64) (Figura 27, setas: rosa; azul; verde). Dentre estas células foram identificados e caracterizados três padrões distintos de localização de GFP-MinC, que diferem do padrão observado durante a fase vegetativa. Num dos padrões de localização, GFP-MinC deixou completamente o pólo das células e agora se apresenta na forma de bandas transversais na posição onde deverá se formar o septo assimétrico (padrão "assimétrico", Figura 27, seta verde). Nos outros padrões de localização, GFP-MinC apresenta-se localizada na forma de focos ou pontos nos pólos das células (padrão "três pontos" Figura 27, seta azul; padrão "dois pontos" Figura 27, seta rosa). Nestas células não existe mais a distribuição homogênea da proteína em forma de "crescente". Quando realizamos a co-localização de GFP-MinC e membranas nas células em esporulação, detectamos que o padrão assimétrico freqüentemente está associado à formação do septo

assimétrico. Por outro lado, os padrões de "dois pontos" e "três pontos" estão presentes antes que um septo assimétrico seja formado, representando, portanto, prováveis intermediários na transição de GFP-MinC do padrão vegetativo para o padrão "assimétrico" de esporulação (Figura 28). Os diferentes padrões de localização de GFP-MinC (inclusive o vegetativo) são encontrados simultaneamente em uma cultura em esporulação, pois há células em diferentes estágios da esporulação nesta cultura (o processo não é totalmente sincronizado em nossas condições experimentais).

A)



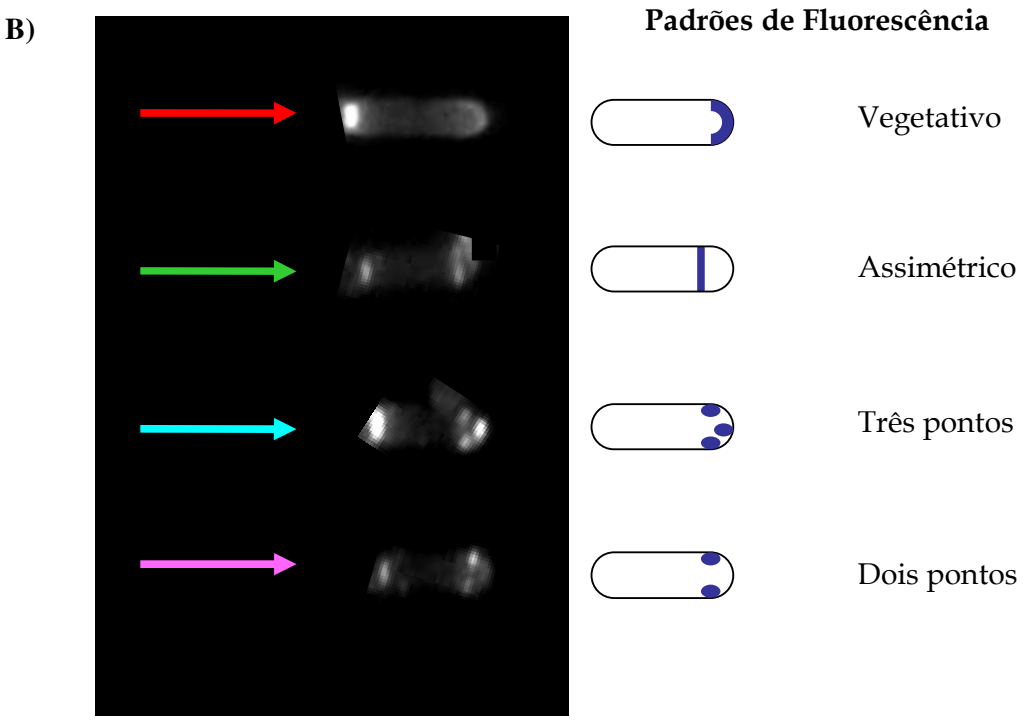


Figura 27. Análise da localização de *gfp-minC* (FG672, *minCD*Δ:: *thrC*::P_{spac}-*gfp-minC,minD cat spc*) após noventa minutos de esporulação por microscopia de fluorescência**.** A) As diferentes cores das setas mostram os diferentes padrões de localização de GFP-MinC identificados durante a esporulação. B) Representação esquemática dos quatro padrões de GFP-MinC caracterizados na esporulação.

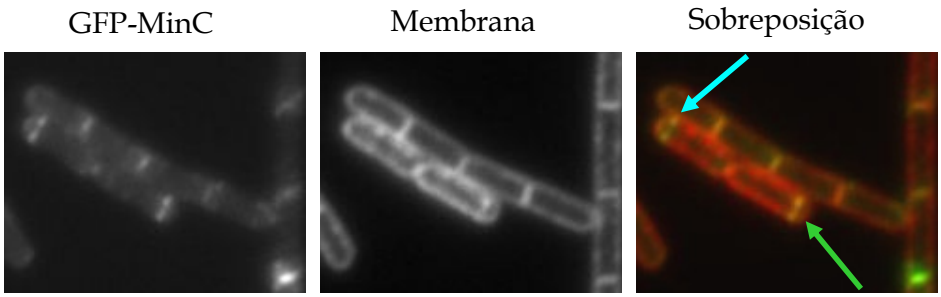


Figura 28. A co-localização entre GFP-MinC e membrana sugere que o padrão de pontos exibido por GFP-MinC parece ser anterior ao padrão assimétrico na re-localização de GFP-MinC após noventa minutos de esporulação**.** O padrão "assimétrico" da fusão GFP-MinC co-localiza com o septo assimétrico (seta verde) enquanto que o padrão "três pontos" não co-localiza com o septo assimétrico (seta azul). Membrana marcada com FM4-64 (1μg/ml). Na sobreposição, GFP-MinC e membrana foram pseudocoloridas nas cores verde e vermelho, respectivamente.

Postulamos que durante a esporulação MinC deixa o pólo antigo da célula para associar-se ao septo assimétrico seguindo uma suposta ordem cronológica de localização. Primeiramente, GFP-MinC apresenta-se localizado na forma de focos ou pontos nos pólos das células (padrão "três pontos"; padrão "dois pontos") e então GFP-MinC deixa completamente o pólo das células e apresenta-se na forma de bandas transversais na posição onde deverá se formar o septo assimétrico (padrão "assimétrico") (Figura 29).

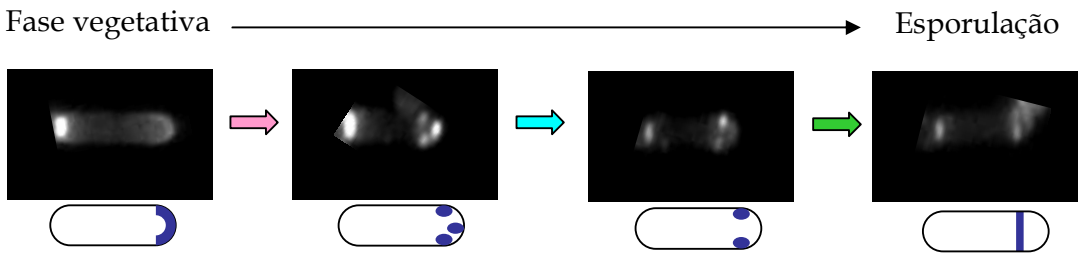


Figura 29. Representação esquemática da suposta ordem cronológica de saída de GFP-MinC dos pólos em direção ao novo septo assimétrico, durante a esporulação.

Nossos dados demonstraram que a localização de GFP-MinC parece ser mais nítida, menos difusa, durante a esporulação. Uma hipótese para que isto ocorra, é o fato de que este fenômeno seja um reflexo do aumento da expressão de MinC na esporulação, além disso, existe a possibilidade de que SpoIIE ou outra proteína ainda desconhecida possa atuar sobre MinC mudando seu comportamento durante a esporulação.

4.3.2 As Proteínas MinD e DivIVA também deixam os Pólos durante a Esporulação.

A saída de MinC dos pólos após noventa minutos de esporulação nos levou a questionar o que acontece com as outras proteínas (MinD e DivIVA) responsáveis em confinar *minC* nos pólos durante a fase vegetativa. MinC deve sair dos pólos porque as proteínas responsáveis pela sua localização também saem dos pólos em direção ao septo assimétrico durante a esporulação.

Para localizar MinD na célula nós utilizamos a linhagem FG145 (*amyE::*P_{xil}*-gfp-minD cat)* que expressa a fusão P_{xil}*-gfp-minD* sob a indução de xilose. Na literatura, quando a fusão *gfp-minD* está presente como segunda cópia, a célula apresenta fenótipo de filamentação leve e severa se induzida com 0,5% e 1% de xilose, respectivamente (Marston & Errington 1999). Para evitar este efeito indesejável, utilizamos 0,2% de xilose para indução. As células

induzidas com 0,2% de xilose apresentaram o fenótipo semelhante à selvagem durante a fase vegetativa, não apresentando o fenótipo de filamentação visto em Marston & Errington, 1999 (Figura 30).

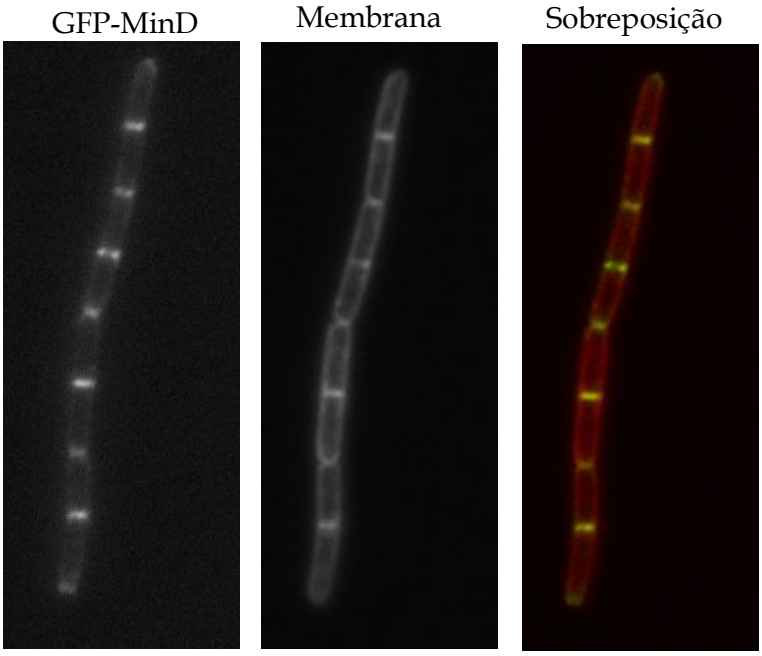


Figura 30. Localização polar da fusão *gfp-minD* durante a fase vegetativa. A cepa FG145 (*amyE::*P_{xil}*-gfp-minD cat)* foi cultivada em meio CH até alcançar a DO_{600}= 0,5 na presença de 0,2% de xilose a 37ºC, tratada com o corante de membrana FM4-64 (1µg/ml) e observada no microscópio de fluorescência. Na sobreposição, GFP-MinD e membrana foram pseudocoloridas nas cores verde e vermelho, respectivamente.

A cepa FG145 (*amyE::*P_{xil}*-gfp-minD cat)* foi submetida à esporulação pela metodologia de ressuspensão (Sterlini e Mandelstam, 1969), de acordo com o protocolo descrito em Materiais e Métodos. Após noventa minutos de esporulação nós observamos a fusão GFP-MinD co-localizando com o septo assimétrico de membrana (Figura 31). Não foram encontramos os padrões de fluorescência "dois pontos" e "três pontos" vistos em MinC, mas este padrão assimétrico sugere que MinD também saia dos pólos em direção ao novo septo assimétrico durante a esporulação.

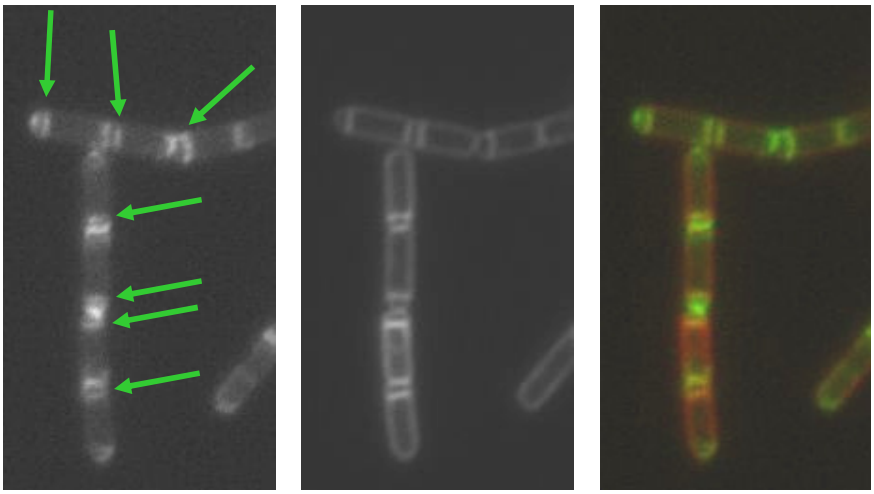


Figura 31. Análise da localização de GFP-MinD (FG145, *amyE::*P_{xil}*-gfp-minD cat*) após noventa minutos de esporulação por microscopia de fluorescência**.** A fusão GFP-MinD co-localiza com o septo assimétrico (seta verde). A membrana foi corada com FM4-64 (1µg/ml) e pseudocolorida de vermelho e GFP-MinD foi pseudocolorida de verde.

Para observar DivIVA, utilizamos a linhagem FG96 (*amyE::*P_{xil}*-divIVA-gfp cat)* pertencente à nossa coleção, contendo a fusão P_{xyl}*-divIVA-gfp* presente no *locus amyE*. A superexpressão de *divIVA* ocasiona o fenótipo de filamentação, podendo levar ao bloqueio da divisão celular (Cha & Stewart, 1997). Desta forma, induzimos a fusão *divIVA-GFP* somente com 0,2% de xilose e submetemos a cepa FG96 (*amyE::*P_{xil}*-gfp-MinD cat)* à esporulação pela metodologia de ressuspensão (Sterlini e Mandelstam, 1969). A fusão DivIVA-GFP sai dos pólos em direção ao septo assimétrico apresentando padrões de localização semelhantes aos caracterizados para GFP-MinC após noventa minutos de esporulação (Figura 32). Esta co-localização entre DivIVA-GFP e o septo assimétrico nunca havia sido vista durante a esporulação. Na literatura é sugerido que DivIVA não se localiza no septo assimétrico durante a esporulação (Thomaides, *et al.*, 2001). Porém nossos dados demonstram que em mais da metade (55,5%) das células DivIVA-GFP co-localiza com o septo assimétrico (Tabela 07). Thomaides, *et al.*, 2001 utilizaram uma cepa na qual a

fusão *divIVA-gfp* está sob a regulação do seu promotor natural enquanto nós utilizamos uma cepa na qual *divIVA-gfp* é regulada por um promotor induzido por xilose. Para verificar se a discrepância entre nossos resultados e os de Thomaides et al. seria devido a uma possível diferença no nível de expressão das fusões, nós determinamos a localização de DivIVA-GFP na cepa FG100 (*divIVAΩdivIVA-gfp kan)* que apresenta *divIVA-gfp* sob a regulação do promotor natural. Como esta cepa também demonstrou a presença de DivIVA-GFP no septo assimétrico após noventa minutos de esporulação (Figura 33), nós sugerimos que a conclusão atualmente presente na literatura de que DivIVA não se associa ao septo assimétrico é incorreta.

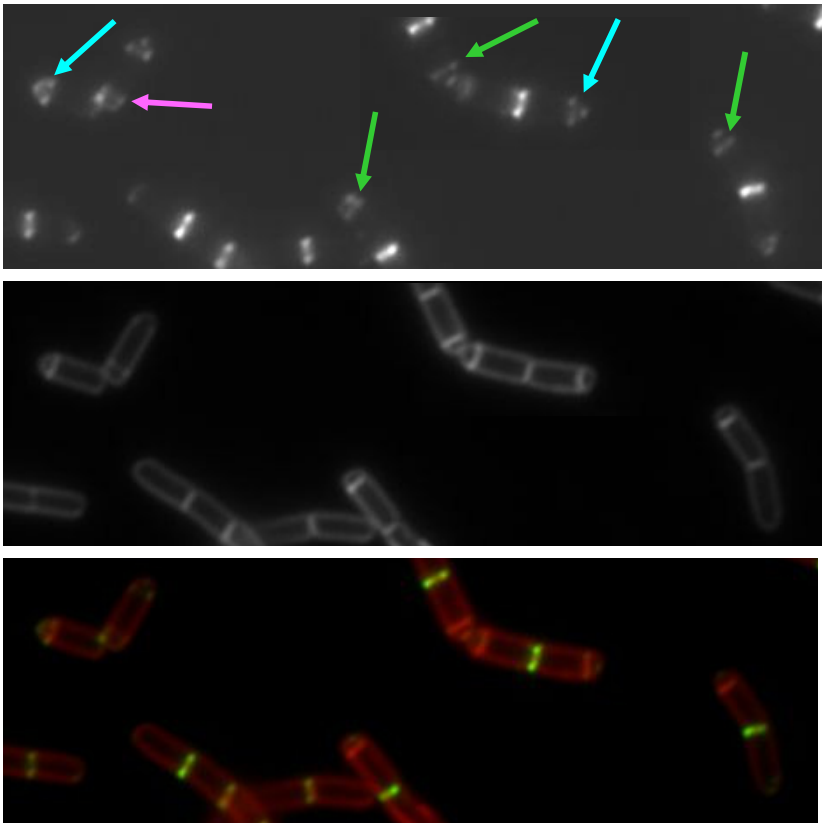


Figura 32. Análise da localização de DivIVA-GFP (FG96, *amyE::P$_{xil}$-divIVA-gfp cat*) após noventa minutos de esporulação por microscopia de fluorescência**.** A fusão DivIVA-GFP apresenta padrões de fluorescência semelhantes ao observado para a fusão GFP-MinC (padrão: "dois pontos"= seta rosa; "três pontos"= seta azul; "assimétrico"= seta verde). A membrana foi corada com FM4-64 (1µg/ml) e pseudocolorida de vermelho e DivIVA-GFP foi pseudocolorida de verde.

Sem sinal de DivIVA nos pólos	DivIVA saindo dos pólos em direção ao septo assimétrico	DivIVA co-localizando com o septo assimétrico
3%(04)	**41,5%(56)**	**55,5%(75)**

Tabela 07. Análise quantitativa da localização de DivIVA-GFP (FG96) após noventa minutos de esporulação. Entre parênteses os números absolutos.

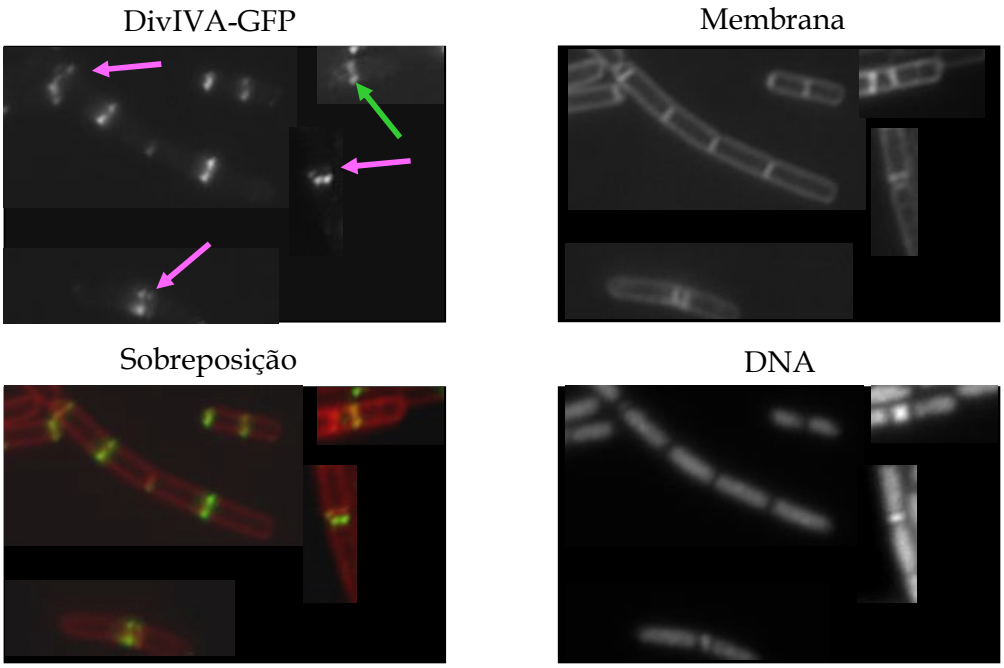


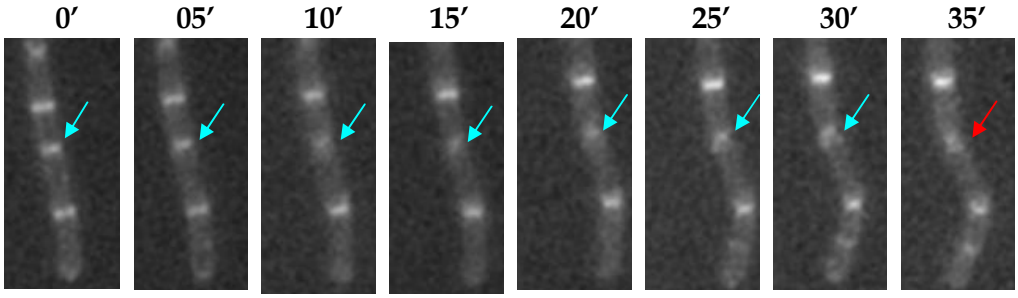
Figura 33. Análise da localização de DivIVA-GFP (FG100, *divIVAΩdivIVA-gfp kan*) após noventa minutos de esporulação por microscopia de fluorescência**.** A expressão da fusão DivIVA-GFP como única cópia da proteína DivIVA, demonstra padrões de fluorescência semelhantes ao observado para a fusão GFP-MinC (padrão: "dois pontos"= seta rosa; "assimétrico"= seta verde). O DNA foi marcado com Hoechst (5 µg/ml). A membrana foi corada com FM4-64 (1µg/ml) e pseudocolorida de vermelho e DivIVA-GFP foi pseudocolorida de verde.

4.3.3 Microscopia de Série Temporal Demonstra a Dinâmica da Re-localizacão de MinD durante a Esporulação.

Para ordenar sequencialmente os padrões de fluorescência (padrão "três pontos"; padrão "dois pontos"; padrão "assimétrico") descobertos anteriormente, realizamos a microscopia de série temporal de um único campo de células de *B. subtilis* do início até o fim do estágio II da esporulação (formação do septo assimétrico). Inicialmente testamos sem sucesso um estudo da evolução dos padrões de fluorescência de MinC, filmando (fotos de 5 em 5

minutos num total de 40 min) a fusão GFP-MinC (cepa FG672, *minCD*Δ:: *thrC::*P_{spac}*-gfp-minC,minD cat spc*) em um único campo durante a esporulação. Infelizmente, nossas observações de microscopia por série temporal demonstraram que a fluorescência da fusão GFP-MinC diminui significativamente a cada nova exposição, a ponto de não distinguirmos o sinal de fluorescência da fusão do da fluorescência do ruído ("background"). Isto se deve ao fenômeno de foto-inativação de GFP, que ocorre quando várias moléculas de GFP são inativadas de maneira irreversível pela exposição à luz de fluorescência necessária a sua excitação. Desta maneira, não conseguimos captar a riqueza de detalhes que revelaria a evolução dos padrões de GFP-MinC durante a esporulação. Como alternativa, utilizamos esta mesma metodologia para analisar o comportamento da fusão GFP-MinD (FG145, *amyE::*P_{xil}*-gfp-MinD cat)* durante a esporulação, pois esta fusão exibe maior intensidade de fluorescência que a fusão GFP-MinC. Como MinD é responsável pela localização de MinC nos pólos celulares, analisando a localização de GFP-MinD podemos inferir que GFP-MinC segue o mesmo padrão de localização. A fusão GFP-MinD foi induzida com 0,2 % de xilose (P_{xil}*-gfp-minD*) durante o início da esporulação e as células foram montadas para microscopia em uma câmara de silicone (ver Materiais e Métodos). O padrão inicial de GFP-MinD é de uma banda com forte intensidade próxima aos pólos (Figura 34, 0 minuto, seta azul). Após dez minutos de esporulação na câmara de silicone, surge o padrão "crescente", aos trinta minutos é identificado o padrão "três pontos" e aos trinta e cinco minutos o padrão "assimétrico" começa a ser formado (Figura 34). O resultado obtido corrobora os nossos dados anteriores, demonstrando que o processo de re-localização de MinC e MinD parecem seguir as etapas que postulamos.

A



B

Figura 34. Re-localização de GFP-MinD durante a esporulação**.** A) Microscopia temporal da fusão de GFP-MinD. Fotos foram capturadas de cinco em cinco minutos durante a esporulação. As setas azuis marcam a dinâmica de re-localização da fusão GFP-MinD, iniciando-se no padrão de fluorescência "três pontos" até o padrão de fluorescência "assimétrico". B) Formação do septo assimétrico após trinta e cinco minutos de esporulação. A membrana foi marcada com FM4-64 (1µg/ml).

4.3.4 A Re-localização de MinC durante a Esporulação ocorre Independentemente de RacA

Como descrito na introdução, a saída de MinC dos pólos no início da esporulação foi postulada por Ben-Yehuda *et al.*, 2003. Neste trabalho os autores sugerem que RacA, uma proteína expressa somente durante a esporulação, desfaz a interação de MinCD com DivIVA, liberando MinCD dos pólos e

facilitando a formação de anéis Z assimétricos. De acordo com este modelo, o complexo Min se redistribui de maneira homogênea por todo o cilindro celular no início da esporulação. Entretanto, nossos resultados demonstram que MinC se re-localiza em direção ao novo septo assimétrico durante a esporulação. Para investigarmos se RacA estaria envolvida na mudança da localização de GFP-MinC que detectamos durante a esporulação decidimos estudar o comportamento da fusão GFP-MinC em um mutante *racA*$^-$. Foi construída a cepa FG688 (*minCD*Δ *racA*Δ *thrC::*P_{spac}*-gfp-minC,minD cat tet)*, transformando a cepa FG672 (*minCD*Δ *thrC::*P_{spac}*-gfp-minC,minD cat*) com o DNA genômico contendo *racA*Δ (ver materiais e métodos). O fenótipo da ausência de *racA* é caracterizado pelas células apresentarem uma eficiência de esporulação de 50% se comparado ao selvagem. Isto ocorre porque RacA é responsável pelo correto ancoramento do DNA nos pólos celulares no início da esporulação. Na ausência de RacA as células não avançam a estágios posteriores da esporulação, levando ao bloqueio da esporulação em 50% das células (Ben-Yehuda *et al.*, 2003). O fenótipo da ausência de *racA* na cepa construída (FG688) foi confirmado pelo ensaio de resistência ao calor. Neste ensaio uma cultura submetida à esporulação é aquecida por 20 minutos a 80ºC. Este tratamento mata as células que não esporularam, mas não afeta a viabilidade dos esporos presentes na cultura. Estes esporos são então quantificados pelo plaqueamento de diluições seriadas e contagem do número de colônias formadas. A cepa FG688 apresentou 50% de freqüência de esporulação comparado com a selvagem, resultado semelhante ao obtido na literatura (Ben-Yehuda *et al.*, 2003).

A análise da localização da fusão GFP-MinC na cepa FG688 revelou que essa apresenta os mesmos padrões de localização detectados anteriormente na cepa selvagem (Figura 35), ou seja, a re-localização de GFP-MinC durante a esporulação não é alterada na ausência de *racA*. Isto sugere que, contrariando o sugerido na literatura, a saída de GFP-MinC dos pólos em direção ao septo assimétrico durante a esporulação ocorra independentemente de RacA.

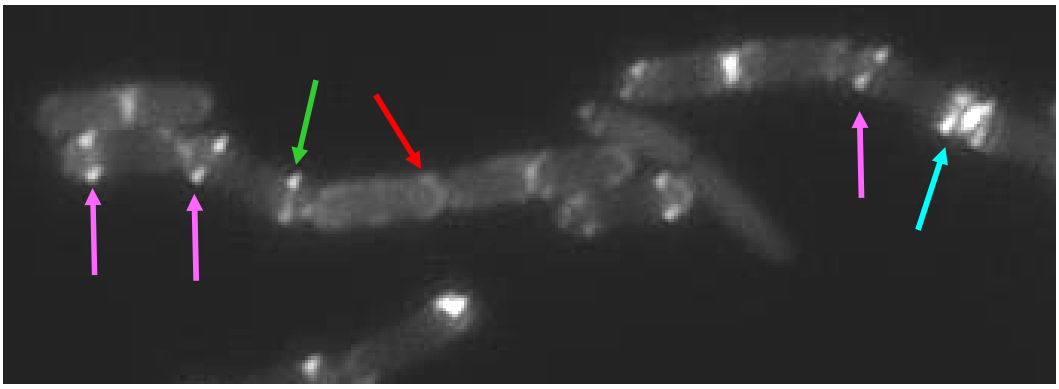


Figura 35. Análise da localização de GFP-MinC numa cepa *racAΔ* (FG688) após noventa minutos de esporulação**.** A classificação dos padrões de localização de GFP-MinC é igual ao observado em nossos ensaios anteriores.

4.4 Co-localização de *gfp-minC* e *ftsZ-mCherry* durante a Etapa Inicial da Esporulação.

Nossas análises demonstraram a dinâmica de re-localização do complexo Min e DivIVA em direção ao septo assimétrico durante a esporulação, contrapondo o modelo existente na literatura. Este processo de re-colocalização de MinC parece iniciar antes da formação do septo assimétrico de divisão durante a esporulação. Para entendermos melhor quando este processo ocorre, nós observamos a re-localização da fusão GFP-MinC e a formação de anéis Z bipolares, pois é descrito na literatura que esta etapa precede a formação do septo assimétrico durante a esporulação (Errington, 2003). Para isso, nós construímos a cepa FG714 (*minCD*Δ *thrC::*P_{spac}*-gfp-minC,minD amyE::*P_{spac}*-ftsZ-mCherry cat spc)* que contem a fusão P_{spac}*-gfp-minC* no locus (*thrC*) e uma fusão de FtsZ à proteína vermelha fluorescente mCherry (P_{spac}*-ftsZ-mCherry)* no locus (*amyE*). Ambas as fusões estão sob a regulação de um promotor induzido por IPTG, o P_{spac}, (ver materiais e métodos). Nós colocamos esta segunda cópia de *ftsZ* (*ftsZ-mCherry*) no lócus (*amyE*), para evitar que a única fonte da proteína seja a fusão, pois foi demonstrado na literatura que se FtsZ fusionado a GFP for a única fonte de FtsZ da célula isto prejudica a capacidade da célula de formar anéis Z (Levin et al., 1999). Nós expressamos a fusão *ftsZ-mCherry* com somente

100μM de IPTG, pois já foi descrito na literatura que *ftsZ-gfp* quando expressa em baixos níveis na presença da cópia selvagem de *ftsZ* não afeta o processo de divisão (Levin et al., 1999).

Observando células da cepa FG714 (*minCD*Δ *thrC::*P_{spac}*-gfp-minC,minD amyE::*P_{spac}*-ftsZ-mCherry cat spc)* após noventa minutos de esporulação, nós encontramos dois padrões de localização representados na Figura 36. Curiosamente, em diversas células com anéis Z bipolares observamos que GFP-MinC ainda se encontrava concentrada nos pólos adjacentes aos anéis Z assimétricos (Figura 36, setas brancas). Isto demonstra que MinC ainda não saiu dos pólos quando ocorreu a formação do anel Z assimétrico. Este dado reforça a hipótese formulada aqui de que MinC não se distribui por todo o cilindro celular no início da esporulação. Entretanto, a formação do anel Z bipolar mesmo com a presença de MinC nos pólos contraria a idéia de que a atividade de MinC deve inibir a formação do anel Z em sua proximidade. (Hu et al., 1999; Scheffers, 2008). Existem também a co-localização de GFP-MinC com o anel Z assimétrico (Figura 36, setas amarelas), sugerindo que MinC parece ser recrutado para o anel Z assimétrico assim que ele é formado.

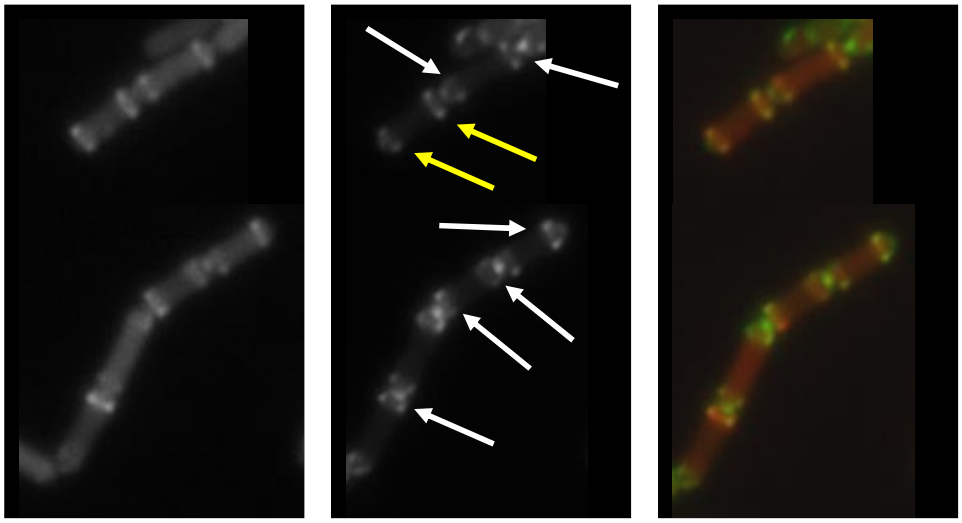


Figura 36. Localização das fusões *ftsZ-mCherry* e *gfp-minC* após noventa minutos de esporulação. A fusão FtsZ-mCherry nos mostra a localização bipolar do anel Z durante a esporulação. GFP-MinC apresentou dois padrões de localização após noventa minutos de esporulação: GFP-MinC ainda presente nos pólos enquanto o anel Z bipolar assimétrico é formado (setas brancas) e GFP-MinC co-localizando com o anel Z bipolar (setas amarelas). Estes dados sugerem que MinC não inibe a polimerização de FtsZ durante a esporulação.

4.5 SpoIIE é Capaz de Suprimir a Letalidade Causada pela Superexpressão de *minD* em Células Vegetativas de *B. subtilis*:

Os ensaios anteriores utilizando as fusões GFP-MinC e FtsZ-mCherry demonstraram que, ao contrário do que é relatado na literatura, a formação do anel Z assimétrico é realizada mesmo com a presença adjacente de MinC nos pólos (Figura 36, setas brancas). Estes resultados sugerem que MinC parece não exercer seu efeito inibitório sobre a formação do anel Z assimétrico. Postulamos que a atividade inibitória de MinC possa ser impedida pela ação de alguma outra proteína com função de promover a polimerização assimétrica de FtsZ durante a esporulação. Nossa hipótese é que SpoIIE exerça esta função de

contrapor a ação inibitória de MinC durante a esporulação, pois como comentado na introdução, SpoIIE é uma proteína que auxilia na formação do septo assimétrico durante a esporulação.

Para demonstrar se SpoIIE é responsável por contrapor a ação de Min durante a esporulação, realizamos um ensaio semelhante ao utilizado na busca por novos moduladores que auxiliam na formação do anel Z (Gueiros-Filho & Losick, 2002). Super-expressamos SpoIIE em células em crescimento vegetativo com o objetivo de resgatar a viabilidade de células que apresentavam bloqueio na divisão celular devido a super expressão

Para este ensaio construímos a cepa FG877 (*thrC*::$P_{hiperspac}$-*minD amyE*::P_{spank}-*spoIIE erm spc cat*), como descrito em Materiais e Métodos. Plaqueamos aproximadamente 10^3 células referentes à cepa FG 877 na ausência e na presença de IPTG (50µM). Foi observado um número semelhante de colônias em placas com e sem IPTG, indicando que a superexpressão de SpoIIE torna viável toda a população de células plaqueadas (Figura 37). Como controle de que a super-expressão de MinD é capaz de bloquear a divisão celular, submetemos cerca de 10^3 células referentes a cepa FG871 (*thrC*::$P_{hiperspac}$-*minD*), ao crescimento na presença de 50µM de IPTG, esta concentração de IPTG demonstrou-se suficiente para bloquear a divisão celular, pois não observamos a presença de colônias da cepa FG871 na placa de LB com 50µM de IPTG.

As colônias da cepa FG877 que cresceram na presença de IPTG são menores em tamanho e algumas colônias apresentaram uma morfologia distinta daquela obtida na ausência de IPTG (ausência de superexpressao de MinD) (Figura 37B). Este fato nos indica que apesar de SpoIIE resgatar a viabilidade celular, a proteína é incapaz de suprimir completamente a inibicão da divisão provocada por Min. Dessa maneira, investigamos a freqüência de divisão das células tanto na ausência quanto na presença de IPTG (50µM) por microscopia de fluorescência. Nossas análises revelaram que as células observadas na ausência de IPTG apresentaram uma freqüência de divisão semelhante à selvagem enquanto que as células observadas na presença de IPTG apresentaram uma menor freqüência de divisão (Figura 38).

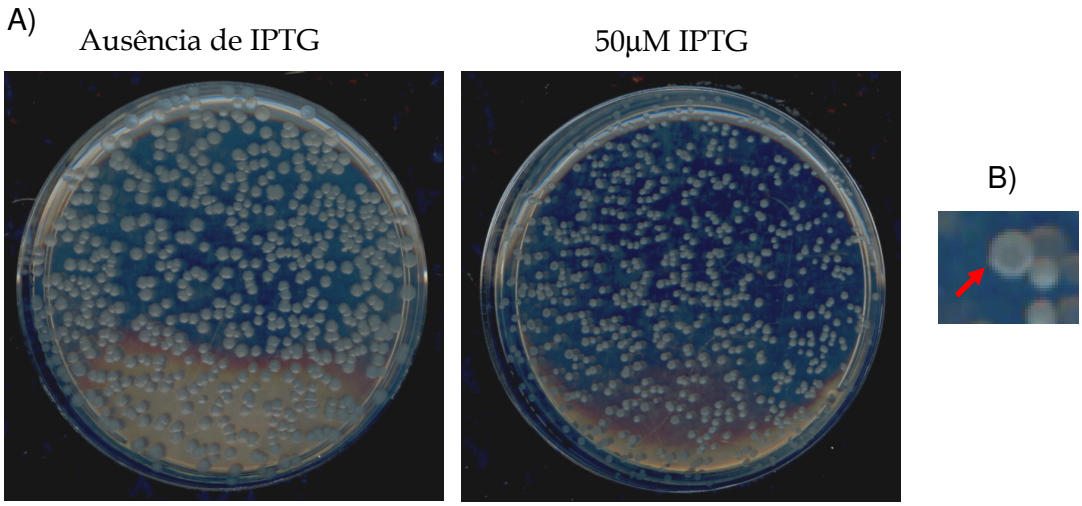


Figura 37: Teste quantitativo da capacidade de SpoIIE de suprimir a letalidade de MinD**.** A) Plaqueamento de aproximadamente mil células referentes à cepa FG877 (*thrC*::$P_{hiperspac}$-*minD amyE*::P_{spank}-*spoIIE erm spc cat*) na ausência e presença de 50µM de IPTG. B) Exemplo de uma colônia morfologicamente diferente (seta vermelha) ao lado de uma colônia com aspecto selvagem. Esta morfologia de colônia foi encontrada somente na presença de 50µM de IPTG. O crescimento das células na placa foi observado após 12h a 37°C.

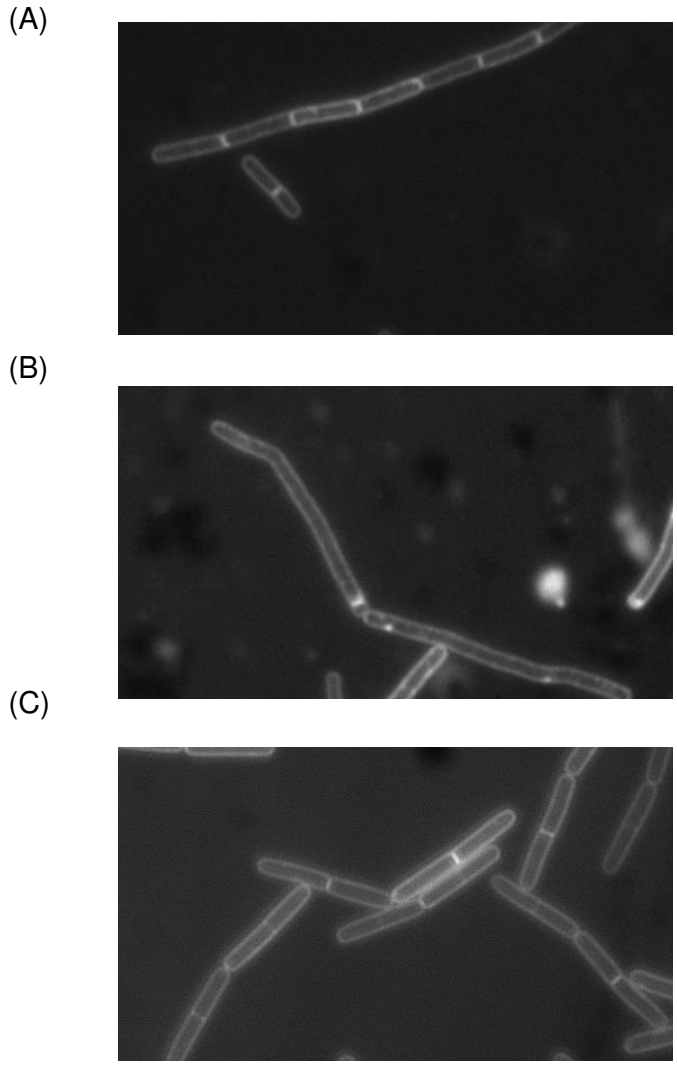


Figura 38: Análise qualitativa da freqüência de divisão celular observada no microscópio de fluorescência. Células da cepa FG 877 (*thrC*::$P_{hiperspac}$-*minD amyE*::P_{spank}-*spoIIE erm spc cat*) na ausência de IPTG (A), na presença de 50µM IPTG (B). Freqüência de divisão celular da célula selvagem (PY79) (C). Comparando o painel (A) com o painel (C) observamos que as células da cepa FG 877 na ausência de IPTG revelaram uma frequência de divisão celular semelhante a selvagem, enquanto que na presença de 50µM IPTG (B) as células apresentaram um certo grau de filamentação. As células foram retiradas das respectivas placas de LB com e sem IPTG, coradas com corante de membrana (FM4-64) e analisadas no microscópio de fluorescência.

4.5.1 O domínio Fosfatase não é Essencial para SpoIIE Suprimir a Letalidade causada por *minD* em Células Vegetativas de *B. subtilis*:

Sabe-se que SpoIIE exerce duas funções: promover a formação do septo assimétrico e regular a ativação do fator σ^F, através da desfosforilação de SpoIIAA-P durante a esporulação (Barak & Youngman, 1996; Feucht et al., 1996). SpoIIE é constituído por três domínios: domínio I transmembrana, responsável pela associação de SpoIIE à membrana; domínio II, de função desconhecida; domínio III, que contém os resíduos responsáveis pela atividade fosfatásica da proteína (Carniol et al, 2005). Carniol e colaboradores (Carniol et al, 2005) estudaram os seguintes mutantes de *spoIIE*: deleções referentes ao domínio I ou II; mutantes pontuais nos domínios II ou III e uma quimera na qual o domínio I (transmembrana) de SpoIIE foi substituído pela região transmembrana da proteína MalF de *E. coli*. Estes autores analisaram a capacidade destes mutantes de promover a formação do septo assimétrico expressando estas proteínas durante a fase vegetativa e verificando a formação de mini-células. Os autores concluíram que o domínio I e a atividade fosfatásica não são essenciais para promover a formação do septo assimétrico, mas o domínio II mostrou-se essencial. Todos os mutantes e a cepa controle (SpoIIE selvagem) possuem uma cópia de *ftsZ* em seu genoma, então a expressão desta cópia pode auxiliar no fenótipo observado pelos autores, pois resultados demonstrados na literatura indicam que a mudança do anel Z para os pólos durante a esporulação depende de um aumento na expressão de *ftsZ* e da presença de SpoIIE (Gonzy-Treboul et al., 1992; Gholamhoseinian et al., 1992; Khvorova et al., 1998; Ben-Yehuda & Losick, 2002). Nós questionamos se o resultado obtido com estes mutantes seria o mesmo se medíssemos a capacidade de SpoIIE de antagonizar MinD em nosso ensaio. Para analisar se existe relação entre a capacidade de SpoIIE promover septos assimétricos em células vegetativas e a capacidade de SpoIIE de contrapor a ação inibitória de MinCD nós construímos cepas contendo o alelo de super-expressão de MinD em combinação com os diferentes mutantes de SpoIIE: FG873 (*thrC*::$P_{hyperspac}$-*minD amyE*::P_{spank}-*spoIIE*-D746A *erm spc cat*); FG875 (*thrC*::$P_{hyperspac}$-*minD*

amyE::P_{spank}-*spoIIE*-Q483A *erm spc cat*); FG879 (*thrC*::$P_{hyperspac}$-*minD amyE*::P_{spank}-*spoIIE*-S361F *erm spc cat*); FG881 (*thrC*::$P_{hyperspac}$-*minD amyE*::P_{spank}-*spoIIE*ΔdomII *erm spc cat*); FG883 (*thrC*::$P_{hyperspac}$-*minD amyE*::P_{spank}-*spoIIE*ΔregI *erm spc cat*); FG912 (*thrC*::$P_{hyperspac}$-*minD amyE*::P_{spank}-*malF-spoIIE erm spc cat*). Para maiores detalhes, ver Materiais e Métodos. As cepas FG881 e FG883 não apresentam o domínio II e I, respectivamente. A cepa FG 912 apresenta o domínio I (transmembrana) substituído pelo domínio transmembrana da proteína MalF de *E. coli*. O mutante FG873 apresenta uma substituição no resíduo 746 do domínio III de SpoIIE que inativa sua atividade fosfatase. Os mutantes FG875 e FG879 apresentam substituição nos resíduos do domínio II que afetam a eficiência de esporulação. Os mutantes e as cepas FG871 (*thrC*::$P_{hyperspac}$-*minD erm*), e FG877 (*thrC*::$P_{hiperspac}$-*minD amyE*::P_{spank}-*spoIIE)* foram utilizadas num ensaio em que foi medida a viabilidade das células na presença de 500µM de IPTG. Esta indução proporciona tanto a super-expressão de Min como a expressão vegetativa de IIE. Para isso, aproximadamente mil células de cada cepa foram plaqueadas em placas com e sem IPTG (500µM) e o número de colônias que cresceram na ausência de IPTG foi comparado com o número de colônias que cresceram na presença de IPTG (500µM), gerando a porcentagem de células que sobreviveram na presença dos diferentes mutantes de *spoIIE* (Tabela 08). FG871, que superexpressa MinD apenas, e FG877, que superexpressa MinD e SpoIIE, foram utilizados como controle negativo e positivo, respectivamente. Dentre as cepas mutantes de *spoIIE*, somente a cepa FG873 sobreviveu a presença de 500µM de IPTG. Este resultado indica que a substituição que leva ao bloqueio da atividade fosfatásica parece não interferir na função de contrapor a superexpressão de MinD executada por SpoIIE.

Cepas	**Sem IPTG**				**500µM IPTG**				%
	A	B	C	Média	A	B	C	Média	
FG871 *thrC*::$P_{hiperspac}$-*minD*	266	315	301	294	0	0	0	0	0
FG877 *thrC*::$P_{hyperspac}$-*minD* a*myE*::P_{spank}-*spoIIE*	342	319	327	329	334	274	299	302	92
FG873 *thrC*::$P_{hyperspac}$-*minD* *amyE*::P_{spank}-*spoIIE*-D746A	256	269	280	268	258	281	223	254	95
FG875 *thrC*::$P_{hyperspac}$-*minD* *amyE*::P_{spank}-*spoIIE*-Q483A	338	362	305	335	1	1	1	1	0,3
FG879 *thrC*::$P_{hyperspac}$-*minD* *amyE*::P_{spank}-*spoIIE*-S361F	271	243	310	275	0	0	0	0	0
FG881 *thrC*::$P_{hyperspac}$-*minD* *amyE*::P_{spank}-*spoIIE*ΔdomII	293	347	277	306	0	0	0	0	0
FG883 *thrC*::$P_{hyperspac}$-*minD* *amyE*::P_{spank}-*spoIIE*-Δreg1	254	304	320	293	0	0	0	0	0

Continuação

Cepas	**Sem IPTG**				**500µM IPTG**				**%**
	A	B	C	Média	A	B	C	Média	
FG912 *thrC*::$P_{hyperspac}$-*minD* *amyE*::P_{spank}-*malf-spoIIE*	255	302	294	284	0	0	0	0	0

Tabela 08: Cálculo da viabilidade celular utilizando as cepas FG871, FG877 e as cepas mutantes de SpoIIE na ausência e na presença de 500µM de IPTG.

5. DISCUSSÃO:

Capítulo 1

5.1 Análise da Cinética da Montagem do Divisomo durante o Crescimento Vegetativo em *B. subtilis*.

Em *E. coli* foi demonstrado que a maturação do divisomo ocorre em duas etapas: a primeira etapa é caracterizada pela associação das proteínas que não dependem de FtsQ para se associarem ao anel Z. Após um intervalo de dezessete minutos, FtsQ e outras proteínas envolvidas na síntese de peptideoglicano são recrutadas para o divisomo (Aarsman et al., 2005). O modelo existente na literatura para a dinâmica de montagem do divisomo em *B. subtilis* sugere que esta montagem ocorra em duas etapas. Na primeira etapa se associam proteínas iniciais como EzrA, ZapA e FtsA ao anel Z e na segunda etapa proteínas tardias como Pbp2B, FtsL, DivIB e DivIVA são recrutadas para o divisomo (Gamba et al., 2009).

Neste estudo, Gamba e colaboradores, 2009, realizaram dois tipos de ensaios de série temporal no microscópio de fluorescência: o primeiro acompanhando a dinâmica de localização de diversas proteínas de divisão fusionadas a GFP em várias células de uma população sincronizada de *B. subtilis* na fase logaritmica (DO_{600}=0,3) e o segundo observando a localização das proteínas de divisão fusionadas a GFP ao longo do ciclo celular em uma única célula de *B. subtilis.* No primeiro ensaio, após a germinação, as células foram crescidas até atingir a DO_{600}=0,3 e observadas no microscópio de fluorescência. Os autores analisaram quantas células dentro de uma população que expressava uma determinada proteína de divisão fusionada a GFP apresentavam esta fusão (proteína de divisão–GFP) localizada no sítio de divisão celular. Aproximadamente 60% de células de uma determinada população apresentaram a fusão FtsZ-GFP ou EzrA-GFP localizadas no sítio de divisão, enquanto que apenas 25% das células de uma determinada população apresentaram a fusão FtsW-GFP ou YpsB-GFP ou DivIVA–GFP localizadas no

sítio de divisão. No segundo ensaio, os autores observaram células únicas no microscópio de fluorescência e analisaram em qual momento do ciclo celular as fusões referentes às proteínas de divisão-GFP são localizadas no sítio de divisão. Para isso os autores observaram as células do período de germinação (0%) até a formação do primeiro septo de divisão (100%) e classificaram este período como sendo corresponde ao ciclo celular em *B. subtilis*. Dessa maneira os autores sugerem que FtsZ, EzrA, ZapA, FtsA localizam-se no sítio de divisão após 20% do ciclo celular, Pbp2b, FtsL, DivIB são recrutadas para o divisomo após 45% do ciclo celular e DivIVA se associa após 60% do ciclo celular. Todas as fusões de proteínas de divisão com GFP foram expressas sob o controle do promotor selvagem como cópia única, exceto FtsZ-GFP que foi expressa em locus heterólogo (*amyE*).

O segundo ensaio realizado por Gamba e colaboradores, (2009) a partir de células individuais demonstrou uma cinética de montagem do divisomo mais compatível com a obtida pelo nosso grupo. Porém, nós observamos uma grande dispersão nos dados analisados para uma mesma fusão, por exemplo, DivIB-GFP chegou ao sítio de divisão entre 20% e 80% do ciclo celular em diferentes células (Figura 39). Esta diferença provavelmente ocorre porque o momento do ciclo em que as proteínas se localizam no divisomo varia de célula para célula, devido à variação de expressão gênica existente entre células de uma mesma população (Raser & O'Shea, 2005).

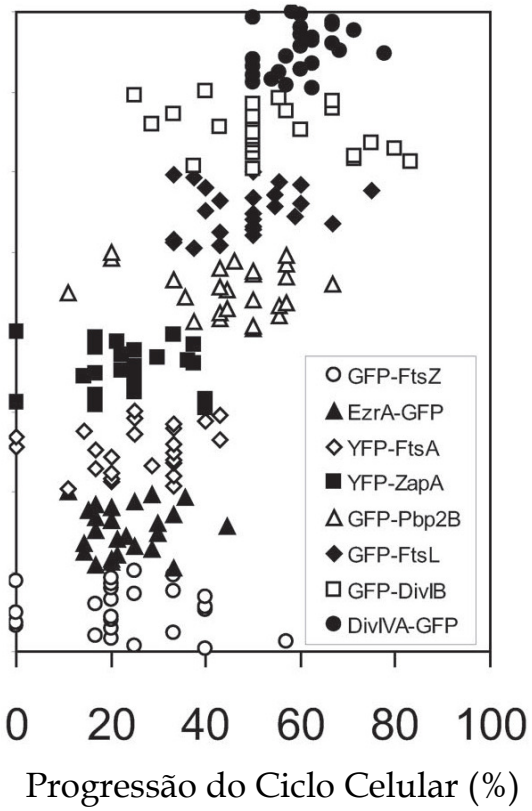


Figura 39: Análise da cinética de localização de oito proteínas de divisão (EzrA, FtsZ, FtsA, ZapA, Pbp2B, FtsL, DivIB, e DivIVA) ao longo do ciclo celular, dadas em porcentagem**.** Cada símbolo representa o momento do ciclo celular no qual uma determinada fusão localizou em uma única célula. Figura adaptada do trabalho de Gamba e colaboradores, 2009.

Para realizar os ensaios de co-localização, tentamos simular o crescimento balanceado em *B. subtilis.* Para isso, nós diluímos as células crescidas por 12h a 37C, para a DO_{600}= 0,05 e crescemos as até alcançar a DO_{600}= 0,3, e em seguida diluímos as novamente para DO_{600}= 0,05 e analisamos as no microscópio de fluorescência quando atingiram a DO_{600}= 0,3. A partir da segunda diluição, a totalidade de células da população de *B. subtilis* divide-se exponencialmente, apresentando um metabolismo celular constante. Isto é importante, pois indica que a população de *B. subtilis* analisada em nossos ensaios é composta por células com a mesma distribuição de idades, ou seja, a

proporção de células que estão no mesmo estágio do ciclo celular não é alterada. Nossos resultados confirmam que a população de células analisada estão em crescimento balanceado, pois observamos valores semelhantes de co-localização entre uma determinada proteína de divisão e o anel Z, em ensaios realizados em três dias diferentes.

Assim como visto em Gamba e colaboradores (2009), observamos que EzrA é recrutado logo após a formação do anel Z, sugerindo que EzrA encontra-se associada ao anel Z durante muito tempo, talvez no início da formação do anel Z. Entretanto, é intrigante o fato de uma proteína que inibe a polimerização do anel Z encontrar-se associada a ele desde o início de sua formação. Uma possível explicação para este resultado é que talvez no início da formação do anel Z as proteínas que promovem a polimerização do anel Z como ZapA e FtsA tenham atividade dominante sobre EzrA. Outra hipótese seria a ativação deste inibidor somente após a formação do primeiro anel Z, pois é descrito na literatura que a função de EzrA é de garantir à bactéria que apenas um anel Z seja formado por ciclo celular (Levin et al., 1999).

A associação de YpsB ao divisomo após a localização da fábrica de peptideoglicano (representada por FtsW) condiz com sua função sugerida de não recrutar PBP1 para o sitio de divisão mas sim remove-la após completada a divisão celular (Claessen et al., 2008). DivIVA apresenta uma maior taxa de co-localização ao anel Z do que MinC. Isto sugere que DivIVA se associe ao anel Z antes de MinC, o que condiz com sua função de recrutar o complexo MinCD que inibirá a formação do anel Z nestes novos pólos. Os dados de MinC corroboram o modelo proposto atualmente na literatura sobre a atuação de MinC (Gregory et al., 2008). Neste novo modelo, MinC é recrutado tardiamente para o sítio de divisão medial e permanece localizado mesmo após a biogênese do septo de divisão. Dessa maneira, MinC impede a maturação do anel Z nos novos pólos (Gregory et al., 2009). Nós sugerimos que DivIVA seja responsável pela permanência de MinC mesmo após a maturação do divisomo, pois nossos resultados demonstraram um grande número de DivIVA que permanece no septo de divisão mesmo após a saída de FtsZ (setas verdes, Figura 21).

Entretanto, é misterioso o fato de nossas análises demonstrarem uma diferença de 10% entre a associação de DivIVA e MinC ao divisomo. Atualmente é sugerido na literatura que MinJ seja responsável pela associação entre DivIVA e o sistema Min (Patrick & Kearns 2008; Bramkamp et al., 2008). Experimentos de co-localização entre MinJ e FtsZ auxiliariam a desvendar se esta diferença de 10% poderia ocorrer por causa de um atraso na associação de MinJ ao divisomo. Porém, outra possibilidade desta diferença de 10% pode ser devido a fraca fluorescência da fusão GFP-MinC em comparação com a fusão DivIVA-GFP, o que nos levaria a subestimar os anéis co-localizados entre MinC e o anel Z.

A metodologia que utilizamos para estabelecer a dinâmica de montagem do divisomo em *B. subtilis*, poderia ser empregada para analisar com mais acurácia a diferença de associação entre os componentes do divisomo. Por exemplo, poderíamos fusionar DivIVA a mCherry e observar a freqüência de co-localização entre GFP-MinC e DivIVA-mCherry numa cepa de *B. subtilis*. Desta maneira, poderíamos ter certeza que há um intervalo entre MinC e DivIVA.

Uma questão importante demonstrada neste trabalho foi a formação do divisomo em três etapas (Figura 40). Isto significa que há passos limitantes que impedem a formação instantânea do divisomo após a polimerização do anel Z. Em *E. coli* são sugeridas duas hipóteses: A primeira delas é que o atraso pode ser causado pela diferença temporal na expressão das proteínas que compõem o divisomo. Por exemplo, a ausência de uma determinada proteína na célula pode impedir que outras proteínas que dependem do seu recrutamento se associem ao divisomo. A segunda hipótese é que seja necessária uma modificação química do peptideoglicano para que proteínas tardias possam se associar ao divisomo (Aarsman et al., 2005). Na literatura foi sugerido que a associação de EzrA e DivIVA em etapas diferentes da montagem do divisomo, não ocorre por regulação transcricional, pois foi demonstrado que tanto EzrA quanto DivIVA são expressas desde o início até o fim do ciclo celular (Gamba et al., 2009). Porém isto não descarta a hipótese de que a regulação transcricional possa ser um fator limitante entre as etapas de montagem do divisomo. Gamba

e colaboradores (2009) analisaram somente a expressão de duas proteínas do divisomo, descartando, por exemplo, a proteína sugerida como sendo importante na montagem do divisomo, FtsL. Esta proteína poderia regular a montagem de uma das etapas do divisomo por ser uma proteína que apresenta uma meia vida curta (Daniel & Errington, 2000), sua ausência poderia provocar também a não associação das proteínas DivIB, DivIC e PBP2B, pois estas proteínas juntamente com FtsL formam um subcomplexo interdependente (Daniel et al., 1998; Errington et al., 2003; Daniel et. al., 2006; Bramkamp et al., 2006). Dessa maneira, FtsL poderia regular a cinética de associação do subcomplexo ao divisomo, pois em sua ausência, as outras proteínas que formam este complexo, não são recrutadas para o divisomo (Errington et al., 2003). Nossas análises demonstraram que FtsL apresenta 78,43% de co-localização com o anel Z, demonstrando que FtsL não se associa ao anel Z logo que este é formado. Dessa maneira, o primeiro passo para determinar se FtsL pode ser um fator chave para que a montagem do divisomo ocorra em etapas, seria analisar se FtsL está presente na célula desde o início da divisão celular.

Apesar de não haver dados na literatura que relatam a interação entre FtsL e FtsW, nossas análises demonstraram uma freqüência de co-localização entre FtsW e o anel Z de 83,90% semelhante aos 78,43% observada para FtsL. Por FtsW ser uma proteína envolvida na síntese de peptideoglicano nós sugerimos que talvez FtsL regule a associação de FtsW ao divisomo através da formação do subcomplexo formado por FtsL-DivIB-DivIC-PBP2B. Neste caso poderíamos super expressar FtsL e analisar a co-localização de FtsW e o anel Z, se houver um aumento na porcentagem de co-localização entre FtsW e o anel Z, poderíamos afirmar que FtsL é um fator limitante para a associação de FtsW e provavelmente outras proteínas intermediarias/tardias ao divisomo.

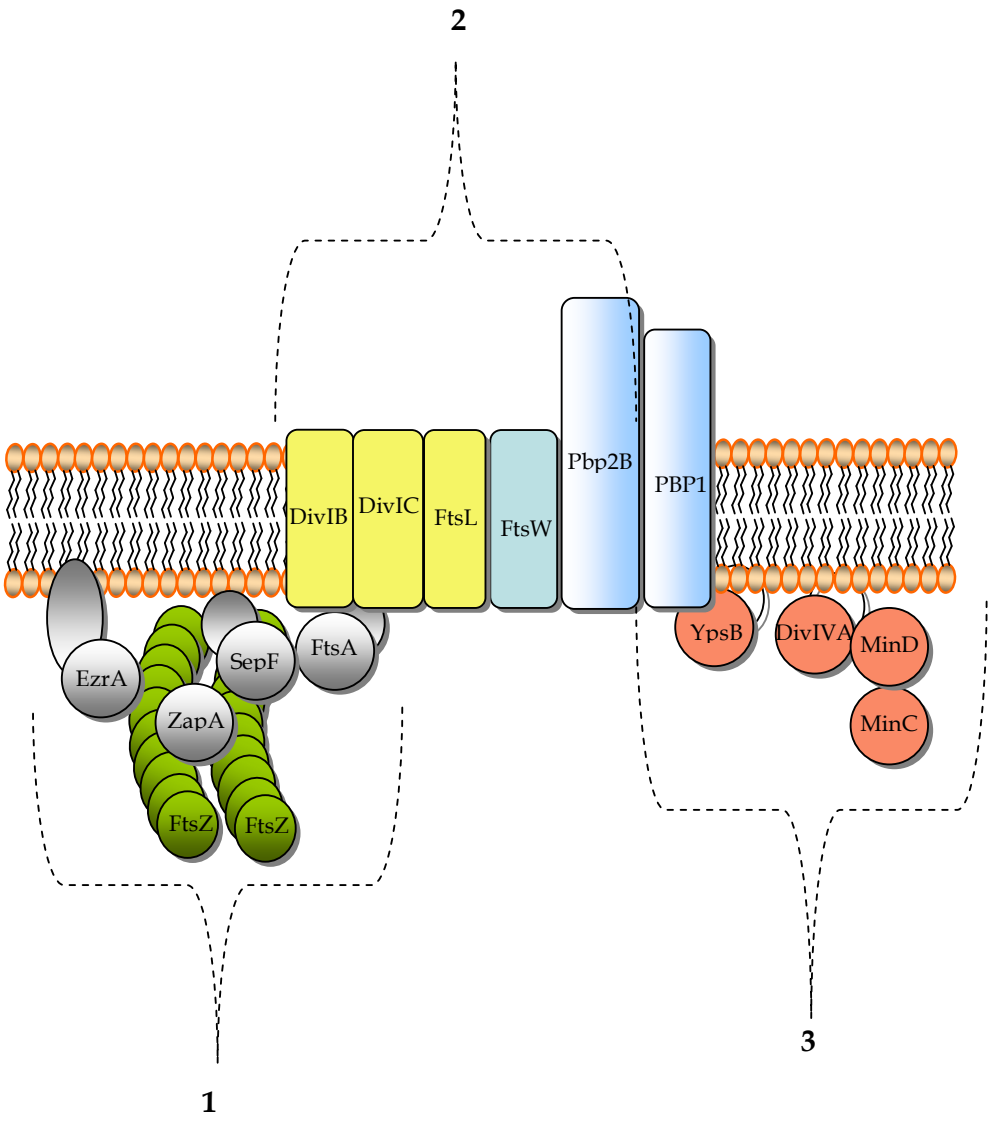


Figura 40: Esquema representado a montagem do divisomo em três etapas. Primeiramente, o anel Z e as proteínas que modulam a sua formação localizam-se no meio da célula (1). Em seguida, o complexo DivIB, DivIC, FtsL são recrutados juntamente com as proteínas que participam da síntese de peptideoglicano (FtsW, Pbp2B) (2). Por último, as proteínas YpsB, DivIVA, PBP1, MinD e MinC são recrutadas para o divisomo (3).

Em nossas análises de co-localização nós observamos um atraso maior na associação das proteínas YpsB, DivIVA e MinC ao divisomo do que as proteínas FtsL e FtsW, sugerindo uma terceira etapa de associação ao divisomo. Isto sugere que as proteínas FtsL e FtsW não exercem um efeito limitante para a associação das proteínas YpsB, DivIVA e MinC no divisomo, sugerindo que este efeito possa ser realizado por outros componentes do divisomo ou que haja outro fator limitante da montagem do divisomo além da regulação transcricional. Recentemente foi observado em *B. subtilis* que DivIVA se associa a curvatura negativa das membranas plasmáticas e por isso seria recrutado para os pólos em vez de se ligar a membrana presente em todo cilindro bacteriano (Ramamurthi & Losick, 2009; Lenarcic et al., 2009). Nós postulamos que talvez DivIVA não seja recrutado diretamente pelas proteínas do divisomo mas que esta se dirige ao divisomo após a invaginação da membrana, pois DivIVA tem afinidade pela curvatura negativa da membrana. Nós supomos que por isto haja três etapas de montagem do divisomo e que esta terceira etapa seja indiretamente regulada pelo próprio divisomo, ou seja, pela geometria de membrana formada após a sua formação**.** Como DivIVA é responsável pelo recrutamento do complexo MinCD para o divisomo (Cha & Stewart, 1997; Edwards & Errington, 1997), a associação de MinC só ocorre após a presença de DivIVA no divisomo, como visto em nossos ensaios de co-localização. YpsB é semelhante a DivIVA, principalmente na região provável de associação com a membrana (Tavares et al 2008), sugerindo que YpsB também possua afinidade por membranas curvas. Isto poderia explicar a associação de YpsB em etapas mais tardias da montagem do divisomo.

Neste trabalho nós demonstramos a presença de uma terceira etapa na montagem do divisomo em *B. subtilis,* sugerindo que existam mais fatores limitantes na montagem do divisomo. Trabalhos como de Aarsman e colaboradores, (2005) em *E. coli*, Gamba e colaboradores, (2009) e o apresentado nesta tese em *B. subtilis* contribuem para demonstrar que a montagem do divisomo não é regulada somente pela formação do anel Z e sim por outros fatores limitantes ainda não totalmente esclarecidos.

Capítulo 2

5.2 Novo Modelo Proposto Para a Re-localização de MinC durante a Esporulação:

Na literatura é proposto que no início da esporulação o complexo MinCD sai dos pólos, encontrando-se localizado de maneira homogenea por todo o cilindro bacteriano (Ben-Yehuda *et al.*, 2003). Estes autores sugerem que isto ocorra pela ação da proteína RacA, uma proteína expressa no início da esporulação, responsável pela ancoragem das regiões de origem de replicação do DNA (OriC) aos pólos celulares. RacA é uma proteína que se liga ao DNA, principalmente na região da origem de replicação, e atua como uma ponte entre OriC e DivIVA presente nos pólos celulares auxiliando na formação correta do filamento axial, no início da esporulação. Os autores postulam que RacA e MinCD competem pelo mesmo sítio de associação a DivIVA. Desta maneira, a presença de RacA durante a esporulação desfaria a interação de MinCD com DivIVA, liberando MinCD dos pólos para todo o cilindro bacteriano, promovendo a formação do septo assimétrico.

Nós observamos que a saída de MinC dos pólos no início da esporulação não ocorreu como previsto pela literatura, pois a fusão GFP-MinC não se encontrou distribuída por todo o cilindro celular, mas apresentou uma dinâmica de re-localização seguindo três padrões bem determinados identificados como: "três pontos", "dois pontos" e "assimétrico". Estes padrões se mantiveram mesmo quando analisamos a localização de MinC em uma cepa *racA*Δ. Dessa maneira, além de MinC não apresentar a dinâmica de re-localização sugerida pela literatura, esta ocorre de maneira independente de RacA.

Nossos experimentos indicam que RacA não atue de maneira drástica desfazendo a interação entre DivIVA e o complexo MinCD (Figura 41), pois não observamos um aumento na proporção de padrões mais tardios de re-localização de MinC, como por exemplo, padrões "dois pontos" e/ou

"assimétricos" quando é comparado qualitativamente a freqüência de células com estes padrões em células selvagens e células *racA∆*, durante a esporulação. Entretanto isto não descarta que haja uma influência sutil de RacA, pois esta proteína interage com DivIVA (Ben-Yehuda et al., 2003), podendo acarretar numa nova conformação de DivIVA após a interação RacA-DivIVA. Talvez esta nova conformação de DivIVA, possa ser menos eficiente em sua associação com o complexo MinCD.

Na literatura foi descrito que ocorre uma condensação assimétrica do cromossomo durante a esporulação. Esta condensação ocorre na região próxima a OriC que se encontra perto do pólo do futuro pré-esporo, mas não ocorre no restante do cromossomo (Pogliano et. al., 2002). Como esta condensação assimétrica ocorre antes da formação do anel Z bipolar, foi sugerido que está conformação do DNA próximo a OriC, não presente no restante do cromossomo, seja importante para a formação do anel Z assimétrico no início da esporulação (Pogliano et. al., 2002). Este fenômeno é independente da presença de FtsZ e de outras proteínas que participam na segregação do DNA como Spo0J e Soj, mas é dependente de fatores de transcrição de esporulação como SpoOA e σ^H (Pogliano et. al., 2002). Nosso grupo postula que RacA possa exercer o papel de condensar a região próxima a OriC durante a esporulação. Dessa maneira, na ausência de *racA*, o anel Z assimétrico levaria mais tempo para se formar devido a falta desta correta condensação assimétrica próxima a OriC e isto poderia explicar o atraso existente na promoção do septo assimétrico observado durante a esporulação em células *racA∆* (Ben-Yehuda et al., 2003).

Nossos dados sugerem a re-localização de MinC, MinD e DivIVA em direção ao novo septo assimétrico formado (Figura 42). Nós postulamos que provavelmente este fenômeno ocorra pela formação do divisomo assimétrico durante a esporulação e que este possa recrutar o complexo MinCD e DivIVA antes da formação do septo assimétrico. Para confirmar a hipótese de que o divisomo seja responsável pela saída do complexo MinCD e DivIVA dos pólos seria necessário analisar a localização destas proteínas em uma cepa que não forme o divisomo durante a esporulação. Para isto nós propomos um

experimento em que observaríamos a localização da fusão GFP-MinC em uma cepa de *B. subtilis* que expresse a proteína MciZ no início da esporulação. MciZ foi identificada em *B. subtilis* como sendo a proteína responsável por impedir a maturação do anel Z formado na célula mãe no início da esporulação. Esta proteína também foi capaz de inibir a formação do anel Z quando expressa por um promotor indutivo na fase vegetativa (Handler et al., 2008). Para provar que o novo divisomo formado seja responsável pela re-localização do complexo MinCD e de DivIVA nós propomos expressar a proteína MciZ sob o controle de um promotor ativado no início da esporulação e analisar o comportamento de MinC no início da esporulação. Se a fusão GFP-MinC se mantiver localizada nos pólos na ausência da formação do divisomo assimétrico, isto indicaria que a re-localização de MinC é vinculada à formação do novo divisomo assimétrico durante a esporulação.

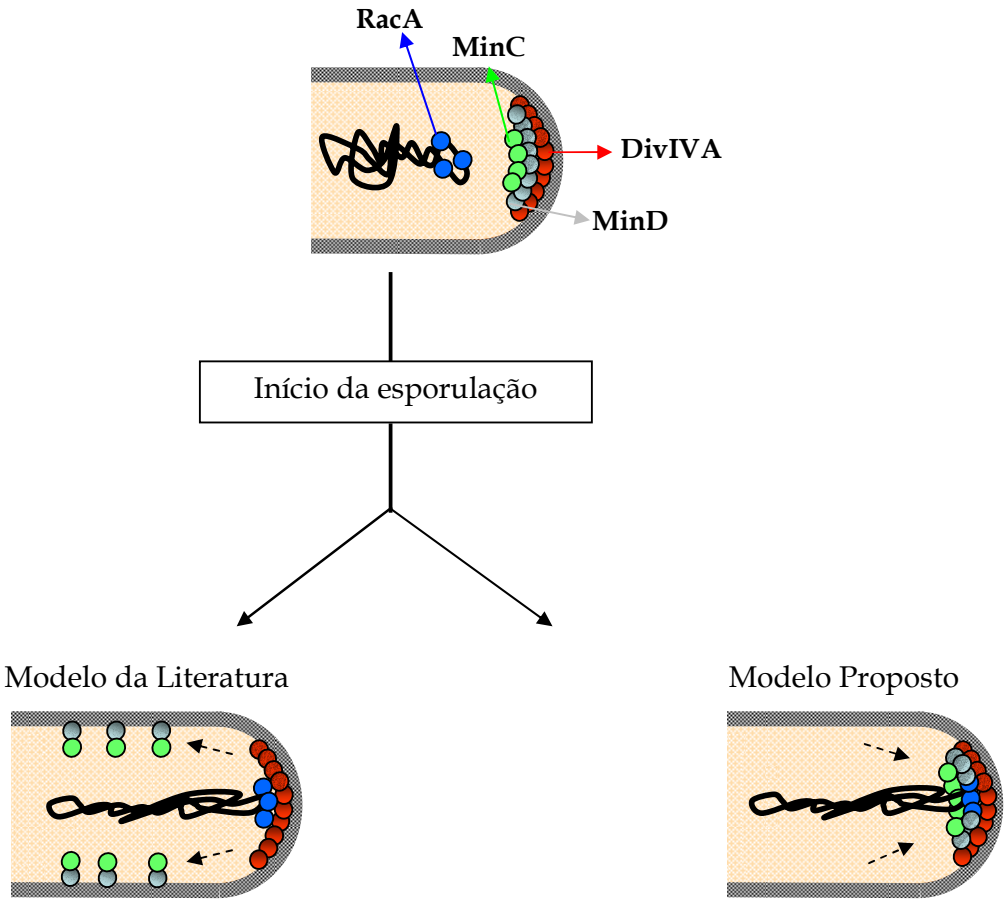
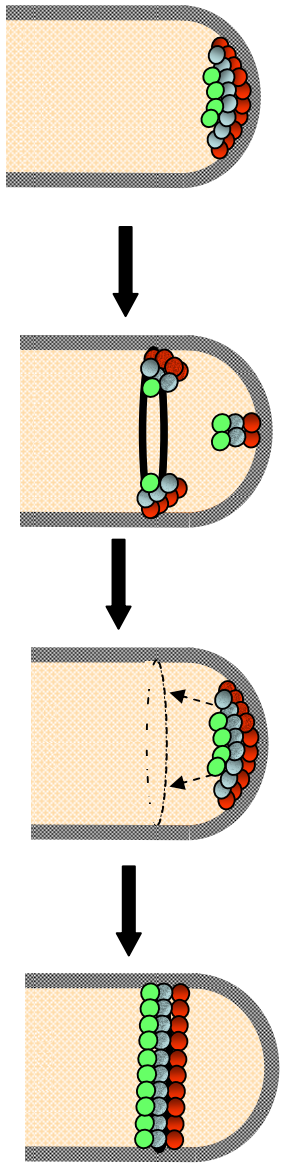


Figura 41: Representação esquemática da associação de RacA a DivIVA, nos pólos no início da esporulação em *B. subtilis*. O modelo presente na literatura (Ben-Yehuda *et al.*, 2003), sugere que o complexo MinCD se redistribui de maneira homogênea por todo o cilindro celular pela ação da proteína RacA. O modelo proposto pelo nosso grupo propõe que RacA se associe a DivIVA sem deslocar o complexo MinCD dos pólos. Esta representação mostra só um dos pólos celulares para melhor visualização, mas nós sugerimos que este processo ocorra em ambos os pólos.



Legenda:

Anel tracejado = formação do anel Z assimétrico;

Anel contínuo = maturação do divisomo.

Figura 42: Representação esquemática do modelo de re-localização do complexo MinCD e DivIVA durante a esporulação**.** Nós postulamos que a saída do complexo MinCD e DivIVA dos pólos ocorra em resposta à formação do novo septo assimétrico.

Durante o início da esporulação a saída do complexo MinCD dos pólos não é fundamental para a divisão assimétrica, pois observamos a formação do anel Z mesmo na presença de MinC. Nós postulamos que a saída de MinCD dos pólos na esporulação ocorra semelhantemente ao observado durante a fase vegetativa. Dessa maneira, a saída de MinC dos pólos ocorre apenas pela

formação do septo de divisão seja este simétrico como na fase vegetativa ou assimétrico como na esporulação.

5.3 A Atividade de MinC parece Não afetar a Formação do Anel Z Assimétrico durante a Esporulação.

Inesperadamente, no início da esporulação, nós observamos a formação bipolar do anel Z mesmo na presença de MinC nos pólos das células, sugerindo que o anel Z formado na esporulação é imune a ação do complexo MinCD. A maquinaria de divisão encontrada nas células vegetativas é semelhante à observada na esporulação (Errington, 2003). Entretanto, existem algumas proteínas que se associam somente ao septo de divisão assimétrico e não ao septo vegetativo (Hilbert & Piggot, 2004). A proteína SpoIIE foi descrita como candidata em promover a formação do septo assimétrico (Arigoni et. al., 1995; Barák et. al., 1996; Barak & Youngman, 1996; Feucht et. al., 1996; Levin et. al., 1997; Ben-Yehuda & Losick,2002; Carniol et. al., 2005). Nossos resultados sugerem que a superexpressão de *spoIIE* é suficiente para reverter o fenótipo letal provocado pela superexpressão de *minD*, indicando que SpoIIE contrapõe o efeito inibitório de MinC na formação do anel Z. Entretanto esta reversão do fenótipo letal não restaura a freqüência de divisão celular aos níveis da selvagem. Esta característica pode ser explicada pelo fato do nível de expressão de SpoIIE ser insuficiente para suprimir totalmente o efeito inibitório de Min. Uma maneira de contornar isto, seria aumentar a concentração de SpoIIE e analisar a freqüência de divisão celular. Porém nesta cepa que construímos os dois genes estão sob a regulação de IPTG, portanto, aumentar a concentração de IPTG levaria também a um aumento na expressão de MinD. Para desvincular a expressão por IPTG de ambas as proteínas nós testamos a cepa FG133 (*amyE*::P_{xil}-*gfp-minD cat)* presente na nossa coleção, que expressa *minD* sob a indução de xilose (P_{xil}-*gfp-minD*). Entretanto, mesmo a indução com 2% de xilose demonstrou-se insuficiente para expressar níveis altos de MinD na célula

capazes de bloquear de maneira severa a divisão celular em *B. subtilis*. Uma maneira alternativa não realizada em nosso trabalho seria construir uma cepa contendo $P_{hiperspac}$-*minD* no locus (*thrC*) com *spoIIE* no locus (*amyE*) sob a regulação de um promotor de xilose. Desta maneira, poderíamos aumentar a expressão de SpoIIE até observar o resgate total da freqüência de divisão celular semelhante a exibida pela cepa selvagem de *B. subtilis*.

Carniol e coloboradores, (2005) sugere em seu trabalho que o mutante *spoIIE*-D746A promove a formação do septo assimétrico em células vegetativas na mesma proporção que SpoIIE selvagem. Nosso resultado é semelhante, e representa mais um indício de que as duas funções que SpoIIE executa na esporulação, a de promover a formação do septo polar e a de ativar σ^F são executadas por regiões diferentes da proteína. Nós sugerimos que as mutações ou deleções presentes nos outros mutantes de *spoIIE* o tornam incapaz de contrapor a atividade inibitória de MinD. Estes experimentos também sugerem que SpoIIE seja capaz de contrapor a ação de MinD sem a presença de uma cópia selvagem de *ftsZ*.

A capacidade de promover a divisão assimétrica observada em SpoIIE parece ocorrer pela supressão da ação do complexo Min. Entretanto, os detalhes moleculares de como SpoIIE atua ainda são obscuros, mas nós postulamos que SpoIIE possa agir juntamente com ZapA impedindo a ação de MinC e permitindo a formação dos anéis Z assimétricos no início da esporulação.

Na literatura é sugerido que MinC inibe a formação do anel Z, por impedir as ligações laterais entre os polímeros de FtsZ (Scheffers, 2008). Como o papel molecular de SpoIIE ainda é desconhecido na literatura, uma maneira de investigar o mecanismo de ação de SpoIIE seria determinar se seu papel na divisão assimétrica poderia ser desempenhado por uma outra proteína de divisão cujo mecanismo de ação é melhor conhecido. ZapA é uma proteína do complexo de divisão que promove a formação de ligações cruzadas entre protofilamentos de FtsZ, estabilizando a formação do anel Z (Gueiros-Filho & Losick, 2002). O efeito inibitório do complexo MinCD é contraposto *in vivo* e *in vitro* pela super-expressão da proteína ZapA (Gueiros-Filho & Losick, 2002;

Scheffers, 2008). Nós postulamos que SpoIIE possa promover a polimerização de FtsZ de uma maneira semelhante a ZapA. Para analisarmos esta hipótese, nós propomos um experimento para testar se a super-expressão de ZapA durante a fase de esporulação poderia compensar o fenótipo provocado pela ausência de SpoIIE. Para isso nós poderíamos quantificar e comparar o número de septos assimétricos formados entre duas cepas de *B. subtilis*: uma cepa *spoIIEΔ* e uma cepa *spoIIEΔ* que possuí uma cópia de *zapA* no locus heterologo (*amyE*) sob a regulação de um promotor que induz a superexpressão de ZapA somente no início da esporulação - P_{spoVG} (Zuber et al., 1987). Outra maneira de estudar como SpoIIE poderia atuar sobre FtsZ seria desvendar os sítios em FtsZ que interagem com SpoIIE. O aluno de mestrado Alexandre Wilson Bisson Filho utilizou com sucesso uma metodologia genética de triagem de mutantes para identificar regiões de FtsZ importantes para a interação com ZapA (Bisson-Filho, 2009). Nosso grupo propõe utilizar esta mesma estratégia genética para identificar quais resíduos em FtsZ são importante para a interação com SpoIIE. Além disso, poderiam ser realizados ensaios bioquímicos para compreendermos como SpoIIE atua sobre o polímero de FtsZ. Por exemplo, analisar se SpoIIE aumenta a polimerização de FtsZ *in vitro*, realizando um ensaio como descrito em Hu et. al., (1999) e o ensaio de espalhamento de luz como descrito em Mukherjee & Lutkenhaus, (1999); poderíamos monitorar também se SpoIIE aumenta a formação de ligações laterais entre os polímeros de FtsZ, analisando-os por microscopia eletrônica como descrito em Scheffers, (2008). Dessa maneira, a partir de ensaios genéticos e bioquímicos poderíamos colocar uma luz sobre o obscuro mecanismo molecular exercido por SpoIIE na promoção do septo assimétrico durante a esporulação.

É interessante observar que o mecanismo que propomos para a divisão assimétrica, em que a célula expressa tanto o inibidor quanto o antídoto, tenha sido adotado em detrimento de um mecanismo com gasto menor de energia como, por exemplo, a expressão de um repressor no início da esporulação que seja responsável por bloquear a expressão de MinC. Entretanto durante o processo de evolução este mecanismo que talvez não seja o mais eficiente

energeticamente pode ter sido recompensado pela seleção de uma proteína que executa duas funções como SpoIIE, que além de promover a formação da divisão assimétrica, ela atua também como um regulador da ativação do fator σ^F no pré-esporo (Barak & Youngman, 1996; Feucht et al., 1996). Dessa maneira a célula "economiza" a energia que seria gasta para sintetizar a proteína que seria responsável pela ativação de σ^F. Outra possibilidade é que a célula possa utilizar o sistema *min* na esporulação para outras finalidades e por isso seja vantajoso não desligá-lo. Por exemplo, é possível que durante a esporulação MinCD seja responsável por atrasar a formação do anel Z, para que esta seja realizada somente após a ancoragem correta das OriC nos pólos. Talvez na ausência de MinCD o anel Z assimétrico se formaria de maneira mais rápida e antes da ancoragem do DNA para o pré-esporo, resultando num fenótipo semelhante ao observado na ausência de *racA*. Este modelo poderia ser testado observando se a supressão do complexo MinCD somente durante a esporulação, causaria a formação de pré-esporo sem nucleóide. Isto poderia ser feito expressando, no início da esporulação, um mutante de MinC que interagisse com MinD, mas fosse incapaz de inibir a polimerização de FtsZ e que atuasse de maneira dominante negativa sobre MinC selvagem.

6. CONCLUSÕES:

Neste trabalho, nós propomos que a montagem do divisomo seja executada em três etapas e não em duas como está descrito na literatura. Esta contribuição dada pelo nosso grupo aumenta a complexidade da montagem do divisomo e torna ainda mais instigante a busca por fatores que sejam limitantes a este processo.

O processo que regula a mudança da divisão simétrica para a assimétrica durante a esporulação ainda não está esclarecida em sua totalidade. Nosso grupo coloca mais luz sobre este processo, propondo um novo modelo para a re-localização do complexo MinCD e DivIVA durante a esporulação e sugerindo que SpoIIE atue como um antídoto de MinC na promoção do septo assimétrico durante a esporulação.

7. REFERÊNCIAS.

Aarsman ME, Piette A, Fraipont, C, Vinkenvle TM, Nguyen-Distèche M, den Blaauwen T. Maturation of the Escherichia coli divisome occurs in two steps. Mol Microbiol. 2005. 55(6):1631-45.

Angert ER. Alternatives to binary fission in bacteria. Nat Rev Microbiol. 2005. (3):214-24.

Arigoni F, Pogliano K, Webb CD, Stragier P, Losick R. Localization of protein implicated in establishment of cell type to sites of asymmetric division. Science. 1995. 270, 637-40.

Arigoni F, Duncan L, Alper S, Losick R, and Stragier P. SpoIIE governs the phosphorylation state of a protein regulating transcription factor σ^F during sporulation in *Bacillus subtilis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996. 93:3238–3242.

Bath J, Wu LJ, Errington J, and Wang JC. Role of *Bacillus subtilis* SpoIIIE in DNA transport across the mother cell-prespore division septum. Science. 2000. 290:995–997

Barak I, & Youngman P. SpoIIE mutants of *Bacillus subtilis* comprise two distinct phenotypic classes consistent with a dual functional role for the SpoIIE protein. J Bacteriol. 1996. 178, 4984-89.

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

Bartosik AA, Jagura-Burdzy G. Bacterial chromosome segregation. Acta Biochim Pol. 2005. 52(1):1-34.

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

Ben-Yeduda S, Rudner DZ, Losick R. RacA, a bacterial protein that anchors chromosomes to the cell poles. Science. 2003. 299, 532-36.

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

Bramkamp M, Weston L, Daniel RA, Errington J. Regulated intramembrane proteolysis of FtsL protein and the control of cell division in *Bacillus subtilis*. Mol Microbiol. 2006. 62 (2):580-91.

Bisson-Filho, AW. Estudo Genético da Interação entre FtsZ e o Modulador de Divisao ZapA em Bacillus subtilis. 2009. 116p. Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Ciencias (Bioquimica). Instituto de Quimica, Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo.

Bramkamp M, Weston L, Daniel RA, and Errington J. Regulated in trasmembrane proteolysis of FtsL protein and the control of cell division in *Bacillus subtilis*. Mol. Microbiol. 2006. 62:580–591

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

Britton RA, Lin DC, and Grossman AD. Characterization of a prokaryotic SMC protein involved in chromosome partitioning. Genes Dev. 1998. 12:1254–1259.

Britton RA, Eichenberger P, Gonzalez-Pastor JE, Fawcett P, Monson R, Losick R, Grossman AD. Genome-wide analysis of the stationaryphase sigma factor (σH) regulon of Bacillus subtilis. J. Bacteriol. 2002. 184, 4881–4890.

Buddelmeijer N, Beckwith J. Assembly of cell division proteins at the *E. coli* cell center. Curr Opin Microbiol. 2002. 5(6):553-7.

Burkholder WF, and Grossman AD. 2000. Regulation of the initiation of endospore formation in Bacillus subtilis, p. 151–166. In Y. V. Brun and L. J. Shimkets (ed.), Prokaryotic development. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Bylund JE, Haines MA, Piggot PJ, and Higgins ML. Axial filament formation in Bacillus subtilis: induction of nucleoids of increasing length after addition of chloramphenicol to exponential-phase cultures approaching stationary phase. J. Bacteriol. 1993. 175:1886–1890.

Cabeen MT, Jacobs-Wagner C. Bacterial cell shape. Nat Rev Microbiol. 2005. 3(8):601-10.

Carniol K, Ben-Yehuda S, King N, Losick R. Genetic dissection of the sporulation protein SpoIIE and its role in asymmetric division in Bacillus subtilis. J Bacteriol. 2005. 187 (10):3511-20.

Cha JH, and Stewart GC. The *divIVA* minicell locus of *Bacillus subtilis*. J Bacteriol. 1997. 179(5):1671-83

Claessen D, Emmins R, Hamoen LW, Daniel RA, Errington J, and Edwards DH. 2008. Control of the cell elongation-division cycle by shuttling of PBP1 protein in *Bacillus subtilis*. Mol. Microbiol. 68:1029–1046

Cluzel P, Surette M, Leibler S. An ultrasensitive bacterial motor revealed by monitoring signaling proteins in single cells. Science. 2000. 287(5458):1652-5.

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

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

Daniel RA, Noirot-Gros MF, Noirot P, Errington J. Multiple interactions between the transmembrane division proteins of *Bacillus subtilis* and the role of FtsL instability in divisome assembly. J Bacteriol. 2006. 188(21):7396-404.

de Boer P, Crossley R, Rothfield L. The essential bacterial cell-division protein FtsZ is a GTPase. Nature. 1992. 359(6392):254-6.

Duncan L, and Losick R. SpoIIAB is an anti-σ factor that binds to and inhibits transcription by regulatory protein σ^F from *Bacillus subtilis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA . 1993. 90:2325–2329.

Duncan L, Alper S, Arigoni F, Losick R, and Stragier P. Activation of cell-specific transcription by a serine phosphatase at the site of asymmetric division. Science. 1995. 270:641–644.

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

Elledge SJ. Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. Science. 1996. 274(5293):1664-72.

Erickson HP, Taylor DW, Taylor KA, Bramhill D. Bacterial cell division protein FtsZ assembles into protofilament sheets and minirings, structural homologs of tubulin polymers. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996. 93(1):519-23.

Errington J. Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. Nat Rev Microbiol. 2003. 1 (2): 117-26. Review.

Errington J, Daniel RA, Scheffers DJ. Cytokinesis in bacteria. Microbiol Mol Biol Rev. 2003. 67(1):52-65.

Esue O, Wirtz D, Tseng Y. GTPase activity, structure, and mechanical properties of filaments assembled from bacterial cytoskeleton protein MreB. J Bacteriol. 2006. 188(3):968-76.

Feucht A, Magnin T, Yudkin MD, Errington J. Bifunctional protein required for asymmetric cell division and cell-specific transcription in *Bacillus subtilis*. Genes Dev. 1996. 10 (7):794-803.

Feuch A, Lucet I, Yudkin MD, Errington J. Cytological and biochemical characterization of the FtsA cell division protein of *Bacillus subtilis*. Mol Microbiol. 2001. 40 (1): 115-25.

Fishov I, Zaritsky A, Grover NB. On microbial states of growth. Mol Microbiol. 1995. 15(5):789-94.

Fu X, Shih YL, Zhang Y, Rothfield LI. The MinE ring required for proper placement of the division site is a mobile structure that changes its cellular location during the *Escherichia coli* division cycle. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001. 98(3):980-5.

Fujita M. & Losick R. The master regulator for entry into sporulation in *Bacillus subtilis* becomes a cell-specific transcription factor after asymmetric division. Genes Dev. 2003. 17, 1166–1174

Gamba P, Veening JW, Saunders NJ, Hamoen LW, Daniel RA. Two-step assembly dynamics of the *Bacillus subtilis* divisome. J Bacteriol. 2009. 191(13):4186-94. .

Gitai Z, Dye NA, Reisenauer A, Wachi M, Shapiro L. MreB actin-mediated segregation of a specific region of a bacterial chromosome. Cell. 2005. 120(3):329-41.

Graumann PL, Losick R. Coupling of asymmetric division to polar placement of replication origin regions in *Bacillus subtilis*. J Bacteriol. 2001. 183(13):4052-60.

Gregory JA, Becker EC, Pogliano K. Bacillus subtilis MinC destabilizes FtsZ-rings at new cell poles and contributes to the timing of cell division. Genes Dev. 2009. 22 (24): 3475-88.

Gueiros-Filho FJ, and Losick R. A widely conserved bacterial cell division protein that promotes assembly of the tubulin-like protein FtsZ. Genes Devl. 2002. 16: 2544-2556.

Gueiros-Filho, F.J. Cell Division. In: Bacillus Cellular and Molecular Biology. 2007. 93-134, Caister Academic Press. Peter Graumann.

Goehring NW, Beckwith J. Diverse paths to midcell: assembly of the bacterial cell division machinery. Curr Biol. 2005. 15(13):R514-26.

Goffin C, Ghuysen JM. Multimodular penicillin-binding proteins: an enigmatic family of orthologs and paralogs.Microbiol Mol Biol Rev. 1998. 62(4):1079-93.

Gonzy-Tréboul G, Karmazyn-Campelli C, Stragier P. Developmental regulation of transcription of the Bacillus subtilis *ftsAZ* operon. J Mol Biol. 1992. 224(4):967-79.

Gholamhoseinian A, and Piggot PJ. Timing of spoII gene expression relative to septum formation during sporulation of *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 1989. 171:5747–5749.

Gholamhoseinian A, Shen Z, Wu JJ, Piggot P. Regulation of transcription of the cell division gene *ftsA* during sporulation of Bacillus subtilis. J Bacteriol. 1992.174(14):4647-56.

Haeusser DP, Schwartz RL, Smith AM, Oates ME, Levin PA. EzrA prevents aberrant cell division by modulating assembly of the cytoskeletal protein FtsZ. Mol Microbiol. 2004. 52 (3):801-814.

Haeusser DP, Levin PA. The great divide: coordinating cell cycle events during bacterial growth and division. Curr Opin Microbiol. 2008. 11(2):94-9.

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

Hale CA, Meinhardt H, de Boer PA. Dynamic localization cycle of the cell division regulator MinE in *Escherichia coli*. EMBO J. 2001. 20(7):1563-72.

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

Handler AA, Lim JE, Losick R. Peptide inhibitor of cytokinesis during sporulation in Bacillus subtilis. Mol Microbiol. 2008. 68(3):588-99.

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

Hilbert DW, Piggot PJ. Compartmentalization of gene expression during *Bacillus subtilis* spore formation. Microbiol Mol Biol Rev. 2004. 68(2):234-62.

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

Höltje JV. Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*. Microbiol Mol Biol Rev. 1998. 62(1):181-203.

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

Hu Z, Mukherjee A, Pichoff S, Lutkenhaus J. The MinC component of the division site selection system in *Escherichia coli* interacts with FtsZ to prevent polymerization. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999. 96(26):14819-24.

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

Huang KC, Meir Y, Wingreen NS. Dynamic structures in *Escherichia coli*: spontaneous formation of MinE rings and MinD polar zones. Proc Natl Acad Sci. 2003. 100(22):12724-8.

Ishikawa S, Kawai Y, Hiramatsu K, Kuwano M, Ogasawara N. A new FtsZ-interacting protein, YlmF, complements the activity of FtsA during progression of cell division in *Bacillus subtilis*. Mol Microbiol. 2006. 60(6):1364-80.

Jacobs C, Domian IJ, Maddock JR, Shapiro L. Cell cycle-dependent polar localization of an essential bacterial histidine kinase that controls DNA replication and cell division. Cell. 1999. 97(1):111-20.

Jacobs C, Hung D, Shapiro L. Dynamic localization of a cytoplasmic signal transduction response regulator controls morphogenesis during the *Caulobacter* cell cycle. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001. 98(7):4095-100.

Jiang M, Shao W, Perego M, Hoch JA. Multiple histidine kinases regulate entry into stationary phase and sporulation in *Bacillus subtilis*. Mol Microbiol. 2000. 38(3):535-42.

Jones LJ, Carballido-Lopez R, and Errington J. Control of cell shape in bacteria: helical, actin-like filaments in *Bacillus subtilis*. Cell. 2001. 104: 913–922.

Katis VL, Wake RG, HarryEJ. Septal localization of the membrane-bound division proteins of *Bacillus subtilis* DivIB and DivIC is codependent only at high temperatures and requires FtsZ. J. Bacteriol. 2000. 182(12):3607-11.

Kunst F, & Rapoport G. Salt stress is an environmental signal affecting degradative enzyme synthesis in *Bacillus Subtilis*. J. Bacteriol. 1995. 177: 2403-2407.

Khvorova A, Zhang L, Higgins ML, Piggot PJ. The spoIIE locus is involved in the Spo0A-dependent switch in the location of FtsZ rings *Bacillus subtilis*. J Bacteriol. 1998. 180, 1256-1260.

Kruse T, Blagoev B, Løbner-Olesen A, Wachi M, Sasaki K, Iwai N, Mann M, Gerdes K. Actin homolog MreB and RNA polymerase interact and are both required for chromosome segregation in Escherichia coli. Genes Dev. 2006. 20(1):113-24.

Lazazzera, BA. Quorum sensing and starvation: signals for entry into stationary phase. Curr Opin Microbiol. 2000. 3 (2):177-182.

Lee PS, Grossman AD. The chromosome partitioning proteins Soj (ParA) and Spo0J (ParB) contribute to accurate chromosome partitioning, separation of replicated sister origins, and regulation of replication initiation in *Bacillus subtilis*. Mol Microbiol. 2006. 60(4):853-69.

Lenarcic R, Halbedel S, Visser L, Shaw M, Wu LJ, Errington J, Marenduzzo D, Hamoen LW. Localisation of DivIVA by targeting to negatively curved membranes. EMBO J. 2009. 28(15):2272-2282.

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

Levin PA, Losick R, Stragier P, Arigoni F. Localization of the sporulation protein SpoIIE in *Bacillus subtilis* is dependent upon the cell division protein FtsZ. Mol Microbiol. 1997. 25, 839-46.

Levin PA, Shim JJ, Grossman AD. Effect of minCD on FtsZ ring position and polar septation in *Bacillus subtilis*. J Bacteriol. 1998. 180(22):6048-51

Levin PA, Kurtser IG, Grossman AD. Identification and characterization of a negative regulator of FtsZ ring formation in *Bacillus subtilis*. Proc Natl Acad Sci. 1999. 96(17):9642-7

Lindow JC, Britton RA, and Grossman AD. Structural Maintenance of Chromosomes protein of *Bacillus subtilis* affects supercoiling in vivo. J. Bacteriol. 2002. 184:5317–5322.

Lucet I, Feucht A, Yudkin MD, Errington J. Direct interaction between the cell division protein FtsZ and the cell differentiation protein SpoIIE. EMBO J. 2000. 19, 1467-75.

Lutkenhaus J. Assembly dynamics of the bacterial MinCDE system and spatial regulation of the Z ring. Annu Rev Biochem. 2007. 76:539-62.

Margolin W. Themes and variations in prokaryotic cell division. FEMS Microbiol Rev. 2000. 24(4):531-48.

Margolin W. Spatial regulation of cytokinesis in bacteria. Curr Opin Microbiol. 2001. 4(6):647-52.

Marston AL, Errington J. Selection of the midcell division site in *Bacillus subtilis* through MinD-dependent polar localization e activation of MinC. Mol Microbiol**.** 1999. 33, 84-96.

Migocki MD, Freeman MK, Wake RG, and Harry EJ. The Min system is not required for precise placement of the midcell Z ring in *Bacillus subtilis*. EMBO Rep. 2002. 3:1163–1167.

Min KT, Hilditch CM, Diederich B, Errington J, and Yudkin MD. σ^F, the first compartment-specific transcription factor of *B. subtilis*, is regulated by an anti-σ factor that is also a protein kinase. Cell. 1993. 74:735–7

Miyagishima SY, Nishida K, Kuroiwa T. An evolutionary puzzle: chloroplast and mitochondrial division rings. Trends Plant Sci. 2003. 8(9):432-8.

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

Nanninga N. Cytokinesis in prokaryotes and eukaryotes: common principles and different solutions. Microbiol Mol Biol Rev. 2001. 65(2):319-33

Najafi SM, Willis AC, and Yudkin MD. Site of phosphorylation of SpoIIAA, the anti-anti- σ factor for sporulation-specific σ^F of *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 1995. 177:2912–2913.42.

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

Perego M, Hanstein C, Welsh KM, Djavakhishvili T, Glaser P, Hoch JA. Multiple protein-aspartate phosphatases provide a mechanism for the integration of diverse signals in the control of development in *B. subtilis*. Cell. 1994. 79(6):1047-55.

Pichoff S, Lutkenhaus J. Identification of a region of FtsA required for interaction with FtsZ. Mol Microbiol. 2007. 64(4):1129-38.

Piggot PJ, Hilbert DW. Sporulation of Bacillus subtilis. Curr Opin Microbiol. 2004. 7(6):579-86.

Pogliano J, Sharp MD, Pogliano K. Partitioning of chromosomal DNA during establishment of cellular asymmetry in *Bacillus subtilis*. J Bacteriol. 2002. 184(6):1743-9.

Poteete AR, Fenton AC, Murphy KC. Roles of RuvC and RecG in phage lambda red-mediated recombination. J Bacteriol. 1999. 181(17):5402-8.

Ramamurthi KS, Losick R. Negative membrane curvature as a cue for subcellular localization of a bacterial protein. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009. 106(32):13541-5.

Raser JM, O'Shea EK.Noise in gene expression: origins, consequences, and control. Science. 2005. 309(5743):2010-3.

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

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

Rudner DZ, Losick R. Morphological coupling in development: lessons from prokaryotes. Dev Cell. 2001. 1(6):733-42.

Rothfield LI, Zhao CR. How do bacteria decide where to divide? Cell. 1996. 84 (2): 183-6. Review.

Rothfield L, Justice S, García-Lara J. Bacterial cell division. Annu Rev Genet. 1999. 33:423-48.

Sánchez M, Valencia A, Ferrándiz MJ, Sander C, Vicente M. Correlation between the structure and biochemical activities of FtsA, an essential cell division protein of the actin family. EMBO J. 1994. 13(20): 4919-25.

Scheffers DJ, Pinho MG. Bacterial cell wall synthesis: new insights from localization studies. Microbiol Mol Biol Rev. 2005. 69(4):585-607

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

Schmidt R, Margolis P, Duncan L, Coppolecchia R, Moran CP Jr, and Losick R. Control of developmental transcription factor σ^F by sporulation regulatory proteins SpoIIAA and SpoIIAB in *Bacillus subtilis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1990. 87:9221–9225.

Sharp MD, and Pogliano K. An in vivo membrane fusion assay implicates SpoIIIE in the final stages of engulfment during *Bacillus subtilis* sporulation. Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1999. 96(25):14553–14558.

Sharpe ME, Hauser PM, Sharpe RG, Errington J. *Bacillus subtilis* cell cycle as studied by fluorescence microscopy: constancy of cell length at initiation of DNA replication and evidence for active nucleoid partitioning. J Bacteriol. 1998. 180 (3):547-55.

Sievers J, Raether B, Perego M, Errington J. Characterization of the parB-like *yyaA* gene of Bacillus subtilis. J Bacteriol. 2002. 184(4):1102-11.

Southward CM, Surette MG. The dynamic microbe: green fluorescent protein brings bacteria to light. Mol Microbiol. 2002. 45(5):1191-6.

Sterlini, JM, Mandelstam J. Commitment to sporulation in *Bacillus subtilis* and its relationship to development of actinomycin resistance. Biochem J. 1969. 113(1): 29-37.

Stricker J, Maddox P, Salmon ED, Erickson HP. Rapid assembly dynamics of the *Escherichia coli* FtsZ-ring demonstrated by fluorescence recovery after photobleaching. Proc Natl Acad Sci. 2002. 99(5):3171-5.

Trach KA, Hoch JA. Multisensory activation of the phosphorelay initiating sporulation in *Bacillus subtilis*: identification and sequence of the protein kinase of the alternate pathway. Mol Microbiol. 1993. 8(1):69-79.

Tavares JR, de Souza RF, Meira GL, Gueiros-Filho FJ. Cytological characterization of YpsB, a novel component of the *Bacillus subtilis* divisome. J Bacteriol. 2008. 190(21):7096-107

Thanbichler M, Shapiro L. Getting organized--how bacterial cells move proteins and DNA. Nat Rev Microbiol. 2008. 6(1):28-40.

Thomaides HB, Freeman M, El Karoui M, Errington J. Division site selection protein DivIVA of *Bacillus subtilis* has a second distinct function in chromosome segregation during sporulation. Genes Dev. 2001. 15(13):1662-73

van den Ent F, Amos LA, Löwe J. Prokaryotic origin of the actin cytoskeleton. Nature. 2001. 413(6851):39-44.

Varley AW, Stewart GC. The *divIVB* region of the *Bacillus subtilis* chromosome encodes homologs of *Escherichia coli* septum placement (*minCD*) and cell shape (*mreBCD*) determinants. J Bacteriol. 1992. 174(21):6729-42.

Wang JD, Levin PA. Metabolism, cell growth and the bacterial cell cycle. Nat Rev Microbiol. 2009. 7(11):822-7.

Weart RB, Levin PA. Growth rate-dependent regulation of medial FtsZ ring formation. J Bacteriol. 2003. 185(9):2826-34.

Webb CD, Teleman A, Gordon S, Straight A, Belmont A, Lin DC, Grossman AD, Wright A, and Losick R. Bipolar localization of the replication origin regions of chromosomes in vegetative and sporulating cells of *B. subtilis*. Cell. 1997. 88:667–674.

Webb CD, Graumann PL, Kahana JA, Teleman AA, Silver PA, Losick R. Use of time-lapse microscopy to visualize rapid movement of the replication origin region of the chromosome during the cell cycle in *Bacillus subtilis*. Mol Microbiol. 1998. 28(5):883-92.

Wheeler RT, Shapiro L. Differential localization of two histidine kinases controlling bacterial cell differentiation. Mol Cell. 1999. 4(5):683-94.

Williams DR, and Thomas CM. Active partitioning of bacterial plasmids. J. Gen. Microbiol. 1992. 138:1–16.

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

Wu LJ, and Errington J. Septal localization of the SpoIIIE chromosome partitioning protein in *Bacillus subtilis*. EMBO J. 1997. 16:2161–2169.

Wu LJ, and Errington J. Use of asymmetric cell division and spoIIIE mutants to probe chromosome orientation and organization in *Bacillus subtilis*. Mol. Microbiol. 1998. 27:777–786.

Wu LJ, and Errington J. RacA and the Soj-Spo0J system combine to effect polar chromosome segregation in sporulating *Bacillus subtilis*. Mol. Microbiol. 2003. 49:1463–1475.

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

Zuber P, Healy JM, Losick R. Effects of plasmid propagation of a sporulation promoter on promoter utilization and sporulation in *Bacillus subtilis*. J Bacteriol. 1987. 169(2):461-9.