**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

ALEXANDRE WILSON BISSON FILHO

**Estrutura e Mecanismos de MciZ, um Capeador
da Extremidade Menos de FtsZ em *Bacillus subtilis***

Versão corrigida da Dissertação/Tese conforme Resolução CoPGr 5890
O original se encontra disponível na Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP

São Paulo

Data do Depósito na SPG:
26/02/2014

ALEXANDRE WILSON BISSON FILHO

**Estrutura e Mecanismos de MicZ, um Capeador
da extremidade menos de FtsZ em *Bacillus subtilis***

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

Orientador : Prof. Dr. Frederico José Gueiros Filho

São Paulo
2014

Ficha Catalográfica

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

Bisson Filho, Alexandre Wilson

B623e Estrutura e mecanismos de MicZ, um capeador da extremidade
menos de FtsZ em *Bacillus subtilis* / Alexandre Wilson Bisson
Filho. -- São Paulo, 2014.
166p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de
São Paulo. Departamento de Bioquímica.

Orientador: Gueiros Filho, Frederico José

1. Proteína-proteína : Interação : Bioquímica I. T. II. Gueiros Filho,
Frederico José, orientador.

574.19245 CDD

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

**“Estrutura e mecanismos de MciZ, um capeador da
extremidade menos de FtsZ em *Bacillus subtilis*”**

ALEXANDRE WILSON BISSON FILHO

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo
como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências - Área:
Bioquímica.

Aprovada por:

Prof. Dr. Frederico José Gueiros Filho
Orientador e Presidente

Prof. Dr. Walter Ribeiro Terra
IQ - USP

Prof. Dr. Sandro Roberto Marana
IQ - USP

Prof. Dr. Richard Charles Garrat
IFSC - USP

Prof. Dr. Adriano Defini Andricopulo
IFSC - USP

SÃO PAULO
24 de março de 2014

Agradecimentos

Agradeço meus pais, Alexandre e Cássia, e meu irmão Gustavo. Sem eles nada disso seria possível. À Ana Maria, que com seu amor, compreensão e inteligência me fez acreditar até o fim.

Ao Fredy, pela liberdade de desenvolver minhas idéias e a orientação para melhorá-las. Alê Pancetti, J.R., Guilherme, Robson, Valdir, Patrícia, Theopi, Max, Valquíria, André, Jonnatan, Diego, Rodrigo, Camila e Sirley, minha gratidão por sempre me ensinarem algo novo. Aos alunos que pude contribuir com alguma orientação, Lucy, Danilo, Theopi e Tyler, agradeço por terem posto à prova aquilo que eu acreditava. Aos meus amigos e colegas do IQ-USP.

Os agradecimentos aos que fizeram parte desse trabalho, que não é só meu, e sim de um grupo. Agradeço ao Dr. Harold Erickson por ter me recebido em seu grupo e, juntamente ao Dr. Masaki Osawa, terem me ensinado a história da minha proteína favorita. Ao Dr. Tomoo Ohashi pelos ensinamentos gerais sobre bioquímica. Ao Dr. David Rudner por ter me recebido em seu grupo e me ajudado a evoluir como cientista. À Dra. Karen Fulan e à Dra. Andrea Dessen, responsáveis pela resolução da estrutura cristalográfica do complexo FtsZ:MciZ, à Dra. Patrícia Castellen, responsável pela resolução de MciZ por RMN, ao Dr. Wanius Garcia pela ajuda nos ensaios com mant-GTP, ao Valdir pela expertise no Western blotting e também ao Dr. Chandra Joshi, que contribuiu imensamente nos experimentos de TIRF. Agradeço à FAPESP, CNPq, CAPES, Programa Ciência sem Fronteiras e ao IQ-USP pelo suporte financeiro em forma de bolsas, equipamentos, reagentes e participações em congressos.

“You can know the name of a bird in all the languages of the world, but when you’re finished, you’ll know absolutely nothing whatever about the bird. You’ll only know about humans in different places and what they call the bird. So let’s look at the bird and see what it’s doing - that’s what counts.”

Richard Feynman

Resumo

Bisson-Filho, A.W. **Estrutura e Mecanismos de MciZ, um Capeador da Extremidade Menos de FtsZ em *Bacillus subtilis***. 2014. 166p. Tese - Programa de Pós Graduação em Ciência Biológicas (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

FtsZ é homóloga de tubulina, presente em quase todas as bactérias, que se autoassocia em filamentos que formam uma estrutura chamada anel Z dentro das células. O anel Z quando formado recruta de um macrocomplexo proteico chamado divisomo, que é responsável pela síntese do septo de divisão, formando duas células filhas. Diversos moduladores se ligam diretamente a FtsZ regulam sua polimerização, controlando o momento e o local onde o anel Z é formado. MciZ é um peptídeo de 40 aminoácidos expresso durante a esporulação de *Bacillus subtilis* e inibe a formação do anel Z na célula mãe. O objetivo do presente trabalho foi estudar a interação entre as proteínas FtsZ e MciZ e investigar os mecanismos envolvidos na inibição da polimerização de FtsZ por MciZ. Através de uma triagem genética, usando uma biblioteca de mutantes de *ftsZ*, identificamos treze mutações em *ftsZ* que conferiram resistência à superexpressão de MciZ *in vivo*. Sete delas eram capazes de crescer na presença e na ausência da superexpressão de MciZ e as outras seis se mostraram dependentes da superexpressão de MciZ. A partir da coexpressão e copurificação do complexo FtsZ:MciZ, observamos que todas as proteínas mutantes ainda continuavam interagindo com MciZ *in vitro*. O Kd estimado para a interação entre as proteínas foi de 150 ± 50 nM, e mostrou-se que MciZ não se liga nem ao CTP (C-Terminal Peptide) de FtsZ, nem compete com GTP para a ligação no mesmo sítio. Usando construções truncadas de MciZ, determinou-se que o N-terminal da proteína (resíduos 1 ao 27) é suficiente para inibição. A partir das estruturas tridimensionais de MciZ (RMN) e do complexo FtsZ:MciZ (cristalografia de raios x), determinou-se que MciZ é um peptídeo desenovelado, que assume uma estrutura terciária ao interagir através da sua α -hélice H2 e folha- β B2 com a α -hélice H10 e a folha- β S9 de FtsZ. MciZ mostrou-se capaz de reduzir o tamanho dos protofilamentos de FtsZ de forma subestequiométrica, gerando fragmentos menores de filamentos. Proporções de MciZ:FtsZ de 1:10 foram suficientes para extinguir completamente o anel Z, confirmando a inibição subestequiométrica também *in vivo*. A conservação da inibição da fusão FtsZ-MciZ e a cinética de despolimerização de FtsZ induzida por MciZ provaram que MciZ não é um simples sequestrador. Marcações fluorescentes de MciZ sugeriram que o peptídeo é capaz de interagir com o anel Z *in vivo*, e também decorar feixes de FtsZ *in vitro*, formando focos localizados frequentemente na ponta dos filamentos. Cossedimentações com polímeros de FtsZ mostraram a presença de MciZ ou da fusão FtsZ-MciZ. Apesar de MciZ induzir o aumento da atividade GTPásica específica de FtsZ, a ausência de hidrólise de GTP não eliminou o efeito subestequiométrico de MciZ. Nossos resultados em conjunto mostram que MciZ é um capeador dos filamentos de FtsZ, bloqueando a elongação pela ponta menos e bloqueando o anelamento entre protofilamentos.

Palavras-chave: FtsZ, MciZ, Capeador, Citoesqueleto, Divisão Celular, Moduladores.

Abstract

Bisson-Filho, A.W. **Structure and Mechanisms of MciZ, a Minus End Capper of FtsZ in *Bacillus subtilis***. 2014. 166p. PhD Thesis – Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

FtsZ is a tubulin-like protein present in most bacteria, that self-assembles into filaments forming a structure known as Z-ring in the cells. Following formation, the Z-ring recruits a protein macrocomplex, the divisome, which is responsible by the division septum synthesis, resulting in two daughter cells. Many modulators interact directly to FtsZ, regulating its polymerization and controlling the time and place of the Z-ring formation. MciZ is a 40-amino-acid peptide that is expressed during sporulation in *Bacillus subtilis* and inhibits the formation of the Z-ring in the mother-cell. The aim of this work was to study the interaction between FtsZ and MciZ proteins, and to investigate the mechanisms involved in FtsZ inhibition by MciZ. Applying a genetic screening, using an *ftsZ* mutant library, we identified 13 mutations on *ftsZ* that conferred resistance to MciZ overexpression *in vivo*. Seven of them were able to grow either in the presence or absence of MciZ overexpression, and the other six showed to be dependent on it. With the co-expression and co-purification of the FtsZ:MciZ complex, we observed all mutant proteins still interact with MciZ *in vitro*. Estimated K_d for the interaction was 150±50nM, and it was demonstrated that MciZ does not bind to FtsZ CTP (C-Terminal Peptide), nor does it compete with GTP for the same binding site. Using truncated versions of MciZ, it was determined that its N-terminal (residues 1 to 27) is sufficient for the inhibition. Based on the tridimensional structure of MciZ (NMR) and of the FtsZ:MciZ complex (x-ray crystallography), it was determined that MciZ is an unstructured peptide that assumes a tertiary structure by interacting with FtsZ α -helix H10 and β -sheet S9 through its α -helix H2 and β -sheet B2. MciZ was able to reduce the size of FtsZ protofilaments in a substoichiometric manner, generating smaller fragmented filaments. 1:10 ratios of MciZ:FtsZ were sufficient to completely extinguish the Z-ring, thus confirming the substoichiometric inhibition *in vivo* as well. The inhibition of FtsZ polymerization by the FtsZ-MciZ fusion and the FtsZ depolymerization kinetics induced by MciZ proved that MciZ is not a simple sequesterer. Fluorescent dyeing of MciZ suggests the peptide is able to interact with the Z-ring *in vivo*, as well as decorate FtsZ bundles *in vivo*, forming localized spots frequently at the filaments' ends. Co-sedimentations with FtsZ polymers showed the presence of MciZ or of the FtsZ-MciZ fusion. Despite MciZ-induced increase in specific GTPase activity of FtsZ, the lack of GTP hydrolysis did not eliminate the substoichiometric effect of MciZ. Combined, our results show that MciZ is an FtsZ filament capper, blocking elongation at the minus end and blocking the annealing between protofilaments.

Keywords: FtsZ, MciZ, Capper, Cytoskeleton, Cell Division, Modulators.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
1.1. Nós e o mundo bacteriano.....	10
1.2. O citoesqueleto eucariótico.....	12
1.2.1. Microfilamentos de actina.....	13
1.2.2. Microtúbulos.....	17
1.3. A regulação do citoesqueleto eucariótico.....	21
1.4. O citoesqueleto procariótico.....	25
1.4.1. FtsZ, a tubulina procariótica.....	27
1.4.2. As actinas procarióticas.....	34
1.5. A regulação do anel Z.....	39
1.5.1. Moduladores positivos, os estabilizadores do anel Z.....	40
1.5.2. Moduladores negativos, os inibidores do anel Z.....	45
 2. Objetivos	 52
 3. RESULTADOS	 53
3.1. FtsZ:MciZ, um complexo pouco usual.....	53
3.1.1. Uma plataforma para a purificação do complexo FtsZ:MciZ.....	53
3.1.2. Determinação da constante de dissociação entre FtsZ e MciZ.....	57
3.1.3. Um sítio pouco usual.....	58
3.2. Triagem genética de mutantes <i>ftsZ</i>	60
3.2.1. Estratégia para seleção de mutantes <i>ftsZ</i>	61
3.2.2. Obtenção e identificação dos mutantes <i>ftsZ</i>	63
3.2.3. Mutantes resistentes e dependentes de MciZ.....	64
3.2.4. Mapeamento dos resíduos mutados na estrutura de FtsZ.....	67
3.2.5. Resistência e dependência a outros inibidores.....	70
3.2.6. Interação entre os mutantes e MciZ <i>in vitro</i>	72
3.2.7. Caracterização dos mutantes dependentes <i>in vivo</i>	74
3.3. Estrutura MciZ e do complexo FtsZ:MciZ.....	77
3.3.1. Estrutura 3D de MciZ por RMN.....	78
3.3.2. Resíduos de MciZ importantes para interação com FtsZ.....	80
3.3.3. Estrutura cristalográfica do complexo FtsZ:MciZ.....	82
3.4. Mecanismo de ação de MciZ.....	89
3.4.1. Efeito de MciZ sobre a polimerização de FtsZ <i>in vitro</i>	89
3.4.2. Efeito de MciZ sobre a formação do anel Z <i>in vivo</i>	93
3.4.3. MciZ induz a formação de protofilamentos de FtsZ mais curtos.....	95
3.4.4. MciZ não é um simples sequestrador de FtsZ.....	101
3.4.5. MciZ interage com FtsZ polimérico <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	104
3.4.6. MciZ aumenta a atividade GTPásica de FtsZ.....	109

3.4.7. A inibição por MciZ independe da atividade GTPásica de FtsZ....	111
--	-----

4. DISCUSSÃO113

4.1. MciZ, o capeador-terminador do anel Z.....	113
4.2 Como MciZ reduz o tamanho dos filamentos?.....	115
4.3. A alça T7 faz a diferença entre monômeros e filamentos.....	120
4.4. Treadmilling si, pero no mucho.....	122
4.5. Atividade GTPásica, quando menos é mais.....	124
4.6. Os mutantes R&D, uma jornada inesperada.....	125
4.7. A busca para sítios alternativos em FtsZ.....	128
4.8. Perspectivas: MciZ como ferramenta para o estudo de FtsZ.....	129

5. MATERIAIS E MÉTODOS132

5.1. Cepas bacterianas e condições de crescimento.....	132
5.2. Manipulação de DNA, plasmídios e transformação.....	133
5.3. Expressão, purificação e quantificação de proteínas.....	138
5.4. Conjugação dos fluoróforos às proteínas purificadas.....	141
5.5. Determinação do Kd da interação entre FtsZ e MciZ.....	142
5.6. Microscopia de fluorescência.....	142
5.7. Microscopia eletrônica de transmissão.....	144
5.8. Resolução da estrutura de MciZ e ensaios de STD.....	144
5.9. Resolução da estrutura do complexo FtsZ:MciZ.....	146
5.10. Ensaio de polimerização/despolimerização reportado por espalhamento de luz a 90°.....	147
5.11. Ensaio de polimerização por Bodipy.....	148
5.12. Western blot quantitativo de GFP-MciZ de extratos celulares.....	149
5.13. Cosedimentação dos polímeros de FtsZ e MciZ.....	150
5.14. Medidas de atividade GTPásica.....	150
5.15. Afinidade de mant-GTP por FtsZ e pelo complexo FtsZ:MciZ.....	151

6. BIBLIOGRAFIA.....153

101 – Introdução

1.1 – Nós e o mundo bacteriano

A microbiologia moderna nasceu em meados do século XVII com as primeiras observações de Antonie van Leeuwenhoek, porém apenas mais tarde durante o século XIX aconteceu o amadurecimento e consolidação e amadurecimento desse campo. Grandes cientistas como Cohn (1828-1898), Winogradsky (1856-1953), Pasteur (1822-1895) e Koch (1843-1910) foram os grandes responsáveis, entre outros, a classificar, caracterizar e criar postulados sobre os microorganismos que foram seguidos por décadas, alguns até os dias de hoje (Wainwright 2003).

Ao longo da evolução do conhecimento sobre os microorganismos, tornou-se inevitável a comparação entre os grandes domínios da vida, mais especificamente entre os eucariotos e os procariotos. Entre as principais diferenças, podemos destacar o tamanho das células (as células eucarióticas são entre 100 e 1000 vezes maiores que as procarióticas), a presença de organelas especializadas (complexo de Golgi, retículo endoplasmático, mitocôndria, entre outros), genoma procariótico minimalista e a mais importante: presença de núcleo isolando o material genético do citoplasma (Theriot 2013). O fato dos eucariotos possuírem núcleo acarreta no total desacoplamento da transcrição (feita dentro do núcleo) e tradução (realizada no citoplasma), enquanto que entre as bactérias ambos os processos acontecem

simultaneamente no citoplasma. A Figura 1 mostra um bom comparativo entre o tamanho dessas estruturas e as principais técnicas utilizadas para sua visualização.

Figura 1 – Escala de resolução das técnicas utilizadas para a visualização de cada estrutura, desde microscopia ótica para células e organelas, até cristalografia de raios x e RMN para átomos. Extraído de Celler 2013.

Por outro lado, existem diversas similaridades com relação à maquinaria molecular utilizada por ambas as células eucarióticas e procarióticas, como os complexos de transcrição e tradução (Kozak 1999), enzimas usadas nas vias metabólicas e a presença de citoesqueletos (Theriot 2013) (Frixione 2000). Reconstruções filogenéticas apontam inclusive que toda a complexidade estrutural eucariótica surgiu de interações e combinação dos domínios Bacterea e Archaea (Williams 2013) (Rochette 2014). Portanto as bactérias possivelmente também tiveram a chance de desenvolver estruturas complexas semelhantes, mas optaram por um caminho evolutivo diferente.

Dentre as similaridades apontadas, justamente o fato de ambas as células possuírem proteínas citoesqueléticas foi um ponto elucidado recentemente (Löwe 1998) (Nogales 1998a) (Erickson 1996a) (Erickson 1996b) (Erickson 1998). Ao passo que o citoesqueleto eucariótico vem sendo estudado há mais de meio século, esse campo entre as bactérias não soma mais de vinte anos. Assim, ao iniciarmos o entendimento sobre o funcionamento do citoesqueleto procariótico, devemos levantar também o que já se sabe sobre seu primo eucariótico.

1.2 – O citoesqueleto eucariótico

A condição essencial para a formação de qualquer estrutura citoesquelética, eucariótica ou não, é a existência de proteínas capazes de se auto-associar em forma de polímeros (Frixione 2000). Esses polímeros tornam-se portanto o arcabouço para a maioria dos trabalhos realizados dentro das células, geralmente ligados à geração de força que é usada desde o transporte de outras moléculas à morfogênese da célula (citocinese, segregação fuso mitótico, motilidade, transporte de vesículas e organelas, adesão celular, entre outros) (Wickstead 2011). Existem quatro principais classes de filamentos que constituem o a maior parte do que chamamos de citoesqueleto eucariótico: microfilamentos de actina, microtúbulos, filamentos intermediários e as septinas. Nessa introdução iremos discutir apenas as proteínas citoesqueléticas com regulação dependente de nucleotídeos.

1.2.1 – Microfilamentos de actina

No começo da década de 1940 o consenso de que a miosina era a única responsável pela contração muscular veio abaixo quando um trabalho do grupo de Szent-Györgyi (Straub 1943), apoiado em uma série de outros estudos onde mostraram pela primeira vez uma atividade enzimática relacionada a um extrato protéico puro (Needham 1942) (Bailey 1942). Nesses estudos também foi demonstrado que as fibras musculares eram compostas de duas proteínas, sendo que a actina a segunda proteína descoberta, chamada então de adenosinatrifosfatase. Esses estudos iniciais sobre os polímeros de actina são, juntamente com os de hemoglobina e mioglobina, os exemplos mais clássicos de caracterização mecânica de máquinas moleculares da história da bioquímica.

Actina é uma ATPase de 42kDa que convive dentro do citoplasma das células eucarióticas na forma monomérica (G actina) (Figura 2a) e polimérica (F actina) (Figura 2b) simultaneamente. A polimerização da actina é dependente da presença de ATP (e a hidrólise de ATP pela actina depende da polimerização) e seus filamentos são constituídos por dois segmentos em dupla-hélice, podendo formar longos feixes helicoidais contendo milhares de subunidades (Figura 2c) (Brenner 1983).

A actina apresenta uma concentração crítica, ou seja, uma concentração mínima de proteína necessária para se observar polimerização, denotando uma

cooperatividade entre as subunidades do polímero (Wenger 1976). Apesar de diversos estados conformacionais de actina terem sido identificados (Engelman 1995) (Orlova 1995), nenhum tipo de sincronização alostérica existe entre os estados de cada subunidade dentro do mesmo filamento (Steinmetz 1997). Portanto, a origem da cooperatividade está relacionada à ativação de determinados estados, somado ao fato dos filamentos serem constituídos de mais de uma fita.

Figura 2 – Actina é uma proteína capaz de se autoassociar em filamentos. (A) Estrutura cristalográfica da actina monomérica (G actina) a 2,8Å de resolução (PDB 1ATN). Em vermelho está representado uma molécula de ATP ligada ao monômero. (B) Modelo criado a partir da estrutura cristalográfica da actina polimérica (F actina) a 1,9Å de resolução (PDB1 YAG). Extraído de Shaevitz 2010. (C) Modelo da dupla-hélice entre dois protofilamentos de actina (Goodsell 2001).

No momento que a polimerização da actina alcança o equilíbrio, a velocidade que os monômeros são incorporados ao polímero se torna igual à velocidade que as

subunidades são liberadas do mesmo, sendo que tanto a adição de novas subunidades como a perda delas ocorrem sempre pelas extremidades dos filamentos (Figura 3a) (Neuhaus 1983).

Os filamentos de actina são estruturalmente polarizados devido à diferente topologia das suas extremidades, ou seja, o domínio C-terminal da actina está exposto à superfície em uma extremidade, enquanto o N-terminal está exposto na extremidade oposta (Figura 2b). Por conta desta polarização, foi proposto que a polimerização e despolimerização se dariam de forma diferente em cada extremidade, já que interagiriam de forma diferente com os monômeros livres na solução (Figura 3b) (Neuhaus 1983).

Figura 3 – (A) As trocas entre as subunidades monoméricas e poliméricas acontecem apenas pelas extremidades dos filamentos de actina (Wenger 1976). (B) Os filamentos de actina apresentam polarização pois as superfícies de interação em cada extremidade são diferentes, fazendo com que os monômeros (pontilhado) interajam de maneira diferente entre elas (Neuhaus 1983).

De fato esse fenômeno foi observado e as constantes cinéticas de cada extremidade foram determinadas através de experimentos envolvendo a medição da alongação e contração das extremidades nesses polímeros (Pollard 1981). A diferenciação das extremidades só foi possível graças do formato diferenciado que a incorporação de meromiosina pesada conferia para cada extremidade dos filamentos observados por microscopia eletrônica. Por conta disso, as pontas dos filamentos de actina foram nomeados como “barbed” e “pointed” (Figuras 4a) (Huxley, 1963).

Uma consequência imediata dessa assimetria cinética é que uma das extremidades incorpora e libera subunidades em uma maior velocidade (barbed) que a oposta (pointed). Outra consequência é que, dependendo da concentração de proteína e composição iônica no meio, é possível observar “treadmilling” dos filamentos de actina. Treadmilling é um fenômeno que acontece quando uma das extremidades do polímero (barbed) está incorporando subunidades enquanto a oposta (pointed) está se desfazendo delas, havendo um fluxo de subunidades que podem criar um efeito de movimento dos filamentos (Figura 4b) (Wegner 1976) (Neuhaus 1983). Esse fenômeno só é possível pois as pontas possuem concentrações críticas diferentes (Neuhaus 1983). Treadmilling desempenha um papel direto na função celular, como motilidade, contração muscular e transporte (DeRosier 1980) (Frixione 2000).

Figura 4 – A polarização e diferentes concentrações críticas das extremidades resulta em treadmilling. (A) Gráfico representativo da taxa de incorporação/dissociação de subunidades de actina em cada extremidade (Neuhaus 1983). (B) Micrografias temporais mostrando filamentos de actina marcadas com meromiosina pesada. Desde o tempo 1 até o tempo 6, pode-se observar a barbed end (seta verde) alongando, enquanto a pointed end (seta vermelha) encolhe (Kovar 2004).

1.2.2 – Microtúbulos

Após algum tempo da descoberta e entendimento dos mecanismos básicos envolvidos nos filamentos de actina, outra importante estrutura citoesquelética foi encontrada constituindo as fibras dos cílios e flagelos celulares. Através de micrografias eletrônicas pode-se notar que tais estruturas eram compostas por cilindros ocos com uma superfície frisada por filamentos longitudinais em intervalos regulares (André

1963) (Pease 1963). Após alguns termos temporários, esses “tubos” foram então nomeados de “microtúbulos” (Slautterback, 1963).

Os microtúbulos são polímeros formados pela polimerização de heterodímeros de duas isoformas da tubulina (α -tubulina e β -tubulina) (Figura 5a) (Nogales 1998b). Os heterodímeros se associam longitudinalmente em polímeros chamados protofilamentos. A parede dos microtúbulos é formada por 13 protofilamentos longitudinais organizados de forma periódica, formando um cilindro com diâmetro de aproximadamente 25nm (Figura 5b) (Ledbetter 1964) (Tilney 1973).

Figura 5 – (A)Os microtúbulos são compostos de dímeros de duas isoformas de tubulina: α -tubulina (cinza claro) e β -tubulina (cinza escuro). Em vermelho e azul estão representados GTP e GDP, respectivamente (PDB 1TUB). (B) Micrografia eletrônica de estruturas formadas por microtúbulos. 1-Cílios; 2-Microtúbulos periféricos; 3-Microtúbulos centrais; 4-Microvillus; 5-Corpos basais. Figura extraída de Allen 1967.

A polimerização dos microtúbulos ocorre por um mecanismo parecido com o da actina, e sendo assim também apresenta uma dinâmica de reciclagem de subunidades através de extremidades assimétricas, onde a ponta mais dinâmica é chamada ponta mais (plus end) e a menos dinâmica de ponta menos (minus end), correlatas às “barbed end” e “pointed end” da actina, respectivamente (Figura 6a) (Margolis 1978) (Horio 1986) (Walker 1988). As extremidades dos protofilamentos dos microtúbulos também apresentam concentrações críticas diferentes, e portanto também realizam treadmilling (Figura 6b) (Margolis 1981) (Margolis 1998).

Figura 6 – Microtúbulos também são filamentos polarizados que realizam treadmilling (A) Micrografia eletrônica mostrando que a diferença de atividade das pontas afetam inclusive suas morfologias. Figura extraída de Schoer 2003. (B) Micrografias temporais registrado o movimento de microtúbulos devido à treadmilling (Sumino 2012).

Outra importante diferença entre os filamentos de actina e os microtúbulos é que apenas no segundo tipo de polímero foi observado um comportamento chamado

instabilidade dinâmica. Segundo essas observações, apesar da população de microtúbulos em solução aparentar um equilíbrio temporário, cada estrutura individualmente comporta-se de forma independente, alongando a partir da sua ponta mais em uma taxa constante, até que em determinado momento acontece uma rápida transição e o microtúbulo passa a despolimerizar (evento chamado catástrofe) (Kirschner 1984) (Desai 1997). Esses períodos de polimerização seguidos de rápida despolimerização, apesar de frequentes, não apresentam regularidade ou sincronia entre as estruturas de microtúbulos em solução.

Um modelo que explica a instabilidade dinâmica é o de capeamento por GTP e se baseia no fato de que o GTP ligado às subunidades vão sendo hidrolisados à GDP ao longo do tempo, após serem adicionadas em uma das pontas. Isso gera estruturas de microtúbulos compostas em sua maioria por subunidades ligadas à GDP, com as pontas capeadas com subunidades ligadas à GTP, sendo que essas subunidades estabilizam e impedem que as subunidades ligadas à GDP se dissociem do polímero. Em determinado momento, estocasticamente, a hidrólise do GTP ligado à subunidade capeadora acontece antes da adição de uma nova subunidade ligada à GTP na mesma ponta, desestabilizando o protofilamento por inteiro, culminando na catástrofe (Figura 7) (Kirschner 1984) (Desai 1997). Assim como treadmilling, a instabilidade dinâmica é essencial para que os microtúbulos possam desempenhar suas funções celulares,

como contração do fuso mitótico, migração direcional e sinaptogênese (Liao 1995) (Jaworski 2009).

Figura 7 – Além de realizar treadmilling como a actina, os microtúbulos também apresentam instabilidade dinâmica. À esquerda: micrografias dos microtúbulos durante as fases de alongação e catástrofe. Ao centro: medidas do crescimento e encolhimento de cada extremidade dos microtúbulos acompanhados no painel à esquerda. À direita: modelo mecânico que usa o capeamento por GTP e a atividade GTPásia dos microtúbulos para explicar a catástrofe. Figura retirada de Horio 1986.

1.3 – A regulação do citoesqueleto eucariótico

Uma consequência relevante de se possuir poucas proteínas citoesqueléticas formando diversas estruturas diferentemente especializadas que comandam processos em diversas células com diferentes especializações, é que se faz necessário um número considerável de acessórios que ajudem na transição entre essas estruturas, ou até mesmo que elas possam coexistir na mesma célula, mas em compartimentos diferentes. Como as células eucarióticas evoluíram para apresentarem citoplasmas volumosos, com organelas e núcleo isolando processos dele, a difusão passou a não ser mais a principal força que medeia as interações e reações entre moléculas (Marshall 2012). São necessárias proteínas que interajam com os polímeros

citoesqueléticos e auxiliem na execução das tarefas, modulando a morfologia e a dinâmica dos filamentos.

Os reguladores de polimerização são em geral proteínas que se associam aos monômeros ou polímeros citoesqueléticos e controlam seu estado de polimerização. Mesmo com diferenças marcantes entre os filamentos citoesqueléticos, os mecanismos de ação de seus reguladores parecem ser bem conservados (principalmente entre os filamentos de actina e os microtúbulos). A Figura 8 apresenta exemplos de mecanismos que são considerados mais frequentes e importantes para a regulação da polimerização dos filamentos de actina. Apesar de todos os citoesqueletos apresentarem reguladores que controlam a sua polimerização, focaremos apenas na regulação de actina e microtúbulos, já que possuem os mecanismos mais conhecidos e detalhados.

Figura 8 – Mecanismos de regulação da polimerização e morfologia dos filamentos de actina. extraído de Gerard Karp, 7ª edição.

Os sequestradores são proteínas que levam à despolimerização dos filamentos, sendo que a despolimerização é proporcional à concentração do inibidor (despolimerização estequiométrica) (Alberts 2002). Os sequestradores se ligam às proteínas citoesqueléticas na forma monomérica e as deslocam fora do equilíbrio entre monômeros e polímero (as impedindo de polimerizar novamente). Timosina (actina) e statmina (microtúbulos) são exemplos de sequestradores (Hertzog 2004) (Irobi 2004) (Sobel 1991).

Sequestradores não são os únicos tipos de reguladores que se ligam aos monômeros das proteínas citoesqueléticas. Existem também aqueles que ativam de alguma forma a polimerização através da interação com os monômeros, chamados de nucleadores. Essa ativação é importante pois os monômeros de actina e tubulina isolados apresentam uma cinética de nucleação lenta e portanto não seriam capazes de iniciar a polimerização *in vivo* de forma eficiente (Alberts 2002) (Theriot 2013). Arp2/3 (actina) e γ -tubulina (microtúbulos) são exemplos dessa classe de proteínas chamadas de nucleadoras de polimerização (Paavilainen 2004) (Zheng 1995). Outro bom exemplo de uma proteína que se liga a monômeros e ativa a polimerização é a profilina, que se liga a moléculas de actina monoméricas e acelera a troca de ADP por ATP, induzindo a inserção dessas subunidades na malha polimérica (Pollard 2003).

Outra classe de reguladores que modulam positivamente a polimerização do citoesqueleto são daqueles que se ligam à filamentos citoesqueléticos e auxiliam na formação de ligações cruzadas entre eles (“cross-linking”) ou no empacotamento de feixes (anti)paralelos de filamentos (“bundling”). Existem inúmeros exemplos de proteínas capazes de intermediar a interação lateral entre filamentos, como α -actinina, filamina, espectrina e transgelina (actina) ou MAP2, tau, família MAP65, etc (microtúbulos), e cada um deles é capaz de associar filamentos em uma configuração específica (Alberts 2002).

Finalmente, os capeadores (cappers) e severadores (severes) são uma importante classe de reguladores que controlam o tamanho e a dinâmica dos filamentos. Na maioria das vezes, os capeadores são proteínas que se ligam na ponta mais dos microtúbulos, ou na “barbed end” dos filamentos de actina, impedindo que novas subunidades poliméricas sejam adicionadas ou eliminadas nessa extremidade (Winder 2005) (Dominguez 2004). Apesar da maioria dos capeadores possuírem afinidade específica pela extremidade mais dinâmica do polímero, existem alguns exemplos que se ligam às ponta menos e “pointed end” (Southwick 1982a) (Southwick 1982b). Já os severadores são proteínas que se ligam primeiramente à lateral do polímero, facilitando a fragmentação e em seguida se acomodam à extremidade recém criada, de forma a agir como um capeador (Roll-Mecak 2010). Alguns exemplos dessas classes de moduladores são katanina, catastrofina e colchicina (microtúbulos) ou citocalastina B, CapZ, e gelsolina (actina) (McNally 1993) (Waters 1996) (Maruyama 1990) (Burtnick 2004) (Maclean-Fletcher 1980)

1.4 – O citoesqueleto procariótico

Por conta dos diferentes caminhos evolutivos tomados pelos eucariotos e procariotos, seria normal esperar diferenças morfológicas e funcionais entre esses dois domínios. A investigação dessas diferenças entre ambos citoesqueletos tem revelado cada vez mais peculiaridades de como essas estruturas funcionam e se organizam

(Theriot 2013) (Celler 2013) (Shaevitz 2010). Antes de mais nada, é importante ressaltar que como o estudo do citoesqueleto procariótico ainda é novo comprado às décadas de estudos do primo eucariótico, a cada ano temos novas evidências e uma compreensão diferente das diferenças e semelhanças.

Primeiramente, podemos apontar que a principal diferença mecânica sobre o funcionamento dos citoesqueletos é que as proteínas eucarióticas evoluíram para poucas delas serem capazes de se organizarem em diferentes estruturas (ambos actina e microtúbulos podem formar ásteres e *fusos in vivo*, estruturas nunca observadas entre os citoesqueletos procarióticos), sendo que cada uma é responsável por um processo e função distintos, enquanto que nos procariotos cada proteína citoesquelética desempenha apenas uma função dentro da célula. Prova dessa observação é o fato dos filamentos de actina e os microtúbulos acumularem diversas funções cada, com morfologias poliméricas diversas, enquanto que até o momento não se tenha encontrado mais de uma função ou estrutura *in vivo* pra cada proteína procariótica. Isso indica que talvez os procariotos tenham apostado suas “fichas evolutivas” na especialização de cada citoesqueleto, enquanto que os eucariotos preferiram mecanismos de regulação mais complexos.

Uma observação que suporta essa hipótese é que enquanto nos eucariotos existe tanto regulação positiva como negativa desempenhando papéis igualmente importantes na formação do arcabouço citoesquelético, os procariotos aparentemente

se pautam quase que exclusivamente na regulação negativa da polimerização de suas proteínas. Ou seja, até o momento não foi encontrado nenhum nucleador de polimerização essencial em procariotos. Claro que isso pode ser reparado no futuro, porém estudos cinéticos com proteínas citoesqueléticas procarióticas *in vitro* (principalmente FtsZ) apontam que elas apresentam cinética de nucleação rápida comparado com as eucarióticas, e portanto não precisariam necessariamente de nucleadores para iniciar sua polimerização (Romberg 2001) (Romberg 2003).

Dentre as diferentes proteínas citoesqueléticas dos procariotos, podemos destacar como os exemplos “canônicos” FtsZ (tubulina), MreB (actina) e ParM (actina).

1.4.1 – FtsZ, a tubulina procariótica

FtsZ (**F**ilamentous **T**emperature **S**ensitive mutant **Z**) é uma proteína citoplasmática de 40kDa amplamente conservada (presente na quase totalidade das bactérias e arqueias) que foi descoberta através do mapeamento de mutações que causaram bloqueio da divisão (filamentação) de células bacterianas a altas temperaturas (Lutkenhaus 1980) (Vaughan 2004). FtsZ também pode ser encontrada em algumas organelas eucarióticas (que descendem de simbiontes eucarióticos), como os cloroplastos e mitocôndrias (Osteryoung 2003) (TerBush 2012).

Foi apenas no fim da década de 90, quando ambas estruturas cristalográficas de FtsZ e tubulina foram resolvidas que se ratificou que se tratavam realmente de

proteínas homólogas (Figuras 9a) e que de fato as bactérias também possuíam um citoesqueleto (Nogales 1998a) (Lowe 1998) (Erickson 1996a) (Erickson 1996b) (Erickson 1998). A estrutura de FtsZ é dividida entre três regiões principais: uma cauda N-terminal desestruturada chamada NTP (**N-Terminal Peptide**), um domínio globular conservado dividido em dois sub-domínios (N-terminal e C-terminal) e uma cauda C-terminal desestruturada aonde se encontra o CTP (**C-Terminal Peptide**), uma sequência conservada de aproximadamente 11 resíduos extremamente importante para a interação de FtsZ com outras proteínas (Figura 9b)(Adams 2009).

Figura 9 – FtsZ é homóloga à tubulina eucariótica. (A) Estruturas cristalográficas dos dímeros α -tubulina (cinza claro) e β -tubulina (cinza escuro) (PDB 1TUB, à esquerda) e de FtsZ de *S. aureus* (PDB 3VOA, à direita). (B) Dímero de SaFtsZ (PDB 3VOA) com uma modificação para representar a cauda C-terminal flexível (CTP, em pontilhado) importante para ligação de moduladores.

FtsZ, assim como a tubulina, também é uma GTPase que se autoassocia de maneira cabeça-cauda, formando protofilamentos de comprimento médio por volta de 200nm *in vitro* (Figura 10a) (Erickson 2010). Os resíduos necessários para a ligação de GTP/GDP a FtsZ se encontram no N-terminal de seu domínio globular, porém eles não são suficientes para sua atividade hidrolítica. Para tanto, FtsZ depende dos resíduos da assinatura NxDFAD (similar à assinatura NxDxxE das α -tubulinas), presentes na alça T7, localizada no C-terminal do domínio globular (Figura 10b) (Oliva 2004). Quando ocorre a polimerização de FtsZ, o C-terminal do domínio globular de uma subunidade se encaixa no N-terminal do domínio globular de outra, aproximando assim a sua alça T7 do nucleotídeo. Portanto, a hidrólise de GTP é dependente da polimerização de FtsZ.

Figura 10 – FtsZ se autoassocia em protofilamentos capazes de hidrolisar GTP. (A) Micrografia eletrônica mostrando protofilamentos isolados de FtsZ de *E. coli* (Erickson 2010). Barra de escala de 100nm. (B) A alça T7 (verde) é importante para a interação entre as subunidades dos protofilamentos e para a atividade enzimática de FtsZ. Dímero de SaFtsZ (PDB 3VOA), GDP em vermelho.

Em condições fisiológicas, FtsZ é capaz de polimerizar *in vitro* com a adição de GTP (Erickson 2010) (Mukherjee 1994) (Romberg 2003), sendo que o equilíbrio é alcançado em uma questão de segundos (Mukherjee 1999) (Chen 2009). Ao passo que as subunidades do polímero hidrolisam GTP, as espécies FtsZ-GDP aumentam em proporção nos protofilamentos e com isso a afinidade entre as subunidades cai, desestabilizando os polímeros (Erickson 1996a) (Lu 2000) (Mukherjee 1999).

Apesar da diferença de afinidade entre subunidades carregando GTP ou GDP, nenhuma mudança conformacional entre monômeros carregando cada nucleotídeo foi reportada (Oliva 2007). Recentemente, experimentos com repórteres fluorescentes e estruturas cristalográficas de protofilamentos de *Staphylococcus aureus* demonstraram que as subunidades poliméricas apresentam um estado conformacional diferente da monomérica (Chen 2011) (Matsui 2012) (Elsen 2012). Essa é uma forte evidência que de fato existe uma conformação ativa de alta afinidade e uma conformação inativa que leva à dissociação.

Evidências do efeito da atividade GTPásica sobre a dinâmica dos polímeros de FtsZ foram apresentadas a partir de experimentos usando análogos de GTP que são hidrolisados mais lentamente, como GMPCPP (α,β -metil-guanosina-5'-trifosfato). Usando esses derivados de guanina mostrou-se que tanto a massa quanto as interações laterais entre os protofilamentos no polímero aumentam consideravelmente,

indicando uma estabilização do mesmo (Romberg 2001) (Huecas 2003) (Huecas 2004).

O fato de a atividade GTPásica de FtsZ interferir com a dinâmica da sua autoassociação e a morfologia de seus polímeros, assim como com os microtúbulos e actina, abre a possibilidade de que FtsZ também possa apresentar treadmilling ou instabilidade dinâmica. Apesar da dificuldade de se visualizar protofilamentos em tempo real por microscopia convencional por serem pequenos (perto do limite do comprimento de onda da luz visível, limite da resolução da microscopia ótica), e assim acompanhar a dinâmica de associação e dissociação de cada extremidade dos filamentos, foi observado feixes dinâmicos de FtsZ *in vitro* e protofilamentos exibindo treadmilling dependentemente da proteína FtsA (Figura 11) (Loose 2013).

Assim como os polímeros de actina e tubulina, a polimerização de FtsZ também acontece de forma cooperativa, com uma concentração crítica para os monômeros de FtsZ se autoassociarem (só se observa polimerização a partir de cerca de $1\mu\text{M}$ de FtsZ) (Chen 2005) (Mukherjee 1999). Esse é um ponto misterioso sobre FtsZ, pois ainda não se sabe como seus polímeros podem apresentar cooperatividade sendo formados por protofilamentos simples-fita (Erickson 1989).

Figura 11 – FtsZ também realiza treadmilling. (A) Microscopia TIRF reportando um protofilamento em treadmilling ao longo do tempo. (Loose 2013). (B) Modelo representando o experimento que mostrou que FtsZ, quando polimerizado com FtsA e ligado à membrana, possui uma dinâmica diferenciada (Loose 2013).

Um dos maiores desafios da área atualmente é conseguir aliar todas as informações sobre a polimerização de FtsZ obtidas dos ensaios *in vitro* nos últimos 20 anos para entender a arquitetura e o comportamento do anel Z *in vivo*.

Em determinado momento do ciclo celular, FtsZ se polimeriza e forma uma estrutura chamada anel Z, demarcando o local aonde a divisão celular ocorrerá (Figura 12) (Margolin 2003) (Pogliano 2008). No momento que o anel Z é formado, diversas outras proteínas (citoplasmáticas e de membrana) são recrutadas (direta ou indiretamente) para ele, formando um complexo multiprotéico chamado divisomo, que

possui todos os elementos necessários para a síntese do septo de divisão, dividindo a célula em duas células filhas, completando a citocinese (Figura 12)(Goehring 2005) (Barák 2007). Com a observação de fusões de FtsZ com proteínas fluorescentes ao longo do tempo concluiu-se que a montagem e dissociação do anel Z é um processo rápido, acontecendo em um intervalo de poucos minutos (Sun 1998).

Figura 12 – Ciclo celular e citocinese de *B. subtilis* descrito por etapas através das proteínas responsáveis pela divisão celular. Componentes do divisomo estão representados como FtsZ (vermelho), proteínas citoplasmáticas (verde) e de membrana (azul). Figura adaptada de Meira 2011.

Experimentos usando FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) demonstraram que o anel Z recicla suas subunidades com um tempo de meia vida de aproximadamente 10 segundos (Anderson 2004) (Geissler 2007) (Stricker 2002) e que essa troca deve ser regulada pela hidrólise de GTP, já que mutantes de FtsZ com baixa atividade enzimática demoram até 10 vezes mais para trocá-las comparados à proteína selvagem (Stricker 2002) (Bisson-Filho 2009).

Além de sua dinâmica, muitos esforços estão direcionados para elucidar a arquitetura do anel Z na escala nanométrica. Quase todos os experimentos utilizando técnicas que mostraram a organização do anel Z com uma resolução entre 10-200nm (criotomografia eletrônica, PALM, STORM, 3S-SLIM e STED, por exemplo) apontaram uma estrutura descontínua, composta por pequenos protofilamentos que não interagem e que devem favorecer a constrição por aplicar força na membrana, sem a aparente necessidade de formar ultraestruturas através da interação lateral de protofilamentos (Erickson 2010) (Li 2007) (Coltharp 2012) (Fu 2010) (Biteen 2012) (Jennings 2010) (Strauss 2012).

1.4.2 – As actinas procarióticas

Assim como os microfilamentos de actina desempenham diversas funções celulares e para isso assumem variadas morfologias, existem mais de 20 subgrupos de homólogos de actina (Figura 13) distribuídos entre as bactérias, com cada grupo exercendo uma função celular (Derman 2009). Entre essas funções, podemos destacar principalmente manutenção da morfologia celular, segregação plasmidial e divisão celular (Ingerson-Mahar 2011). Nós iremos focar na descrição dos dois representantes que são os mais bem caracterizados bioquimicamente: FtsA, MreB e ParM (Shaevitz 2010). FtsA será discutido na seção 1.5.1.

Figura 13 – Diagrama representando a árvore filogenética das subfamílias das actinas procarióticas, identificadas por homologia de sequência. As subfamílias representadas em cores são aquelas que já foram investigadas e mostraram ser capazes de polimerizar-se. Extraído de Shaevitz 2010.

Poucos anos após da identificação de FtsZ como homóloga a tubulina, MreB surgiu como a próxima proteína citoesquelética descoberta em bactérias (Jones 2001) (van der Ent 2001). MreB é homóloga a actina (Figura 14a) mais amplamente distribuída entre as bactérias não esféricas e é um componente importante para localização do maquinário de síntese de peptídeoglicano da parede celular (Garner 2011). Apesar da semelhança estrutural, MreB forma protofilamentos retos e simples, ao contrário da dupla-hélice dos filamentos de actina (Figura 14a)(van den Ent et al. 2001) (Oda et al. 2009).

Estudos mostraram que MreB também polimeriza *in vitro* na presença de ATP e Mg^{2+} (Figura 14b) (Nurse 2013) e que ele e seus parálogos (MreC e Mbl) formam hélices *in vivo* (Figura 14c) (Reimold 2013). Apesar de MreB formar protofilamentos

retos e isolados, assim como FtsZ ele também é capaz de formar feixes através de sua associação lateral (Bean 2008).

Figura 14 – MreB é homóloga à actina. (A) Modelos dos filamentos de actina e MreB usando as estruturas cristalográficas (PDBs iYAG e IJCE, respectivamente). Imagem modificado de Shaevitz 2010. (B) Micrografia eletrônica de filamentos de MreB (Nurse 2013). (C) Espirais dinâmicas de MreB em células de *B. subtilis*, registradas por microscopia N-SIM (Reimold 2013).

Muito ainda existe para ser investigado sobre a natureza de MreB e sua função. Praticamente nenhum regulador de sua polimerização é conhecido (tanto negativos como positivos) e no momento os grupos que tentam elucidar a natureza bioquímica da sua polimerização apresentam resultados divergentes (Esue 2005) (Bean 2008) (Mayer 2009).

Apesar dos eucariotos basearem a segregação de seus cromossomos na polimerização da tubulina, as bactérias optaram por uma maquinaria que controla a

arquitetura do cromossomo (SMCs) em conjunto com a força gerada pela própria replicação do DNA (Lewis 2001).

Porém as bactérias também possuem um sistema de segregação de DNA baseado na dinâmica de polímeros citoesqueléticos de actina (Gerdes 2010) (Lim 2005). ParM é uma proteína homóloga de actina e se polimeriza na presença de ATP, formando filamentos entrelaçados em forma de dupla-hélice, tal qual actina (Figura 15a) (van den Ent 2002). Apesar de sua similaridade estrutural com a actina, ParM apresenta polimerização bidirecional e instabilidade dinâmica tal como microtúbulos (Figura 15b) (Garner 2004) (Garner 2007).

Figura 15 – ParM é um homólogo de actina, porém apresenta crescimento bidirecional. (A) Estrutura da dupla-hélice formada por dois protofilamentos de ParM (PMichie 2006). Adaptado de Shaevitz 2010. (B) Microscopia TIRF registrando o crescimento bidirecional de um filamento de ParM ao longo do tempo. As setas vermelhas demarcam a posição inicial das extremidades (Garner 2004).

Para segregar o plasmídio R1, as bactérias utilizam um complexo de três proteínas: *parC*, ParR e ParM (Gerdes 1986). ParR é uma proteína que possui um sítio de ligação a sequências repetidas e que, quando associada a *parC* (que funciona como

um centrômero), liga-se à origem de replicação do DNA plasmidial e à ParM (Dam 1994).

Enquanto ParM está isolado no citoplasma, seus filamentos ativamente se polimerizam e rapidamente encolhem em catástrofe (em processo de instabilidade dinâmica). Porém, quando os filamentos de ParM são ligados ao plasmídio através do complexo ParR/*parC* (Moller-Jensen 2002), eles são estabilizados e não se observa mais eventos de catástrofe (Garner et al. 2004). A partir deste momento, os filamentos de ParM continuam a elongar-se, empurrando os plasmídios em direções opostas, no sentido dos pólos da célula (Figura 16).

Figura 16 – Em conjunto com ParR e o centrômero *parC*, ParM faz uso de suas propriedades de polimerização (instabilidade dinâmica) para realizar a segregação do plasmídeo R1. Filamentos de ParM livres (vermelho) são instáveis, porém são estabilizados quando associado a *parC* locus através de ParR (amarelo), e sua polimerização bidirecional empurra os plasmídios (verde) em igual quantidade para os pólos das células. Modelo retirado de Shaevitz 2010.

1.5 – A regulação do anel Z

Assim como existem nas células eucarióticas fatores capazes de regular a polimerização e a morfologia das estruturas dos polímeros de actina e tubulina, existem também nas bactérias proteínas responsáveis pela regulação da formação e desestabilização do anel Z durante o ciclo celular. Tais moduladores ao estabilizarem (moduladores positivos) ou inibirem (moduladores negativos) a formação do anel Z, controlam o local e o momento mais apropriado para a divisão celular.

Como a concentração de FtsZ dentro das células (entre 4 e 10 μM) é significativamente maior que sua concentração crítica (em torno de 1 μM) (Erickson 2010), e a nucleação de FtsZ não apresenta uma barreira cinética para a sua polimerização (Theriot 2013), são os moduladores negativos geralmente os responsáveis pelo controle da formação do anel Z, enquanto que os moduladores positivos atuam na associação de FtsZ com a membrana, auxiliam no recrutamento das outras proteínas do divisomo e também contrabalanceiam a ação dos moduladores negativos, além de supostamente regular mudanças na morfologia do anel Z (para espirais e hélices, por exemplo) (Anderson 2004) (Peters 2007) (Sun 1998) (Thanedar 2004). Um resumo das principais propriedades dos moduladores positivos e negativos pode ser encontrado nas figuras 17a e 17b, respectivamente.

Figura 17 – Lista dos moduladores da polimerização de FtsZ e resumo das suas propriedades. (A) Representando o equilíbrio da formação do anel Z, os moduladores positivos estão escritos em verde, enquanto que os inibidores em vermelho. Modificado de Bisson-Filho 2009. (B) Resumo de alguns mecanismos já propostos para a regulação do estado de polimerização de FtsZ. extraído de Adams 2009.

1.5.1 – Moduladores positivos, os estabilizadores do anel Z

Dentre os moduladores positivos do anel Z, o primeiro a ser identificado tanto em *E. coli* como em *B. subtilis* e também o mais bem estudado é FtsA (Beall 1992) (Dai 1992). FtsA é uma ATPase da família da actina, que também pode formar filamentos e interage com o CTP de dos polímeros de FtsZ (Figura 18) (Szwedziak 2012) (Loose 2013). FtsA possui uma hélice anfipática em seu C-terminal, permitindo que recrute

FtsZ para a membrana (Pichoff 2005). Além disso, FtsA é importante para recrutar as proteínas mais tardias do divisomo ao anel Z (Rico 2004).

Figura 18 – FtsA também é um homólogo de actina capaz de formar filamento. (A) FtsA em presença de ATPγS cristaliza-se em forma de filamentos similares aos de MreB (Szwedziak 2012). (B) Confirmando os dados de estrutura, FtsA também apresenta filamentos por EM. Figuras adaptadas de Szwedziak 2012.

Atuando conjuntamente com FtsA está também ZipA (em *E. coli*). ZipA é uma proteína bitópica, com um domínio transmembrana e outro globular responsável pela interação com FtsZ (Mosyak 2000) (Moy 2000). Apesar de FtsA e ZipA possuírem o mesmo sítio de ligação em FtsZ e aparentemente funções redundantes *in vivo*, experimentos de reconstituição com vesículas *in vitro* mostraram que enquanto ZipA atua na estabilização e formação de feixes de FtsZ, FtsA aumenta a dinâmica dos polímeros (Hale et al., 2000) (Haney et al., 2001) (Ma 1999) (Loose 2013).

Apesar de não existir um homólogo para ZipA em *B. subtilis*, descobriu-se outra proteína com sobreposição de função com FtsA. SepF localiza-se no anel Z *in vivo* induz a associação de protofilamentos de FtsZ em forma de tubos que se assemelham aos microtúbulos (Hamoen 2006) (Ishikawa 2006) (Gündogdu 2011). Essa observação levanta a questão se tais moduladores, mesmo com certa redundância e sítios de interação similares (todos ligam na cauda CTP de FtsZ), estariam estabilizando polímeros no anel Z em arquiteturas diferentes e se essa regulação seria importante para a dinâmica do anel Z e também para o recrutamento dos outros componentes do maquinário de divisão.

Um segundo grupo de proteínas moduladoras é chamada de família Zap. Dentre elas, ZapA foi a primeira a ser descoberta em *B. subtilis*, porém pode ser encontrada em *E. coli* também, como uma supressora do efeito da superexpressão de MinD (um efetor negativo do anel Z) (Gueiros-Filho 2002). ZapA pode se associar em forma de dímeros ou tetrâmeros, e sua dimerização é essencial para sua função (Low 2004) (Small 2007) (Mohammadi 2009). Apesar de não ser uma proteína essencial, ela induz grandes mudanças no estado polimérico de FtsZ *in vitro*, aumentando a massa de proteína na fração polimérica (Gueiros-Filho 2002). ZapA é predita como importante para a associação lateral dos protofilamentos e também para ligação cruzada entre eles, porém detalhes de seu mecanismo de ação (bem como seu sítio de interação em FtsZ) continuam obscuros (Dajkovic 2010) (Bisson-Filho 2009).

Nos últimos anos outras proteínas Zap foram sendo identificadas com propriedades semelhante a ZapA. Ao contrário de ZapA, que está presente em um número considerável de bactérias, ZapB, ZapC e ZapD são proteínas exclusivas de *E. coli* que induzem a formação de grandes feixes de FtsZ (Durand-Heredia 2011) (Durand-Heredia 2012) (Hale 2011). Enquanto poucas informações estão disponíveis sobre os mecanismos de ZapC e ZapD, sobre ZapB se sabe que é recrutada por ZapA para o anel Z e forma um segundo anel interno à ele (Galli 2010) (Galli 2012).

Outra interessante proteína pertencente à família ZapA é FzIA de *C. crescentus* (Goley 2010). Além de FzIA se localizar no anel Z e suprimir a superexpressão de um modulador negativo (MipZ), como outros membros da família Zap, ela apresenta uma característica única que é organizar os feixes de FtsZ em estruturas helicoidais. Assim como no caso de SepF, essa transformação da ultraestrutura pode ser importante na regulação da formação do anel Z e da maturação do divisomo.

Além dos moduladores que atuam durante o crescimento vegetativo das células, *B. subtilis* e outras espécies que possuem algum tipo de diferenciação possuem também moduladores de FtsZ que atuam especificamente nesse processo, já que a divisão celular também é afetada por essa mudança no ciclo celular. *B. subtilis* quando exposto a condições drásticas como falta de nutrientes no ambiente, ativa uma via que leva a uma divisão assimétrica e à formação de uma forma latente: o esporo. O esporo é uma forma celular especializada que, além de sobreviver na ausência de nutrientes, é

capaz de resistir a inúmeras adversidades, como altas temperaturas e ataque de agentes oxidantes, solventes e enzimas digestivas, funcionando como uma carapaça de proteção para o material genético da bactéria (Stragier 1996).

O evento inicial da esporulação é a mudança de localização do anel Z da região central da célula para os pólos (Levin 1996), culminando em uma divisão assimétrica (uma célula mãe maior que morre em seguida e uma célula menor que se tornará o esporo propriamente dito). Este remodelamento envolve a formação transitória de um polímero de FtsZ em forma de espiral (Ben-Yehuda 2002) e é dependente da atividade dos fatores de transcrição Spo0A e σ^H , os reguladores que desencadeiam o processo de esporulação (Levin 1996). A ativação de Spo0A e o σ^H levam a um aumento da síntese de FtsZ através da indução do promotor P2 de seu gene (Gholamhoseinian 1992) (Gonzy-Tréboul 1992), além da indução de cerca de cem outros genes. Dentre eles, *spolIE* parece ser o único envolvido na formação do septo polar (Ben-Yehuda 2002) (Khvorova 1998). Mutantes sem este gene apresentam um atraso e uma diminuição da eficiência de formação do septo polar durante a esporulação (Barak 1996) (Ben-Yehuda 2002). O aumento do nível de FtsZ e a síntese de *SpolIE* são suficientes para causar a formação de septo polar em células vegetativas (Ben-Yehuda 2002). Uma possível hipótese para o papel de *SpolIE* seria que sua associação com FtsZ faria com que polímeros desta última se tornassem menos sensíveis a inibidores, permitindo assim a divisão assimétrica. Além de seu papel acessório na divisão polar,

SpolIE é uma serina fosfatase cuja atividade é essencial para a ativação de σ^F no pré-esporo (Hilbert 2004). Um esquema resumido do processo de esporulação está representado na figura 19.

Figura 19 – A esporulação em *B. subtilis* envolve uma reprogramação da expressão gênica. (A) Painel superior: micrografias de fluorescência usando um corante de membrana registrando cada etapa do desenvolvimento até a maturação do esporo. Painel central: fusão transcricional de GFP reportando a expressão do fator de σ^F apenas no esporo. membrana marcada e vermelho. Painel inferior: fusão transcricional de GFP reportando a expressão do fator de σ^E apenas na célula mãe. Membrana marcada em vermelho. (B) Modelo resumindo os resultados mostrados em A. Figuras adaptadas de Rudner 2001.

1.5.2 – Moduladores negativos, os inibidores do anel Z

Além dos moduladores positivos, existem também proteínas que desestabilizam a polimerização de FtsZ. Um dos principais inibidores da formação do anel Z é o chamado sistema Min. O sistema Min é formado principalmente por três proteínas em

B. subtilis: MinC, MinD, MinJ e DivIVA. MinC é o verdadeiro efetor da inibição ao anel Z no sistema (Dajkovic 2008a), sendo que ela interage com a ATPase MinD, que ajuda a localizar MinC na membrana através de sua hélice anfipática (Szeto 2002) (Hu 2003). MinD interage diretamente com MinJ, que é recrutado por DivIVA, que é capaz de reconhecer curvaturas específicas na membrana e assim limita a distribuição espacial do complexo MinCDJ aos pólos da célula (van Baarle 2011) (Rothfield 2005) (Ramamurthi 2009) (Eswaramoorthy 2011). Dessa forma, o sistema Min inviabiliza que o anel Z seja formado nos pólos, (Figura 20a) modelo confirmado pelo fenótipo do mutante minCD, que apresenta uma alta porcentagem de septos assimétricos e formação de minicélulas (Edwards 1997) (Marston 1999). A forma que MinC inibe a formação do anel Z ainda é uma discussão em aberto, principalmente pela possibilidade dos mecanismos de MinC de *E. coli* e *B. subtilis* serem diferentes, apesar de compartilharem sítios semelhantes em FtsZ (Shen 2009) (Shen 2010) (Shen 2011) (Blasios 2013) (Hernández-Rocamora 2013).

Um segundo regulador espacial da formação do anel Z é o sistema NO (oclusão do nucleóide). Observações de que, sob condições normais, o anel Z não se forma em regiões da célula ocupadas pelo cromossomo levaram à proposição de que esse sistema deveria existir para assegurar a integridade do material genético, impedindo a formação do anel nessas regiões (Figura 20b) (Woldringh 1991). Tanto em *B. subtilis* (Noc) como em *E. coli* (SlmA) foram identificadas proteínas que se ligam ao nucleóide

e inibem a formação do anel Z (Wu 2004) (Bernhardt 2005) (Tonthat 2011) (Tonthat 2013). Em conjunto com o sistema Min, é possível propor um modelo de como a seleção temporal e espacial da formação do anel Z costuma ser precisa entre diferentes células (Figura 20c).

Figura 20 – Modelo de ação do sistema Min e da proteína Noc, em *B. subtilis*. (A) DivIVA (círculos pretos) recruta MinD (cinza) para os pólos. MinD se liga a MinC (polígonos azuis), que por sua vez inibe a formação do anel Z (circunferência verde) na região. (B) Noc (círculos marrons) se liga ao longo do cromossomo (fitas pretas) e inibe a formação do anel Z (circunferência verde) no espaço ocupado pelo nucleóide. (C) Integração dos dois sistemas (Min e Noc), direcionando a formação do anel Z para a região medial da célula. Figura extraída de Bisson-Filho 2009.

EzrA é outro modulador que inibe a polimerização de FtsZ e foi identificado como um supressor de um alelo de FtsZ termossensível em *B. subtilis* (Levin 1999). EzrA é uma proteína com um domínio transmembrana e uma região “coiled coil” citoplasmática. EzrA encontra-se disperso por toda a membrana, porém possui alta afinidade pelo divisomo depois que o anel Z é formado. Cepas deletadas de *ezrA*

apresentam múltiplos anéis ao longo da célula (Levin 1999), indicando que EzrA deve atuar como um desestabilizador de FtsZ.

Um possível mecanismo de atuação de EzrA na citocinese é que ele seria uma importante peça para impedir a formação do anel Z ao longo de toda membrana citoplasmática. Como EzrA não desestabiliza polímeros de FtsZ já formados, ele pode localizar-se ao divisomo sem efeitos mais severos (Hausser, Levin et al., 2004). Assim como FtsA, SepF, ZipA e MinC, EzrA também interage com FtsZ através de sua cauda CTP (Singh 2007) (Król 2012) (Son 2013).

Além do controle basal do posicionamento do anel Z, estímulos externos também podem enviar sinais para a célula expressar moduladores e inibir a polimerização de FtsZ. Em culturas ricas em nutrientes, as células naturalmente aumentam a taxa de crescimento e se adaptam de acordo. UgtP (*B. subtilis*) e OpgH (*E. coli*) são capazes de inibir a formação do anel Z usando UDP-glicose como cofator para poder diminuir a taxa de divisão, dando tempo para que a replicação e a segregação dos cromossomos sejam completadas (Weart 2007) (Hill 2013). De fato, a ausência dessas proteínas causa um aumento na frequência da formação de anéis Z e uma diminuição do tamanho das células. Assim, tais inibidores seriam reguladores utilizados pelas células controlar a velocidade que os anéis Z estão sendo formados, podendo ser mais rápido ou mais devagar.

Outro inibidor de FtsZ que responde a um evento ocasional à célula é SulA. SulA foi uma das primeiras proteínas ligada ao controle de divisão identificada e mecanisticamente o inibidor mais bem estudado até o momento. SulA é uma proteína expressa em resposta à ativação do sistema SOS e inibe a divisão celular enquanto os danos ao DNA são reparados (Bi 1993) (Mukherjee 1998). A estrutura cristalográfica do complexo FtsZ:SulA é a única até o momento que mostra a associação de FtsZ com um inibidor (Cordell 2003). Através dela, observou-se que SulA interage diretamente com a alça T7 de FtsZ, obstruindo uma das interfaces de polimerização, sugerindo que SulA deveria ser ou um sequestrador ou um capeador de FtsZ (Figura 21). Após estudos bioquímicos, se esclareceu que SulA sequestra os monômeros de FtsZ, deslocando o equilíbrio para a despolimerização (Djakovic 2008b) (Chen 2012).

Figura 21 – Estrutura cristalográfica do complexo FtsZ:SulA. Um dímero de SulA está no meio de dois monômeros de FtsZ sequestrados, interagindo com ambos através de suas alças T7 (PDB 1OFU). Imagem retirada de Low 2003.

Durante a esporulação em *B. subtilis* é importante que ocorra a formação de apenas um único esporo por célula. Apesar de célula apresentar dois pólos disponíveis para a divisão assimétrica, apenas um é usado para a formação do septo na esporulação (Eichenberger 2001). Além disso, observa-se que a célula mãe nunca apresenta a formação de anéis Z após a formação do esporo (Rudner 2001). Para que isso aconteça, deveria existir algum inibidor que limitasse a formação de um segundo septo polar após a formação de um primeiro.

Recentemente foi descrito na literatura mais um modulador negativo do anel Z, um peptídeo de quarenta aminoácidos chamado MciZ (**M**other **C**ell **I**nhibitor of **F**ts**Z**), expresso sob controle do fator de transcrição de esporulação σ^E e que é responsável pela inibição da formação de um segundo divisomo na célula mãe após a formação do septo polar na esporulação (Figura 22) (Handler 2008).

Poucas informações estão disponíveis sobre o mecanismo molecular pelo qual MciZ inibe o segundo divisomo, porém existem evidências que MciZ se liga diretamente em FtsZ, inibe sua polimerização e consequentemente sua atividade GTPásica (Handler 2008). Experimentos também apontam que GTP e MciZ competem pelo mesmo sítio de ligação em FtsZ, propondo que MciZ inibe a polimerização de FtsZ por impedir a ligação do nucleotídeo (Ray 2013).

Com o objetivo de compreender melhor como MciZ inibe a polimerização de FtsZ, decidimos adotar abordagens genéticas, bioquímicas e estruturais para estudar a interação entre as duas proteínas.

Figura 22 – MciZ é um inibidor da formação do anel Z durante a esporulação em *B. subtilis*. (A) Células em crescimento vegetativo (membrana em vermelho) apresentam cada uma um anel Z (verde). (B) Após a superexpressão de MciZ as células não sintetizam septos, filamentam (membrana em vermelho) e nenhum anel Z é localizado, apenas FtsZ citoplasmático (verde). (C) MciZ é controlado pelo fator de transcrição especificamente expresso na célula mãe e é conservado entre os bacilares (que esporulam). (D)(E)(F) Células deletadas de *mciZ* apresentam frequentes anéis Z na célula mãe. Figuras extraídas de Handler 2008.

2 – Objetivos

No curso deste doutorado fixamos os seguintes objetivos:

- Estudar a interação entre FtsZ e MciZ, mapeando os sítios de interação entre as proteínas;
- Investigar os mecanismos da inibição da polimerização de FtsZ por MciZ
- Compreender o funcionamento de FtsZ à nível molecular e atômico.

3 – Resultados

3.1– FtsZ:MciZ, um complexo pouco usual

3.1.1 – Uma plataforma para a purificação do complexo FtsZ:MciZ

Para estudarmos a interação entre FtsZ e MciZ, desenvolvemos um sistema de coexpressão e copurificação do complexo FtsZ:MciZ. Extratos de células *E. coli* BL21 com plasmídios expressando ambos His₆-MciZ e FtsZ foram submetidos a cromatografia de afinidade a Ni²⁺ e o complexo purificado foi eluído em 250mM de imidazol e confirmado em um gel de tricina 16% pelas bandas de FtsZ (~40kDa) e His₆-MciZ (~8kDa) (Figura 23).

Figura 23 – Copurificação de FtsZ:MciZ por cromatografia de afinidade. T-Extrato Total; FT-Flow Through; E-Eluato. Todas as purificações foram realizadas em batelada com o mesmo procedimento, alterando apenas o tampão (entre purificação 1 e 2) e sem a expressão de MciZ (purificação 3).

Para confirmarmos que as duas proteínas estavam sendo eluídas juntas da coluna devido a sua interação, repetimos a purificação usando em paralelo dois extratos. O primeiro foi idêntico ao descrito acima, porém ao tampão foi adicionado 8M de uréia para quebrar a interação entre FtsZ e MciZ por desnaturação. Como a cauda de histidina não depende de nenhuma estrutura secundária para se ligar à coluna de Ni^{2+} , vimos que a única proteína eluída foi MciZ (Figura 23). O segundo extrato foi gerado a partir de células expressando apenas FtsZ. Como era esperado, não vimos nenhuma das proteínas no eluato, provando que a ligação de FtsZ à coluna não é inespecífica e sim dependente da interação com MciZ (Figura 23).

Também titulamos a concentração de uréia e determinamos que FtsZ continua eluindo juntamente com MciZ até uma concentração em torno de 4M de uréia, indicando que o complexo FtsZ:MciZ deve ser bastante estável (Figura 24).

Figura 24 – Copurificação de FtsZ:MciZ por cromatografia de afinidade em diversas concentrações de uréia. P-Complexo purificado usado como ponto de partida para todas as condições. Todas as purificações foram realizadas em batelada.

Um último controle para confirmar que a interação (e a formação do complexo) era real foi aplicar o eluato da cromatografia de afinidade em uma coluna de filtração em gel. Para isso, usamos duas colunas com resoluções diferentes (Superdex 200 e Superdex 75), sendo que em ambas conseguimos isolar o complexo estável (Figura 25).

Figura 25 – Purificação do complexo FtsZ:MciZ por cromatografia de exclusão por tamanho. Painel à esquerda: cromatograma com o pico referente ao complexo (seta preta). As frações obtidas pela filtração foram aplicadas em gel de eletroforese e após corados com azul de coomassie (painel à direita superior) ou nitrato de prata (painel à direita inferior). Em ambos os géis pode-se observar o complexo purificado.

Com o complexo purificado, pudemos investigar a estequiometria entre FtsZ e MciZ. Para isso, realizamos a eletroforese da fração resultante da filtração em gel e coramos o gel com sypro-ruby (Life technologies) (Figura 26). A vantagem de corantes fluorescentes como sypro-ruby é que eles coram homogeneamente diferentes proteínas, ao contrário do azul de coomassie, cujo grau de coloração depende do

tamanho e da sequência primária da proteína. Quantificando a fluorescência das bandas de FtsZ (2150) e MciZ (9540) no gel, e levando em conta a razão de tamanho de 5:1 entre as proteínas, respectivamente, pudemos concluir que a proporção FtsZ:MciZ no complexo é de 1:1.

Figura 26 – Eletroforese do complexo FtsZ:MciZ em gel de tricina 16%, corados com azul de coomassie e sypro-ruby. O complexo FtsZ:MciZ purificado foi aplicado em duas canaletas do mesmo gel, e cortado ao meio para serem corados separadamente.

Também aplicamos a plataforma de coexpressão e copurificação para investigar a especificidade de MciZ para FtsZ de outras espécies. Seleccionamos os FtsZs de *E. coli* e *S. aureus*, que junto com *B. subtilis* são as espécies em que FtsZ e seus parceiros são melhor estudados (Erickson 2010). A eletroforese nos mostrou que MciZ é capaz de interagir tão bem com SaFtsZ como com BsFtsZ, porém não com EcFtsZ

(Figura 27), sugerindo que talvez MciZ interaja apenas com FtsZs de bactérias gram-positivas.

Figura 27 – Coexpressão e copurificação dos complexos EcFtsZ:MciZ e SaFtsZ:MciZ. EcFtsZ não foi copurificada com MciZ, porém a afinidade de MciZ por SaFtsZ mostrou-se comparável à pelo BsFtsZ.

3.1.2 – Determinação da constante de dissociação entre FtsZ e MciZ

Usamos espectroscopia de fluorescência para determinar a constante de dissociação (K_d) do complexo FtsZ:MciZ. Fazendo valer de dois triptofanos presentes na estrutura de MciZ (Trp17 e Trp36) e da ausência deles em FtsZ, nós observamos que a emissão de fluorescência de MciZ sofre uma diminuição (quenching) de 75% na presença de FtsZ (Figura 28).

A partir da titulação de FtsZ em uma concentração fixa de MciZ (50nM), determinamos que o K_d da interação entre as duas proteínas é 150 ± 50 nM. Esse

resultado mostra que a interação entre FtsZ e MciZ é uma das mais fortes, ao lado de SlmA, já reportadas até o momento entre FtsZ e outras proteínas (Tonthat 2013) (Chen 2012) (Hernández-Rocamora 2013) (Singh 2007) (Kenny 2003). Essa medida corrobora os resultados da sessão anterior, mostrando a formação de um complexo estável. Essa constante também é próxima de 300nM, valor recentemente relatado na literatura para o Kd do complexo FtsZ:MciZ (Ray 2013).

Figura 28 – Estimativa da constante de dissociação (Kd) da interação entre FtsZ e MciZ. Espectros da emissão de fluorescência intrínseca de MciZ (50nM) foram registrados em diversas concentrações de FtsZ (painel esquerdo) e então plotados em um gráfico [FtsZ] x Fmáx.

3.1.3 – Um sítio pouco usual

Sendo a região CTP de FtsZ um sítio preferencial para a ligação de moduladores de polimerização, nós resolvemos investigar se ela não seria importante para a interação entre FtsZ e MciZ. Usando nossa plataforma de coexpressão, testamos se uma construção de FtsZ sem os últimos trinta resíduos ainda seria capaz

de ser copurificado juntamente com His₆-MciZ. A Figura 29 mostra que tanto a proteína integral como a construção truncada, sem o CTP, são coeluídas com MciZ, sendo que nenhuma diferença significativa entre a intensidade das bandas foi observada. Isso indica que a cauda CTP não é importante para a interação com MciZ.

Figura 29 – A região CTP não é o sítio de ligação de MciZ em FtsZ. Coexpressão e copurificação da versão CTP Δ 30 de FtsZ foi idêntica à da proteína selvagem.

Já que a cauda CTP não é o sítio de ligação de MciZ a FtsZ, consideramos uma segunda possibilidade. Embasados na possibilidade de MciZ se ligar no mesmo sítio de GTP (Handler 2008) (Ray 2013), nós realizamos um ensaio de competição entre MciZ e GTP comparando a afinidade entre o análogo fluorescente mant-GTP [2'-/3'-O-(N'-Metilantraniloil)guanosina-5'-O-trifosfato] e FtsZ isolado e o complexo FtsZ:MciZ. Assim, determinamos que as constantes de dissociação entre mant-GTP:FtsZ e mant-GTP:Complexo são muito semelhantes ($1,7 \pm 0,2 \mu\text{M}$ e $1,4 \pm 0,3 \mu\text{M}$, respectivamente, Figura 30).

Figura 30 – MciZ não compete com GTP pelo mesmo sítio em FtsZ. (A) Titulação do mant-GTP (100nM) com FtsZ purificado. (B) Titulação do mant-GTP (100nM) com o complexo FtsZ:MciZ.

Nossos resultados são discrepantes com relação a experimentos recentemente publicados (Ray 2013), que apontam que MciZ compete com GTP pelo mesmo sítio. Contudo, acreditamos que nossos resultados são corroborados pela estrutura do complexo a ser discutida adiante.

3.2 – Triagem genética de mutantes *ftsZ*

Como os experimentos acima mostraram que MciZ não se liga aos sítios usuais em FtsZ, optamos por realizar uma triagem genética que pudesse indicar qual seria o sítio de ligação de MciZ. Tais triagens já se mostraram efetivas em outros estudos do nosso grupo tanto em identificar sítios de interação de outros moduladores como para isolar mutantes com fenótipos interessantes a serem caracterizados (Bisson-Filho 2009) (Wagner-Herman 2012) (Blasios 2013).

3.2.1 – Estratégia para seleção de mutantes *ftsZ*

Para encontrar mutantes que forneçam pistas do sítio de interação de MciZ em FtsZ, usamos uma biblioteca de clones de *ftsZ* mutantes feita por “error prone PCR”, cada um contendo uma ou mais mutações aleatórias ao longo do gene (Bisson-Filho e Gueiros-Filho 2009).

A biblioteca usada foi construída e caracterizada em nosso laboratório (Bisson-Filho e Gueiros-Filho 2009) (Wagner-Herman 2012) (Blasios 2013) e foi usada para transformação de células competentes de *B. subtilis*, onde o alelo mutante de *ftsZ* (sem o códon de iniciação ATG) substitui a cópia selvagem no genoma por recombinação simples (Figura 31). A integração do plasmídeo resulta em duas cópias de *ftsZ* no genoma, uma endógena selvagem e outra carregando as mutações da biblioteca, mas somente a cópia mutante integrada irá ser traduzida, por ser a única com os sinais necessários, como RBS (**R**ibosome **B**inding **S**equences) e códon de iniciação ATG.

A partir dessa biblioteca, procuramos mutações em FtsZ que rompessem a interação com MciZ. Uma forma de se fazer isso foi utilizar uma cepa (AB19, Materiais e Métodos) que continha uma cópia extra de *mciZ* sob o controle de um promotor indutível por xilose. No caso de MciZ, um modulador que desestabiliza o anel Z *in vivo*, sua superexpressão causa filamentação e morte às células de *B. subtilis*. Portanto a estratégia foi baseada em transformar a biblioteca de mutantes na cepa especificada,

plaqueando as células na presença do indutor para a superexpressão de MciZ (xilose) e isolando as colônias que se mostrassem resistentes (Figura 32).

Figura 31 – Esquema da substituição da cópia selvagem de *ftsZ* por um mutante. A cópia sem o códon de iniciação de tradução de *ftsZ* da biblioteca (*ftsZ*^{*}) foi transformada em *B. subtilis* e integrada por recombinação simples no *locus* selvagem de *ftsZ*. A recombinação, irá substituir a cópia endógena pela cópia da biblioteca. A cópia endógena, como perderá o códon de iniciação de tradução no processo e, assim, não será expressa em forma de FtsZ. Figura retirada de Bisson-Filho 2009.

Figura 32 – Esquema da estratégia da triagem genética. Em situação normal (*ftsZ* selvagem) a superexpressão de MciZ leva as células à morte (painel superior). Porém, ao ser introduzido um supressor (por exemplo, uma mutação em *ftsZ* que rompa a interação entre FtsZ e MciZ), as células voltam à crescer mesmo na presença da superexpressão do inibidor (painel inferior).

3.2.2 – Obtenção e identificação dos mutantes *ftsZ*

Durante a triagem foram obtidas aproximadamente $1,5 \times 10^5$ colônias oriundas da transformação da biblioteca de mutantes *ftsZ* na cepa AB19. Tais colônias transformantes foram distribuídas em 20 placas com 1% de xilose para seleção.

Observamos o crescimento de 168 colônias resistentes à superexpressão de MciZ. Estas colônias foram estriadas em placas frescas contendo xilose, seu DNA genômico foi extraído e retransformado novamente na cepa AB19 para confirmar o fenótipo encontrado. Desses candidatos apenas 90 continuaram a crescer na presença de superexpressão de MciZ. Esse alto número de falsos positivos pode ser explicado pelo excesso de transformantes por placa (cerca de 7500), deixando a seleção menos eficiente, e também por mutações fora de *ftsZ* que poderiam estar conferindo tal resistência às células (por exemplo, mutações em *mciZ* que abolissem sua atividade).

Considerando-se apenas os verdadeiros positivos, a frequência de mutantes resistentes foi de 1 a cada 1700 transformantes (90 resistentes em $1,5 \times 10^5$ transformantes). Os mutantes resistentes foram sequenciados, e os aminoácidos alterados foram determinados (Tabela 1).

Tabela 1 – Mutações encontradas na triagem genética

T45M (9)	G107C (4)	T109I (3)	T111A (1)	G112D (3)
A118V (1)	E139G (1)	I162T (1)	I293T (15)	G112S (5)
E305D (1)	D213H (1)	I201S (2)		

Tabela 1 – Mutações encontradas na triagem genética. As substituições encontradas nos sequenciamentos dos mutantes selecionados foram catalogados pelo resíduo mutado e também pela frequência (número entre parênteses).

3.2.3 – Mutantes resistentes e dependentes de MciZ

Para iniciarmos a caracterização dos mutantes, decidimos focar apenas naqueles que carregavam apenas uma substituição ao longo de *ftsZ*.

Ao estriarmos em placas frescas, observamos que entre os treze mutantes, sete deles (*ftsZ-T45M*, *ftsZ-T111A*, *ftsZ-G112D*, *ftsZ-I162T*, *ftsZ-I201S*, *ftsZ-I293T* e *ftsZ-E305D*) mostraram-se indiferentes à superexpressão de MciZ. Além disso, nas placas sem xilose as colônias tinham a aparência semelhante ao controle selvagem, indicando que as mutações não devem ter alterado significativamente a atividade de FtsZ *in vivo* (Figura 33).

Por outro lado, os seis mutantes restantes (*ftsZ-G107C*, *ftsZ-T109I*, *ftsZ-G112S*, *ftsZ-A118V*, *ftsZ-E139G* e *ftsZ-D213H*) apresentaram uma dependência da superexpressão de MciZ. Nas placas sem xilose, ou seja, em uma situação de ausência de MciZ, as células não sobrevivem. Já nas placas com xilose, em que há a superexpressão de MciZ, elas crescem aparentemente saudáveis (Figura 33). Portanto

tais mutações prejudicam a função de FtsZ, e a presença de MciZ resgatou sua atividade.

Figura 33 – Estrias dos 13 mutantes *ftsZ* selecionados em placas LB com e sem 1% de xilose (superexpressão de MciZ).

Tal observação foi de fato inesperada, já que à primeira vista um efector negativo da divisão bacteriana estaria agora resgatando a viabilidade desses mutantes. Os mutantes de cada classe foram sumarizados na Tabela 2. Apesar do mutante *ftsZ*-*E139G* ter mostrado uma melhora em seu crescimento nas placas com xilose, as colônias mostraram-se significativamente debilitadas (Figura 33). Por essa razão não incluímos este mutante na continuidade de nossas futuras análises.

Para investigar se a dependência de MciZ em alguns mutantes era algo ligado a divisão em si, e não a algum efeito secundário desconhecido da superexpressão de MciZ, nós utilizamos microscopia de fluorescência aliada a um corante de membrana

(FM5-95) para observar a frequência de septação de células da cepa *ftsZ^{WT}* (AB19) e da cepa de um dos mutantes dependentes, *ftsZ-G112S* (AB95) (Figura 34).

Tabela 2 – Classes fenotípicas dos mutantes *ftsZ*

Resistentes		Dependentes	
E305D	I201S	A118V	D213H
I293T	G112D	G107C	G112S
I162T	T111A	T109I	E139G
T45M			

Tabela 2 – Classes fenotípicas dos mutantes *ftsZ*. Segundo as estrias da figura 33, nós classificamos os mutantes selecionados na triagem como resistentes a MciZ (sobrevivem tanto com como sem superexpressão de MciZ) e dependentes de MciZ (sobrevivem apenas na presença da superexpressão de MciZ).

Na ausência da superexpressão de MciZ (sem xilose), foi observado que as células contendo o alelo selvagem de *ftsZ* se dividiam normalmente, enquanto que aquelas carregando o alelo dependente *ftsZ-G112S* não apresentavam nenhum septo. Enquanto que nas células superexpressando MciZ (com xilose) observamos justamente o contrário, uma severa filamentação na cepa selvagem e um retorno da septação no mutante *ftsZ-G112S* (setas amarelas).

Mesmo que MciZ não tenha resgatado a frequência de septação do mutante dependente completamente, tal aumento deve ser o motivo da sobrevivência dessas células em comparação com sua morte na ausência da superexpressão de MciZ, aonde praticamente nenhum novo septo foi observado.

Figura 34 – O mutante G112S volta a dividir com a superexpressão de MciZ. Microcopia de fluorescência usando corante de membrana FM5-95 e as cepas selvagem e mutante G112S, crescidas em LB (com e sem 1% de xilose).

3.2.4 – Mapeamento dos resíduos mutados na estrutura de FtsZ

Para buscarmos uma hipótese que explicasse a identificação de mutantes resistentes e dependentes do efeito de MciZ, mapeamos a posição dos resíduos mutados na estrutura de FtsZ. Além de fornecer indícios que expliquem a diferença de comportamento entre os mutantes, uma possível tendência na localização desses resíduos poderia indicar o possível sítio de ligação de MciZ em FtsZ.

Duas diferentes estruturas de FtsZ depositadas no banco de dado de estrutura de proteína (“RCSB Protein Data Bank”) foram utilizadas. A primeira é a estrutura canônica do monômero de *Bacillus subtilis* (PDB 2VAM, Oliva 2007) e a segunda é a estrutura de *Staphylococcus aureus* (PDB 3VOA, Matsui 2012). A última estrutura, cujo FtsZ foi cristalizado na presença de GDP na forma de protofilamento (aqui

representado na forma de um dímero), tem a vantagem de apresentar a proteína na conformação polimérica e assim podemos observar os resíduos que estão enterrados na superfície de contato FtsZ-FtsZ e aqueles que estão expostos à superfície do protofilamento (Figura 35).

Figura 35 – Mapeamento dos resíduos mutados encontrados na triagem. Usando o dímero de MjFtsZ (*M. jannaschii*, PDB 1W5B) marcamos os resíduos que causaram resistência à MciZ (vermelhos), dependência de MciZ (azuis) e o único que encontramos mutações que causaram tanto resistência como dependência de MciZ (G112DS, verde).

Os resíduos marcados em vermelho mostram mutações que acarretaram uma resistência simples (células crescem tanto nas placas com indução como sem indução) e os resíduos marcados em azul relacionam os mutantes que causaram dependência de MciZ. O único resíduo marcado em verde refere-se ao aminoácido Gly112, que foi o único identificado tanto como resistente (*ftsZ-G112D*) como dependente (*ftsZ-G112S*). A primeira impressão ao observar a posição dos resíduos assinalados é de que boa parte

deles se localiza na superfície de contato entre as subunidades do dímero de FtsZ, na vizinhança do sítio de ligação de GTP (marcado em laranja), com exceção dos resíduos Ile162 e Glu305. O resíduo Ala118 também não parece fazer parte da interface entre os dois monômeros de FtsZ, porém ele faz parte da mesma estrutura secundária (hélice H4) que outros mutantes desta triagem (Gly107, Thr109, Thr111, Gly112) que fazem parte da interface e também estão na vizinhança imediata do sítio de ligação de GTP.

Levando em conta o mapeamento das mutações na estrutura de FtsZ, podemos considerar duas hipóteses. A primeira de que a região nas proximidades da hélice H4, na interface entre as subunidades de FtsZ, deve ser o sítio de ligação de MciZ a FtsZ. Essa hipótese se torna pouco provável em face dos resultados anteriores, já que essa região é muito próxima ao sítio de ligação de GTP e dificilmente MciZ se ligaria ali sem perturbar a ligação do nucleotídeo. A segunda hipótese seria que tais mutações não estão interferindo na interação entre FtsZ e MciZ, e sim causando um efeito na polimerização de FtsZ (ou seja, na interação entre FtsZ e FtsZ).

Trabalhos recentemente publicados (Dajkovic 2008b) (Blasios 2013) encontraram mutantes de FtsZ que, apesar de serem resistentes ao efeito dos inibidores de polimerização SulA e MinC em *E. coli* e *B. subtilis*, respectivamente, continuam a interagir com o modulador. Coincidentemente, esses mutantes, assim como alguns presentes neste trabalho, possuem substituições em resíduos da interface

entre as subunidades de FtsZ (FtsZ-D212G, FtsZ-D209N e FtsZ-T111A, por exemplo), e apresentaram uma diminuição na atividade GTPásica (Blasios 2013) (Lu 2001) (Stricker 2003) (Redick 2005). Uma possível explicação para esse efeito é que as mutações estariam alterando as afinidades entre as subunidades do anel Z, gerando um efeito de estabilização dos polímeros. Assim, em casos onde um modulador compete com FtsZ em seu sítio de polimerização (uma hipótese ainda possível no caso de MciZ), estes mutantes de FtsZ teriam sua afinidade por si mesmos aumentada, ganhando a competição com MciZ e diminuindo assim o efeito negativo provocado pelo modulador.

3.2.5 – Resistência e dependência cruzada a outros inibidores

Se, como levantado na seção anterior, as mutações encontradas conferiram resistência à superexpressão de MciZ não por abolir a interação entre as duas proteínas, mas por deixar os protofilamentos de FtsZ mais estáveis, é possível que estes mutantes também sejam resistentes à superexpressão de outros moduladores negativos. Além de confirmar essa possibilidade, nós também poderíamos reduzir o número de candidatos aptos a caracterização *in vitro*. Assim, nós testamos se FtsZ mutantes seriam resistentes à superexpressão de MinD e ZapA-MTS (Tabela 3).

Nos ensaios com superexpressão de MinD, a indução de MinD com 500 μ M de IPTG matou todas as células carregando o alelo *ftsZ* selvagem. O mesmo foi

observado na maioria dos mutantes, exceto nos mutantes que carregavam os alelos *ftsZ-T111A*, *ftsZ-I293T*, *ftsZ-I162T* e *ftsZ-E305D*.

ZapA-MTS é uma versão do modulador positivo ZapA construída em nosso laboratório que se mostrou letal às células ao ser superexpressa. Sua superexpressão causa o mesmo efeito de MciZ e MinD nos ensaios de placa (Bisson-Filho 2009). O mesmo ensaio foi realizado e todos os mutantes mostraram-se sensíveis a superexpressão de ZapA-MTS, com exceção do *ftsZ-T111A* e *ftsZ-T45M*.

Destas cinco mutações que se mostraram “promíscuas” com relação a resistência aos três moduladores testados (MciZ, MinCD e ZapA-MTS), apenas as presentes nos resíduos Asp305 e Thr45 não foram encontradas e identificadas anteriormente por nosso grupo em outras triagens realizadas (Bisson-Filho 2009) (Blasios 2013).

O fato de alguns dos mutantes continuarem sensíveis a outros moduladores (ZapA-MTS e MinCD) corrobora a hipótese de que MciZ deve estar competindo com FtsZ pela interface de polimerização do próprio FtsZ. Porém, existe a possibilidade desses mutantes, mesmo sendo sensíveis aos inibidores testados, ainda não apontarem para o sítio de MciZ em FtsZ.

Tabela 3 – Resistência e dependência cruzada

Alelos FtsZ	Superexpressão do Inibidor		
	MciZ	ZapA-MTS	MinCD
WT	●	●	●
T111A	●	●	●
T109I	●	●	●
A118V	●	●	●
G112S	●	●	●
D213H	●	●	●
G107C	●	●	●
G112D	●	●	●
I201S	●	●	●
I162T	●	●	●
I293T	●	●	●
T45M	●	●	●
E305D	●	●	●

Tabela 3 – Resistência e dependência cruzadas dos mutantes selecionado na triagem contra MciZ à outros inibidores de FtsZ. Os testes foram feitos tanto por crescimento líquido e inóculo, como por estrias diretamente nas placas LB. Após incubação por 12 horas, checkou-se o crescimento e a viabilidade das células frente à selvagem. Círculo vermelho: morte; círculo verde: sobrevivência e círculo azul: resgate pela superexpressão do inibidor.

Outra observação é que nenhum dos dois inibidores (MinD e ZapA-MTS) foi capaz de restaurar a viabilidade dos mutantes dependentes de MciZ, apontando que a dependência, ao contrário da resistência, deve ser especificamente ligada ao efeito de MciZ sobre FtsZ. Essa é uma evidência de que o mecanismo de MciZ deve ser substancialmente diferente de outros inibidores conhecidos.

3.2.6 – Interação entre os mutantes e MciZ *in vitro*

A partir da análise da Tabela 3, foram selecionados os mutantes FtsZ-T111A (resistente a MciZ e a todos inibidores testados), FtsZ-G112D e FtsZ-I201S (resistentes

a MciZ mas sensíveis aos outros inibidores), FtsZ-G112S e FtsZ-D213H (dependentes de MciZ) e FtsZ-E305D (único mutante não mapeado na interface de polimerização de FtsZ) e usamos a plataforma de coexpressão e copurificação detalhada na seção 3.1.1 para testar a interação deles com MciZ.

Nenhum dos mutantes selecionados para o ensaio perturbaram a interação entre FtsZ e MciZ (Figura 36). Aparentemente a proporção entre FtsZ e MciZ copurificadas continua sendo a mesma comparado ao FtsZ selvagem.

Figura 36 – Coexpressão e copurificação de His₆-MciZ com mutantes de FtsZ. Os mutantes de FtsZ (incluindo o selvagem) foram copurificados por cromatografia de afinidade, com as frações eluídas da coluna aplicadas em géis de tricina 16%.

A conclusão que chegamos a partir desse resultado é que nenhum desses resíduos fazem parte do sítio de ligação de MciZ em FtsZ e que a resistência e dependência de MciZ deve ser um fenômeno indireto, possivelmente uma mudança na propriedade de polimerização de FtsZ que confere a capacidade do anel Z persistir

dentro das células mesmo na presença (ou por conta dela, no caso dos dependentes) de MciZ.

3.2.7 – Caracterização dos mutantes dependentes *in vitro*

Mesmo a triagem genética falhando em apontar o sítio de interação de MciZ em FtsZ, os mutantes que obtivemos têm valor para se entender melhor o mecanismo de ação de MciZ sobre FtsZ e o funcionamento de FtsZ por si.

Escolhemos caracterizar bioquimicamente o mutante FtsZ-T111A como representante dos resistentes, já que se trata de um mutante já conhecido e inicialmente caracterizado em nosso laboratório (Blasios 2013) (Bisson-Filho 2009) e os mutantes FtsZ-G112S e FtsZ-D213H como representantes dos dependentes.

O primeiro experimento foi purificar e medir a atividade enzimática dos mutantes selecionados. A Figura 36 mostra que tanto o mutante resistente (T111A) como os dependentes (G112S e D213H) possuem baixa atividade enzimática, comparados a proteína selvagem ($16\pm 5\%$, $13\pm 3\%$ e $12\pm 7\%$, respectivamente), porém apenas os mutantes dependentes mostraram um aumento significativo na atividade quando incubados com uma proporção equimolar de MciZ ($23\pm 6\%$, $46\pm 10\%$ e $43\pm 12\%$, respectivamente). Esse aumento na atividade pode estar relacionado à volta da viabilidade dos mutantes dependentes, ou seja, o retorno da atividade GTPásica pode

ser um indício de que o efeito de MciZ sobre FtsZ deve estar causando o resgate da formação dos polímeros.

Figura 36 – Efeito de MciZ na atividade GTPásica dos mutantes de FtsZ. Os ensaios foram feitos a partir de 10 μ M de FtsZ apenas (barras pretas) e 10 μ M de FtsZ e 10 μ M de MciZ sintético (barras cinzas).

Sendo a atividade GTPásica de FtsZ dependente de polimerização, podemos deduzir que existem duas formas pelas quais que FtsZ não apresentaria atividade enzimática: ausência de polimerização ou ausência de hidrólise de GTP mesmo com a formação de polímeros. Para determinarmos qual dessas hipóteses estaria ocorrendo com os mutantes dependentes, nós usamos o espalhamento de luz a 90° para medir a polimerização de FtsZ, na ausência e presença de MciZ.

Através da quantificação das curvas de espalhamento (Figura 37) observou-se que tanto o mutante T111A (272 $\pm$ 12%) como o D213H (448 $\pm$ 13%) acumularam muito mais polímero do que a proteína selvagem (100 $\pm$ 14%). Porém, quando MciZ é

adicionado às reações com as proteínas mutantes, o sinal cai para níveis similares ao FtsZ-WT ($124 \pm 9\%$ para FtsZ-T111A e $119 \pm 12\%$ para FtsZ-D213H).

Figura 37 – Polimerização dos mutantes D213H e T111A por espalhamento de luz a 90°. A polimerização de 10 μ M de FtsZ foi registrada com e sem 5 μ M de MciZ (esquerda). Os valores quantificados também foram plotados em um gráfico de barras (pretas para FtsZ sozinho e cinza para FtsZ mais MciZ).

Porém, pudemos observar um cenário diferente com relação o mutante dependente G112S. Apesar do mutante G112S conseguir polimerizar na ausência de MciZ, a polimerização é ainda maior na presença do peptídeo. A polimerização dependente de MciZ do mutante G112S também se mostrou específica ao nucleotídeo GTP, e nada aconteceu quando era adicionado GDP ou MciZ apenas com a proteína mutante (Figura 38).

Figura 38 – Polimerização do mutante G112S por espalhamento de luz a 90°. A polimerização de 10 μ M de FtsZ foi registrada com e sem 5 μ M de MciZ, assim como na Figura 37.

Usando essas informações, pode-se inferir 3 conclusões: (a) os mutantes T111A e D213H são apenas mais resistentes ao efeito de MciZ, comparativamente a proteína selvagem, porém ainda são parcialmente sensíveis ao peptídeo; (b) o mutante D213H depende de MciZ *in vivo* para sobreviver provavelmente porque acumula quantidades anormalmente altas de FtsZ polimérico dentro da célula, ou porque forma uma estrutura polimérica disfuncional, impossibilitando a formação correta ou mesmo a constrição do anel Z; (c) o mutante G112S apresenta alguma deficiência de polimerização que é compensada por MciZ, o que corrobora o fenótipo deste mesmo mutante *in vivo*.

3.3 – Estrutura MciZ e do complexo FtsZ:MciZ

Como complemento à abordagem genética, utilizamos também biologia estrutural para tentar identificar os sítios de interação entre MciZ e FtsZ.

3.3.1 – Estrutura 3D de MciZ por RMN

Para entender melhor a natureza de MciZ e assim a sua interação com FtsZ, a estrutura terciária do peptídeo sintético foi resolvida por RMN ^1H (Ressonância Magnética Nuclear) sem marcação isotópica. Através do trabalho da pós-doutoranda Dra. Patrícia Castellen, todos os resíduos foram assinalados através dos espectros de TOCSY (Figura 39a) e NOESY (Figura 39b). Um total de 100 confôrmeros randômicos foram anelados e após o ciclo final, as vinte estruturas de menor “target function” foram selecionadas para representar MciZ (figura 40) (Tabela 4) (Materiais e Métodos).

Figura 39 – Espectros obtidos para a resolução da estrutura de MciZ. (A) Espectro de TOCSY com os sinais assinalados. (B) Ampliação de um espectro de NOESY com os sinais assinalados.

Figura 40 – Conjunto de 20 confôrmeros de MciZ.

Tabela 4 – Estatísticas das estruturas de MciZ

NMR-derived restraints	
¹ H- ¹ H distance restraints	279
Intraresidue	125
Sequential (i-j =1)	88
Medium range (1< i-j ≤4)	46
Long range (4< i-j)	20
Distance restraints per residue (16 to 27 and 32 to 35)	19.9
Restraint violations	
Ave. max. upper dist. viol. (Å)	0.09 ± 0.01
Ave. max. van der Waals viol. (Å)	0.2 ± 0.05
Cyana target function (Å ²)	0.17 ± 0.12
Residue distribution in Ramachandran plot (%)	
Most favored regions	70.7
Additional allowed regions	29.1
Generously allowed regions	0.1
Disallowed regions	0.0
Structure convergence (Å)	
Main chain atoms RMSD (residues 16-27)	0.35 ± 0.15
All heavy atoms RMSD (residues 16-27)	1.47 ± 0.16

O peptídeo MciZ isolado apresenta-se parcialmente desenovelado em solução (fosfato 50mM pH 4,0), com a formação de duas α -hélices compostas pelos resíduos de Ala16 a Gly27, e de Tyr32 a Asp35. A α -hélice H1 sendo a estrutura mais organizada, além de um dos triptofanos usados como repórter para a interação estar localizado dentro dela, sugere que provavelmente ela é pelo menos uma das regiões de interação com FtsZ.

3.3.2 – Resíduos de MciZ Importantes para Interação com FtsZ

Para testar a hipótese que a alfa-hélice H1 (entre os resíduos Ala16 e Gly27 de MciZ) fosse o sítio de ligação de FtsZ, a Dra. Patrícia Castellen realizou experimentos de diferença de transferência de saturação (STD) entre MciZ sintético e o domínio C-terminal de FtsZ. Neste experimento, a interação é monitorada observando-se mudanças no espectro do ligante (MciZ) após a saturação das ressonâncias dos núcleos da proteína (FtsZ). Apenas os núcleos do ligante que estiverem em contato direto com a proteína terão sinal no espectro.

Muitos dos sinais de MciZ apareceram no espectro após a transferência de saturação, o que indicou que uma grande quantidade de resíduos do peptídeo poderia estar em contato com FtsZ. Apesar disso, foi possível determinar os sinais que mais sofreram alterações e que podem ser o ponto de início de contato entre os ligantes. Como os resíduos identificados foram a Ile19, a Lys22 e a Tyr26, que se encontram na

primeira alfa-hélice de MciZ (figura 41), tal resultado é mais uma evidência de que essa estrutura deve ser o sítio de ligação em MciZ.

Figura 41 – Experimentos de STD para mapeamento dos resíduos importantes de MciZ para a interação com FtsZ. (A) Ampliação da sobreposição de espectros de TOCSY e STD-TOCSY de MciZ. O espectro de TOCSY está representado em preto e o espectro de STD-TOCSY em azul. Os sinais correspondentes aos resíduos I19, K22 e Y26 estão identificados. (B) Representação da hélice H2 de MciZ e dos resíduos I19, K22 e Y26 (amarelo).

Para confirmar o resultado gerado pelo STD, nós seccionamos a sequência de MciZ em 3 pedaços, gerando 5 construções em sobreposição (Figura 42) e estes foram testados por espalhamento de luz a 90° para identificar os fragmentos que ainda conservariam atividade inibitória da polimerização de FtsZ.

O único peptídeo que manteve atividade foi o peptídeo 4 (resíduos 1 ao 27), que compreende o N-terminal desenovelado mais a alfa-hélice H1 de MciZ (Figura 42). Como o peptídeo 2 (apenas o fragmento correspondente a alfa-hélice H1) não apresentou nenhuma atividade, conclui-se que a hélice H1 sozinha não é suficiente

para a interação/função, ou essa construção apenas não possui estrutura terciária corretamente enovelada.

Figura 42 – Teste da atividade inibitórias das versões truncadas de MciZ. Detalhadamente de cada construção está no painel à esquerda. Espalhamento de luz à 90° de 10 μM de FtsZ e 5 μM de cada peptídeo sintético foram usados (painel à direita).

3.3.3 – Estrutura cristalográfica do complexo FtsZ:MciZ

A fim determinar o sítio de ligação de MciZ em FtsZ, nós cristalizamos e resolvemos a estrutura cristalográfica do complexo FtsZ:MciZ. Para isso, nosso grupo estabeleceu uma colaboração com o laboratório da Dra. Andrea Dessen, do Institut de Biologie Structurale (IBS) em Grenoble. Através do trabalho da pós-doutoranda Dra. Karen Fulan Discola, utilizamos nossa plataforma de coexpressão e copurificação do complexo FtsZ:MciZ, porém dessa vez utilizamos uma versão de FtsZ que continha apenas o domínio globular (FtsZ¹²⁻³¹⁵). Essa construção já foi descrita na literatura

como uma versão de FtsZ mais apropriada para cristalização, pois não possui as caudas flexíveis CTP e NTP (Oliva 2007).

Obtivemos cristais (Figura 43a) e a estrutura tridimensional do complexo foi resolvida a partir deles (Figuras 43b e 43c). A estrutura foi resolvida por substituição molecular usando uma estrutura já depositada no banco como referência (PDB 2XVY) e o resultado foi a geração de 9 moléculas FtsZ por unidade assimétrica, sendo que em todas pode-se observar a densidade eletrônica correspondente a MciZ, com uma resolução atômica de 3,2Å. A tabela 5 mostra os parâmetros obtidos e as estatísticas da coleta da difração do cristal que possibilitou a resolução da estrutura.

Figura 43 – Cristalização e resolução da estrutura do complexo FtsZ:MciZ. (A) exemplo de um dos cristais obtidos. (B)(C) Estrutura do complexo (FtsZ em verde e MciZ em vermelho).

Tabela 5 – Estatísticas da coleta de dados da difração de raios x

Data collection	
Wavelength (Å)	1.0044
Space group	P6 ₅ 22
Unit cell parameters (Å)	a = b = 167.36, c= 528.64
Resolution (Å)	3.19 (3.39-3.19)
Number of observed/unique reflections	1,250,520/72,155
Completeness (%)	97.50 (91.20)
Rmeas	5.90 (38.20)
I/σ (I)	62.64 (12.70)
Refinement	
Rwork	0.232
Rfree	0.292
rmsd _{BOND} (Å)	0.011
rmsd _{ANGLE} (°)	1.422
Mean B factor (Å ²)	93.80
No. of protein atoms	19,145
Ramachandran analysis	
Residues in favored regions (%)	96.0
Residues in allowed regions (%)	3.9
Outliers (%)	0.1

Observando a estrutura do complexo, percebemos que MciZ (em vermelho) interage com domínio C-terminal globular de FtsZ (em verde) através da alfa-hélice H10 e da folha-beta S9. Isso corrobora os nossos dados que apontam que sítio não coincide nem com o sítio de ligação a GTP ou com o CTP (seção 3.1.3).

Comparando a estrutura de MciZ resolvida por RMN com a estrutura cristalográfica, pode-se notar que ambas são similares. Ambas possuem alfa-hélices nas mesmas posições (uma com quatro e outra com apenas uma volta), sendo a

grande diferença a mudança de conformação no N-terminal, ocorrendo uma complementação à folha-beta S9 de FtsZ com mais duas fitas, por parte de MciZ (Figura 44).

Figura 44 – MciZ assume uma conformação terciária ao se ligar a FtsZ, complementando a folha-β B9 com mais duas fitas.

Observando a área de contato entre as proteínas na estruturas, vemos que a maior contribuição para a interação vem de pontes de hidrogênio, gerando uma complementação entre a fita β9 de FtsZ e a β2 de MciZ, gerando uma sexta fita na folha-β B9 de FtsZ. Interações hidrofóbicas também são observadas, considerando que as cadeias laterais dos resíduos Leu272, Met292, Ile293 e Phe294 de FtsZ estão bem próximas das Trp36, Ile19, Val13 e Leu23 de MciZ, possivelmente havendo interações

de Van der Waals entre elas. Uma ponte salina entre o carboxilato da Asp280 de FtsZ e o grupo guanidínico da Arg20 de MciZ também foi observada no complexo (Figura 43).

Figura 45 – Interações estabilizadoras da do complexo FtsZ:MciZ. FtsZ:cinza; MciZ:amarelo.

Para validarmos a estrutura do complexo, nós alteramos resíduos da interface de interação de ambas proteínas através de mutações sítio-dirigidas. Apesar da maioria dos resíduos de FtsZ fazer contato com MciZ através de pontes de hidrogênio do esqueleto da cadeia peptídica, o mutante FtsZ-D280R mostrou-se incapaz de interagir com MciZ. O mesmo aconteceu quando mutamos a cadeia lateral do resíduo Arg20 de MciZ (MciZ-R20D) (Figura 46).

A ligação de MciZ numa das faces de polimerização de FtsZ sugere que o efeito inibitório de MciZ é devido a um impedimento estérico. Ao alinharmos a estrutura do complexo FtsZ:MciZ com a estrutura do dímero de FtsZ de *S. aureus* (PDB 3VOA), observamos uma sobreposição entre MciZ e a subunidade inferior do protofilamento de

FtsZ (figura 47). Portanto, seria impossível que um monômero de FtsZ em complexo com MciZ interagir com outra molécula de FtsZ através de seu C-terminal.

Figura 46 – Mutantes FtsZ-D280R e MciZ-R20D não são capazes de copurificar com MciZ e FtsZ selvagens, respectivamente.

Nós também investigamos se a ligação de MciZ causaria uma mudança conformacional em FtsZ. Ao alinhar o complexo FtsZ:MciZ com as estruturas monoméricas de FtsZ presentes no PDB (PDBs 2VAM, 2VXY, 2RHL, 2RHO e 2RHH), nenhuma diferença majoritária foi encontrada (RMSD=0,610 Å) (Figura 48). Porém, observamos a ausência de densidade eletrônica na região da alça T7 no complexo FtsZ:MciZ (Figuras 44 e 48). Isso pode ser explicado pela sobreposição entre a estrutura de MciZ no complexo e a alça T7 na estrutura do monômero de FtsZ, sendo que o peptídeo poderia estar deslocando a alça T7 e assim impedindo-a de assumir uma posição definida na estrutura. Tal efeito pode ser importante para o mecanismo de ação de MciZ, como discutido adiante (seção 4.3).

Figura 47 – MciZ não poderia coexistir intercalado entre duas subunidades de FtsZ. No alinhamento entre o complexo FtsZ:MciZ com a subunidade superiora (verde) do dímero de SaFtsZ (PDB 3VOA), nota-se um conflito entre MciZ (esferas vermelhas) e a subunidade inferior (azul) de FtsZ.

Figura 48 – MciZ não pode coexistir com a alça T7 na sua posição canônica. Cinco diferentes estruturas de BsFtsZ (PDBs 2VAM-verde, 2VXY-ciano, 2RHL-amarelo, 2RHO-rosa e 2RHH-salmão) foram alinhados com o FtsZ do complexo FtsZ:MciZ (painel à esquerda). A alça T7 do FtsZ no complexo FtsZ:MciZ não apresentou densidade eletrônica, sugerindo que está em uma conformação flexível (seta amarela no painel à direita).

3.4 – Mecanismo de ação de MciZ

3.4.1 – Efeito de MciZ sobre a polimerização de FtsZ *in vitro*

A fim de estudarmos o mecanismo de ação de MciZ, nós investigamos o efeito de diferentes concentrações de MciZ sobre a polimerização de FtsZ *in vitro* usando espalhamento de luz a 90°. Assim descobrimos que quantidades subestequiométricas de MciZ são suficientes para inibir a polimerização de FtsZ (uma razão 1:10 de MciZ:FtsZ é capaz de inibir 50% da polimerização de FtsZ, (Figura 49).

Por causa do espalhamento de luz a 90° não reportar a quantidade de polímero, mas sim o tamanho das malhas poliméricas formadas, não podemos com confiança correlacionar diretamente a diminuição do sinal obtido na presença de MciZ com a redução da massa total de polímero no ensaio. MciZ poderia induzir a quebra de grandes feixes de FtsZ em fragmentos menores, sem contudo despolimerizá-los significativamente. Esse tipo de mecanismo já foi bastante reportado para moduladores de proteínas citoesqueléticas eucarióticas, como actina e microtúbulos (MacLean-Fletcher 1980) (Bryan 1985) (Margolis 1977) (Pecqueur 2012).

Para investigar se MciZ induz ou não a despolimerização de FtsZ de maneira subestequiométrica (mais de uma ligação FtsZ-FtsZ por molécula de MciZ), nós usamos ensaios de fluorescência estabelecidos na literatura (Chen 2011) (Chen 2012) que por princípio reportariam o número de ligações FtsZ-FtsZ dentro dos polímeros ao invés do simples espalhamento de luz por eles.

Figura 49 – Polimerização de FtsZ reportada por espalhamento de luz a 90°. 5 μ M de FtsZ foi polimerizado na ausência e na presença de 0,2 μ M (1:25), 0,5 μ M (1:10), 1 μ M (1:5) e 2,5 μ M de MciZ sintético.

Um dos repórteres escolhido foi o duplo mutante FtsZ-S152C+S223W conjugado através da sua nova cisteína ao fluoróforo Bodipy (Materiais e Métodos). Nesse mutante, enquanto FtsZ estiver na forma monomérica, o Trp223 estará perto o suficiente (aproximadamente 10Å) para absorver a luz emitida pelo fluoróforo Bodipy (conjugado à Cys152), constituindo um par de FRET (“**F**luorescence **R**esonance **E**nergy **T**ransfer”). Porém quando os monômeros se associam em forma de protofilamentos, a consequente mudança de conformação de FtsZ faz com que o Trp223 e a Cys152 se afastem (aproximadamente 3Å), diminuindo o FRET e aumentando a emissão do Bodipy. Portanto, cada subunidade de FtsZ que esteja na conformação polimérica irá contribuir para um aumento da emissão de fluorescência de

Bodipy, tornando ele um repórter para quantificar a proporção monômero/polímero em nossos ensaios de polimerização (Chen 2011).

Usando esse ensaio, investigamos a polimerização em diversas concentrações de FtsZ e MciZ (Figura 51) e plotamos a diferença de fluorescência entre o platô e a linha de base (ΔF) relativa a cada concentração de FtsZ (Figura 52). Ao contrário do efeito subestequiométrico de MciZ visto no ensaio de espalhamento de luz, o peptídeo induz uma despolimerização apenas estequiométrica sobre os protofilamentos, acompanhada de um aumento na concentração crítica de FtsZ proporcional à concentração de MciZ adicionada (Tabela 6). Tal aumento relativo na concentração crítica pode ser interpretado como resultado de sequestro de FtsZ por MciZ. Portanto, apenas a despolimerização induzida por MciZ não deve ser suficiente para explicar o efeito subestequiométrico registrado anteriormente.

Figura 50 – Polimerização de FtsZ reportada pela emissão de fluorescência de Bodipy. Diferentes concentrações de FtsZ (curvas coloridas) foram polimerizadas na ausência e na presença de 0 μM (painel superior esquerdo), 1 μM (painel superior direito), 2 μM (painel inferior esquerdo) e 3 μM de MciZ sintético (painel inferior direito).

Figura 51 – Plot das medidas Δ Fluorescência x [FtsZ] usadas no ensaio da figura 50. Uma regressão linear foi feita com os pontos presentes na faixa linear do plote e o coeficiente angular usado pra calcular a proporção cinética de polimerização. Da mesma equação da reta pode-se estimar a C_c em cada condição (intersecção com o eixo y). Os resultados constam na Tabela 6.

Tabela 6 – Medidas de polimerização de FtsZ com MciZ

[MciZ] (μ M)	C_c Teórica* (μ M)	C_c estimada (μ M)
0	-	1,5
1	2,4	2,4
2	3,3	3,1
3	4,2	4,1

*A C_c teórica foi calculada à partir da equação $C_{cApp} = (C_c + KAS C_c St) / (1 + KAS C_c)$, para sequestradores simples (Chen 2012).

3.4.2 – Efeito de MciZ sobre a formação do anel Z *in vivo*

Assim como *in vitro*, MciZ mostrou ser um potente inibidor de FtsZ *in vivo*, podendo bloquear completamente a formação de anéis Z (e septos consequentemente) e causar filamentação das células (Handler 2008) (Figura 22) (seção 1.5.2). Titulando a concentração de xilose em culturas de células contendo uma cópia indutível de *gfp*-

mciZ (AB150) vimos que 0,01% de xilose era suficiente para abolir qualquer sinal de septo em células marcadas com corante de membrana FM 5-95 (Figura 52).

Para determinar quanto de MciZ era necessário para a inibicao completa da divisão, usamos Western blots quantitativos usando soro anti-GFP e GFP purificada como padrão de quantificação (Figura 53). Isto permitiu estimarmos que 0,01% de xilose leva ao acúmulo de 350 ± 150 moléculas de GFP-MciZ por célula de *B. subtilis*. Baseados nos dados presentes na literatura de que existem cerca de 5000 moléculas de FtsZ por célula em *B. subtilis* (Feucht 2001) (Haeusser 2004) (Ishikawa 2006), chegamos à conclusão que a proporção 1:15 é suficiente para inibir a formação do anel Z *in vivo*.

Figura 52 – Microscopia de fluorescência com sinais de membrana (painéis à esquerda) e GFP-MciZ (painéis à direita). As células foram induzidas com as referidas concentrações de xilose por 1 hora e visualizadas imediatamente.

Figura 53 – Western blot quantitativo de GFP-MciZ. Foram aconstruídas curvas padrão com GFP purificado e, juntamente com extratos de células induzindo GFP-MciZ, calculou-se o número de moléculas por célula em média.

3.4.3 – MciZ induz a formação de protofilamentos de FtsZ mais curtos

O fato de MciZ induzir a diminuição do sinal de espalhamento de luz de forma subestequiométrica sugere que o peptídeo estaria causando a quebra dos protofilamentos de FtsZ em fragmentos menores.

Para investigar essa hipótese, nós usamos microscopia eletrônica de transmissão (contraste negativo) para obter imagens dos protofilamentos de FtsZ na presença de diversas concentrações de MciZ (Figura 54).

Figura 54 – Microscopia eletrônica de transmissão com protofilamentos de FtsZ. 3μM de FtsZ foi polimerizado na ausência e na presença de 0,3μM (1:10), 0,6μM (1:5) e 1,5μM (1:2) de MciZ sintético. A magnificação foi de 50000X.

Mesmo nas proporções mais baixas de MciZ:FtsZ (1:10), pudemos observar uma mudança significativa tanto na média (de $200 \pm 75 \text{ nm}$ para $120 \pm 45 \text{ nm}$) como na distribuição dos tamanhos dos protofilamentos de FtsZ (Figura 55). Razões progressivamente mais altas de MciZ:FtsZ (1:5 e 1:2) tiveram um efeito mais drástico que acarretou na formação de protofilamentos ainda menores ($90 \pm 30 \text{ nm}$ e $60 \pm 20 \text{ nm}$, respectivamente).

Figura 55 – Histogramas da distribuição de tamanhos dos protofilamentos em diferentes proporções de MciZ:FtsZ. Microscopia eletrônica de transmissão com protofilamentos de FtsZ. 3 μ M de FtsZ foi polimerizado na ausência e na presença de 0,3 μ M (1:10), 0,6 μ M (1:5) e 1,5 μ M (1:2) de MciZ sintético. Foram medidos entre 200 e 300 protofilamentos por condição. A magnificação foi de 50000X.

Como a concentração de FtsZ usada (3 μ M) foi relativamente perto da concentração crítica (em torno de 1,5 μ M), o fato de estarmos trabalhando em condições limítrofes poderia explicar a diminuição do comprimento dos protofilamentos (já que a adição de um inibidor poderia aumentar a C_c). Por isso optamos por usar um mutante (FtsZ-L69W) com uma C_c menor que a proteína selvagem (entre 0,1 e 0,5 μ M) (Chen 2005). Além de podermos trabalhar com concentrações mais afastadas da C_c , ainda existe a vantagem dessa variante de FtsZ formar protofilamentos mais longos e portanto mais fáceis de serem observados

Repetimos o ensaio de EM com o mutante e assim como com a proteína selvagem, os protofilamentos de FtsZ-L69W mostraram-se sensíveis a concentrações subestequiométricas de MciZ, formando protofilamentos menores do que na ausência do inibidor (Figuras 56 e 57).

Figura 56 – Microscopia eletrônica de transmissão com protofilamentos de FtsZ-L69W. 3μM de FtsZ mutante foi polimerizado na ausência e na presença de 0,3μM (1:10), 0,6μM (1:5) e 1,5μM (1:2) de MciZ sintético. A magnificação foi de 50000X.

Figura 57 – Histogramas da distribuição de tamanhos dos protofilamentos em diferença proporções de MciZ:FtsZ. Microscopia eletrônica de transmissão com protofilamentos de FtsZ-L69W. $3\mu\text{M}$ de FtsZ-L69W foi polimerizado na ausência e na presença de $0,3\mu\text{M}$ (1:10), $0,6\mu\text{M}$ (1:5) e $1,5\mu\text{M}$ (1:2) de MciZ sintético. Foram medidos entre 200 e 300 protofilamentos por condição. A magnificação foi de 50000X.

Como controle, também registramos imagens de protofilamentos de FtsZ-L69W em diferentes concentrações ($3\mu\text{M}$ e $1\mu\text{M}$) e nenhuma diferença aparente entre o tamanho dos protofilamentos foi notada, reforçando que mesmo concentrações mais próximas da C_c produzem protofilamentos de comprimento similar (Figura 58). Por isso o efeito de MciZ sobre o tamanho dos protofilamentos não deve estar ligado apenas a um possível aumento da C_c e/ou sequestro de subunidades de FtsZ do polímero.

Figura 58 – Microscopia eletrônica de transmissão com protofilamentos de FtsZ-L69W. 3µM e 1µM de FtsZ mutante foram usados na reação. A magnificação foi de 50000X.

Outra observação interessante sobre as micrografias do mutante L69W é que, na ausência de MciZ, observou-se uma alta frequência de protofilamentos conectados internamente, formando círculos contínuos (flechas pretas). Porém, mesmo em baixas proporções de MciZ:FtsZ (1:50), praticamente nenhuma estrutura semelhante foi observada (Figura 59).

Figura 59 – Microscopia eletrônica de transmissão com protofilamentos de FtsZ-L69W. 3µM de FtsZ mutante foi polimerizado na ausência e na presença de 0,03µM de MciZ. A magnificação foi de 50000X.

3.4.4 – MciZ não é um simples sequestrador de FtsZ

Apesar de MciZ apresentar indícios de sequestrar FtsZ da fração monomérica pelo aumento da Cc ser equivalente à sua concentração (Seção 3.4.1, Figura 51, Tabela 6), um mecanismo de simples sequestro apenas não pode explicar os dados apresentados até o momento, pois um sequestrador não seria capaz de induzir a formação de protofilamentos mais curtos de maneira subestequiométrica. Um simples sequestrador, formando complexos 1:1 com FtsZ (como é o caso de MciZ), só seria capaz de inibir de forma estequiométrica. Portanto MciZ deve se valer de um mecanismo mais complexo somado ao sequestro.

Para provarmos que MciZ não é um simples sequestrador, nós usamos novamente do ensaio de espalhamento de luz a 90°. Porém, desta vez ao invés do peptídeo isolado, utilizamos tanto o complexo FtsZ:MciZ purificado (Seção 3.1.1), como

um complexo covalente FtsZ-MciZ, esse último sendo resultado de uma fusão de MciZ à cauda C-terminal de FtsZ. Se MciZ fosse um simples sequestrador, nenhum efeito seria observado sobre a polimerização de FtsZ, já que todo inibidor adicionado já estaria complexado com FtsZ.

Ambos complexo e fusão mostraram-se tão inibitórios quanto o peptídeo isolado (Figuras 60), provando que MciZ definitivamente não pode ser um simples sequestrador. Sendo assim, as moléculas de FtsZ ligadas a MciZ devem ser capazes de interagir, através de seu N-terminal livre, com o C-terminal livre de uma subunidade de FtsZ na extremidade de um protofilamentos.

Figura 60 – Polimerização de FtsZ reportada por espalhamento de luz a 90°. 5 μ M de FtsZ foi polimerizado na ausência e na presença de 0,2 μ M (1:25), 0,5 μ M (1:10), 1 μ M (1:5) e 2,5 μ M de Complexo FtsZ:MciZ (painel à esquerda) e da fusão FtsZ-MciZ (painel à direita) purificados.

Experimentos bioquímicos investigando o mecanismo da desmontagem de polímeros concluíram que GDP é um sequestrador de FtsZ, já que os monômeros

ligados a GDP seriam incapazes de se associar à forma polimérica (Chen 2005) (Chen 2009). Usando o GDP como comparativo, um estudo sobre o efeito de Sula sobre FtsZ mostrou que esse inibidor apresenta a mesma cinética de desmontagem que GDP, sendo uma das evidências de que Sula também é um sequestrador (Chen 2012). Seguindo o mesmo paralelo, também estudamos a cinética de despolimerização de FtsZ induzida por MciZ (Figura 61).

Figura 61 – Despolimerização de FtsZ induzida por MciZ ou GDP, reportada por espalhamento de luz a 90°. 5μM de FtsZ foi polimerizado (curva preta), e quando atingido o equilíbrio (t=60s), foi adicionado 5μM de MciZ (curva vermelha) ou GDP (curva azul).

Usando luz espalhada a 90°, acompanhamos a polimerização de 5μM de FtsZ (2mM GTP, curva preta) até a reação alcançar o equilíbrio, adicionando então (seta verde) 5μM de MciZ ou 5mM de GDP e acompanhamos a cinética de despolimerização (curvas vermelha e azul, respectivamente). O $t_{1/2}$ para que os polímeros de FtsZ fossem desmontados por MciZ foi sensivelmente menor comparado com dos

desmontados por GDP (6 ± 2 s e 13 ± 1 s, respectivamente). Podemos concluir portanto que MciZ atua com um mecanismo diferente de GDP e SulA.

3.4.5 MciZ interage com FtsZ polimérico *in vitro* e *in vivo*

Um dos mecanismos de ação que explicariam os resultados até o momento é de que MciZ seria um capeador dos protofilamentos de FtsZ, ligando-se na extremidade C-terminal livre e impedindo a elongação dos polímeros. Para fortalecer essa hipótese, nós investigamos se MciZ de fato liga-se à fração polimérica de FtsZ.

Primeiramente, nós realizamos um ensaio de cosedimentação entre polímeros formados com o domínio globular de FtsZ (FtsZ¹²⁻³¹⁵) e o peptídeo sintético de MciZ e também com a fusão FtsZ-MciZ (Figura 62, painel à direita). Foram usadas diversas proporções entre as proteínas (1:25, 1:10 e 1:5) e em todas as condições pode-se identificar a presença de MciZ no sedimento juntamente com FtsZ polimérico. O fato da fusão ter mostrado resultado semelhante ao peptídeo reforça que, mesmo em complexo com MciZ, FtsZ continua apto a ser incorporado à extremidade C-terminal do protofilamento.

Como controle para provar que o resultado não se tratava de um artefato (um carregamento inespecífico do MciZ pela malha do FtsZ polimérico), nós repetimos o experimento substituindo MciZ por $10\mu\text{M}$ de BSA (albumina de soro bovino), mostrando uma cosedimentação proporcionalmente menor que a de MciZ, apesar da

concentração maior do controle (Figura 62, painel à direita, colunas 1 e 2). Para provar que o resultado não era devido à agregação de MciZ, repetimos a cosedimentação utilizando apenas BSA e MciZ ou a fusão FtsZ-MciZ, novamente com resultado negativo (Figura 62, painel à direita, colunas 3 a 6). Por fim, mostramos que sem GTP nenhuma proteína foi sedimentada para a fração insolúvel (Figura 62, painel à direita, colunas 7 e 8).

Figura 62 – Cosedimentação entre polímeros de FtsZ e MciZ sintético/fusão FtsZ-MciZ (painel à direita). 10 μ M de FtsZ¹²⁻³¹⁵ foi usado para polimerização. Como controle foram usadas as mesmas condições das reações anteriores, substituindo MciZ/FtsZ-MciZ por BSA, FtsZ por BSA e GTP por GDP (painel à direita).

Para investigar como MciZ decora os filamentos de FtsZ e confirmar os resultados da cosedimentação, nós usamos microscopia TIRF (“Total Internal Reflection Fluorescence”) com FtsZ e MciZ marcados com os fluoróforos Bodipy e Alexa647, respectivamente. Já que protofilamentos de FtsZ são estruturas muito

pequenas (em torno de 100 a 200nm) para serem visualizadas por microscopia ótica, nós utilizamos o domínio globular de FtsZ (FtsZ¹²⁻³¹⁵) que tem a tendência de formar feixes maiores de FtsZ naturalmente (Figura 63).

Figura 63 – Microscopia eletrônica de transmissão com feixes formados por 5 μ M de FtsZ¹²⁻³¹⁵.

Usando uma razão 1:1000 entre MciZ e FtsZ, nós encontramos diversos casos onde feixes de FtsZ (verde) se apresentaram decorados com um foco localizado de MciZ (vermelho) (Figura 64). Como observamos os focos na maioria das vezes localizados no meio dos feixes, é possível que eles apresentem uma grande descontinuidade, gerando uma ou mais extremidades expostas derivadas de quebra dos protofilamentos.

Figura 64 – Colocalização de feixes de FtsZ e MciZ por microscopia TIRF. Os feixes de FtsZ foram formados por 5 μ M de FtsZ¹²⁻³¹⁵, marcados com 0,5 μ M de FtsZ-Bodipy (verde) e 5nM de MciZ-Alexa647 (vermelho).

Como nessas condições foi raro encontrar pontas de feixes (já que os feixes eram longos e preferencialmente aderem à lamínula através do seu corpo, usamos de diluições *in situ* para induzir a despolimerização dos feixes, tornando-os menores. Dessa forma, além do padrão de localização, pudemos observar em filmes gerados a partir de fotos sequenciais que os focos de MciZ acompanham o movimento browniano dos feixes de FtsZ (Figura 65a), sendo uma forte evidência contra um possível artefato (como agregação na lamínula) gerando os focos de MciZ. Filmes de reações onde GDP foi adicionado no lugar de GTP, sem nenhuma polimerização de FtsZ observada, mostraram praticamente nenhum sinal (ou foco) de MciZ (Figura 65b).

Figura 65 – Focos de MciZ acompanham os movimentos caóticos de um feixe de FtsZ. (A) Filmes foram feitos através de microscopia TIRF, onde cada foto foi tirada a cada 2s, em um total de 5min a 30min para cada campo. Para seguir o movimento do filamento com sinal de MciZ em sua ponta (flecha azul com círculos vermelhos), foi usado como referência um feixe estático que também estava ligado a um MciZ (flecha amarela com círculo roxo na ponta). Os feixes de FtsZ foram formados por 5 μ M de FtsZ¹²⁻³¹⁵, marcados com 0,5 μ M de FtsZ-Bodipy (verde) e 5nM de MciZ-Alexa647 (vermelho). Após a visualização dos mesmos, a reação foi diluída 2 vezes com tampão HMK para desestabilização dos feixes. **(B)** Controle do experimento, onde foi adicionado à reação todos os componentes presentes no item acima, com GDP ao invés de GTP.

Complementando os ensaios *in vitro*, nós captamos imagens de microscopia de fluorescência de células de *B. subtilis* expressando GFP-MciZ com o intuito de registrar a colocação do peptídeo com o anel Z. Porém, como mesmo induções baixas de GFP-MciZ levam a desmontagem do anel Z rapidamente (Seção 1.5.2, Figura 22),

decidimos por usar um alelo de *ftsZ* mutante (T45M) que confere às células maior resistência aos efeitos de MciZ. Dessa forma, conseguimos visualizar o sinal das estruturas dos anéis Z (setas amarelas), indicando que MciZ interage com o FtsZ polimérico *in vivo* (Figura 66).

Figura 66 – GFP-MciZ localiza-se no anel Z por microscopia de fluorescência *in vivo*. Células em fase exponencial foram induzidas por adição de xilose durante 30min e imediatamente visualizadas sob filtro de emissão vermelho (Membrana) e verde (GFP).

3.4.6 MciZ aumenta a atividade GTPásica de FtsZ

Na Seção 3.2.7 mostramos que MciZ inibe a atividade GTPásica de FtsZ, de acordo com o descrito na literatura (Handler 2008) (Ray 2013). Porém, a proporção MciZ:FtsZ usada no ensaio foi 1:1. Para investigar o efeito subestequiométrico de MciZ sobre a hidrólise de GTP, nós medimos a liberação de fosfato ao longo do tempo em

concentrações variadas de MciZ e de FtsZ e plotamos um gráfico [FtsZ] x Atividade GTPásica (Figura 67).

Figura 67 – Efeito de MciZ sobre a atividade GTPásica de FtsZ. Diversas medidas de hidrólise com variadas concentrações de FtsZ (entre 2μM e 12μM) e MciZ (2μM, 4μM e 6μM) apontam que apesar da atividade total diminuir, a atividade específica aumenta.

Como no ensaio de polimerização com o repórter Bodipy (seção 3.4.1, Figura 51), o mesmo efeito do aumento da Cc dependente da concentração de MciZ é visto (1,5, 3, 5 e 6,5μM para concentrações de MciZ de 0, 2, 4 e 6μM, respectivamente). Porém, pode-se observar que as retas não são paralelas como no ensaio de polimerização. As retas compostas pelas reações com MciZ apresentam um coeficiente angular maior do que a reta plotada das reações sem MciZ. Como o coeficiente angular das retas são exatamente as atividade GTPásica específica de FtsZ (quantas

moléculas de GTP são hidrolisadas por minuto, por molécula de FtsZ), concluímos que em baixas proporções de MciZ:FtsZ a atividade GTPásica é aumentada (de $2,3 \pm 0,2$ para $3,4 \pm 0,4$ GTP min⁻¹ FtsZ⁻¹).

3.4.7 – A inibição por MciZ independe da atividade GTPásica de FtsZ

A observação de que MciZ aumenta a atividade GTPásica específica de FtsZ indicou a possibilidade de alguma sinergia entre a hidrólise de GTP e a inibição de MciZ. Uma hipótese é que MciZ dependeria da atividade enzimática de FtsZ para inibir sua polimerização.

Para testar essa hipótese, realizamos um ensaio de despolimerização de FtsZ por diluição. Experimentos reportaram que é possível observar a cinética de despolimerização de FtsZ após diluir-se reações para concentrações de FtsZ abaixo de sua Cc (Chen 2005) (Chen 2009). Assim realizamos experimentos usando novamente o repórter fluorescente Bodipy em quatro condições de polimerização: em dois tampões diferentes (HMK e MEK) e na presença e ausência de $0,5 \mu\text{M}$ de MciZ (proporção MciZ:FtsZ de 1:10). Como magnésio é um cofator essencial para a atividade enzimática de FtsZ (Mendieta 2009), a despolimerização induzida no tampão MEK (com EDTA) acontece sem hidrólise de GTP por FtsZ.

Tanto na presença como na ausência de atividade GTPásica, MciZ foi capaz de acelerar a despolimerização por diluição de polímeros em equilíbrio com $5 \mu\text{M}$ para

0,25 μ M de FtsZ (Figura 68). Na presença de hidrólise de GTP, os polímeros foram despolimerizados totalmente com $t_{1/2}$ de 10 $\pm$ 2s e 3 $\pm$ 2s (sem e com MciZ, respectivamente) (Figura 68a). Já em tampão MEK, sem hidrólise de GTP, foram observados $t_{1/2}$ mais longos, de 20 $\pm$ 3s e 9 $\pm$ 2s (sem e com MciZ, respectivamente) (Figura 68b). Esses resultados juntos desclassificam a hipótese inicial e comprovam que MciZ não necessita da atividade GTPásica de FtsZ para sua inibição.

Figura 68 – Cinética de despolimerização induzida por diluição. Reações de 5 μ M de FtsZ (e 0,5 μ M de FtsZ-Bodipy) foram polimerizadas e ao chegar ao equilíbrio foram diluídas 10 vezes com o próprio tampão, acompanhando a cinética de despolimerização. (A) Tampão HMK, com hidrólise de GTP, sem (curva preta) e com 0,5 μ M de MciZ sintético (curva vermelha). (B) Tampão MEK, sem hidrólise de GTP, sem (curva azul) e com 0,5 μ M de MciZ (curva vermelha).

4 – Discussão

4.1 – MciZ, o capeador-terminador do anel Z

Nesse trabalho nós determinamos os resíduos importantes para a interação entre FtsZ e seu inibidor MciZ. MciZ se liga na α -hélice H10 de FtsZ (Figura 43), obstruindo sua superfície C-terminal de interagir com o domínio N-terminal de outra molécula de FtsZ.

Entre todos os outros moduladores de FtsZ já estudados, apenas SulA se liga em um sítio próximo ao de MciZ (Cordell 2003). SulA se liga à alça T7 de FtsZ, agindo como um sequestrador (Chen 2012). Porém, ao contrário de SulA, nossos resultados apontam que MciZ é um inibidor capaz de capear a ponta menos de filamentos de FtsZ. Esta proposta se baseia nos seguintes achados: MciZ se liga ao subdomínio C-terminal de FtsZ (Figura 43); MciZ se liga nas extremidades dos filamentos (Figuras 64 e 65) e induz sua redução (Figuras 49 e 54 a 57); MciZ também inibe quando fusionado a FtsZ, o que indica que não é um sequestrador (Figura 60).

MciZ é uma proteína expressa durante a esporulação na célula mãe, com a finalidade de inibir qualquer formação do anel Z nesse compartimento depois que o septo assimétrico já foi sintetizado (Handler 2008). A alta afinidade de MciZ por FtsZ (Figura 28) e sua alta atividade em baixas proporções de FtsZ:MciZ *in vivo* (Figuras 52 e 53) corroboram seu papel na diferenciação terminal das células, já que MciZ não é um

inibidor transitório pois após a formação do esporo a célula mãe é auto-degradada (Stragier 1996) (Rudner 2001).

MciZ possui características bioquímicas e funcionais diferentes de SulA, que é um inibidor acionado para congelar temporariamente a formação do anel Z durante a resposta SOS, enquanto existe reparo de danos ao DNA (Bi 1993) (Mukherjee 1998). Portanto, sua afinidade por FtsZ mais baixa (Chen 2012), comparada a de MciZ, é compatível com seu caráter transitório, já que SulA deve ser rapidamente degradada após o reparo de DNA for completado, levando a célula de volta ao seu ciclo convencional.

Apesar de MciZ ser um capeador da ponta menos dos protofilamentos de FtsZ, ele também liga com alta afinidade a monômeros (Figura 28). Isso acontece porque, ao contrário da actina e microtúbulos, por exemplo, os filamentos de FtsZ são compostos de protofilamentos simples, sendo que as superfícies das extremidades não são muito diferenciadas do que as dos monômeros. Dessa forma MciZ, em altas proporções MciZ:FtsZ, age também como um sequestrador (Figura 51)(Tabela 6).

Existe descrito um capeador de microtúbulos que também atua como sequestrador (Pecqueur 2012). D1 é uma proteína artificial, composta por repetições de domínios de anquirinas, e foi selecionada por se ligar em microtúbulos. D1 se liga tanto à ponta mais dos microtúbulos, capeando-os, e também aos dímeros isolados de tubulina.

The diagram illustrates a closed-loop system. A central horizontal chain consists of blocks labeled 'D' and 'T'. From left to right, the sequence is: a dark grey 'D' block, a light grey 'D' block, a grey 'T' block, a grey 'D' block, a grey 'D' block, a grey 'T' block, a grey 'T' block, a grey 'D' block, a grey 'T' block, a grey 'T' block, a grey 'D' block, and a grey 'T' block. This chain is flanked by a minus sign '-' on the left and a plus sign '+' on the right. Above the chain, three grey arrow-shaped blocks labeled 'T' point to the right. Below the chain, three grey arrow-shaped blocks labeled 'T' point to the left, each with a green circle at its tail. Two curved lines connect the ends of the chain, forming a loop. The top curved line has a red 'X' on its left side. The bottom curved line has red 'X' marks on both its left and right sides.

4.2 – Como MciZ reduz o tamanho dos filamentos?

115

proporção estequiométrica do inibidor, a quebra dos polímeros observado deve estar ligada ao efeito capeador de MciZ.

A grande maioria dos capeadores de actina e microtúbulos conhecidos são capazes de induzir a formação de filamentos mais curtos por se ligarem nas extremidades mais ativas dos protofilamentos (“barbed end” e ponta mais, respectivamente), bloqueando a elongação dos polímeros (Dos Remedios 2003).

Porém, como descrito anteriormente, MciZ se liga na extremidade oposta à mais ativa em microtúbulos e filamentos de actina. Portanto, podemos sugerir que, apesar da elongação possa acontecer preferencialmente pela ponta mais, ela também é significativa na ponta menos para os filamentos de FtsZ. Assim, podemos concluir que o crescimento de FtsZ deve ser bidirecional e que MciZ bloqueia a elongação de uma das extremidades. FtsZ não seria o primeiro citoesqueleto procariótico a crescer igualmente pelas duas pontas. ParM, apesar de possuir morfologia quase idêntica à actina, não realiza treadmilling e apresenta crescimento bidirecional (Figura 16) (Garner 2004) (Garner 2007).

Outro mecanismo que deve ser de extrema importância para a dinâmica de FtsZ e que MciZ poderia afetar é a fragmentação de protofilamentos. Fragmentação é quando uma ligação entre subunidades se quebra fora das extremidades do filamento, partindo-o em dois filamentos menores (Erickson 1989). Fragmentação dos filamentos de FtsZ é um fenômeno já proposto por diferentes grupos (Miraldi 2008) (Allard 2009) e

foi observado pela primeira vez em experimentos com FtsZ associado a FtsA (Loose 2013). A atual proposta que explica a fragmentação é que as ligações FtsZ-FtsZ dentro dos filamentos se enfraquecem cooperativamente ao passo que o GTP ligado à elas é hidrolisado à GDP, até que em determinado momento alguma delas pode ser quebrada (Chen 2009). Porém, existe a necessidade de mais estudos para se entender esse fenômeno corretamente.

Portanto, levando em consideração que exista uma taxa de fragmentação constante, o fato dos protofilamentos capeados por MciZ estarem alongando em uma velocidade menor faria que as fragmentações levassem à formação de protofilamentos mais curtos. Logo após a fragmentação, MciZ se liga à ponta menos do protofilamento criado e o ciclo é recomeçado. A observação de que a atividade GTPásica específica de FtsZ aumenta na presença de MciZ (Figura 67) também favorece a idéia de que a fragmentação tem um papel importante na redução do tamanho dos protofilamento, levando em consideração os modelos que relacionam a estabilidade das ligações FtsZ-FtsZ com a composição dos nucleotídica da fração polimérica (Chen 2009).

Por último, outro fenômeno que deve sofrer influência direta da ação de MciZ é o anelamento de protofilamentos. O anelamento de dois protofilamentos acontece quando a ponta menos de um protofilamento encontra a ponta mais de outro protofilamento e ocorre uma fusão em um único protofilamento, agora mais longo

(Mingorance 2005) (Chen 2009). Assim MciZ, ligando na ponta menos, seria uma obstrução não só para elongação mas também para anelamento.

Esse bloqueio de anelamento entre protofilamentos deve ser a explicação de porque MciZ continua induzindo a formação de protofilamentos mais curtos em baixas proporções MciZ:FtsZ, independentemente da hidrólise de GTP (Figura 68), onde a troca de subunidades é lenta e a fragmentação deve ser muito menos frequente (Chen 2009).

Apesar do anelamento de Ec-FtsZ só ter sido observado com o mutante L68W (maior auto-afinidade e uma Cc menor) em condições não fisiológicas (em EDTA, sem hidrólise de GTP) (Chen 2009), pode ser que esse mecanismo seja importante dentro das células, onde os protofilamentos estão ancorados à membrana e a concentração local no anel Z é bem mais alta (Surovtsev 2008). Além disso, mesmo em condições fisiológicas, nós conseguimos observar por EM uma alta frequência de anelamentos intramoleculares (estruturas circulares) com o mutante FtsZ-L69W apenas na ausência de MciZ (Figura 59), sendo uma boa evidência que em BsFtsZ os anelamentos devem ser mais frequentes que em EcFtsZ.

Agrupando todos os mecanismos descritos e discutidos, segue abaixo o modelo proposto de como MciZ é capaz de atuar sobre a polimerização de FtsZ (Figura 70).

A

B

Figura 70 – MciZ induz a redução de tamanho dos protofilamentos por uma adição de mecanismos. Subunidades de FtsZ carregando diferentes nucleotídeos devido à hidrólise foram representado com T (GTP, subunidades cinza-escuro) e D (GDP, subunidades cinza-claras). A subunidade marcada de Z (marrom) foi usada como referência em ambos os casos. (A) Modelo da dinâmica dos protofilamentos de FtsZ, com fenômenos como elongação bidirecional, fragmentação e anelamento e como contribuem para o tamanho dos filamentos em equilíbrio. (B) Efeito de MciZ sobre os mecanismos citados acima.

4.3 – A alça T7 faz a diferencia entre monômeros e filamentos

O fato de MciZ ser um capeador dos protofilamentos de FtsZ acarreta que o peptídeo precisa necessariamente apresentar uma afinidade consideravelmente maior pela ponta menos dos polímeros do que por FtsZ monomérico, tendo em vista que em equilíbrio existe cerca de 10 vezes mais sítios para a ligação de MciZ na fração monomérica que na polimérica. Portanto, MciZ necessariamente deve ter uma afinidade pelo menos uma ordem de grandeza maior da estimada para os monômeros de FtsZ ($K_d=150\text{nM}$, Figura 28), já que se fossem parecidas MciZ ficaria praticamente inteiramente ligado na fração monomérica.

Como o polímero de FtsZ, ao contrário dos filamentos de actina e microtúbulos, é composto essencialmente por protofilamentos individuais, não existiria a priori nenhuma diferença na superfície de ligação de MciZ quando FtsZ está na ponta menos do protofilamento ou na forma monomérica. Porém, observações sobre os nossos resultados de que MciZ e a alça T7 apresentam, sítios sobrepostos (folha beta S9) nos levam a crer que ela tem um papel importante no mecanismo de reconhecimento de MciZ pela extremidade de FtsZ.

Experimentos investigando estruturas de mutantes e e quimeras com diferentes alças T7 mostraram que ela reflete o estado de polimerização de FtsZ (Matsui 2013). Com a polimerização, existe uma mudança conformacional na alça T7 dentro dos

filamentos de FtsZ, e possivelmente induziria uma flexibilização ou um deslocamento dela na extremidade menos do polímero, já que o C-terminal ali não está ligado a outra subunidade de FtsZ. Portanto, essa mudança conformacional da alça T7 na ponta menos poderia facilitar a interação entre MciZ e FtsZ, aumentando a afinidade comparada ao FtsZ monomérico, que ainda teria seu sítio parcialmente ocupado por ela (Figura 71).

Figura 71 – Modelo para a seletividade de MciZ pela extremidade do filamento: A dinâmica da alça T7 é o que diferencia a ponta menos do C-terminal do monômero de FtsZ. MciZ (círculo verde) apresenta afinidade pelo seu sítio nas duas formas: a extremidade menos dos protofilanetos e o C-terminal do monômero de FtsZ. Porém, ele prefere a ponta menos pelo fato da alça T7 não estar bloqueando-o, já que está em uma conformação relaxada, ao contrário do monômero. Porém, quando MciZ rompe essa barreira, desloca a alça T7 e consegue estabelecer um complexo de alta afinidade com FtsZ.

Interessantemente SulA também se liga a FtsZ em uma região semelhante de MciZ, porém seu sítio é precisamente a alça T7 (Cordell 2003). Portanto, usando os resultados que apontam que o estado conformacional da alça T7 é importante para a ativação da polimerização de FtsZ (Matsui 2013), SulA ao ligar-se à alça T7 deve estar estabilizando-a no estado desativado de FtsZ. Por outro lado, quando MciZ liga-se à FtsZ, empurraria a alça T7 no sentido contrário, estabilizando-a na sua conformação ativa (Figura 72).

Figura 72 – A alça T7 na conformação estática deve induzir FtsZ ao estado inativo, ao passo que a dinâmica deve ser um dos gatilhos para a nucleação da polimerização. SulA (losango vermelho) liga-se provavelmente preferencialmente à conformação estática da alça T7, deslocando o equilíbrio de moléculas que estão transitando entre os estados. Já MciZ (círculo verde), ao se ligar em FtsZ e deslocar a alça T7 da conformação estática deve empurrar FtsZ para o estado de ativação. SulA ligado à FtsZ aparece transparente para evidenciar o estado estático da alça T7.

4.4 – Treadmilling si, pero no mucho

Um comportamento presente em grande parte dos filamentos citoesqueléticos eucarióticos é o treadmilling (Neuhaus 1983)(Margolis 1981). Apesar de alguns debates

sobre MreB, é provável que uma fração considerável das proteínas citoesqueléticas procarióticas não realizem treadmilling (Shaevitz 2010) (Kim 2006) (Garner 2007) (Garner 2011) (Dominguez-Escobar 2011) (Reimold 2013) (Loose 2013). Até o momento, podemos destacar a homóloga de tubulina TubZ, envolvida na segregação de plasmídios em *B. thuringiensis* (Larsen 2007), MreB (Reimold 2013) e a própria FtsZ (Loose 2013). O comportamento de treadmilling foi mostrado em FtsZ apenas na presença de FtsA, usando sistemas miméticos com o modulador ancorando protofilamentos de FtsZ à membranas lipídicas *in vitro* (Loose 2013).

Treadmilling ocorre apenas em polímeros que apresentem 2 características principais: a) possuam atividade GTPásica; b) cada extremidade deve apresentar concentrações críticas distintas. Essas duas propriedades conjuntamente fazem com que os filamentos, em concentrações maiores que a menor C_c e menores que a C_c mais alta, a ponta mais estará adicionando subunidades em uma velocidade maior que as perde, enquanto que a ponta menos estará perdendo mais rapidamente que adicionando. Dessa forma os filamentos em treadmilling estão sempre alongando em uma extremidade, enquanto que encolhem na outra (Wegner 1978) (Neuhaus 1983).

Quando capeadores de actina e microtúbulos se ligam aos polímeros que estão em treadmilling, bloqueiam a extremidade que está alongando (ponta mais), a tendência é uma rápida despolimerização dos protofilamentos, já que a ponta menos continua a encolher, até a concentração referente à C_c desta extremidade. Já quando

um capeador bloqueia a extremidade que estaria encolhendo (ponta menos), observa-se um aumento do comprimento dos filamentos e diminuição da concentração crítica (Wegner 1978) (Neuhaus 1983).

Portanto, baseados em nossos resultados, podemos deduzir que não deve existir treadmilling dos protofilamentos de FtsZ nas nossas condições experimentais, já que nenhum aumento ou diminuição substanciais da Cc foram observados além do decorrente de sequestro (Figura 51, Tabela 6). Outra possibilidade é que os filamentos de FtsZ estão em treadmilling, mas quando MciZ capeia a ponta menos acaba por estabilizá-la e impedindo a saída de suas subunidades.

Independente dos filamentos de FtsZ apresentarem treadmilling ou não, nossos resultados apontam que MciZ não depende da atividade GTPásica (condição essencial para o fenômeno) para quebrar os protofilamentos de forma subestequiométrica (Figura 68). Ou seja, o efeito de MciZ sobre FtsZ é independente dele. Interessantemente, MciZ não parece ser um capeador convencional ao ser comparado com os capeadores eucarióticos, já que a grande maioria deles dependem de treadmilling para inibição subestequiométrica (MacLean-Fletcher 1980).

4.5 – Atividade GTPásica, quando mais é menos

Apesar de MciZ despolimerizar FtsZ (Figura 51), foi observado que ele aumenta a atividade GTPásica específica de FtsZ (Figura 67). O fato de concentrações

subestequiométricas de MciZ conseguir diminuir significativamente o comprimento dos protofilamentos (Figuras 49 e 60), sugere que MciZ produz um maior número de protofilamentos de menor comprimento, comparado com um número menor de protofilamentos mais longos na ausência do inibidor.

Como a troca das subunidades dos filamentos acontecem principalmente pelas extremidades (Chen 2009), o polímero apresentando um maior número de pontas mais livres (e as pontas menos capeadas com MciZ), a troca entre subunidades FtsZ-GDP da fração polimérica e FtsZ-GTP da fração monomérica deve aumentar, aumentando também a taxa de hidrólise por subunidade.

Outra possibilidade que se soma ao efeito do aumento do número de pontas livres é que a estabilização da ponta menos por MciZ esteja induzindo um tempo maior de residência das subunidades de FtsZ nessa extremidade, hidrolisando mais moléculas de GTP. Uma evidência que suporta essa explicação são os experimentos mostraram que a taxa de reciclagem é em torno de 2 vezes mais rápida que a atividade GTPásica de FtsZ (Chen 2009). Portanto, as extremidades dos filamentos de FtsZ devem estar trocando suas subunidades independente do nucleotídeo ligado à elas.

4.6 – Os mutantes R&D, uma jornada inesperada

Se tornou uma prática frequente nosso grupo usar triagens genéticas para encontrar informações sobre interações entre FtsZ e seus moduladores (Bisson-Filho

2009) (Wagner-Herman 2012) (Blasios 2013). Ao contrário da maioria dos trabalhos, que optaram por mutações sítio-dirigidas em *ftsZ* para seu estudo *in vivo* e *in vitro* (Stricker 2003) (Wang 2001) (Lu 2001) (Dajkovic 2008a), nossos trabalhos (bem como de alguns outros grupos) fizeram uso de uma biblioteca randômica para seleções de mutantes não enviesadas (Feucht 2005) (Shen 2009) (Shen 2010). A vantagem de se aplicar bibliotecas de mutantes (tanto para as de um único gene, como para as genômicas) é que na maioria das vezes se obtêm resultados inesperados e que ampliam a compreensão sobre o objeto de estudo.

A triagem genética aplicada nesse presente estudo é um exemplo de um resultado não previsto e que gerou mais perguntas sobre o funcionamento de FtsZ. A obtenção de *ftsZ* mutantes que tornam as células resistentes ao efeito da superexpressão de MciZ não é algo inédito, pois um supressor da ação do peptídeo já havia sido caracterizado anteriormente (Handler 2008). Porém, a identificação de mutações em *ftsZ* que obrigam a célula a depender de um inibidor de FtsZ para se dividir nunca havia sido relatado (Figuras 33 e 34).

Existe na literatura uma caracterização citológica de mutantes similares ao FtsZ-D213H, dependente da superexpressão de MciZ. As mutações D212ACG em *E. coli*, quando superexpressas acima da concentração endógena, levavam as células à morte (Lu 2001) (Stricker 2003) (Redick et al., 2005). Assim, podemos sugerir que esses que esses mutantes, apesar de competentes para polimerização, devem formar uma

arquitetura de anel Z *in vivo* não funcional ou instável que pode ser compensada pela presença de MciZ. Uma possibilidade é que a ponta menos desses mutantes seja muito instável, não conseguindo formar as estruturas necessárias para a estabilização do anel Z.

Uma caracterização mais extensa sobre os mutantes dependentes de MciZ poderia fornecer dados interessantes sobre a morfologia desses polímeros, bem como medidas da cinética de sua polimerização. Essas informações podem ser relevantes no entendimento das diferentes etapas da dinâmica de polimerização de FtsZ (nucleação, alongação e dissociação).

Apesar de termos tido sucesso em uma das nossas triagens (Blasios 2013), é evidente a limitação que essa estratégia tem apresentado para selecionar mutantes que tenham deixado de interagir com moduladores, inclusive no presente trabalho (Bisson-Filho 2009). Uma das razões pode ser o elevado número de resíduos importantes para polimerização e atividade enzimática de FtsZ. Outro motivo seria que alguns desses moduladores ligam em FtsZ justamente na sua interface de polimerização, tornando mais difícil de encontrar uma mutação específica que rompa essa interação sem comprometer a função da proteína.(Bisson-Filho 2009) (Wagner-Herman 2012) (Blasios 2013).

4.7 – A busca para sítios alternativos em FtsZ

Como já citado anteriormente, ao tabularmos os sítios de interação dos moduladores em FtsZ, percebe-se um grande viés em favor da cauda CTP. Dos aproximadamente 20 moduladores conhecidos (9 positivos e 11 negativos), 4 se ligam exclusivamente à cauda CTP (FtsA, ZipA, SepF e EzrA) (Adams 2009) (Gündogdu 2011) (Król 2012) e 4 apresentam sítios alternativos (ZapA se liga à α -hélice H3, MinC a um sítio composto pela cauda CTP e pela α -hélice H9, Sula à alça T7 e MciZ à α -hélice H10 e à folha-beta β 9) (Bisson-Filho 2009) (Blasios 2013) (Cordell 2003). Nada se sabe sobre o sítio de ligação dos outros 12 moduladores restantes (Figura 17).

Esse viés, somado ao elevado número de moduladores sem seus sítios conhecidos, nos leva a crer que, apesar de poder existir outros sítios alternativos como o caso de MciZ, há uma correlação entre a localização do modulador e seu sítio em FtsZ. Todas as proteínas de membranas (como FtsA, ZipA, EzrA e SepF) foram caracterizadas como ligadoras do CTP de FtsZ. Já as citoplasmáticas (como Sula, ZapA, SlmA e MciZ) encontram seu sítio fora da cauda C-terminal.

Um exemplo de sítio alternativo, que poderia ser viável e até hoje nunca se encontrou um modulador que desempenhasse esse papel, é o de ligação de GTP/GDP. Com a caracterização de MciZ como um capeador da ponta menos, surge a pergunta se deve existir proteínas capazes de fazer o mesmo na ponta mais de FtsZ.

4.8 – Perspectivas: MciZ como ferramenta para o estudo de FtsZ

Neste trabalho, com o intuito de estudar a interação entre a proteína citoesquelética procariótica FtsZ e MciZ, estabelecemos em nosso grupo tanto novas técnicas como a possibilidade de novos projetos para a aplicação desses novos conhecimentos.

A primeira herança que podemos apontar é a plataforma de coexpressão e copurificação de FtsZ com proteínas parceiras. Nós coexpressamos e copurificamos o complexo FtsZ:MciZ solúvel (Figura 23), usando-o tanto para a cristalização e resolução de sua estrutura como para nossos ensaios mecânicos.

A coexpressão de proteínas parceiras tem se tornado uma prática cada vez mais útil, pois em muitos casos as proteínas dependem de parceiros para um correto enovelamento e maior estabilidade, além de geralmente aumentar sensivelmente sua solubilidade (Li 1997) (Wang 2003). Em alguns casos a formação de um complexo estável só é possível através de sua coexpressão ao invés da adição dos componentes após serem purificados separadamente (Romier 2006) (Kümmel 2006).

Baseados no sucesso da copurificação do complexo FtsZ:MciZ, nosso laboratório está apostando na obtenção de complexos entre FtsZ e outros moduladores utilizando o mesmo princípio. Apesar de termos falhado inicialmente na primeira tentativa de copurificar FtsZ:MinC e FtsZ:FtsA, a coexpressão/copurificação do complexo FtsZ:ZapA tem se mostrado tão promissora como do FtsZ:MciZ. Acreditamos

que trilhando um caminho semelhante, com algumas adaptações necessárias, poderemos resolver a estrutura cristalográfica do complexo FtsZ:ZapA, bem como de outros complexos entre FtsZ e moduladores em um futuro próximo.

Com a mesma plataforma também investigamos a interação de MciZ com FtsZ oriundo de *E. coli* e *S. aureus* (Figura 27). O fato de MciZ ser capaz de interagir com SaFtsZ o torna ainda mais interessante para a aplicação biotecnológica, já que que FtsZ é um alvo para novas drogas em evidência (Ma 2012) (Sass 2013) e *S. aureus* é considerado um patógeno oportunista potencialmente perigoso por conta do aparecimento de algumas cepas multirresistentes a antibióticos, como as MRSA (**M**ethicilin-**R**esistant ***S**ta**ph**yl**o**coccus **a**ureus*) (Braine 2011). Assim, respaldados no fato que nem todos os 40 aminoácidos de MciZ são essenciais para sua atividade (Figura 42), é possível que o peptídeo possa ser base de uma droga mimética, com ação subestequiométrica tendo FtsZ como alvo.

Com a caracterização de MciZ como um capeador dos filamentos de FtsZ, o peptídeo ganha potencial como ferramenta para o estudo do comportamento de FtsZ. Enquanto que em filamentos de actina e microtúbulos esse comportamento já vem sendo estudado há décadas, muito pouco se sabe sobre a dinâmica das extremidades dos protofilamentos de FtsZ.

No momento, já é possível estudar essa dinâmica através de técnicas de fluorescência como microscopia “single molecule”. Com essa abordagem se observou

a dinâmica de protofilamentos pela primeira vez (Loose 2013). Portanto, em experimentos como esse, é possível fazer medidas cinéticas das pontas, e usando MciZ para bloquear a ponta menos e observar o comportamento da ponta mais isoladamente. Perguntas importantes como se o crescimento dos protofilamentos de FtsZ é polarizado ou bidirecional, e se, em que condições FtsZ realiza treadmilling e/ou instabilidade dinâmica serão mais fáceis de serem respondidas e MciZ poderá se tornar um importante instrumento para isso.

Por fim, seria interessante perseguir no estudo sobre a dinâmica da alça T7. Experimentos utilizando sondas que reportem a dinâmica da alça T7 na ausência e presença de polimerização, bem como na ausência e presença de quantidades subestequiométricas de MciZ, poderão no futuro confirmar se a alça T7 apresenta diferenças quando presente na ponta menos ou em monômeros. Outra direção interessante nesse estudo é a triagem de mutantes na região da folha- β S9 e da alça T7 com a finalidade de encontrar situações que FtsZ esteja sempre ativado (alça T7 flexível) ou sempre desativado (alça T7 fixa), mimetizando assim a ligação de MciZ e SulA, respectivamente.

5 – Materiais e Métodos

5.1 – Cepas bacterianas e condições de crescimento

Todas as cepas utilizadas neste estudo estão listadas na tabela 7. As cepas de *B. subtilis* utilizadas foram derivadas da cepa selvagem PY79 (AB16), previamente descrita (Okubo, Ohlsson-Wilhelm et al., 1972). A cepa comercial *E. coli* DH5α foi utilizada para as clonagens. Tanto *B. subtilis* quanto *E. coli* foram cultivadas em LB a 37°C, com agitação. Antibióticos, quando necessários, foram utilizados nas seguintes concentrações: espectinomicina, 100 µg ml⁻¹; tetraciclina, 10 µg ml⁻¹; ampicilina, 100 µg ml⁻¹; cloranfenicol 5 µg ml⁻¹; canamicina, 5 µg ml⁻¹.

Tabela 7: Cepas utilizadas nesse trabalho

Cepa	Genótipo	Origem
DH5α	<i>F– φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK–, mK+) phoA supE44 λ– thi-1 gyrA96 relA1</i>	Hanahan 1983
PY79	<i>Prototrófica</i>	Youngman 1983
BL21 (DE3)	<i>F– ompT hsdSB(rB–, mB–) gal dcm (DE3)</i>	Estoque Lab
FG247	<i>thrC::PhySpac-minD (erm)</i>	Gueiros-Filho 2002
AB19	<i>amyE::Pxil-mciZ (cat)</i>	Handler 2008
AB91	<i>amyE::Pxil-mciZ (cat) ftsZ-E305DΩftsZ (tet)</i>	Presente Trabalho
AB92	<i>amyE::Pxil-mciZ (cat) ftsZ-I293TΩftsZ (tet)</i>	Presente Trabalho
AB93	<i>amyE::Pxil-mciZ (cat) ftsZ-I162TΩftsZ (tet)</i>	Presente Trabalho

Cepa	Genótipo	Origem
AB94	<i>amyE::Pxil-mciZ (cat) ftsZ-E139GΩftsZ (tet)</i>	Presente Trabalho
AB95	<i>amyE::Pxil-mciZ (cat) ftsZ-G112SΩftsZ (tet)</i>	Presente Trabalho
AB96	<i>amyE::Pxil-mciZ (cat) ftsZ-G112DΩftsZ (tet)</i>	Presente Trabalho
AB97	<i>amyE::Pxil-mciZ (cat) ftsZ-D213HΩftsZ (tet)</i>	Presente Trabalho
AB98	<i>amyE::Pxil-mciZ (cat) ftsZ-I201SΩftsZ (tet)</i>	Presente Trabalho
AB99	<i>amyE::Pxil-mciZ (cat) ftsZ-T109IΩftsZ (tet)</i>	Presente Trabalho
AB100	<i>amyE::Pxil-mciZ (cat) ftsZ-T45MΩftsZ (tet)</i>	Presente Trabalho
AB101	<i>amyE::Pxil-mciZ (cat) ftsZ-A118V-ftsZ (tet)</i>	Presente Trabalho
AB102	<i>amyE::Pxil-mciZ (cat) ftsZ-G107CΩftsZ (tet)</i>	Presente Trabalho
AB103	<i>amyE::Pxil-mciZ (cat) ftsZ-T111AΩftsZ (tet)</i>	Presente Trabalho
AB105	<i>amyE::Pxil-gfp-zapA-mts (cat)</i>	Bisson-Filho 2009
AB150	<i>amyE::Pxil-gfp-mciZ (cat)</i>	Presente Trabalho
AB271	<i>amyE::Pxil-gfp-mciZ (cat) ftsZ-T45MΩftsZ (tet)</i>	Presente Trabalho

5.2 – Manipulações de DNA, plasmídios e transformação

As manipulações de DNA e as transformações em *E. coli* foram feitas seguindo os protocolos padrões (Sambrook e Russel, 2001). As extrações de DNA genômico de

B. subtilis foram preparadas segundo protocolo descrito em Harwood e Cutting (1991). As transformações em *B. subtilis* foram feitas basicamente seguindo o método de um passo de Anagnostopoulos e Spizizen (1961) e o método de dois passos descrito em Harwood e Cutting (1991). Os plasmídeos utilizados estão descritos na tabela 8, e os oligonucleotídeos na tabela 9. Os sequenciamentos de DNA foram feitos com o kit Big Dye Terminator (Applied Biosystem), utilizando seu próprio protocolo, seguido de purificação pelo procedimento padrão de precipitação (Sambrook e Russel, 2001). As amostras purificadas foram encaminhadas ao serviço de sequenciamento do IQ-USP.

Tabela 8: Plasmídios utilizados nesse trabalho

Plasmídio	Descrição	Origem
pEA18	Vetor integrativo em <i>amyE. gfp</i> sob controle do <i>P_{xyl}</i> (CmR)	Estoque Lab
pET28a	Vetor expressão sob controle do Promotor T7 (KanR)	Novagen
pET22b	Vetor expressão sob controle do Promotor T7 (AmpR)	Novagen
pET11b	Vetor expressão sob controle do Promotor T7 (AmpR)	Novagen
pCXZ	Expressão FtsZ sem tag (AmpR)	Joe Lutkenhaus Lab
pCXZ-L69W	Expressão FtsZ-L69W sem tag (AmpR)	Petra Levin Lab
SaFtsZ-pET22b	Expressão SaFtsZ sem tag (AmpR)	Daniel Pilch Lab
EcFtsZ-pET11b	Expressão EcFtsZ sem tag (AmpR)	Harold Erickson Lab
pMG1	Expressão FtsZ ¹⁻³⁵⁰ sem tag (AmpR). Modificado do pCXZ	Blasios 2013
pAB20	Expressão His ₆ -FtsZ (KanR). Clonado em pET28a	Blasios 2013
pAB20-S152C+S223W	Expressão His ₆ -FtsZ-S152C+S223W (KanR)	Presente Trabalho

Plasmídio	Descrição	Origem
pAB20-T111A	Expressão His ₆ -FtsZ-T111A (KanR)	Blasios 2013
pAB20-G112D	Expressão His ₆ -FtsZ-G112D (KanR)	Presente Trabalho
pAB20-I201S	Expressão His ₆ -FtsZ-I201S (KanR)	Presente Trabalho
pAB20-G112S	Expressão His ₆ -FtsZ-G112S (KanR)	Presente Trabalho
pAB20-D213H	Expressão His ₆ -FtsZ-D213H (KanR)	Presente Trabalho
pAB21	Expressão FtsZ ¹²⁻³¹⁵ sem tag (AmpR). Clonado em pET22b	Presente Trabalho
pAB21-T111A	Expressão FtsZ ¹²⁻³¹⁵ -T111A sem tag (AmpR)	Presente Trabalho
pAB21-G112D	Expressão FtsZ ¹²⁻³¹⁵ -G112D sem tag (AmpR)	Presente Trabalho
pAB21-I201S	Expressão FtsZ ¹²⁻³¹⁵ -I201S sem tag (AmpR)	Presente Trabalho
pAB21-G112S	Expressão FtsZ ¹²⁻³¹⁵ -G112S sem tag (AmpR)	Presente Trabalho
pAB21-D213H	Expressão FtsZ ¹²⁻³¹⁵ -D213H sem tag (AmpR)	Presente Trabalho
pAB21-E305D	Expressão FtsZ ¹²⁻³¹⁵ -E305D sem tag (AmpR)	Presente Trabalho
pAB21-D280R	Expressão FtsZ ¹²⁻³¹⁵ -D280R sem tag (AmpR)	Presente Trabalho
pAB21-Q276E	Expressão FtsZ ¹²⁻³¹⁵ -Q276E sem tag (AmpR)	Presente Trabalho
pAB21-D280R +Q276E	Expressão FtsZ ¹²⁻³¹⁵ -D280R+Q276E sem tag (AmpR).	Presente Trabalho
pAB50	Expressão His ₆ -MciZ (KanR). Clonado em pET28a	Presente Trabalho
pAB50-W17C	Expressão His ₆ -MciZ-W17C (KanR)	Presente Trabalho
pAB50-W36C	Expressão His ₆ -MciZ-W36C (KanR)	Presente Trabalho

Plasmídio	Descrição	Origem
pAB50-R20D	Expressão His6-MciZ-R20D (KanR)	Presente Trabalho
pAB51	Vetor integrativo em <i>amyE</i> (CmR). <i>gfp-mciZ</i> sob controle do <i>P_{xyl}</i> . Clonado em pEA18	Presente Trabalho
pAB52	Expressão MciZ sem tag (AmpR). Clonado em pET11b	Presente Trabalho
pAB53	Expressão fusão His6-FtsZ-MciZ (KanR). Clonado em pET28a	Presente Trabalho

Tabela 9: Oligonucleotídeos utilizados nesse trabalho

Oligo	Descrição	Sequência (5'→3')	Origem
oFG69	<i>ftsZ</i> Seq Fw	AAAACACACCGATGCTTGAA	Estoque Lab
oFG70	<i>ftsZ</i> Seq Rv	ACCGATACCCATCAAAGCAG	Estoque Lab
oAB6	<i>mciZ</i> BamHI Rv	AAGGATCCTTATGGCTTTGAGATCCAAT	Presente Trabalho
oAB7	<i>ftsZ</i> S152C Fw	GGCTGCAGGCGGAATCTGCGCAATGAAAGAAGCGG	Presente Trabalho
oAB8	<i>ftsZ</i> S152C Rv	CCGCTTCTTTTCATTGCGCAGATTCCGCCTGCAGCC	Presente Trabalho
oAB9	<i>ftsZ</i> S223W Fw	CATGTCAAACAAAGGATGGGCTTTGATGGGTATCGG	Presente Trabalho
oAB10	<i>ftsZ</i> S223W Rv	CCGATACCCATCAAAGGCCATCCTTTGTTTGACATG	Presente Trabalho
oAB11	<i>mciZ</i> W17C Fw	GTCTTAGTCGGAAAAGCATGCGAAATTCGAGCGAAG	Presente Trabalho
oAB12	<i>mciZ</i> W17C Rv	CTTCGCTCGAATTTGCGATGCTTTTCCGACTAAGAC	Presente Trabalho
oAB13	<i>mciZ</i> W36C Fw	GTGAAAGATTGCATCTCAAAGCCATAAGGATCC	Presente Trabalho
oAB14	<i>mciZ</i> W36C Rv	GGATCCTTATGGCTTTGAGATGCAATCTTTCAC	Presente Trabalho

Oligo	Descrição	Sequência (5'→3')	Origem
oAB15	<i>ftsZ</i> NdeI Fw	AACATATGATGTTGGAGTTCGAAAC	Presente Trabalho
oAB16	<i>ftsZ</i> Rv (<i>mciZ</i>)	GCGGTGCACTTTACGCGCGTTTATTACGG	Presente Trabalho
oAB17	<i>mciZ</i> Fw (<i>ftsZ</i>)	CCGTAATAAACGCGGCGTGAAAGTGCACCGC	Presente Trabalho
oAB19	<i>ftsZ</i> Q276E +D280R Fw	GCCTATATGAGGTTGAGGAAGCAGCACGCATTGTCTGCTTCGGCG	Presente Trabalho
oAB20	<i>ftsZ</i> Q276E +D280R Rv	CGCCGAAGCGACAATGCGTGCTGCTTCCTCAACCTCATATAGGC	Presente Trabalho
oAB21	<i>ftsZ</i> Q276E Fw	CTCAGCCTATATGAGGTTGAGGAAGCAGCAGACATTG	Presente Trabalho
oAB22	<i>ftsZ</i> Q276E Rv	CAATGTCTGCTGCTTCCTCAACCTCATATAGGCTGAG	Presente Trabalho
oAB23	<i>ftsZ</i> D280R Fw	G TTCAGGAAGCAGCACGCATTGTCTGCTTCGGC	Presente Trabalho
oAB24	<i>ftsZ</i> D280R Rv	GCCGAAGCGACAATGCGTGCTGCTTCCTGAAC	Presente Trabalho
oFG362	<i>mciZ</i> NheI NotI Fw	AAGCTAGCGGCGCGTGAAAGTGCACCGCATG	Presente Trabalho
oFG298	<i>ftsZ</i> T111A Fw	GGGCGGCGGAACAGGAGCAGGTGCCGCACCGGTTATCGC	Presente Trabalho
oFG299	<i>ftsZ</i> T111A Rv	GCGATAACCGGTGCGGCACCTGCTCCTGTTCCGCCGCC	Presente Trabalho
oFG479	<i>ftsZ</i> G112D Fw	GGGCGGCGGAACAGGAACAGATGCCGCACCGGTTATCG	Presente Trabalho
oFG480	<i>ftsZ</i> G112D Rv	CGATAACCGGTGCGGCATCTGTTCTGTTCCGCCGCC	Presente Trabalho
oFG475	<i>ftsZ</i> G112S Fw	GGGCGGCGGAACAGGAACAAGTGCCGCACCGGTTATCG	Presente Trabalho
oFG476	<i>ftsZ</i> G112S Rv	CGATAACCGGTGCGGCACTTGTTCTGTTCCGCCGCC	Presente Trabalho
oFG481	<i>ftsZ</i> I201S Fw	GGGGTTCAAGGTATTTCTGACTTGAGTGCTACACCTGG	Presente Trabalho

Oligo	Descrição	Sequência (5'→3')	Origem
oFG482	<i>ftsZ</i> I201S Rv	CCAGGTGTAGCACTCAAGTCAGAAATACCTTGAACC CC	Presente Trabalho
oFG477	<i>ftsZ</i> D213H Fw	TCTTATCAACCTTGACTTTGCTCATGTGAAAACAATCA TGTCAAA	Presente Trabalho
oFG478	<i>ftsZ</i> D213H Rv	TTTGACATGATTGTTTTACATGAGCAAAGTCAAGGT TGATAAGA	Presente Trabalho
oFG519	<i>ftsZ</i> E305D Fw	TAATGAAAATCTAAAAGATGATATTGTGGTGACAGTGA TTGC	Presente Trabalho
oFG520	<i>ftsZ</i> E305D Rv	GCAATCACTGTCACCACAATATCATCTTTTAGATTTTC ATTA	Presente Trabalho
oFG533	<i>mciZ</i> R20D Fw	GTCGGAAAAGCATGGGAAATTGAAGCGAAGTTAAAA GAGTATGGA	Presente Trabalho
oFG534	<i>mciZ</i> R20D Rv	TCCATACTCTTTTAACTTCGCTTCAATTTCCCATGCTT TTCCGAC	Presente Trabalho

5.3 – Expressão, purificação e quantificação de proteínas

FtsZ e suas variantes foram expressas e purificadas com diferentes protocolos, dependendo do vetor em que suas construções foram clonadas. Os protocolos foram seguidos conforme descrito anteriormente (Gueiros-Filho 2002) (Blasios 2013) com algumas modificações.

A partir dos plasmídios pCXZ (FtsZ) e pAB21 (FtsZ¹²⁻³¹⁵), que expressam versões de FtsZ sem nenhuma cauda acessória, células BL21 (DE3) (Stratagene) foram transformadas, inoculadas em culturas de 2 litros de LB até crescimento exponencial e então induzidas por 3 horas a partir da adição de 0,5 mM de IPTG (D.O._{600nm} ~ 0,5). Após o período de indução das proteínas, as culturas foram centrifugadas

e ressuspensas em tampão TKEG (50 mM de Tris pH 8,0, 50 mM de KCl, 1 mM de EDTA e 10% glicerol) e armazenadas a -80°C.

Seguido à etapa de expressão, as células foram lisadas a partir de sua incubação com 0,5 mg ml⁻¹ de lisozima (Sigma-Aldrich) a 37°C por 30 minutos e 4 ciclos de sonicação de 30 segundos cada (sonicador Sonics VCX500, sonda SM0421). As células lisadas foram então centrifugadas e sua fração solúvel precipitada pela adição de uma solução saturada de (NH₄)₂SO₄ (concentração final de 35%).

O precipitado foi centrifugado, ressuspendido em tampão TKEG e o traços de amônio foram retirados através de uma coluna PD-10 (GE Healthcare). Após a coluna, toda FtsZ ativa da solução foi polimerizado pela adição de 20mM de CaCl₂ (Sigma-Aldrich) e 2mM de GTP (Sigma-Aldrich), seguido de 5 minutos de incubação a 37°C. Os polímeros de FtsZ foram centrifugados e ressuspensos em tampão TKEG mais 2mM GDP (Sigma-Aldrich), seguido de 15 minutos de incubação a 37°C. A ressuspensão então foi centrifugada novamente e a fração solúvel aliquoteada e armazenada a -80°C. Amostras de cada etapa da purificação foram examinadas por eletroforese em gel de poliacrilamida/glicina a 15%.

Já FtsZ oriunda dos plasmídios pAB20 (expressa fusionada a uma cauda de hexahistidina em seu N-terminal) e suas variantes foram expressas da mesma forma que descrita acima, porém purificadas em batelada a partir de resinas NTA-Agarose (GE Healthcare) complexadas aos metais Ni²⁺ ou Co²⁺. As células induzidas foram

ressuspendidas no mesmo tampão descrito anteriormente, porém sem a adição de EDTA (tampão TKG) e as frações solúveis oriundas do extrato lisado foram incubadas com 1 ml das resinas condicionadas a 4°C por 1 hora.

Após uma série de lavagens com tampão TKG (com cada lavagem variando a concentração de imidazol entre 0 e 100 mM, em passos de 25 mM), His6-FtsZ foi eluída em tampão TKG com 500mM de imidazol. O imidazol foi retirado da solução através de colunas PD-10 (GE Healthcare) e a proteína purificada aliquoteada e armazenada a -80°C. Amostras de cada etapa da purificação foram examinadas por eletroforese em gel de poliacrilamida/glicina a 15%.

O complexo FtsZ:MciZ foi expresso e purificado a partir dos plasmídios pAB50 (His₆-MciZ) e pCXZ (FtsZ) ou pAB21 (FtsZ¹²⁻³¹⁵) por cromatografia de afinidade (como descrito acima) e em seguida aplicadas a uma coluna Superdex200 (GE Healthcare) de exclusão em gel e concentradas quando necessário. Amostras de cada etapa da purificação foram examinadas por eletroforese em gel de poliacrilamida/tricina a 16% (Schägger 2006).

Quando foi necessário MciZ (construção integral ou as truncadas) nos ensaios, foi usado um peptídeo sintético comercial (Peptide Specialty Laboratories GmbH), sendo que a proteína liofilizada foi ressuspensa em água ou tampão HMK (50 mM de Hepes pH 7,0, 5 mM MgAc e 100 mM KAc).

As proteínas foram quantificadas pelo reagente BCA (ácido bicinconínico), usando o kit comercial da Pierce (Thermo Scientific). Apenas no caso do MciZ sintético, que foi quantificado usando sua fluorescência intrínseca de seus triptofanos. A absorbância A_{280nm} de diluições da solução estoque de MciZ foram medidas e convertidas usando seu coeficiente de extinção molar teórico ($13.980 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

5.4 – Conjugação de fluoróforos às proteínas purificadas

Todas as conjugações à cisteínas das proteínas foram realizadas com o mesmo procedimento, tanto Bodipy FL Maleimida (Life Technologies) ou Alexa Fluor 647 C2-Maleimida (Life Technologies).

Proteínas purificadas e quantificadas (seção 3) foram incubadas em temperatura ambiente e em agitação com um excesso de 5 vezes do fluoróforo por 2 horas. As reações foram paradas com a adição de um excesso de 10 vezes de DTT e em seguida as amostras foram aplicadas em colunas G-25 QuickSpin (Roche). As preparações foram quantificadas, aliquotadas e armazenadas a -80°C . O rendimento da conjugação foi determinado a partir da fórmula: $R = (A_x \times MM) / (\epsilon \times C)$, onde A_x é o valor da absorbância máximo do fluoróforo, ϵ é o coeficiente de extinção molar ($\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), MM a massa molecular da proteína (Da) e C é a concentração da proteína (mg / ml).

5.5 – Determinação do Kd da interação entre FtsZ e MciZ

As medidas de fluorescência foram obtidas em um espectrofluorímetro Shimadzu RF-5301 PC à 25°C. Os espectros de emissão de fluorescência dos triptofanos de MciZ foram obtidos em um excitação de 295 nm e a emissão registrada entre 300 e 420 nm.

Durante a titulação, 50 nM de MciZ foi equilibrado em tampão HMK (50 mM Hepes, pH 7,7, 5mM MgAc e 100mM KAc) e após acrescentado concentrações finais de 0, 25, 50, 100, 200, 250, 300, 400, 500, 700 e 1000 nM de FtsZ. As medidas foram registrados em triplicata, assim como cada experimento, e foi tirada a média dos espectros em cada condição.

Com os valores médios da emissão de fluorescência a 340 nm, foi construído um gráfico concentração de FtsZ x intensidade de fluorescência. Baseado na saturação dessa curva, foi construído um plote de Scatchard (Rosenthal) para estimar o Kd a partir da equação: $(B/F)K_d + B = B_{max}$, onde B é a concentração do complexo FtsZ:MciZ, F é a concentração de FtsZ livre e Bmax é a concentração máxima do complexo FtsZ:MciZ.

5.6 – Microscopia de Fluorescência

As imagens obtidas de células vivas, foram montadas em lâminas contendo uma

camada sólida de meio de cultura com 1,5% de agarose em LB ou 25% LB (LB diluído em água), para manter sua viabilidade durante o período de observação. Para a visualização da membrana foi utilizado 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ do corante FM4-64 ou FM5-95 (Molecular Probes).

Para as imagens de GFP e membrana foi utilizado um microscópio invertido Nikon TE 300, equipado com filtros para GFP (set Endow GFP, 41018; ChromaTechnology), FM4-64 e mCherry (set Texas Red Brightline, TXRED4040-B; Semrock). As imagens foram captadas com uma câmera Roper CoolSnap HQ, utilizando exposições entre 0,5 e 1 segundos.

Para as imagens e filmes obtidas com proteínas conjugadas (seção 5), as reações foram adicionadas diretamente em lâminas especiais em sistema úmido para TIRF, com as lamínulas em uma leve depressão como porta amostra.

A obtenção de imagens foi utilizado um microscópio Leica DMI6000 B, no modo TIRF, com uma câmera Hamamatsu EM-CCD e objetiva 100x, com abertura numérica de 1,46. Os lasers de excitação usados foram 488/561nm (verde) e 635nm (vermelho), com filtros VBG triplo x490/20 d435 m465/45 | x422/44 d505 m545/55 | x552/24 d550 m610/65 (verde) e 620/60 d660 m700/75 (vermelho). Todas as imagens capturadas foram processadas utilizando-se o programa ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

5.7 – Microscopia eletrônica de transmissão

A visualização dos polímeros de FtsZ por microscopia eletrônica de transmissão foi feita em um microscópio Philips 420, com uma magnificação de 50000X. As reações foram conduzidas em tampão HMK (50 mM Hepes, pH 7,7, 5mM MgAc e 100mM KAc), a temperatura ambiente, e 30 segundos após a adição de 1 mM de GTP foi aplicado 10 μ l da reação nas grades de cobre (pré-tratadas com filmes de carbono) e imediatamente sugadas de volta e fixadas com 2% de acetato de uranila. Todas as imagens capturadas foram processadas utilizando-se o programa ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

5.8 – Resolução da estrutura de MciZ e ensaios de STD

Todos os dados obtidos e a resolução da estruturas foram realizados pela Dra. Patrícia Castellen, auxiliada pelo Dr. Maurício Sforça e Dra. Ana Carolina Zeri, do Laboratório Nacional de Biociência (LNBio, Brasil).

Os dados foram coletados em um espectrômetro de RMN Agilent de 600 MHz com sonda criogênica, em um conjunto de experimentos H1-RMN 2D (80ms TOCSY and 160ms NOESY) com 200 μ M de MciZ (H₂O/D₂O 90/10 e 100% D₂O) sintético em 50 mM de tampão fosfato de sódio, pH 4,0 a 25°C. Os dados foram processados usando um pacote de programas da NMRPipe/NMRDraw (Delaglio et al., 1995) (Johnson and Blevin, 1994). Deslocamentos químicos dos H1 foram assinalados

seguindo procedimentos clássicos e os cruzamento de picos NOE foram assinalados com o programa NMRView (Delaglio et al., 1995).

A estrutura 3D de MciZ foi resolvida utilizando o método descrito por Wuthrich (1982). O cálculo estrutural baseado nos deslocamentos químicos, acoplamento escalar e interações dipolares foi realizado através do programa CYANA 2.1 (Gunter et al., 1997) utilizando o protocolo de anelamento simulado com dinâmica molecular torsional. Um total de 100 confôrmeros randômicos foram anelados em 10000 passos com 7 ciclos. Após o ciclo final, as vinte estruturas de menor “target function” foram selecionadas para representar MciZ.

Para os experimentos de H1-H1 STD-TOCSY (Mayer and Meyer, 2001), 200 μ M de MciZ sintético foram misturados com 20 μ M de FtsZ em tampão fosfato (50 mM, 50 mM KCl, pH 4,0, 10% D2O). Os espectros foram registrados com um tempo misto de 70 ms, 512 incrementos em F1, 8192 pontos em F2 e 64 transições. A abrangência espectral foi de 5000 Hz em todos os casos. Os espectros foram adquiridos pelo uso em cascata de 40 pulsos gaussianos de 50 ms de duração, com 100 μ s de intervalo entre cada pulso. Os espectros foram processados usando o pacote de programas NMRPipe/NMRDraw (Delaglio et al., 1995) (Johnson e Blevin, 1994).

5.9 – Resolução da estrutura do complexo FtsZ:MciZ

Os passos de purificação, cristalização e resolução da estrutura do complexo FtsZ:MciZ descritos nessa seção foram realizados integralmente pela Dra. Karen Fulan Discola, no laboratório da Dra. Andrea Dessen, do Institut de Biologie Structurale (IBS, Grenoble, França). Partindo do complexo purificado como descrito anteriormente (seção 3), a primeira triagem de cristalização foi realizada a 20°C na plataforma de cristalização HTXLab.

Cristais foram obtidos após 3 dias em 1,8M de fosfato de sódio/potássio, pH 6,9, mas os melhores cristais foram obtidos após otimização em um tampão 1,6M de fosfato de sódio/potássio, pH 7,0. Os cristais foram crioprotégidos em 30% de glicerol e congelados com nitrogênio líquido. dados foram coletados na linha ID14-EH4, no ESRF (Grenoble, França).

Os dados foram processados usando o programa XDS (Kabsch, 1993) e o grupo espacial identificado (P6522), com 9 moléculas na unidade assimétrica. A estrutura foi resolvida por substituição molecular usando o programa Phaser (McCoy et al., 2007), a partir da estrutura apo de FtsZ (PDB 2VXY). Ciclos de refinamento foram realizados com os programas Refmac 5.6 (Murshudov et al., 1997), Phenix (Adams et al., 2010) e Coot (Emsley & Cowtan, 2004). A qualidade e a estereoquímica do modelo final foi checado com os programas Scheck (Vaguine et al., 1999) e Procheck (Laskowski et al., 1993).

5.10 – Ensaio de polimerização/despolimerização reportado por espalhamento de luz a 90°

A luz espalhada pelos polímeros de FtsZ foi medida usando um fluorímetro Hitachi F-4500 no comprimento de onda de 350 nm (para excitação e emissão). As aberturas das fendas variaram de 1 a 3,5, dependendo do ensaio, e a voltagem do tubo fotomultiplicador foi de 950V.

As reações de polimerização de FtsZ foram previamente equilibradas com as proteínas no tampão HMK (50 mM Hepes, pH 7,7, 5mM MgAc e 100mM KAc) à temperatura ambiente e então adicionadas à cubeta de quartzo (100 μ l, Starna) contendo GTP em uma concentração final de 2 mM, e as mudanças no espalhamento de luz foram registradas ao longo do tempo. Para as reações de despolimerização de FtsZ induzida por MciZ ou GDP, o mesmo procedimento acima foi seguido, e quando o sinal alcançou o platô 5 μ M de MciZ ou 4 mM de GDP foram adicionados à reação e a diminuição do sinal de espalhamento registrado ao longo do tempo.

5.11 – Ensaio de polimerização/despolimerização por Bodipy

As medidas de fluorescência foram obtidas em um espectrofluorímetro Shimadzu RF-5301 PC à 25°C. A emissão de fluorescência do fluoróforo Bodipy excitado à 490 nm foram registradas em 515 nm através do tempo.

Os ensaios de cinética de polimerização de FtsZ foram obtidos através da conjugação da cisteína do mutante FtsZ-S152C+S223W com o fluoróforo Bodipy FL Maleimida (Life Technologies). Nas reações de polimerização e despolimerização de FtsZ, a proteína duplo-mutante conjugada ao Bodipy foi diluída em sua concentração molar na proporção 1:10 com a proteína selvagem não conjugada.

As reações de polimerização foram previamente equilibradas com as proteínas no tampão HMK (50 mM Hepes, pH 7,7, 5mM MgAc e 100mM KAc) à temperatura ambiente e então adicionadas à cubeta de quartzo (100 μ l, Starna) contendo GTP em uma concentração final de 1 mM. As reações de despolimerização por diluição foram realizadas de forma análoga à descrita na seção 10. Reações de polimerização foram seguidas até atingirem o platô e em seguida foram diluídas 20 vezes em tampão HMK ou MEK (50 mM de Mes, pH 6,5, 1 mM de EDTA e 100 mM de KCl), sendo o decaimento do sinal registrado ao longo do tempo.

5.12 – Western blot quantitativo de GFP-MciZ de extratos celulares

Células de *B. subtilis* (Cepa AB150) cultivadas a 37°C e em agitação até a fase exponencial ($O.D._{600} \sim 0,5$), quando foi adicionado 0,1% de xilose e manteve-se o crescimento e a indução de GFP-MciZ por mais 2 horas ($D.O._{600} \sim 2,0$). As células foram centrifugadas e ressuspensas em tampão de lise (100 mM Tris + 0,5 mg ml⁻¹ de lisozima), incubadas a 37°C por 15 minutos e sonicadas por 4 ciclos de 10 segundos cada. O extrato lisado foi centrifugado e a fração solúvel aplicada ao lado de padrões de GFP purificada (5, 10, 20 e 40ng) em um gel de poliacrilamida/glicina a 15%.

Todos os procedimentos padrão de Western Blotting foram realizados de acordo com Towbin et al., 1979. Os géis foram transferidos para uma membrana de PVDF (Amersham HybondTM-P GE Healthcare) em corrente de 200 mA por 2 horas a 5°C. A membrana foi bloqueada por 2 horas em tampão PBS contendo Tween-20% e 5% de leite desnatado. Em seguida foi adicionado o anticorpo primário (anti-GFP) na proporção 1:3000 e incubado por 2 horas, lavados posteriormente com tampão PBS e Tween-20% por três vezes. As membranas foram incubadas por 1 hora com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com HRP (Pierce) na proporção 1:10000. Após novas lavagens, a membrana foi revelada com o substrato para HRP (ECL Prime Western Blotting Detection Reagent – GE Healthcare) em High Performance Chemiluminescence Film (GE Healthcare).

As bandas resultantes de GFP-MciZ foram quantificadas usando uma curva-padrão construída a partir das bandas de GFP, e sua massa foi transformada em número de moléculas por célula através do seu peso molecular e da densidade ótica relativa aplicada no gel. Todos os filmes scaneados foram processados e quantificados utilizando-se o programa ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

5.13 – Cosedimentação dos polímeros de FtsZ e MciZ

Reações contendo $25\mu\text{M}$ do domínio globular de FtsZ (FtsZ¹²⁻³¹⁵) foram equilibradas a temperatura ambiente em tampão HMK com 0, 1, 2,5 e $5\mu\text{M}$ de MciZ ou da fusão FtsZ-MciZ e a polimerização iniciada com a adição de 2 mM de GTP. Após 5 minutos, as amostras foram centrifugadas por 30 minutos a 100.000 rpm (Beckman, rotor TLA100). Os sedimentos foram ressuspensos e aplicados em gel de poli(acrilamida/tricina) 16%. Como controle foi repetido os experimentos, quando indicados, com GDP no lugar de GTP (2 mM) e BSA ($10\mu\text{M}$).

5.14 – Medidas de atividade GTPásica

Atividade GTPásica foi medida usando o sistema verde malaquita (Bioassay Systems) para quantificar a concentração de fosfato livre em solução adaptado para placas de 96 poços. Reações contendo FtsZ em concentrações entre 1 e $12\mu\text{M}$ e MciZ

sintético entre 0 e 6 μ M foram equilibradas em tampão HMK a 37°C e iniciadas com a adição de 1 mM de GTP.

A reação foi acompanhada ao longo do tempo, e em intervalos de 2,5 minutos uma alíquota foi retirada e misturada a EDTA 5 mM, parando a reação. Após 20 minutos, o reagente verde malaquita foi adicionado em cada alíquota e os pontos foram incubados a temperatura ambiente por 30 minutos, sendo a A_{620} medida em um leitor de placas (Epoch, Biotek). As medidas foram plotadas e dos intervalos lineares das curvas foi extraído a taxa de hidrólise de GTP por minuto. Os dados foram plotados em um gráfico atividade GTPásica x concentração FtsZ.

5.15 – Afinidade de mant-GTP por FtsZ e pelo complexo FtsZ:MciZ

As medidas de fluorescência da emissão de mant-GTP (Life Technologies) foram registradas usando um fluorímetro Cary Eclips (Varian) no comprimento de onda de 356 nm (excitação) e 448 nm (emissão). As aberturas das fendas foram de 3,5, e a voltagem do tubo fotomultiplicador foi de 950V.

100 nM de mant-GTP foi equilibrado em tampão TKEG (50 mM de Tris pH 8,0, 50 mM de KCl, 1 mM de EDTA e 10% glicerol) e titulado com concentrações crescentes de FtsZ ou do complexo FtsZ:MciZ. Os conjuntos de espectros foram obtidos em triplicatas (experimental e amostral). As médias foram plotadas em um gráfico

concentração proteína x intensidade de fluorescência e a estimativa de K_d foi obtida como descrito na seção 6.

Bibliografia

- Adams, D.W., Errington, J. (2009). Bacterial cell division: assembly, maintenance and disassembly of the Z ring. *Nature Reviews Microbiology* 7; 642-653
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., et al. (2002). *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. New York: Garland Science; How Cells Regulate Their Cytoskeletal Filaments. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26809/>
- Allard, J.F., Cytrynbaum, E.N. (2009). Force generation by a dynamic Z-ring in *Escherichia coli* cell division. *Proc Natl Acad Sci USA*. 106(1); 145-50
- Anderson, D.E., Gueiros-Filho, F.J., Erickson, H.P. (2004). Assembly dynamics of FtsZ rings in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* and effects of FtsZ-regulating proteins. *J. Bacteriol.* 186; 5775-5781
- André, J., Thiéry J.P. (1963). Mise en évidence d'une sous-structure fibrillaire dans les filaments axonématiques des flagelles. *J Microscopie* 2; 71– 80
- Bailey K. (1942). Myosin and adenosinetriphosphatase. *Biochem J* 36;121–139.
- Barák, I., Youngman, P. (1996). SpoIIIE mutants of *Bacillus subtilis* comprise two distinct phenotypic classes consistent with a dual functional role for the SpoIIIE protein. *J Bacteriol.* 178; 4984-89
- Barák, I., Wilkinson, A.J. (2007). Division site recognition in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Rev.* 31; 311–326
- Beall, B., Lutkenhaus, J. (1992). Impaired cell division and sporulation of a *Bacillus subtilis* strain with the *ftsA* gene deleted. *J. Bacteriol.* 174; 2398-2403
- Bean GJ, Amann KJ. (2008). Polymerization properties of the *Thermotoga maritima* actin MreB: roles of temperature, nucleotides, and ions. *Biochemistry* 47; 826–835
- Ben-Yehuda, S., Losick, R. (2002). Asymmetric cell division in *B. subtilis* involves a spiral-like intermediate of the cytokinetic protein FtsZ. *Cell*. 109; 257-66
- Bernhardt, T.G., de Boer, P.A. (2005). SlmA, a nucleoid-associated, FtsZ binding protein required for blocking septal ring assembly over chromosomes in *E. coli*. *Mol. Cell* 18; 555-564
- Bertin, A. et al. (2008). *Saccharomyces cerevisiae* septins: supramolecular organization of heterooligomers and the mechanism of filament assembly. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 105; 8274–8279
- Bi, E., Lutkenhaus, J. (1993). Cell division inhibitors SulA and MinCD prevent formation of the FtsZ ring. *J Bacteriol.* 175(4); 1118-25
- Bisson-Filho, A.W., Gueiros-Filho, F.J. (2009). Estudo Genético da Interação entre FtsZ e o Modulador de Divisão ZapA em *Bacillus subtilis*. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Instituto de Química, University of São Paulo, São Paulo, 2009. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/46/46131/tde-03082009-090556/>>

- Biteen, J.S., Goley, E.D., Shapiro, L., Moerner, W.E. (2012). Three-dimensional superresolution imaging of the midplane protein FtsZ in live *Caulobacter crescentus* cells using astigmatism. *Chem. Phys. Chem* 13; 1007-1012
- Blasios, V., Bisson-Filho, A.W., Castellen, P., Nogueira, M.L., Bettini, J., Portugal, R.V., Zeri, A.C., Gueiros-Filho, F.J. (2013). Genetic and biochemical characterization of the MinC-FtsZ interaction in *Bacillus subtilis*. *PLoS One*. 2013;8(4):e60690
- Braine, T. (2011). Race against time to develop new antibiotics. *Bull. World Health Organ*. 89; 88–89
- Brenner, S.L., Korn, E.D. (1983). On the mechanism of actin monomer-polymer subunit exchange at a steady state. *J. Biol. Chem*. 258; 5013-20
- Bryan, J., Coluccio, L.M. (1985). Kinetic analysis of F-actin depolymerization in the presence of platelet gelsolin and gelsolin-actin complexes. *J Cell Biol*. 101(4); 1236-44
- Burntack, L.D., Urosev, D., Irobi, E., Narayan, K., Robinson, R.C. (2004). Structure of the N-terminal half of gelsolin bound to actin: roles in severing, apoptosis and FAF. *EMBO J*. 23; 2713-2722
- Cao, L., Ding, X., Yu, W., Yang, X., Shen, S., Yu, L. (2007) Phylogenetic and evolutionary analysis of the septin protein family in metazoan. *FEBS Lett*. 581; 5526–5532
- Celler, K., Koning, R.I., Koster, A.J., van Wezel, G.P. (2013). Multidimensional View of the Bacterial Cytoskeleton. *J. Bacteriol*. 195(8);1627
- Chen, Y., Erickson, H. (2005). Rapid in vitro assembly dynamics and subunit turnover of FtsZ demonstrated by fluorescence resonance energy transfer. *J. Biol. Chem*. 280; 22549-22554
- Chen, Y., Erickson, H. (2009). FtsZ filament dynamics at steady state: subunit exchange with and without nucleotide hydrolysis. *Biochemistry* 48; 6664-6673
- Chen, Y., Erickson, H. (2011). Conformational changes of FtsZ reported by tryptophan mutants. *Biochemistry* 50; 4675-4684
- Chen, Y., Milam, S., Erickson, H. (2012). Sula inhibits assembly of FtsZ by a simple sequestration mechanism. *Biochemistry* 51; 3100-3109
- Coltharp, C., Xiao, J. (2012). Superresolution microscopy for microbiology. *Cellular Microbiol*. 14; 1808-1818
- Cordell, S.C., Robinson, E.J., Lowe, J. (2003) Crystal structure of the SOS cell division inhibitor Sula and in complex with FtsZ. *Proc Natl Acad Sci USA*. 100; 7889-7894
- Dai, K., Lutkenhaus, J. (1992). The proper ratio of FtsZ to FtsA is required for cell division to occur in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol*. 174; 6145-6151
- Dajkovic, A., Lan, G., Sun, S., Wirtz, D., Lutkenhaus, J. (2008a). MinC spatially controls bacterial cytokinesis by antagonizing the scaffolding function of FtsZ. *Curr. Biol*. 18; 235-244
- Dajkovic, A., Mukherjee, A., Lutkenhaus, J. (2008b). Investigation of regulation of FtsZ assembly by Sula and development of a model for FtsZ polymerization. *J. Bacteriol*. 190, 2513-2526
- Dajkovic, A., Pichoff, S., Lutkenhaus, J., Wirtz, D. (2010). Cross-linking FtsZ polymers into coherent Z rings. *Mol. Microbiol*. 78; 651-668

- Dam, M., Gerdes, K. (1994). Partitioning of plasmid R1. Ten direct repeats flanking the *parA* promoter constitute a centromere-like partition site *parC*, that expresses incompatibility. *J Mol Biol* 236; 1289–1298
- Derman, A.I., Becker, E.C., Truong, B.D., Fujioka, A., Tucey, T.M., Erb M.L., Patterson, P.C., Pogliano, J. (2009). Phylogenetic analysis identifies many uncharacterized actin-like proteins (Alps) in bacteria: Regulated polymerization, dynamic instability and treadmilling in Alp7A. *Mol Microbiol* 73; 534–552
- DeRosier, D.J., Tilney, L.G., Egelman, E. (1980). Actin in the inner ear: the remarkable structure of the stereocilium. *Nature, Lond.* 287, 291-6
- Desai, A., Mitchison, T.J. (1997). Microtubule Polymerization Dynamics. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13; 83–117
- Dominguez, R. (2004). Actin-binding proteins - a unifying hypothesis. *TRENDS in Biochemical Sciences* 29(11); 572-578
- Domínguez-Escobar, J., Chastanet, A., Crevenna, A.H., Fromion, V., Wedlich-Söldner, R., Carballido-López, R. (2011). Processive movement of MreB-associated cell wall biosynthetic complexes in bacteria. *Science*. 333(6039); 225-8
- Dos remedios, C.G., Chhabra, D., Kekic, M., Dedova, I.V., Tsubakihara, M., Berry, D.A., Nosworthy, N.J. (2003). Actins Binding Proteins: Regulation of Cytoskeletal Microfilaments. *Physiol Rev.* 83; 433-473
- Durand-Heredia, J.M., Yu, H.H., de Carlo, S., Lesser, C.F., Janakiraman, A. (2011). Identification and characterization of ZapC, a stabilizer of the FtsZ ring in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 193; 1405-1413
- Durand-Heredia, J.M., Rivkin, E., Fan, G., Morales, J., Janakiraman, A. (2012). Identification of ZapD as a cell division factor that promotes the assembly of FtsZ in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 194; 3189-3198
- Edwards, D., Errington, J. (1997). The *Bacillus subtilis* DivIVA protein targets to the division septum and controls the site specificity of cell division. *Mol. Microbiol.* 24; 905-915
- Eichenberger, P., Fawcett, P., Losick, R. (2001). A three-protein inhibitor of polar septation during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol.* 42(5);1147-62
- Elsen, N.L., Lu, J., Parthasarathy, G., Reid, J.C., Sharma, S., Soisson, S.M., Lumb, K.J. (2012). Mechanism of action of the cell-division inhibitor PC190723: modulation of FtsZ assembly cooperativity. *J Am Chem Soc.* 134(30); 12342-5
- Erickson, H.P. (1989). Co-operativity in protein-protein association. The structure and stability of the actin filament. *J Mol Biol.* 206(3); 465-74
- Erickson, H.P., Taylor, D.W., Taylor, K.A., Bramhill, D. (1996a). Bacterial cell division protein FtsZ assembles into protofilament sheets and minirings, structural homologs of tubulin polymers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 93; 519-523
- Erickson, H., Stoffler, D. (1996b). Tubulin rings are universal polymers of the tubulin Family- α/β , γ and FtsZ. *J. Cell Biol.* 135; 5-8
- Erickson, H. (1998). Atomic Structures of Tubulin and FtsZ. *Trends in Cell Biol.* 8; 133-137
- Erickson, H.P., Anderson, D.E., Osawa, M. (2010). FtsZ in Bacterial Cytokinesis: Cytoskeleton and Force Generator All in One. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74(4); 504-528

- Esue, O., Cordero, M., Wirtz, D., Tseng, Y. (2005). The assembly of MreB, a prokaryotic homolog of actin. *J Biol Chem* 280; 2628–2635
- Eswaramoorthy, P., Erb, M.L., Gregory, J.A., Silverman, J., Pogliano, K., Pogliano, J., Ramamurthi, K.S. (2011). Cellular architecture mediates DivIVA ultrastructure and regulates min activity in *Bacillus subtilis*. *MBio*. 2(6); e00257-11
- Feucht A, Lucet I, Yudkin MD, Errington J. (2001). Cytological and biochemical characterization of the FtsA cell division protein of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*. 40(1); 115-25
- Fraxione, E. (2000). Recurring Views on the Structure and Function of the Cytoskeleton: A 300-Year Epic. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 46; 73–94
- Fu, G., Huang, T., Buss, J., Coltharp, C., Hensel, Z., Xiao, J. (2010). In vivo structure of the *E. coli* FtsZ-ring revealed by photoactivated localization microscopy (PALM). *PLoS ONE* 5; e12682
- Galli, E., Gerdes, K. (2010). Spatial resolution of two bacterial cell division proteins: ZapA recruits ZapB to the inner face of the Z-ring. *Mol. Microbiol*. 76; 1514-1526
- Galli, E., Gerdes, K. (2012). FtsZ-ZapA-ZapB interactome of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol*. 194; 292-302
- Garner, E.C., Campbell, C.S., Mullins, R.D. (2004). Dynamic instability in a DNA-segregating prokaryotic actin homolog. *Science* 306; 1021–1025
- Garner, E.C., Campbell, C.S., Weibel, D.B., Mullins R.D. (2007). Reconstitution of DNA segregation driven by assembly of a prokaryotic actin homolog. *Science* 315; 1270–1274
- Garner, E.C., Bernard, R., Wang, W., Zhuang, X., Rudner, D.Z., Mitchison, T. (2011) Coupled, circumferential motions of the cell wall synthesis machinery and MreB filaments in *B. subtilis*. *Science* 333; 222–225
- Geissler, B., Shiomi, D., Margolin, W. (2007). The *ftsA*^{*} gain-of-function allele of *Escherichia coli* and its effects on the stability and dynamics of the Z ring. *Microbiology* 153(3); 814-825
- Gerdes, K., Molin, S. (1986). Partitioning of plasmid R1. Structural and functional analysis of the *parA* locus. *J Mol Biol*. 190(3); 269-79
- Gerdes, K., Howard, M., Szardenings, F. (2010) Pushing and pulling in prokaryotic DNA segregation. *Cell* 141; 927–942
- Gholamhoseinian, A., Shen, Z., Wu, J.J., Piggot, P. (1992). Regulation of transcription of the cell division gene *ftsA* during sporulation of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*. 174(14); 4647-56
- Goehring, N.W., Beckwith, J. (2005) Diverse paths to midcell: assembly of the bacterial cell division machinery. *Curr. Biol*. 15; R514-526
- Goley, E.D., Dye, N.A., Werner, J.N., Gitai, Z., Shapiro, L. (2010). Imaging-based identification of a critical regulator of FtsZ protofilament curvature in *Caulobacter*. *Mol. Cell* 39; 975-987
- Gonzy-Tréboul, G., Karmazyn-Campelli, C. e Stragier, P. (1992). Developmental regulation of transcription of the *Bacillus subtilis* *ftsAZ* operon. *J Mol Biol*. 224(4); 967-79

- Gueiros-Filho, F., Losick, R. (2002). A widely conserved bacterial cell division protein that promotes assembly of the tubulin-like protein FtsZ. *Genes Dev.* 16;2544-2556
- Gündoğdu, M.E., Kawai, Y., Pavlendova, N., Ogasawara, N., Errington, J., Scheffers, D., Hamoen, L.W. (2011). Large ring polymers align FtsZ polymers for normal septum formation. *EMBO J.* 30; 617-626
- Haeusser, D.P., Schwartz, R.L., Smith, A.M., Oates, M.E., Levin, P.A. (2004). EzrA prevents aberrant cell division by modulating assembly of the cytoskeletal protein FtsZ. *Mol Microbiol.* 52(3); 801-14
- Hagiwara, A., Tanaka, Y., Hikawa, R., Morone, N., Kusumi, A., Kimura, H., Kinoshita, M. (2011). Submembranous septins as relatively stable components of actin-based membrane skeleton. 68(9); 512-525
- Haglund, C.M., Welch, M.D. (2011). Pathogens and polymers: microbe–host interactions illuminate the cytoskeleton. *J. Cell Biol.* 195; 7–17
- Hale, C.A., Rhee, A.C., de Boer, P.A. (2000). ZipA-induced bundling of FtsZ polymers mediated by an interaction between C-terminal domains. *J. Bacteriol.* 182; 5153-5166
- Hale, C.A., Shiomi, D., Liu, B., Bernhardt, T.G., Margolin, W., Niki, H., de Boer, P.A. (2011). Identification of *Escherichia coli* ZapC (YcbW) as a component of the division apparatus that binds and bundles FtsZ polymers. *J. Bacteriol.* 193; 1393-1404
- Hamoen, L., Meile, J., de Jong, W., Noirot, P., Errington, J. (2006). SepF, a novel FtsZ-interacting protein required for a late step in cell division. *Mol. Microbiol.* 59; 989-999
- Handler, A., Lim, J.E., Losick, R. (2008). Peptide inhibitor of cytokinesis during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 68(3); 588-599
- Haney, S., Glasfeld, E., Hale, C., Keeney, D., He, Z., de Boer, P. (2001). Genetic analysis of the *Escherichia coli* FtsZ·ZipA interaction in the yeast two-hybrid system. *J. Biol. Chem.* 276; 11980-11987
- Hartwell, L.H. (1971). Genetic control of the cell division cycle in yeast: IV. Genes controlling bud emergence and cytokinesis. *Exp. Cell Res.* 69; 265–276
- Hernández-Rocamora, V.M., García-Montañés, C., Reija, B., Monterroso, B., Margolin, W., Alfonso, C., Zorrilla, S., Rivas, G. (2013). MinC protein shortens FtsZ protofilaments by preferentially interacting with GDP-bound subunits. *J Biol Chem.* 288(34); 24625-35
- Hertzog, M., Heijenoort, C. v., Didry, D., Gaudier, M., Coutant, J., Gigant, B., Didelot, G., Preat, T., Knossow, M., Guittet, E. et al. (2004). The beta-thymosin/WH2 domain; structural basis for the switch from inhibition to promotion of actin assembly. *Cell* 117; 611-623
- Hilbert, D. W., P. J. Piggot. (2004). Compartmentalization of gene expression during *Bacillus subtilis* spore formation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68; 234-262
- Hill, N.S., Buske, P.J., Shi, Y., Levin, P.A. (2013). A moonlighting enzyme links *Escherichia coli* cell size with central metabolism. *PLoS Genet.* 9, e1003663
- Hu, Z., Lutkenhaus, J. (2003). A conserved sequence at the C-terminus of MinD is required for binding to the membrane and targeting MinC to the septum. *Mol. Microbiol.* 47(2); 345–355
- Huecas, S., Andreu, J.M. (2003). Energetics of the cooperative assembly of cell division protein FtsZ and the nucleotide hydrolysis switch. *J. Biol. Chem.* 278; 46146-46154

- Huecas, S., Andreu, J. (2004). Polymerization of nucleotide-free, GDP- and GTP-bound cell division protein FtsZ: GDP makes the difference. *FEBS Lett.* 569; 43-48
- Huxley, H.E. (1963). Electron microscope studies on the structure of natural and synthetic protein filaments from striated muscle. *J. Molec. Biol.* 7; 281-308
- Ihara, M., Kinoshita, A., Yamada, S., Tanaka, H., Tanigaki, A., Kitano, A., Goto, M., Okubo, K., Nishiyama, H., Ogawa, O., Takahashi, C., Itohara, S., Nishimune, Y., Noda, M., Kinoshita, M. (2005). Cortical Organization by the Septin Cytoskeleton Is Essential for Structural and Mechanical Integrity of Mammalian Spermatozoa, *Developmental Cell*, 8(3); 343-352
- Ingerson-Mahar, M., Gitai Z. (2011). A growing family: the expanding universe of the bacterial cytoskeleton. *FEMS Microbiol Rev* 36; 256–266
- Irobi, E., Aguda, A. H., Larsson, M., Guerin, C., Yin, H. L., Burtnick, L. D., Blanchoin, L. , Robinson, R. C. (2004). Structural basis of actin sequestration by thymosin-beta4: implications for WH2 proteins. *EMBO J.* 23; 3599-3608
- Ishikawa, S., Kawai, Y., Hiramatsu, K., Kuwano, M., Ogasawara, N. (2006). A new FtsZinteracting protein, YlmF, complements the activity of FtsA during progression of cell division in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 60; 1364-1380
- Jaworski, J., Kapitein, L.C., Gouveia, S.M., Dortland, B.R., Wulf, P.S., Grigoriev, I., Camera, P., Spangler, S.A., Di Stefano, P., Demmers, J., Krugers, H., Defilippi, P., Akhmanova, A., Hoogenraad, C.C. (2009). Dynamic Microtubules Regulate Dendritic Spine Morphology and Synaptic Plasticity. *Neuron* 61(1); 85–100
- Jennings, P., Cox, G., Monahan, L., Harry, E. (2010). Super-resolution imaging of the bacterial cytokinetic protein FtsZ. *Micron* 42; 336-341
- Jones, L., Carballido-Lopez, R., Errington, J. (2001). Control of cell shape in bacteria: helical, actin-like filaments in *Bacillus subtilis*. *Cell* 104; 913-922
- Joo, E., Tsang, C.W., Trimble, W.S. (2005). Septins: traffic control at the cytokinesis intersection. *Traffic* 6; 626–634
- Kenny, C.H., Ding, W., Kelleher, K., Benard, S., Dushin, E.G., Sutherland, A.G., Mosyak, L., Kriz, R., Ellestad, G. (2003). Development of a fluorescence polarization assay to screen for inhibitors of the FtsZ/ ZipA interaction. *Anal Biochem.* 323(2); 224-33
- Kim, S.Y., Gitai, Z., Kinkhabwala, A., Shapiro, L., Moerner, W.E. (2006). Single molecules of the bacterial actin MreB undergo directed treadmilling motion in *Caulobacter crescentus*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 103; 10929–10934
- Kim, M.S., Froese, C.D., Estey, M.P., Trimble, W.S. (2011). SEPT9 occupies the terminal positions in septin octamers and mediates polymerization-dependent functions in abscission. *J. Cell Biol.* 195; 815–826
- Kinoshita, M., Noda, M. (2001). Roles of septins in the mammalian cytokinesis machinery. *Cell Struct. Funct.* 26; 667–670

- Kissel, H., Georgescu, M.M., Larisch, S., Manova, K., Hunnicutt, G.R., Steller, H. (2005). Sept4 septin locus is required for sperm terminal differentiation in mice. *Dev. Cell* 8; 353–364
- Kozak, M. (1999). Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes. *Gene* 234, 8; 187–208
- Król, E., van Kessel, S.P., van Bezouwen, L.S., Kumar, N., Boekema, E.J., Scheffers, D. (2012). *Bacillus subtilis* SepF binds to the C-terminus of FtsZ. *PLoS ONE* 7; e43293
- Kümmel, D., Müller, J.J., Roske, Y., Henke, N., Heinemann, U. (2006). Structure of the Bet3-Tpc6B core of TRAPP: two Tpc6 paralogs form trimeric complexes with Bet3 and Mum2. *J. Mol. Biol* 361; 22-32
- Larsen, R.A., Cusumano, C., Fujioka, A., Lim-Fong, G., Patterson, P., Pogliano, J. (2007). Treadmilling of a prokaryotic tubulin-like protein, TubZ, required for plasmid stability in *Bacillus thuringiensis*. *Genes Dev.* 21(11); 1340-52
- Ledbetter, M.C., Porter, K.R. (1964). Morphology of microtubules of plant cells. *Science* 44; 872– 874
- Levin, P.A., Losick, R. (1996). Transcription factor Spo0A switches the localization of the cell division protein FtsZ from a medial to a bipolar pattern in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev.* 10; 478-488
- Lewis, P.J. (2001). Bacterial chromosome segregation. *Microbiology* 147(3); 519-26
- Li, C., Schwabe, J.W., Banayo, E., Evans, R.M. (1997). Coexpression of nuclear receptor partners increases their solubility and biological activities. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94(6); 2278-83
- Li, Z., Trimble, M.J., Brun, Y.V., Jensen, G.J. (2007). The structure of FtsZ filaments in vivo suggests a force-generating role in cell division. *EMBO J.* 26; 4694-4708
- Liao, G., Nagasak,i T., Gundersen, G.G. (1995). Low concentrations of nocodazole interfere with fibroblast locomotion without significantly affecting microtubule level: implications for the role of dynamic microtubules in cell locomotion. *J. Cell Sci* 108; 3473–83
- Lim, G.E., Derman, A.I., Pogliano, J (2005). Bacterial DNA segregation by dynamic SopA polymers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102(49); 17658-63.
- Loose, M., Mitchison, T.J. (2013).The bacterial cell division proteins FtsA and FtsZ self-organize into dynamic cytoskeletal patterns. *Nat Cell Biol.* 16(1); 38-46
- Low, H.H., Moncrieffe, M.C., Lowe, J. (2004). The Crystal Structure of ZapA and its Modulation of FtsZ Polymerisation. *J. Mol. Biol.* 341; 839-852.
- Löwe, J. and Amos, L. A. (1998). Crystal Structure of the bacterial cell-division protein FtsZ. *Nature* 391; 203–206
- Lu, C., Reedy, M., Erickson, H.P. (2000). Straight and curved conformations of FtsZ are regulated by GTP hydrolysis. *J. Bacteriol.* 182; 164-170
- Luedeke, C. et al. (2005). Septin-dependent compartmentalization of the endoplasmic reticulum during yeast polarized growth. *J. Cell Biol.* 169; 897–908
- Lutkenhaus, J.F., Wolf-Watz, H., Donachie, W.D. (1980). Organization of genes in the ftsA-envA region of the *Escherichia coli* genetic map and identification of a new fts locus (ftsZ). *J. Bacteriol.* 142(2); 615-620
- Ma, S., Ma, S. (2012). The development of FtsZ inhibitors as potential antibacterial agents. *Chem Med Chem.* 7(7);1161-72

- Ma, X., Margolin, W. (1999). Genetic and functional analyses of the conserved C-terminal core domain of *Escherichia coli* FtsZ. *J. Bacteriol.* 181; 7531-7544
- Macleod-Fletcher, S., Pollard, T.D. (1980). Mechanism of Action of Cytochalasin B on Actin. *Cell* 20; 329-341
- Margolin, W. (2003). Bacterial Division: The Fellowship of The Ring. *Current biology* 13(1): R16 - R18
- Margolis, R.L., Wilson, L. (1977). Addition of colchicine-tubulin complex to microtubule ends: The mechanism of substoichiometric colchicine poisoning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74(8); 3466-3470
- Margolis, R.L., Wilson, L. (1978). Opposite End Assembly and Disassembly of Microtubules at Steady State in Vitro. *Cell* 13; 1-8
- Margolis, R.L., Wilson, L. (1981). Microtubule treadmills - possible molecular machinery. *Nature* 293; 705-711
- Margolis, R.L., Wilson, L. (1998). Microtubule treadmilling: what goes around comes around. *BioEssays* 20; 830-836
- Marshall, W.F., Young, K.D., Swaffer, M., Wood, E., Nurse, P., Kimura, A., Frankel, J., Wallingford, J., Walbot, V., Qu, X., Roeder, A.H.K. (2012). What determines cell size? *BMC Biol* 10; 101
- Marston, A., Errington, J. (1999). Dynamic movement of the ParA-like Soj protein of *B. subtilis* and its dual role in nucleoid organization and developmental regulation. *Mol. Cell* 4; 673-682
- Maruyama K., Kurokawa H., Oosawa M., Shimaoka S., Yamamoto H., Ito M., Maruyama K. (1990). Beta-actinin is equivalent to Cap Z protein. *J. Biol. Chem.* 265(15); 8712-5
- Matsui, T., Yamane, J., Mogi, N., Yamaguchi, H., Takemoto, H., Yao, M., Tanaka, I. Mayer, J.A., Amann, K.J. (2009). Assembly properties of the *Bacillus subtilis* actin, MreB. *Cell Motil Cytoskeleton* 66; 109-118
- Matsui, T., Yamane, J., Mogi, N., Yamaguchi, H., Takemoto, H., Yao, M., Tanaka, I. (2012). Structural reorganization of the bacterial cell-division protein FtsZ from *Staphylococcus aureus*. *Acta Cryst. Sec. D* 68; 1175-1188
- Matsui, T., Han, X., Yu, J., Yao, M., Tanaka, I. (2013). Structural Change in FtsZ Induced by Intermolecular Interactions between Bound GTP and the T7 Loop. *J Biol Chem* 289(6); 3501-9
- McNally, F.J., Vale, R.D. (1993). Identification of katanin, an ATPase that severs and disassembles stable microtubules. *Cell* 75(3); 419 - 429
- Mendieta, J., Rico, A., Lopez-Vinas, E., Vicente, M., Mingorance, J., Gomez-Puertas, P. (2009). Structural and functional model for ionic (K(+)/Na(+)) and pH dependence of GTPase activity and polymerization of FtsZ, the prokaryotic ortholog of tubulin. *J. Mol. Biol.* 390; 17-25
- Mingorance, J., Tadros, M., Vicente, M., González, J.M., Rivas, G., Vélez, M. (2005). Visualization of single *Escherichia coli* FtsZ filament dynamics with atomic force microscopy. *J Biol Chem.* 280(21); 20909-14
- Miraldi, E.R., Thomas, P.J., Romberg, L. (2008). Allosteric models for cooperative polymerization of linear polymers *Biophys J.* 95(5); 2470-86

- Mitchison, T., Kirschner, M. (1984). Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* 312; 237-242
- Mohammadi, T., Ploeger, G.E., Verheul, J., Comvalius, A.D., Martos, A., Alfonso, C., van Marle, J., Rivas, G., den Blaauwen, T. (2009). The GTPase Activity of *Escherichia coli* FtsZ Determines the Magnitude of the FtsZ Polymer Bundling by ZapA in Vitro. *Biochemistry* 48(46); 11056–11066
- Moller-Jensen, J., Jensen, R.B., Lowe, J., Gerdes, K. (2002). Prokaryotic DNA segregation by an actin-like filament. *EMBO J* 21; 3119–3127
- Mostowy, S., Cossart, P. (2012). Septins: the fourth component of the cytoskeleton. *Nature Reviews* 13; 183-194
- Mosyak, L., Zhang, Y., Glasfeld, E., Haney, S., Stahl, M., Seehra, J., Somers, W. (2000). The bacterial cell-division protein ZipA and its interaction with an FtsZ fragment revealed by Xray crystallography. *EMBO J.* 19; 3179-3191
- Moy, F., Glasfeld, E., Mosyak, L., Powers, R. (2000). Solution structure of ZipA, a crucial component of *Escherichia coli* cell division. *Biochemistry* 39; 9146-9156
- Mukherjee, A., Lutkenhaus, J. (1994). Guanine nucleotide-dependent assembly of FtsZ into filaments. *J Bacteriol.* 176(9); 2754-2758
- Mukherjee, A., Cao, C., Lutkenhaus, J. (1998) Inhibition of FtsZ polymerization by SulA, an inhibitor of septation in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 95; 2885-2890.
- Mukherjee, A., Lutkenhaus, J. (1999). Analysis of FtsZ assembly by light scattering and determination of the role of divalent metal cations. *J. Bacteriol.* 181; 823-832
- Needham, D.M. (1942). The adenosinetriphosphatase activity of myosin preparations. *Biochem J* 36; 113–120
- Neuhaus, J.M., Wanger, M., Keiser, T., Wegner, A. (1983). Treadmilling of actin. *J. of Muscle Res. and Cell Mot.* 4; 507-527
- Nogales, E., Wolf, S. G. and Downing, K. H. (1998a). Tubulin and FtsZ form a distinct family of GTPases. *Nature* 391; 199–203
- Nogales, E., Wolf, S. G. and Downing, K. H. (1998b). Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography. *Nature* 391;199-203
- Nurse, P., Mariani, K.J. (2013). Purification and Characterization of *Escherichia coli* MreB Protein. *The Journal of Biological Chemistry* 288; 3469-3475
- Oda, T., Iwasa, M., Aihara, T., Maeda, Y., Narita, A. (2009). The nature of the globular-to fibrous-actin transition. *Nature* 457; 441–445
- Oliva, A., Cordell, S.C., Löwe, J. (2004). Structural insights into FtsZ protofilament formation. *Nature Struct. & Mol. Biol.* 11; 1243 – 1250
- Oliva, A., Trambaiolo, D., Löwe, J. (2007). Structural Insights into the Conformational Variability of FtsZ. *J. of Mol. Biol.* 373; 1229-1242
- Osteryoung, K.W., Nunnari, J. (2003). The division of endosymbiotic organelles. *Science* 302; 1698-1704

- Paavilainen, V.O., Bertling, E., Falck, S., Lappalainen, P. (2004). Regulation of cytoskeletal dynamics by actin-monomer-binding proteins. *Trends Cell Biol.* 14; 386-394
- Pan, F., Malmberg, R., Momany, M. (2007). Analysis of septins across kingdoms reveals orthology and new motifs. *BMC Evol. Biol.* 7; 103
- Pease, D.C. (1963). The ultrastructure of flagellar fibrils. *J Cell Biol* 18; 313–326
- Pecqueur, L., Duellberg, C., Dreier, B., Jiang, Q., Wang, C., Plückthun, A., Surrey, T., Gigant, B., Knossow, M. (2012). A designed ankyrin repeat protein selected to bind to tubulin caps the microtubule plus end. *Proc Natl Acad Sci USA.* 109(30);12011-6
- Peters, P.C., Migocki, M.D., Thoni, C., Harry, E.J. (2007). A new assembly pathway for the cytokinetic Z ring from a dynamic helical structure in vegetatively growing cells of *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 64; 487-499
- Pichoff, S., Lutkenhaus, J. (2005). Tethering the Z ring to the membrane through a conserved membrane targeting sequence in FtsA. *Mol. Microbiol.* 55; 1722-1734
- Pogliano, J. (2008). The bacterial cytoskeleton. *Curr. Opinion in Cell Biology*, 20: 19–27
- Pollard, T.D., Mooseker, M.S. (1981). Direct Measurement of Actin Polymerization Rate Constants by Electron Microscopy of Actin Filaments Nucleated by Isolated Microvillus Cores. *J Cell Biol.* 88(3); 654-9.
- Pollard, T.D. and Borisy, G.G. (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112, 453-465 (Erratum in *Cell* 2003 113, 549).
- Ramamurthi, K.S., Losick, R. (2009). Negative membrane curvature as a cue for subcellular localization of a bacterial protein. *Proc Natl Acad Sci USA.* 106(32); 13541-5
- Ray, S., Kumar, A., Panda, D. (2013). GTP regulates the interaction between MciZ and FtsZ: a possible role of MciZ in bacterial cell division. *Biochemistry.* 52(2); 392-401
- Redick, S., Stricker, J., Briscoe, G., Erickson, H.P. (2005). Mutants of FtsZ targeting the protofilament interface: effects on cell division and GTPase activity. *J. Bacteriol.* 187; 2727-2736
- Reimold, C., Soufo, H.J.D., Dempwolff, F., Graumann, P.L. (2013). Motion of variable-length MreB filaments at the bacterial cell membrane influences cell morphology. *Mol. Biol. Cell* 24(15); 2340-2349
- Rico, A.I., García-Ovalle, M., Mingorance, J., Vicente, M. (2004). Role of two essential domains of *Escherichia coli* FtsA in localization and progression of the division ring. *Molecular Microbiology* 53; 1359-1371
- Rochette, N.C., Brochier-Armanet C., Gouy M. (2014). Phylogenomic Test of the Hypotheses for the Evolutionary Origin of Eukaryotes. *Mol Biol Evol.* [Epub ahead of print]
- Roll-Mecak, A., McNally, F.J. (2010). Microtubule-severing enzymes, *Current Opinion in Cell Biology* 22(1); 96-103
- Romberg, L., Simon, M., Erickson, H.P. (2001). Polymerization of FtsZ, a Bacterial Homolog of Tubulin. *J. Biol. Chem.* 276(15); 11743-11753

- Romberg, L., Levin, P.A. (2003). Assembly dynamics of the bacterial cell division protein FtsZ: poised at the edge of stability. *Annu. Rev. Microbiol.* 57;125-154
- Romier, C., Ben Jelloul, M., Albeck, S., Buchwald, G., Busso, D., Celie, P.H., Christodoulou, E., De Marco, V., van Gerwen, S., Knipscheer, P., Lebbink, J.H., Notenboom, V., Poterszman, A., Rochel, N., Cohen, S.X., Unger, T., Sussman, J.L., Moras, D., Sixma, T.K., Perrakis, A. (2006). Co-expression of protein complexes in prokaryotic and eukaryotic hosts: experimental procedures, database tracking and case studies. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 62(10); 1232-42
- Rothfield, L., Taghbalout, A., and Shih, Y.L. (2005). Spatial control of bacterial division-site placement. *Nat. Rev. Microbiol.* 3; 959-968
- Rudner, D.Z., Losick, R. (2001). Morphological coupling in development: lessons from prokaryotes. *Dev Cell.* 2001 Dec;1(6):733-42
- Russell, S.E.H., Hall, P.A. (2011) Septin genomics: a road less travelled. *Biol. Chem.* 392, 763–767
- Sass, P., Brötz-Oesterhelt, H. (2013). Bacterial cell division as a target for new antibiotics. *Curr Opin Microbiol.* 16(5); 522-30
- Sellin, M.E., Holmfeldt, P., Stenmark, S., Gullberg, M. (2011). Microtubules support a disc-like septin arrangement at the plasma membrane of mammalian cells. *Mol. Biol. Cell* 22; 4588–4601
- Shaewitz, J.W., Gitai, Z. (2010). The Structure and Function of Bacterial Actin Homologs. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2(9)
- Shen, B., Lutkenhaus, J. (2009). The conserved C-terminal tail of FtsZ is required for the septal localization and division inhibitory activity of MinC/MinD. *Mol. Microbiol.* 72; 410-424
- Shen, B., Lutkenhaus, J. (2010). Examination of the interaction between FtsZ and MinCN in *E. coli* suggests how MinC disrupts Z rings. *Mol. Microbiol.* 75; 1285-1298
- Shen B, Lutkenhaus J. (2011). Differences in MinC/MinD sensitivity between polar and internal Z rings in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 193(2); 367-76
- Singh, J., Makde, R., Kumar, V., and Panda, D. (2007). A membrane protein, EzrA, regulates assembly dynamics of FtsZ by interacting with the C-terminal tail of FtsZ. *Biochemistry* 46; 11013-11022
- Sirajuddin, M. et al. (2007). Structural insight into filament formation by mammalian septins. *Nature* 449; 311–315
- Sirajuddin, M., Farkasovsky, M., Zent, E., Wittinghofer, A. (2009). GTP-induced conformational changes in septins and implications for function. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 106; 16592–16597
- Slautterback, D.B. (1963). Cytoplasmic microtubules. I. Hydra. *J Cell Biol* 18; 367–388
- Small, E., Marrington, R., Rodger, A., Scott, D., Sloan, K., Roper, D., Dafforn, T., Addinall, S. (2007). FtsZ Polymer-bundling by the *Escherichia coli* ZapA Orthologue, YgfE, Involves a Conformational Change in Bound GTP. *J. of Mol. Biol.* 369(1); 210-221
- Sobel, A. (1991). Stathmin: a relay phosphoprotein for multiple signal transduction? *Trends in Biochemical Sciences* 16; 301-305

- Son, S.H., Lee, H.H. (2013). The N-terminal domain of EzrA binds to the C terminus of FtsZ to inhibit *Staphylococcus aureus* FtsZ polymerization. *Biochem Biophys Res Commun.* 433(1)
- Southwick, F.S., Hartwig, J.H. (1982). Acumentin, a protein in macrophages which caps the "pointed" end of action filaments. *Nature* 297(5864); 303-7
- Southwick, F.S., Tatsumi, N., Stossel, T.P. (1982). Acumentin, an actin-modulating protein of rabbit pulmonary macrophages. *Biochemistry* 21(24); 6321-6
- Steinmetz, M.O., Stöffler D., Hoenger A., Bremer A., Aebersold U. (1997). Actin: from cell biology to atomic detail. *J Struct Biol.* 119(3); 295-320
- Stragier, P., Losick R., (1996). Molecular Genetics Sporulation in *Bacillus subtilis*. *Annu. Rev. Genet.* 30; 297-341
- Straub, F.B. (1943). Actin. *Stud Inst Med Chem Univ Szeged* 2; 3–15
- Strauss, M.P., Liew, A.T., Turnbull, L., Whitchurch, C.B., Monahan, L.G., Harry, E.J. (2012). 3D-SIM super resolution microscopy reveals a bead-like arrangement for FtsZ and the division machinery: Implications for triggering cytokinesis. *PLoS Biol.* 10, e1001389
- Stricker, J., Maddox, P., Salmon, E., and Erickson, H. (2002). Rapid assembly dynamics of the *Escherichia coli* FtsZ-ring demonstrated by fluorescence recovery after photobleaching. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* 99; 3171-3175
- Stricker, J., Erickson, H.P. (2003). In Vivo Characterization of *Escherichia coli* ftsZ Mutants: Effects on Z-Ring Structure and Function. *J. of Bacteriol.* 185; 4796-4805
- Sun, Q., Margolin, W. (1998). FtsZ dynamics during the division cycle of live *Escherichia coli* cells. *J. Bacteriol.* 180; 2050-2056
- Surovtsev, I.V., Morgan, J.J., Lindahl, P.A. (2008). Kinetic modeling of the assembly, dynamic steady state, and contraction of the FtsZ ring in prokaryotic cytokinesis. *PLoS Comput Biol.* 4(7):e1000102
- Szeto, T., Rowland, S., Rothfield, L., King, G. (2002). Membrane localization of MinD is mediated by a C-terminal motif that is conserved across eubacteria, archaea, and chloroplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99(24); 15693–15698
- Szwedziak, P., Wang, Q., Freund, S.M., Louml, J., Löwe, J. (2012). FtsA forms actin-like protofilaments. *EMBO J.* 31; 2249-2260
- Tada, T., Simonetta, A., Batterton, M., Kinoshita, M., Edbauer, D., Sheng, M., (2007). Role of Septin Cytoskeleton in Spine Morphogenesis and Dendrite Development in Neurons. *Current Biology* 17(20); 1752-1758
- Takizawa, P.A., DeRisi, J.L., Wilhelm, J.E., Vale, R.D. (2000). Plasma membrane compartmentalization in yeast by messenger RNA transport and a septin diffusion barrier. *Science* 290; 341–344
- TerBush, A.D., Osteryoung, K.W. (2012). Distinct functions of chloroplast FtsZ1 and FtsZ2 in Z-ring structure and remodeling. *J. Cell Biol.* 199; 623-637
- Tetsuya, H., Hotani, H. (1986). Visualization of the dynamic instability of individual microtubules by dark-field microscopy. *Nature* 321; 605-607

- Thanedar, S., Margolin, W. (2004). FtsZ exhibits rapid movement and oscillation waves in helix-like patterns in *Escherichia coli*. *Curr. Biol.* 14; 1167-1173
- Theriot, J.A. (2013). Why are bacteria different from eukaryotes? *BMC Biol.*; 11-119.
- Tilney, L.G., Bryan, J., Bush, D.J., Fujiwara, K., Mooseker, M.S., Murphy, D.B., Snyder, D.H. (1973). Microtubules: evidence for 13 protofilaments. *J Cell Biol* 59; 267–275
- Tonthat, N., Arold, S., Pickering, B., van Dyke, M., Liang, S., Lu, Y., Beuria, T., Margolin, W., Schumacher, M. (2011). Molecular mechanism by which the nucleoid occlusion factor, SlmA, keeps cytokinesis in check. *EMBO J.* 30; 154-164
- Tonthat, N.K., Milam, S.L., Chinnam, N., Whitfill, T., Margolin, W., Schumacher, M.A. (2013). SlmA forms a higher-order structure on DNA that inhibits cytokinetic Z-ring formation over the nucleoid. *Proc Natl Acad Sci USA.* 110(26); 10586-91
- van Baarle, S., Bramkamp, M. (2010). The MinCDJ system in *Bacillus subtilis* prevents minicell formation by promoting divisome disassembly. *PLoS One.* 5(3); e9850
- van den Ent, F., Amos, L., Löwe, J. (2001). Prokaryotic origin of the actin cytoskeleton. *Nature* 413; 39-44
- van den Ent, F., Moller-Jensen, J., Amos, L.A., Gerdes, K., Lowe, J. (2002). F-actin-like filaments formed by plasmid segregation protein ParM. *EMBO J* 21; 6935–6943
- Vaughan, S., Wickstead, B., Gull, K., Addinall, S.G. (2004). Molecular evolution of FtsZ protein sequences encoded within the genomes of archaea, bacteria, and eukaryota. *J. Mol. Evol.* 58; 19-29
- Wagner-Herman, J., Bernard, R., Dunne, R., Bisson-Filho, A.W., Kumar, K., Nguyen, T., Mulcahy, L., Koullias, J., Gueiros-Filho, F.J., Rudner, D.Z. (2012). RefZ Facilitates the Switch from Medial to Polar Division during Spore Formation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 194(17); 4608
- Wainwright, M. (2003). An Alternative View of the Early History of Microbiology. *Advances in Applied Microbiology* 52; 333–55
- Walker, R.A., O'Brien, E.T., Pryer, N.K., Soboeiro, M.F., Voter, W.A., Erickson, H.P., Salmon, E.D. (1988). Dynamic instability of individual microtubules analyzed by video light microscopy: rate constants and transition frequencies. *J. Cell Biol* 107; 1437–48
- Wang, H., Chong, S. (2003). Visualization of coupled protein folding and binding in bacteria and purification of the heterodimeric complex. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100(2); 478-83
- Wang, Y., Jones, B.D., Brun, Y.V. (2001). A set of ftsZ mutants blocked at different stages of cell division in *Caulobacter*. *Mol Microbiol.* 40(2); 347-60
- Waters, J.C., Salmon, E.D. (1996). Cytoskeleton: A catastrophic kinesin, *Current Biology* 6(4); 361-363
- Weart RB, Lee AH, Chien AC, Haeusser DP, Hill NS, Levin, P.A. (2007) A metabolic sensor governing cell size in bacteria. *Cell* 130; 335-347
- Wegner, A. (1976). Head to Tail Polymerization of Actin. *J. Mol. Biol.* 108; 139-150
- Wickstead B., Gull K. (2011). The evolution of the cytoskeleton. *J Cell Biol.* 194(4); 513-25
- Williams, T.A., Foster, P.G., Cox, C.J., Embley, T.M. (2013). An archaeal origin of eukaryotes supports only two primary domains of life. *Nature* 504; 231–236

- Wittinghofer, A., Vetter, I.R. (2011). Structure–function relationships of the G domain, a canonical switch motif. *Annu. Rev. Biochem.* 80; 943–971
- Woldringh, C.L., Mulder, E., Huls, P.G., Vischer, N. (1991). Toporegulation of bacterial division according to the nucleoid occlusion model. *Res. Microbiol.* 142; 309-320
- Wu, L.J., Errington, J. (2004). Coordination of cell division and chromosome segregation by a nucleoid occlusion protein in *Bacillus subtilis*. *Cell* 117; 915-925
- Xie, Y. et al. (2007). The GTP-binding protein septin 7 is critical for dendrite branching and dendritic-spine morphology. *Curr. Biol.* 17; 1746–1751
- Zent, E., Vetter, I., Wittinghofer, A. (2011). Structural and biochemical properties of Sept7, a unique septin required for filament formation. *Biol. Chem.* 392; 791–797
- Zheng, Y., Wong, M.L., Alberts, B., Mitchison, T. (1995). Nucleation of microtubule assembly by a γ -tubulin-containing ring complex. *Nature* 378(6557); 578-583