

UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA



ANÁLISE DA ESTRUTURA E FUNÇÃO DA
PROTEÍNA MORFOGENÉTICA RodZ DE
Bacillus subtilis

ANA MARGARIDA PAIVA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE
EM MICROBIOLOGIA MÉDICA

OEIRAS, DEZEMBRO 2011

UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA



ANÁLISE DA ESTRUTURA E FUNÇÃO DA
PROTEÍNA MORFOGENÉTICA RodZ DE
Bacillus subtilis

ANA MARGARIDA PAIVA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
MICROBIOLOGIA MÉDICA

Orientador: Professor Doutor Adriano O. Henriques

Co-orientadora: Doutora Teresa Costa

Trabalho realizado no Grupo de Desenvolvimento Microbiano, no Instituto de Tecnologia Química e Biológica, da Universidade Nova de Lisboa, Avenida da República, EAN, 2780-157 Oeiras

OEIRAS, DEZEMBRO 2011

Esta dissertação foi escrita de acordo com as regras anteriores ao acordo ortográfico.

Elementos bibliográficos resultantes desta dissertação

Publicações

Paiva*, A., **Costa***, T., **Pereira, A., Matzapetakis, M., Rodrigues, J., Groves, P., Gomes, C., and Henriques., A. O.** 2011. Analysis of the ectodomain of *Bacillus subtilis* RodZ. Manuscrito em preparação.

Costa*, T., **Paiva***, A., **Pereira, A. C., Matzapetakis M. and Henriques., A. O.** 2011. Structural basis for the function of the helix-turn-helix domain of *Bacillus subtilis* RodZ in cell shape control. Manuscrito em preparação.

*Comunicações orais*¹

Pereira, A. C., Paiva, A., Costa, T., Henriques, A. O., Matzapetakis, M. 2011. NMR investigation of the *Bacillus subtilis* morphogenic factor RodZ. *Interbio Summer School on Structural Biology - NMR applications in Protein Research*. Setembro 22-30. Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Oeiras, Portugal

* Estes autores contribuíram de igual modo para o trabalho.

¹ O nome do autor que apresentou o trabalho está sublinhado.

Agradecimentos

Desde já agradeço à Comissão do Mestrado em Microbiologia Médica, organizado pelo Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Faculdade de Ciências Médicas, Instituto de Tecnologia Química e Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, pela oportunidade de frequentar esta quarta edição do Mestrado, e ao Laboratório de Desenvolvimento Microbiano, do Instituto de Tecnologia Química e Biológica, por me ter recebido.

Agradeço ao Professor Doutor Adriano Henriques pela sua sábia orientação, bastante enriquecedora, tanto profissionalmente como pessoalmente. Agradeço não só ao Professor Doutor Adriano Henriques, como também à Doutora Teresa Costa pela possibilidade de integrar um projecto estimulante e por incentivarem o meu interesse pelo conhecimento.

Um agradecimento especial à Doutora Teresa Costa pela extraordinária orientação, compreensão e confiança. Agradeço principalmente por tudo o que me ensinou, dentro e fora do âmbito laboratorial.

Agradeço também ao Dr. Cláudio M. Gomes, do laboratório de *Protein Biochemistry Folding & Stability*, pela realização da análise por espectroscopia de dicroísmo circular. Ao Dr. Patrick Groves do laboratório de *Molecular Interactions and NMR*, pela realização de experiências de *Diffusion Ordered NMR* e 1D ^1H NMR. E ao Dr. Manolis Matzapetakis, assim como à licenciada Ana Pereira, do laboratório de *Biomolecular NMR Laboratory*, pela realização de experiências de 1D ^1H NMR e determinação de estrutura. A todos agradeço a fantástica cooperação durante a realização deste trabalho.

Agradeço também à licenciada Joana Rodrigues por toda a ajuda no Laboratório de Desenvolvimento Microbiano e pelo apoio oferecido na realização dos ensaios em SEC.

Não posso deixar de agradecer a todos os que fazem parte do Laboratório de Desenvolvimento Microbiano (Catarina, Cláudia, Fátima, Filipa, Mónica, João, Carolina e Tiago) pelo acolhimento no laboratório e por todo o apoio prestado. E em especial à Doutora Mónica Serrano por toda a paciência e ajuda com os ensaios de dois-híbridos *Split-Ubiquitin*.

Agradeço igualmente aos membros do laboratório *Genomics and Stress Laboratory*, da Professora Doutora Claudina Rodrigues. Em particular à Doutora Regina Menezes pela disponibilidade e apoio prestados nos ensaios com leveduras.

Um agradecimento final, aos meus pais, por me possibilitarem a realização deste mestrado, e por toda a sua ajuda. E também à Sara, ao António e ao Bruno por todo o apoio.

Resumo

RodZ é um componente do sistema morfogénico das células bacterianas. É uma proteína transmembranar que localiza em bandas ao longo do eixo longitudinal da célula. Em *Bacillus subtilis*, RodZ consiste numa porção citoplasmática, RodZn, e em uma parte extra-citoplasmática, RodZc. RodZn contém um domínio em *helix-turn-helix* (HTH), enquanto que RodZc pode ser dividido num domínio *coiled-coil* e num domínio terminal C, de função desconhecida. Um segmento transmembranar (TM) único separa RodZn de RodZc. A eliminação de *rodZ* causa alongamento do nucleóide e leva à produção de células polares nucleadas. Aqui, mostramos que RodZn é estruturado, estável e em hélice α . Descobrimos que as substituições Y32A e L33A na suposta hélice de reconhecimento (α 3) do motivo HTH, bem como as substituições Y49A e F53A, fora do motivo HTH (α 4), causam divisão assimétrica, mas apenas as últimas levam à deslocalização sub-celular de RodZ. Sugerimos que as hélices α 3 e α 4 são utilizadas para uma interacção proteína-proteína ou proteína-DNA essencial para divisão celular enquanto que α 4 deve contactar um componente do citosqueleto, possivelmente MreB, uma vez que a correcta localização sub-celular de RodZ depende desta proteína. Em todos os mutantes as células polares são anucleadas, pelo que concluímos que o alongamento do nucleóide não é um pré-requisito para divisão assimétrica. RodZc é largamente não estruturado mas com conteúdo de folha β , sendo estabilizado pelo domínio *coiled-coil*. Mostramos uma relação homóloga entre RodZc e a bomba de transporte $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ NCX1 e identificámos dois resíduos no domínio C, G265 e N275, essenciais para a manutenção da forma celular. Estes resíduos fazem parte de um motivo em gancho que pode actuar como um local de interacção com um ligando desconhecido. RodZn e RodZc são monoméricos em solução. Contudo, na membrana, RodZ interage consigo própria num sistema de dois híbridos (*Split-Ubiquitin*) em levedura, sugerindo que possa formar multímeros *in vivo*.

Abstract

RodZ is a transmembrane component of the bacterial core morphogenic apparatus. RodZ localizes in bands long the longitudinal axis of the cell, and it is thought to functionally link the cell wall to the actin cytoskeleton. In *Bacillus subtilis*, RodZ consists of a cytoplasmic moiety, RodZn, and an extracytoplasmic moiety, RodZc. RodZn contains a predicted helix-turn-helix domain, whereas RodZc is thought to contain a coiled-coil region and a terminal C domain of unknown function. A single transmembrane domain separates RodZn from RodZc. Deletion of *rodZ* causes elongation of the nucleoid and leads to the production of polar minicells containing DNA. Here, we have studied the structure and function of RodZn and RodZc. We show that RodZn is a stable, folded, α -helical domain. We discovered that the Y32A and L33A substitutions within the presumptive recognition helix (α 3) of the HTH motif, as well as the Y49A and F53A substitutions outside of the HTH motif (in α 4) cause asymmetric cell division. However, only the substitutions in α 4 cause sub-cellular delocalization of RodZ. We suggest that α 3 and α 4 are used for a protein-protein or protein-DNA interaction important for cell division, whereas α 4 is likely to contact a cytoskeletal component, presumably MreB. The polar cells formed by all the mutants are anucleate. We conclude that nucleoid elongation is not a prerequisite for asymmetric division. RodZc appears to be a largely unstructured domain, with some β -sheet content, and is stabilized by the coiled-coil region. We show a homology relationship between RodZc and the NCX1 Na⁺/Ca²⁺ transporter and we found two residues within the C domain, G265 and N275, that are important for cell shape determination. These residues are predicted to be essential determinants of a claw-like motif, which may act as a binding site for an unknown ligand. Both the isolated RodZn and RodZc proteins are monomeric in solution. However, because full-length RodZ interacts with itself in a split-ubiquitin yeast two-hybrid assay, we suggest that it may dimerize or form higher order multimers *in vivo*.

Símbolos e Abreviaturas²

%	Porcentagem
min	Minutos
DO	Densidade Óptica
TA	Temperatura Ambiente
ddH ₂ O	Água bi-destilada
rpm	Rotações por minuto
ppm	Partes por milhão
nm	Nanómetro
g	Gramma
ml	Mililitro
V	Volt
µl	Microlitro
M	Molar
h	Hora
µg	Micrograma
mM	Milimolar
µM	Micramolar
°C	Graus Celsius
g	Força-g
kDa	Kilo Daltons
::	Interrupção ou junção
Δ	Eliminação
T _m	Temperatura de <i>melting</i>
Amp	Ampicilina
Neo	Neomicina
Sp	Spectinomomicina
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo
ONPG	<i>o</i> -Nitrophenyl-β-galactosidase
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
YFP	Proteína fluorescente amarela (<i>Yellow Fluorescent Protein</i>)
BSA	Albumina do soro bovino

² As abreviaturas utilizadas e a nomenclatura para as unidades de medida e quantidades físicas e químicas estão de acordo com as instruções dos autores do *Journal of Biological Chemistry* (www.jbc.org).

DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
mAU	<i>Mili</i> unidades de absorvância
wt	Estirpe ou fenótipo selvagem
N	Asparagina
A	Alanina
G	Glicina
L	Leucina
Y	Tirosina
F	Fenilalanina
K	Lisina
R	Arginina
S	Serina
I	Isoleucina
D	Aspartato
E	Glutamato
V	Valina
MW	Pesos moleculares (<i>Molecular Weight</i>)
PCR	Reacção em cadeia da polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
OE-PCR	PCR por extensão de fragmentos sobreponíveis (<i>Overlapping Extension PCR</i>)
PSI	<i>Pound Force per Square Inch</i>
LB	Versão líquida do meio de cultura Luria-Bertani
LA	Meio de cultura Luria-Bertani solidificado com agár
YPAD	Meio de cultura de <i>Yeast Extract-Peptone-Dextrose</i>
SD	Meio de cultura de <i>Synthetic Dextrose</i>
IMAC	Cromatografia de afinidade por metais imobilizados (<i>Immobilized Metal Affinity Chromatography</i>)
SEC	Cromatografia de Exclusão Molecular (<i>Size Exclusion Chromatography</i>)
FRET	Transferência de energia por ressonância de fluorescência (<i>Fluorescence resonance energy transfer</i>)
NMR	Ressonância Magnética Nuclear (<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)
1D ¹ H NMR	Ressonância magnética nuclear de prótons 1D
CD	Espectroscopia de Dicroísmo Circular (<i>Circular Dichroism Spectroscopy</i>)
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
TSDS-PAGE	Electroforese em géis desnaturantes de Tris-tricina contendo SDS (<i>Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis</i>)

Índice Geral

1. Introdução	1
1.1. <i>Bacillus subtilis</i>	1
1.2. Morfologia Celular	2
1.3. Alongamento celular e a proteína do citosqueleto MreB	4
1.4. Segregação dos cromossomas e Divisão Celular	5
1.5. O septo de divisão e a proteína do citosqueleto FtsZ	6
1.6. A proteína morfogenética RodZ	8
1.7. Objectivos	14
2. Material e métodos	15
2.1. Estirpes e condições de crescimento	15
2.2. Indução da competência e transformação de células bacterianas e de levedura	15
2.3. Manipulações enzimáticas	17
2.4. Extracção de DNA	18
2.4.1. Extracção de DNA plasmídico	18
2.4.2. Extracção do DNA genómico de <i>B. subtilis</i>	19
2.5. Construções para a super-produção dos domínios RodZn e RodZc	19
2.6. Introdução de mutações pontuais no domínio citoplasmático de RodZ	20
2.7. Introdução de mutações pontuais no domínio extra-citoplasmático de RodZ	21
2.8. Construções para a produção de NubG-RodZ e de Cub-RodZ	22
2.9. Super-produção e purificação dos domínios RodZn e RodZc	22
2.10. TSDS-PAGE e detecção imunológica de proteínas	23
2.11. Cromatografia de exclusão molecular por filtração em gel	24
2.12. Digestão controlada pela Tripsina	25
2.13. Ensaio de estabilidade térmica	26
2.14. Análise estrutural dos domínios RodZn e RodZc por espectroscopia de dicroísmo circular e <i>Diffusion ordered</i> NMR	26
2.15. Análise estrutural do domínio citoplasmático de RodZ por NMR	27
2.16. Microscopia de fluorescência	27
2.17. Sistema de dois híbridos <i>Split-Ubiquitin</i>	28
2.17.1. Detecção de interacção por ensaios de actividade da enzima β -galactosidase	28
3. Resultados	29
3.1. Super-produção e purificação de RodZ ₁₋₉₃ -His ₆ e His ₆ -RodZ ₂₀₁₋₃₀₄	29
3.2. Os domínios RodZn e RodZc são monoméricos em solução	31
	x

3.2.1. Análise por cromatografia de exclusão molecular	31
3.2.2. Análise por <i>Diffusion-ordered</i> NMR (DOSY)	32
3.3. Estabilidade térmica e proteolítica de RodZn e de RodZc	33
3.3.1. Previsão de estrutura secundária	33
3.3.2. Estabilidade térmica	34
3.3.3. Susceptibilidade à tripsina	35
3.4. Estrutura de RodZn e de RodZc: análise por CD e 1D ¹ H NMR	37
3.4.1. RodZn é um domínio estruturado e maioritariamente em hélice α	38
3.4.2. RodZc é parcialmente estruturado e estabilizado pelo domínio <i>coiled-coil</i>	38
3.5. Estrutura de RodZn e de RodZc: modelos estruturais	40
3.5.1. Um modelo para RodZn	40
3.5.2. A estrutura de RodZc é remanescente de NCX1	42
3.6. Mutações pontuais no domínio HTH afectam a localização sub-celular de RodZ	45
3.7. Mutações pontuais em resíduos conservados do domínio C afectam a forma celular	49
3.8. RodZ interage consigo própria num contexto membranar	52
4. Discussão e Conclusão	54
5. Bibliografia	66
6. Anexos	66
6.1. Anexo 1 – Meios de cultura	76
6.2. Anexo 2 – Antibióticos	78
6.3. Anexo 3 – Soluções utilizadas neste trabalho	79
6.4. Anexo 4 – Oligonucleotídeos utilizados neste estudo	82
6.5. Anexo 5 – Análise espectroscópica de RodZn	83
6.6. Anexo 6 – Análise da espectroscópica de RodZc	84

Índice de Figuras

Figura 1 – Ciclo de vida de <i>B. subtilis</i> .	2
Figura 2 – RodZ é uma proteína conservada.	9
Figura 3 – RodZ forma padrão em bandas ao longo do eixo longitudinal da célula.	11
Figura 4 – RodZ controla a forma celular, a divisão e a morfologia do nucleóide.	12
Figura 5 – Ambos os domínios de RodZ são necessários para a função.	13
Figura 6 – Purificação das proteínas RodZ ₁₋₉₃ -His ₆ e His ₆ -RodZ ₂₀₁₋₃₀₄ por cromatografia de afinidade em colunas de Ni ²⁺ -NTA.	30
Figura 7 – Peso molecular e raio hidrodinâmico de RodZ ₁₋₉₃ -His ₆ e His ₆ -RodZ ₂₀₁₋₃₀₄ .	32
Figura 8 – Estrutura secundária de RodZ.	35
Figura 9 – Estabilidade térmica e susceptibilidade à tripsinólise dos domínios RodZn e RodZc.	37
Figura 10 – Modelo estrutural de RodZn.	42
Figura 11 – Modelo estrutural de RodZc.	44
Figura 12 – Substituições simples para alanina separam as interações funcionais de RodZn.	46
Figura 13 – Substituições simples para alanina de resíduos conservados em RodZc afectam a morfologia celular.	51
Figura 14 – RodZ interage consigo própria <i>in vivo</i> .	53
Figura 15 – Análise da interacção de RodZ com MreB.	58
Figura 16 – Mutagénesse de <i>scanning</i> para alanina do domínio HTH de RodZn.	61
Figura 17 – Modelo para a função de RodZ com MreB.	65
Figura S1 – Espectroscopia de CD e de 1D ¹ H NMR de RodZ ₁₋₉₃ .	83
Figura S2 – Espectroscopia de CD de RodZ ₁₃₁₋₃₀₄ e de RodZ ₂₀₄₋₃₀₄ .	84
Figura S3 – Espectros de 1D ¹ H NMR para RodZc.	85

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Estirpes utilizadas neste estudo	18
Tabela 2 – Pesos moleculares estimados e determinados por SEC e NMR	33
Tabela 3 – Quantificação dos fenótipos observados para estirpes com diferentes mutações em RodZn	49
Tabela S1 – Composição dos meios de cultura utilizados neste estudo	76
Tabela S2 – Antibióticos utilizados neste trabalho e respectivas concentrações de utilização e de stock	78
Tabela S3 – Soluções utilizados neste trabalho	79
Tabela S4 – Oligonucleotídeos utilizados neste estudo	82

1. Introdução

1.1. *Bacillus subtilis*

A bactéria Gram-positiva *B. subtilis* é um organismo saprófita do solo que apresenta uma morfologia em forma de bastonete, semelhante à da bactéria Gram-negativa *Escherichia coli*. Este organismo atraiu grande atenção pela sua capacidade de diferenciação num tipo celular de repouso, o esporo, em condições extremas de escassez nutricional (28, 55, 64, 70). Devido à existência de sofisticadas ferramentas para a sua manipulação genética, este organismo tornou-se um modelo não só para estudos de desenvolvimento, mas também para o estudo da fisiologia microbiana de um modo geral. Recentemente, estes estudos incidiram sobre temas relevantes para a presente discussão, incluindo a estrutura e a função da parede celular e do citosqueleto, os processos de segregação do cromossoma, a divisão e a morfogénese celular. *B. subtilis* é também uma das espécies microbianas mais importantes a nível industrial (28, 42, 64, 70).

O ciclo de vida do *B. subtilis* consiste numa fase de crescimento celular vegetativo, em condições óptimas de crescimento, e numa fase de esporulação em condições adversas, tais como a carência nutricional ou a densidade celular (28, 55, 70). O crescimento vegetativo divide-se em duas etapas: o alongamento celular ao longo do eixo longitudinal, e a divisão celular, binária (Fig. 1; 17, 28, 55). Neste processo, a célula bacteriana duplica o cromossoma e divide a meio da célula, originando duas novas bactérias idênticas (55).

No entanto sob condições adversas a bactéria tende a esporular, culminando na formação de um esporo, após divisão assimétrica perto de um dos pólos da célula (Fig.1; 28, 55, 70). Neste, o cromossoma bacteriano duplica-se e uma das cópias do cromossoma é transferida para o pré-esporo (28, 55, 70). Após o processo de envolvimento do pré-esporo pelas membranas septais e a maturação do esporo por adição de várias camadas protectoras de PG (córTEX) e proteínas (manto), o esporo é libertado para o meio ambiente por lise da célula-mãe (28). Ao encontrar um ambiente com condições adequadas para o crescimento, o esporo germina originando uma nova célula vegetativa, que se passa a reproduzir por divisão binária (80).

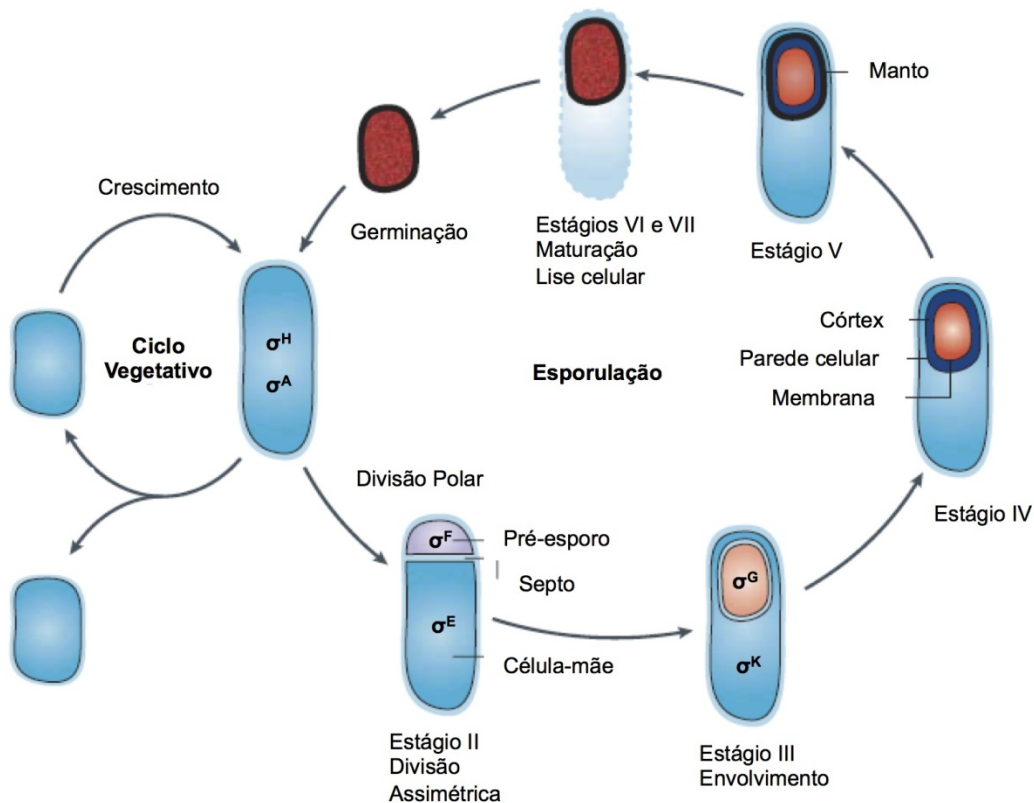


Figura 1 - Ciclo de vida de *B. subtilis*. Durante o ciclo vegetativo, o crescimento da célula dá-se ao longo do eixo longitudinal (elongação). Quando o comprimento da célula atinge o dobro do seu tamanho ao tempo da divisão, tem lugar a replicação e a segregação do cromossoma. De seguida, forma-se um septo de divisão a meio da célula. A divisão celular vegetativa produz duas células de dimensão idêntica, ambas dotadas de uma cópia do genoma. O ciclo alternativo de esporulação, ocorre apenas quando as células são sujeitas a condições adversas. Neste, há a formação de um septo perto dos pólos (divisão assimétrica), originando dois compartimentos de tamanhos diferentes, um maior designado de célula-mãe e um menor designado por pré-esporo. Após migração e fusão das membranas do septo assimétrico (processo de envolvimento), o pré-esporo torna-se num protoplasto totalmente rodeado pelo citoplasma da célula-mãe. Após maturação do esporo e lise da célula-mãe, este acaba por ser libertado para o meio ambiente. Quando em ótimas condições o esporo tem a capacidade de germinar, re-entrando no ciclo vegetativo. Adaptado de Errington 2003 (28).

1.2. Morfologia Celular

A forma das células bacterianas é uma característica central, que influencia todas as actividades celulares, e está sob forte pressão selectiva. A morfologia celular é importante na aquisição de nutrientes, na divisão celular, no desenvolvimento e na patogénese, entre outros (97). Contudo, o nosso conhecimento sobre os mecanismos moleculares envolvidos na determinação e na manutenção da morfologia celular é ainda escasso.

Actualmente sabe-se que a forma celular das bactérias é definida e mantida por duas estruturas moleculares essenciais, a parede celular e o citosqueleto.

O papel da parede celular na aquisição e manutenção da forma celular é ilustrado pela análise funcional de um dos seus constituintes principais, o peptidoglicano (PG). A camada de PG está situada externamente à membrana citoplasmática, garantindo à célula uma pressão osmótica interna estável (78). A morfologia da célula é em parte determinada pela forma desta macromolécula, já que o PG isolado mantém a forma da célula de origem (41). A camada consiste em cadeias de monómeros de PG ligados entre si covalentemente. Os monómeros de PG são heteropolissacarídeos dos açúcares N-acetilglucosamina e ácido N-acetilmurâmico dispostos alternadamente e unidos por ligações glicosídicas $\beta_{1\rightarrow4}$ (41, 78). São sintetizados no citoplasma, pela acção de várias enzimas, e transportados através da membrana plasmática por translocases específicas. Os monómeros de PG são depois incorporados na cadeia de PG crescente por reacções de transglicolização e de transpeptidação, pela acção das proteínas de ligação á penicilina (PBP's; 41, 78).

As mutações em genes envolvidos na via de síntese do PG, ou a interferência química com a acção das enzimas que intervêm nesta via, levam a alterações drásticas na forma da célula, acompanhadas muitas vezes por perda de viabilidade (25, 78). Como é o caso da proteína RodA, que pertence à família SEDS, e presume-se que seja importante para a translocação do lípido II (que se associa ao precursor de PG), durante a síntese do PG (38). A ausência desta proteína em *B. subtilis* leva à perda de morfologia, exibindo células com forma esférica (25, 38).

A síntese de PG, em organismos em forma de bastonete, ocorre em duas ocasiões: associada à síntese de PG ao longo do eixo longitudinal da célula, na fase de alongação do ciclo celular, e associada à síntese do septo, aquando a divisão celular (17, 23, 25, 78).

O citosqueleto bacteriano é formado por homólogos dos três componentes principais do citosqueleto das células eucariotas (4, 15, 98). Em quase todas as espécies, FtsZ é essencial para a divisão celular e é um homóloga da tubulina (ver abaixo); MreB é essencial para o alongamento em bactérias de forma alongada, e é um homólogo da actina (ver abaixo); existem também homólogos das proteínas dos

filamentos intermédios, como exemplificado pela Crescentina, que é essencial para a forma encurvada de *Caulobacter crescentus* (4). Mutações nos genes codificantes para estas proteínas, ou interferência química com a sua acção, produzem alterações importantes no padrão de divisão celular e/ou alongamento e consequentemente resultam em alterações drásticas na forma da célula (4, 15; ver abaixo).

1.3. Alongamento celular e a proteína do citosqueleto MreB

O alongamento celular de bactérias em forma de bastonete dá-se por inserção de PG ao longo do eixo longitudinal da célula sem alteração do diâmetro celular (17, 25). Sabe-se que a proteína MreB do citosqueleto está envolvida neste processo (15, 23). Em *E. coli* e em *B. subtilis*, a eliminação do gene codificante para a proteína MreB, leva à perda da forma de bastonete, demonstrando o papel desta proteína na morfogénese celular (23, 45, 48). O gene codificante para MreB está ausente do genoma da maioria das espécies que apresenta forma esférica, salientando a importância de MreB no processo de alongamento em células em forma de bastonete (2, 45).

Em *B. subtilis* foram descobertos dois outros genes parálogos, *mbl* e *mreBH*. MreB, Mbl e MreBH são parcialmente redundantes (45, 48). Pensa-se que cada uma destas proteínas possa ter funções mais especializadas, como exemplificado pela observação de que a localização sub-celular da autolisina LytE depende especificamente de MreBH (18). As proteínas Mbl e MreBH formam um complexo com MreB. O complexo organiza-se em polímeros dinâmicos formando um padrão de hélice ao longo do eixo longitudinal da célula e parece direccionar a inserção do novo PG, distribuindo-o uniformemente ao longo da parede celular em crescimento (45, 48).

Quer em *B. subtilis* quer em *E. coli* foram igualmente identificadas outras proteínas, tais como MreC, MreD, RodA e a proteína de ligação à penicilina 2 (PBP2), que em conjunto com MreB ajudam a manter a forma celular destas bactérias direccionando a síntese lateral de PG (24, 52). Tanto RodA, como MreC e MreD são proteínas membranares, com domínios intra e extra-citoplasmáticos. A associação destas com MreB, sugere claramente a existência de uma ligação física e funcional entre o citosqueleto e a maquinaria extra-citoplasmática de síntese do PG

(52). Na ausência de outras proteínas do complexo, o padrão de localização de MreB é alterado (24, 48). Contudo, os pormenores moleculares, assim como os factores que promovem a ligação funcional entre o citoesqueleto de MreB e a maquinaria de síntese do PG, ainda não são claros (24, 52, 98).

Observações em *E. coli* e *B. subtilis* sugerem ainda que MreB possa estar envolvida na segregação dos cromossomas, mais especificamente no posicionamento da região de origem de replicação (ou *oriC*; 24, 32, 51).

1.4. Segregação dos cromossomas e Divisão Celular

Durante o crescimento vegetativo (exponencial) de *B. subtilis*, o cromossoma bacteriano mantém-se confinado no espaço compreendido entre $\frac{1}{4}$ e $\frac{3}{4}$ do comprimento das células (87, 89, 92, 93). Quando se inicia o processo de replicação, as regiões *oriC* são rapidamente posicionadas a $\frac{1}{4}$ e a $\frac{3}{4}$ da célula, enquanto que a região de terminação da replicação (*ter*) permanece a meio da célula, até à separação dos cromossomas (89, 92, 93). Quando tal acontece, é formado um septo central, que resulta na produção de duas células irmãs idênticas (89). Claramente, a segregação dos cromossomas é estreitamente coordenada com o processo de divisão celular de modo a que ambas as células produzidas contenham uma cópia completa do genoma (10).

As proteínas de segregação ParA e ParB foram inicialmente identificadas em *E. coli*, codificadas nos plasmídeos P1(*parABS*) e F(*sopABC*; 66, 67). Estas proteínas ligam à origem de replicação e localizam nos quartos celulares, e a sua função é essencial para a segregação com fidelidade dos plasmídeos P1 e F (59, 67). Em *B. subtilis*, as proteínas Soj e Spo0J, inicialmente descobertas pelo papel que desempenham no início da esporulação, são homólogas de ParA e ParB, respectivamente (44, 53, 59). Soj é uma proteína que se liga ao DNA, funcionando como o repressor da transcrição de vários genes de esporulação (44). Já a proteína Spo0J contraria esta acção e apresenta um papel importante na segregação dos cromossomas, possivelmente por afectar a orientação de *oriC* (33, 44, 59, 87). Spo0J liga a locais designados por *parS*, localizados perto de *oriC* (57, 59). Contudo, a eliminação de *spo0J* não tem um fenótipo muito pronunciado na segregação dos

cromossomas em células vegetativas (59). O mesmo acontece quando se elimina o gene codificante para *soj* (44).

O septo de divisão também pode ser formado perto dos pólos da célula, aquando da divisão assimétrica que ocorre no início da esporulação (6). Antecedendo a divisão assimétrica, o cromossoma alonga formando um filamento axial (28). A região *oriC* do filamento fica localizada na extremidade da célula (28, 29, 93). Esta localização é direccionada pela presença de proteínas como RacA e DivIVA (89, 95). Numa fase inicial da esporulação RacA interage com 25 regiões do cromossoma próximas da *oriC* e ao mesmo tempo vai interagir com a proteína DivIVA (7, 28, 95). Esta proteína porém reconhece curvatura negativa, estando localizada nos pólos celulares (43, 73). Assim, o cromossoma é ancorado aos pólos celulares pela interacção do complexo RacA-DNA com DivIVA (7, 89, 95).

A formação do septo assimétrico aprisiona cerca de 30% do cromossoma centrados em torno de *oriC* no pré-esporo (28, 55, 72). Os restantes 70% do cromossoma são bombeados para o pré-esporo por acção da translocase de DNA SpoIIIE que forma complexos funcionais no centro da placa septal (14, 28, 89). Após a translocação do cromossoma, o septo é finalizado, ocorrendo a fusão das membranas.

1.5. O septo de divisão e a proteína do citosqueleto FtsZ

A formação do septo de divisão depende quase sempre da proteína do citosqueleto FtsZ (5, 13). Esta origina polímeros dinâmicos dependentes da ligação e hidrólise de GTP, formando uma estrutura anelar, designada por anel Z (*Z-ring*), nos futuros locais de divisão da célula (1, 5, 13, 27).

Inicialmente, para a formação do *Z-ring* é necessário a presença de duas proteínas ZapA e FtsA (5, 13). A proteína ZapA desempenha um papel importante na formação do anel de FtsZ, pois auxília a polimerização diminuindo a quantidade de FtsZ necessária para formar o *Z-ring* (31, 35). Já a proteína FtsA promove a ligação entre os filamentos de FtsZ, interagindo directamente com o C-terminal de FtsZ, co-localizando na célula (61, 91). Assim, ambas as proteínas desempenham um papel crucial para a formação inicial do *Z-ring*. Posteriormente, são recrutadas outras proteínas essenciais para a divisão celular, que em conjunto com o *Z-ring* formam o

divisoma, como FtsQ, FtsW, FtsL, FtsN, FtsK, FtsI e PBP3 (1, 25). No final da divisão celular, o *Z-ring* contrai ocorrendo a separação das células irmãs, ou citocinese (5, 13). Na ausência de FtsZ, não ocorre formação do divisoma e as células não dividem, originando longos filamentos (5, 85).

Durante a divisão assimétrica há uma mudança na localização do FtsZ do centro da célula para os pólos. Um dos modelos actuais, propõem que a alteração na localização ocorra por redistribuição dos polímeros de FtsZ num padrão helicoidal no sentido de ambos os pólos celulares (6, 27). Como a movimentação dos polímeros ocorre a velocidades diferentes, um anel é formado primeiro, levando ao bloqueio da citocinese no outro pólo (6, 27). Contudo, se este bloqueio não for devidamente regulado, pode levar à formação dos dois septos polares, como acontece em mutantes no factor de transcrição sigma-E (71).

A formação do anel Z é um processo controlado, que assegura a divisão correcta das células e a viabilidade da sua progenia. No entanto, também pode ocorrer divisão assimétrica aberrante em menos de 1% das células aquando da divisão de células vegetativas (56). Em *B. subtilis* são conhecidos mecanismos que promovem o correcto posicionamento do septo. Exemplos incluem a acção da proteína EzrA, da oclusão pelo nucleóide, e o sistema Min (5, 13).

EzrA é uma proteína que se encontra distribuída ao longo da membrana celular, localizando no local de divisão após a formação do anel (36). Na ausência desta proteína, formam-se anéis múltiplos ao longo da célula (36). Pensa-se que EzrA funciona como um destabilizador da formação dos polímeros de FtsZ, diminuindo a afinidade para GTP (20). Contrariando assim, a acção de FtsA e de ZapA, e impedindo a formação do anel Z, contribuindo para que se forme apenas um anel por ciclo celular (20, 36).

O efeito de oclusão pelo nucleóide depende principalmente da proteína Noc. Esta liga a vários locais, designados por *Noc-binding sites* (NBS) dispersos pelo cromossoma, mas ausentes na região *ter* (96). A ligação de Noc ao DNA previne a formação do divisoma sobre o cromossoma, por um mecanismo que ainda não é conhecido (94, 96). A ausência de NBS na região *ter*, sugere a possibilidade da formação do septo de divisão a meio da célula se iniciar ainda antes da finalização da replicação e segregação dos cromossomas (96).

Por seu lado, o sistema Min em *B. subtilis*, consiste nas proteínas, MinC, MinD, MinJ e DivIVA (5, 13, 62, 68). MinC inibe a divisão celular, destabilizando a formação dos polímeros de FtsZ (34). MinD é uma ATPase associada à membrana, que por sua vez interage com MinC (5, 13, 56). MinJ é necessário para a correcta localização de MinD, e consequentemente de MinC (68). Já a proteína DivIVA é recrutada para os septos de divisão em estágios tardios do processo, e é mantido, após a divisão celular, nos pólos celulares (5). O complexo MinCD, é então recrutado para os locais de divisão celular numa fase tardia do processo, de um modo dependente de DivIVA e MinJ, promovendo a despolimerização de FtsZ, que deixa o pólo e dirige-se para o meio da célula (13, 34). MinCD impede a polimerização de FtsZ na região polar, perto do novo pólo da célula, onde a concentração de FtsZ é elevada (34). Na ausência de MinCD, a divisão ainda ocorre predominantemente a meio da célula, no entanto forma-se um número considerável de mini-células, resultantes de divisão polar mas desprovidas de DNA (13, 56).

Quando abandona o pólo novo, FtsZ não polimeriza entre esta região e o meio da célula, presumivelmente devido a um efeito de oclusão pelo nucleóide (96). Presume-se que FtsZ chegue ao meio da célula quando a replicação do cromossoma se encontra na vizinhança de *ter* (6). Deste modo, FtsZ polimeriza no meio da célula para originar um novo pólo celular. Um corolário importante deste modelo é que não prevê a existência de um mecanismo activo de inibição de divisão polar perto do pólo velho da célula: FtsZ nunca chega a esta região porque polimeriza no meio da célula (6).

1.6. A proteína morfogenética RodZ

De um modo geral, a síntese da parede celular em *B. subtilis* parece depender da coordenação temporal e espacial imposta pelos vários elementos do citosqueleto, com destaque para a proteína MreB, que direcciona o crescimento da parede celular lateralmente e para a proteína FtsZ, responsável pela formação do septo durante a divisão (15, 98).

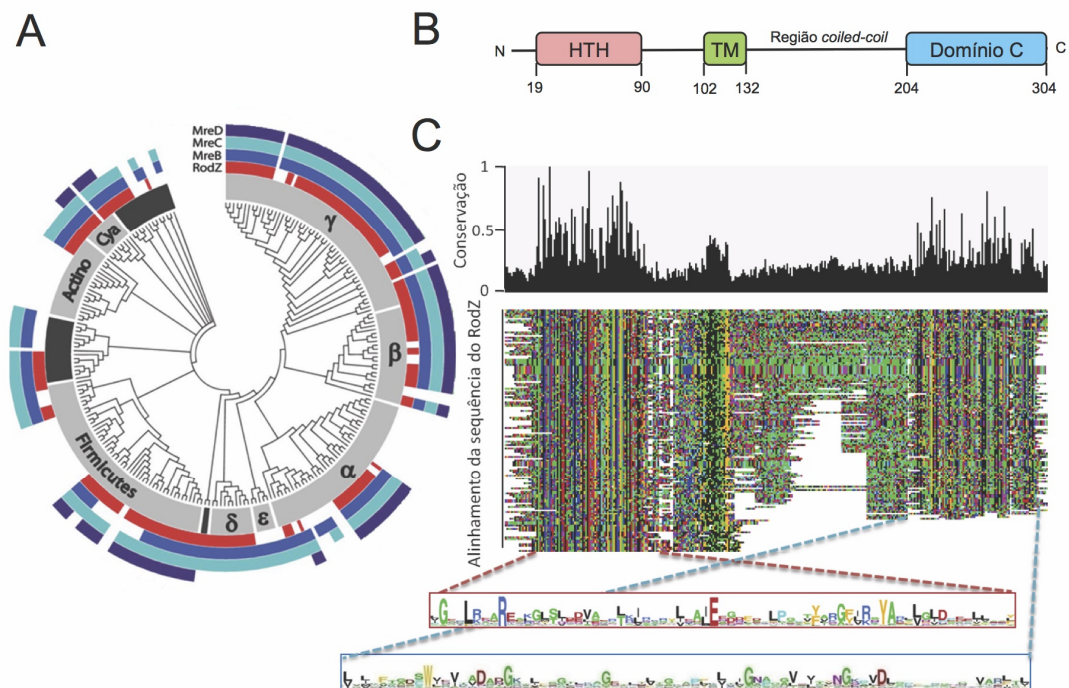


Figura 2 – RodZ é uma proteína conservada. A) Representação da distribuição filogenética das proteínas RodZ (vermelho), MreB (azul escuro), MreC (azul claro) e MreD (púrpura). Os filos bacterianos estão representados a cinzento, e as proteobactérias divididas em classes (β , γ , α , ϵ e δ). B) Representação esquemática da estrutura e motivos conservados da proteína RodZ de *B. subtilis*. Um domínio transmembranar (TM) divide a proteína numa região citoplasmática, que contém um domínio conservado *helix-turn-helix* (HTH), e numa região exterior à membrana celular que contém uma região *coiled-coil* e um domínio C conservado, de função desconhecida. C) Alinhamento de 143 sequências de ortólogos de RodZ. No topo do painel mostra-se um histograma de conservação da proteína de acordo com o alinhamento dos ortólogos de RodZ (mostrado a meio do painel), variando de 0 (sem conservação) até 1 (100% de conservação). A parte inferior do painel mostra uma representação de tipo Logo das sequências de consenso para o domínio HTH e para o domínio C (vermelho e azul, respectivamente). Adaptado de Alyahya *et al* (2).

Recentemente, foi descoberta e caracterizada nas bactérias Gram-negativas *C. crescentus* e *E. coli* uma nova proteína, RodZ, conservada entre diversos grupos de bactérias (Fig. 2A), que está associada ao citoesqueleto e igualmente envolvida no controlo da forma celular (2, 8, 82). Em *B. subtilis* a proteína RodZ é codificado pelo gene *yvfM* e possui 304 aminoácidos (2, 22). Tal como os seus homólogos de *E. coli* e *C. crescentus*, RodZ é constituída por 3 domínios (Fig. 2B e C; 2, 8, 22, 82): uma região citoplasmática que contém um domínio conservado de *helix-turn-helix* (HTH; aminoácidos 19 ao 90); um domínio transmembranar (TM; aminoácidos 102 a 132); e uma região extracitoplasmática formada por uma região possivelmente com uma estrutura *coiled-coil* (resíduos 133 a 203) e por um domínio C de função desconhecida (resíduos 204 a 304). Em estudos realizados em *E. coli* e em *C.*

crescentus observou-se que a região citoplasmática é indispensável para a viabilidade e a manutenção da forma celular, possuindo ainda os determinantes para a localização sub-celular de RodZ (2, 8, 82). Já a região extracitoplasmática é importante para a morfogénese da célula, especulando-se que possa promover ligação à parede celular. O domínio transmembranar é necessário para a localização membranar de RodZ (2, 8, 82).

Em todos os organismos estudados, RodZ localiza num padrão em bandas ao longo do eixo longitudinal da célula (Fig. 3), e co-localiza com MreB (2, 8, 22, 82, 90). Existe uma relação funcional entre RodZ e MreB e a razão entre as concentrações celulares das duas proteínas parece importante. Enquanto que alterações na razão RodZ:MreB afectam a morfologia celular, a super-produção de ambas as proteínas em *E. coli*, não causa alterações no diâmetro celular (8). Em *E. coli*, a interacção entre RodZ e MreB parece ser estabelecida pelo domínio HTH de RodZ, necessário para a localização correcta desta proteína (8, 82). Esta sugestão é apoiada pela resolução da estrutura de cristal de um complexo 1:1 entre MreB e o domínio HTH de RodZ de *Thermotoga marítima* (90). Bastante interessante é o facto de os estudos em *C. crescentus* revelarem que ambas as proteínas são recrutadas em simultâneo para a região mediana da célula onde ocorre síntese de PG antes da divisão celular (2). Neste organismo, a localização de RodZ coincide também com outros locais conhecidos de síntese de PG, sugerindo que RodZ ligue funcionalmente o citoesqueleto de MreB à maquinaria extracelular de síntese do PG (2). Esta sugestão é claramente apoiada pela topologia de RodZ na membrana. Contudo, o mecanismo pelo qual RodZ contribui para a morfogénese celular ainda não foi elucidado.

Ao contrário do que acontece em *E. coli* (8) e *T. marítima* (90), não foi detectada uma interacção directa entre as duas proteínas em *B. subtilis* (22). Isto apesar de ter sido demonstrado por ensaios de pull-down que RodZ e MreB estão presentes num complexo (22) e por *fluorescence resonance energy transfer* (FRET), que ambas as proteínas estão em proximidade na célula (22). Estas observações sugerem que em *B. subtilis* o mecanismo pelo qual as proteínas RodZ e MreB interajam funcionalmente seja distinto daquele que opera nas espécies Gram-negativas estudadas.

Em *B. subtilis* o excesso de RodZ (40000±9000 moléculas por célula) sobre MreB (8000) sugere que RodZ multimerize e que sejam as formas multiméricas da proteína a serem recrutadas por MreB para o citoesqueleto (22, 75). Alternativamente, RodZ poderá ser recrutado para o citoesqueleto por uma proteína igualmente abundante, que está dependente directamente de MreB para localização.

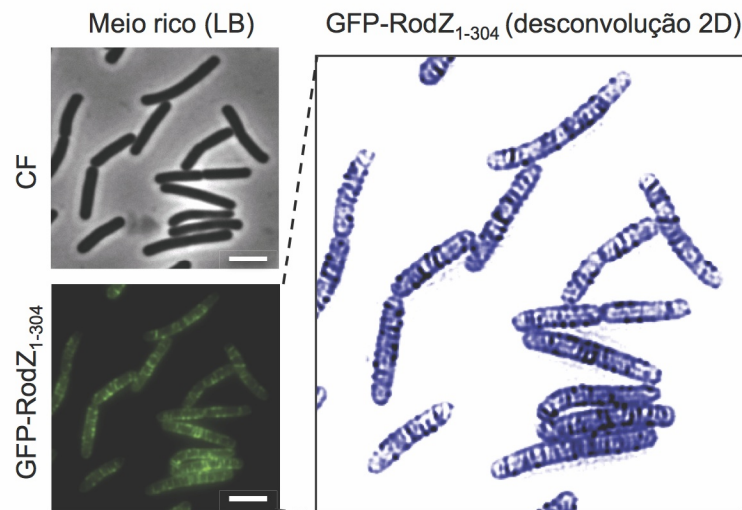


Figura 3 – RodZ forma padrão em bandas ao longo do eixo longitudinal da célula. Imagens de contraste de fase (CF), de fluorescência e de desconvolução 2D (RodZ, corado artificialmente de azul) de células vegetativas de *B. subtilis* que produzem a proteína GFP-RodZ sob controlo do promotor *P_{xylA}* indutível pela xilose. As imagens foram obtidas durante a fase exponencial de crescimento em LB na presença de xilose (22).

Os estudos conduzidos neste Laboratório em *B. subtilis* apontam para uma função conservada da proteína RodZ. A inactivação do gene *rodZ* causa alterações significativas na morfologia celular (Fig. 4), mais drásticas em meio mínimo (22). Nestes mutantes, ao contrário do que acontece durante o crescimento vegetativo, em que o DNA das células se encontra confinado entre $\frac{1}{4}$ e $\frac{3}{4}$ das células, o cromossoma ocupa todo o espaço da célula, uma observação que sugere um papel importante para RodZ na organização espacial do cromossoma (Fig. 4; 22). Outra observação relevante é o facto de 72% das células do mutante *rodZ* produzirem septos assimétricos durante o crescimento vegetativo em meio mínimo (Fig. 4; 22). Por oposição, a divisão polar ocorre em apenas 20% das células de uma estirpe selvagem (Fig. 4; 22). Surpreendentemente, esta reversão completa do padrão normal de divisão celular no mutante *rodZ* ocorre sem perda de viabilidade: o mutante cresce com a mesma taxa do selvagem (22). A maioria dos compartimentos polares

resultantes da divisão assimétrica em células do mutante *rodZ* possui DNA (52% em comparação com 10% nas células selvagens; Fig.4). A frequência de divisão polar no mutante *rodZ* é superior à observada para um mutante *minCD* (cerca de 11%; 56). Além disso, e contrariamente ao mutante *rodZ*, as células polares formadas por um mutante *minCD* não contêm DNA (56). Em *B. subtilis* portanto, RodZ assume um papel central não só na manutenção da forma celular, mas também no controlo do padrão espacial da divisão celular e no posicionamento e organização do cromossoma. Presumivelmente, RodZ tem um papel importante na coordenação entre estes três processos centrais do ciclo celular.

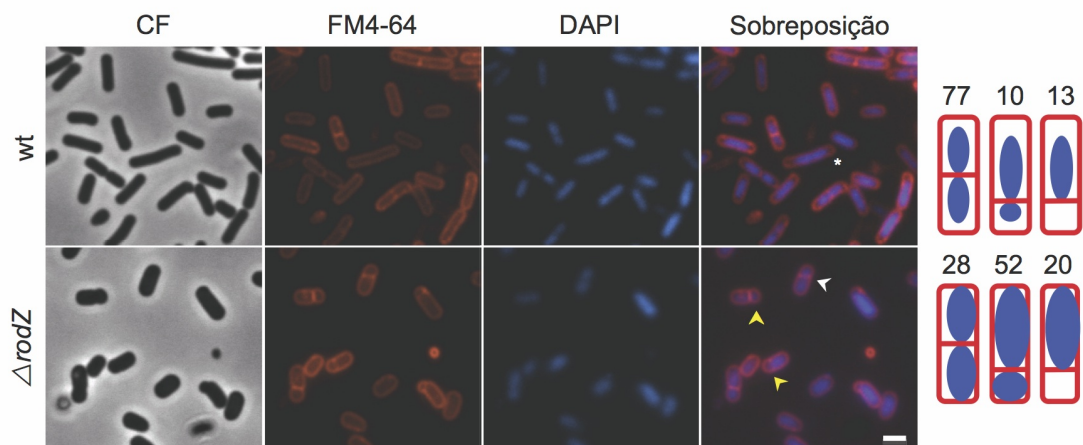


Figura 4 – RodZ controla a forma celular, a divisão e a morfologia do nucleóide. Morfologia de células selvagens de *B. subtilis* (wt) e de mutantes de eliminação para o gene *rodZ*. No mutante de eliminação para *rodZ* ($\Delta rodZ$), o gene essencial *pgsA* a seu jusante encontra-se sob o comando do promotor P_{spac} , indutível pelo IPTG, e as culturas cresceram na presença de IPTG, que assegura a sua viabilidade, até meio da fase exponencial (22). A morfologia das células mutantes é afectada, observando-se células redondas de grandes dimensões, nas imagens de contraste de fase (CF). As células foram coradas com os corantes fluorescentes FM4-64 e com DAPI, de modo a corar as membranas e o cromossoma, respectivamente (22). A sobreposição das duas imagens permite a visualização do cromossoma dentro da célula. Em células wt podemos observar que o DNA está localizado entre os quartos da célula, não tocando nos pólos (asterisco), ao passo que nas células mutantes encontra-se estendido ocupando todo o interior da célula. A formação de septos assimétricos nas células mutantes para *rodZ* origina células polares de menores dimensões que podem ou não conter DNA (assinaladas respectivamente pelas setas amarelas ou brancas). A barra de escala representa 1 μ m. Do lado direito do painel são mostrados os valores (em %) da quantidade de células que apresentam septos simétricos ou assimétricos, sendo que estes últimos originam a formação de células polares com DNA ou sem DNA.

In vivo, a ausência do domínio extracitoplasmático em células mutantes que produzem apenas uma fusão da YFP à porção citoplasmática de RodZ seguida do domínio TM (YFP-RodZn) resulta na perda da forma celular em bastonete; as células resultantes apresentam forma anormal e um diâmetro aumentado (Fig. 5; 22). No

entanto, a localização de YFP-RodZn não parece ser totalmente afectada uma vez que ainda se observa o padrão em bandas característico da localização da proteína RodZ selvagem (Fig. 5; 22). Já o cromossoma, ocupa, nestas células mutantes, todo o espaço celular, observando-se também uma elevada percentagem de divisão assimétrica (Fig. 5; 22). Pelo contrário, quando as células produzem apenas o domínio TM seguido da região extra-citoplasmática (YFP-RodZc), a morfologia em bastonete é mantida apesar de um incremento no diâmetro celular (Fig. 5; 22). Neste mutante, o padrão de localização de RodZ é perdido, levando à acumulação do RodZ em redor da membrana citoplasmática (Fig. 5; 22). O cromossoma também se encontra estendido por toda a célula e grande parte das células apresenta divisão assimétrica semelhante ao mutante *rodZ* de eliminação (Fig. 5(22)).

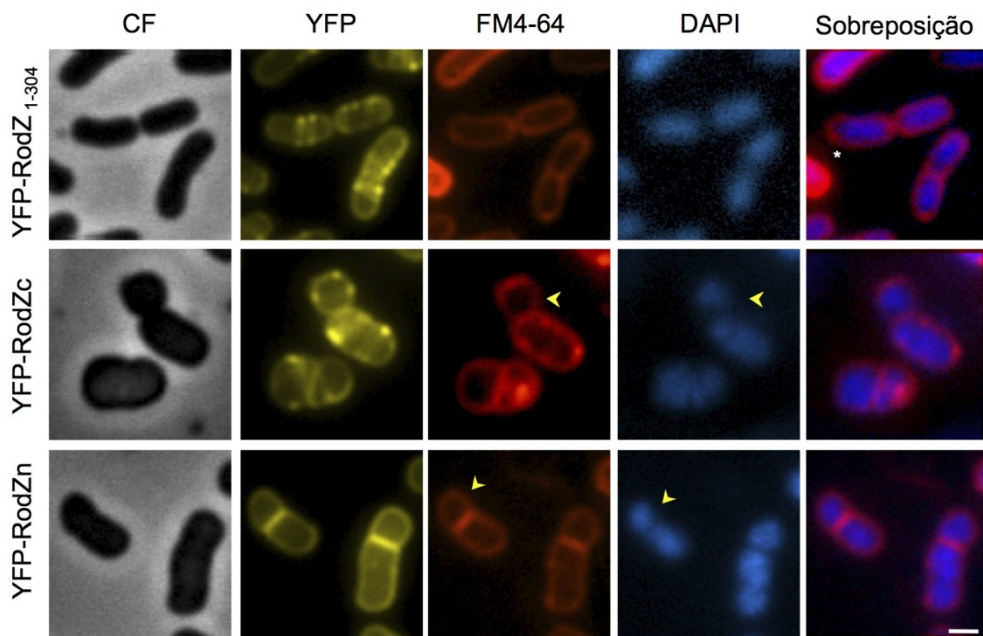


Figura 5 – Ambos os domínios de RodZ são necessários para a função. Morfologia de células de *B. subtilis* que produzem a proteína RodZ completa fundida à proteína fluorescente YFP (YFP-RodZ₁₋₃₀₄), e sem o domínio extracitoplasmático (YFP-RodZn) ou citoplasmático (YFP-RodZc). As proteínas de fusão foram produzidas sob comando do promotor P_{xyIA} no locus não essencial *amyE* de células mutantes para *rodZ*, na presença de IPTG (uma vez que o gene essencial *pgsA*, a jusante de *rodZ* está sob o comando do promotor P_{spac}) e de xilose (22). As células foram observadas por contraste de fase (CF) e a localização das proteínas de fusão observada por fluorescência (YFP). A visualização das membranas e o cromossoma celular, foi realizada através da coloração das células com os compostos fluorescentes FM4-64 e com DAPI, respectivamente (22). A sobreposição das duas imagens permite a visualização do cromossoma dentro da célula. O posicionamento do nucleóide nos quartos da célula é exemplificado pelo asterisco nas células produtoras de YFP-RodZ₁₋₃₀₄, e células polares contendo DNA, resultantes de divisão assimétrica estão assinaladas pelas setas amarelas. A barra representa 1 µm.

1.7. Objectivos

Neste estudo, e com o objectivo último de gerarmos conhecimento relevante para o nosso entendimento da função de RodZ na célula, procedemos de início a uma caracterização estrutural dos domínios RodZn e RodZc (sem o domínio TM), super-produzidos e purificados de células de *E. coli*.

De seguida, a informação obtida foi utilizada para a introdução de mutações pontuais no gene *rodZ* cujo efeito foi avaliado em *B. subtilis*.

Os nossos objectivos específicos foram:

- i) A super-produção e purificação de RodZn e de RodZc;
- ii) A determinação do estado oligomérico de RodZn e de RodZc por cromatografia de exclusão molecular e *diffusion ordered* NMR;
- iii) O mapeamento de regiões importantes para a estrutura e estabilidade dos domínios RodZn e RodZc;
- iv) A avaliação da estrutura secundária e terciária de RodZn e de RodZc e se possível, em trabalho colaborativo, determinar a estrutura em solução dos dois domínios;
- v) Com base em modelos estruturais validados experimentalmente, construir e caracterizar mutantes pontuais para *rodZ* em *B. subtilis*;
- vi) Avaliar a capacidade de oligomerização de RodZ *in vivo*, quando inserido numa membrana.

2. Material e métodos

2.1. Estirpes e condições de crescimento

Neste estudo, a estirpe de *E. coli* DH5 α (Bethesda Research Laboratories, BRL) foi utilizada para trabalho de clonagem molecular, e para a propagação de plasmídeos (Tabela 1). Todas as estirpes de *B. subtilis* utilizadas são congênicas com a estirpe padrão de laboratório MB24 (Tabela 1). O meio de Luria-Bertani (LB), líquido ou solidificado com agár (LA, ver o anexo 1) foi utilizado para o crescimento rotineiro de *E. coli* ou de *B. subtilis*, na presença de antibióticos ou outros suplementos quando necessário (Tabela 1). As culturas líquidas foram incubadas a 37°C a 160 rpm, e preparadas a partir de colônias isoladas, obtidas por crescimento de véspera, a 37°C em meio sólido.

Foi também utilizada a estirpe de *Sacharomyces cerevisiae* NMY32 (Tabela 1), proveniente no DUALmembrane Kit 2 (Dualsystems Biotech), para realização do sistema de dois híbridos *Split-Ubiquitin*. O crescimento e manutenção da estirpe NMY32 foi realizada em meio de *Yeast Extract - Peptone - Dextrose* mais Adenina (YPAD, ver o anexo 1). A incubação em meio líquido foi realizada a 30°C, 180 rpm, a partir de culturas em meio sólido incubadas a 30°C. As estirpes congênicas de NMY32 foram propagadas e mantidas em meio de *Synthetic Dextrose* (SD) sem leucina e sem triptofano (SD – leu, - trp / SD-2; ver o anexo 1) e incubadas a 30°C, durante 48h.

O crescimento celular foi monitorizado por medição da Densidade Óptica a 600 nm (DO₆₀₀), de amostras de culturas diluídas 1:3 em formaldeído 10%.

2.2. Indução da competência e transformação de células bacterianas e de levedura

Para a indução da competência de células de *E. coli* DH5 α , inoculou-se uma colônia isolada em 100 ml de LB e incubou-se a 37°C, 120 rpm num agitador orbital, até uma DO₆₀₀ de aproximadamente 0,6. A cultura foi depois centrifugada durante 5 min, a 4 °C e a 4350 x g. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento celular foi lavado com 50 ml de uma solução de 0,1 M CaCl₂, mantido no gelo. As células

foram incubadas em gelo durante cerca de 2h, e novamente centrifugadas nas condições anteriores. O sedimento celular foi ressuscitado em 6 ml de CaCl₂ e 15% de Glicerol, sendo depois distribuído em alíquotas de 150 µl que foram armazenadas a -80°C até à sua utilização.

Para a transformação das células, incubou-se 150 µl da suspensão de células competentes com 1 µl de DNA plasmídico (cerca de 1 µg), durante 1h em gelo. As células foram depois sujeitas a um choque térmico a 42°C em banho-maria, durante 90s seguido de incubação em gelo durante 2 min. De seguida, foi adicionado 1 ml de LB, previamente equilibrado a 37°C, e a suspensão de células foi incubada durante 1h, a 37°C e 100 rpm. Centrifugou-se então a cultura durante 2 min a 6000 rpm (numa microcentrífuga), sendo o sedimento celular ressuscitado em 150 µl do sobrenadante. As células foram plaqueadas em placas de LA contendo os antibióticos adequados, e incubadas a 37°C durante a noite.

Para a indução da competência de células de *B. subtilis*, inoculou-se uma colónia isolada da estirpe em estudo em 10 ml de meio *Growth Medium 1* (GM1; ver o anexo 1) e a cultura foi incubada a 37°C, e a 200 rpm. 90 min após o final da fase de crescimento exponencial nestas condições (ou T₀), diluiu-se a cultura 1:20 em 4,5 ml de meio *Growth Medium 2* (GM2; ver o anexo 1), e incubou-se durante 2h a 37°C com agitação de 200 rpm. No final deste período, as células competentes foram transformadas por adição de 10 µl do DNA (cerca de 1 µg). A mistura foi incubada durante 1h, a 200 rpm e a 37°C. Foram plaqueados 200 µl da suspensão celular em caixas de LA com os antibióticos adequados. As caixas foram incubadas a 37°C durante a noite.

Para a indução da competência das células de *S. cerevisiae* NMY32, inoculou-se uma colónia isolada em 10 ml de meio YPAD líquido (ver o anexo 1) e incubou-se a 180 rpm, a 30°C, durante a noite. A cultura foi diluída para DO₆₀₀ de 0,1 em meio YPAD, incubando-se a 180 rpm, a 30°C até DO₆₀₀ de aproximadamente 0,7. A cultura foi depois centrifugada a 1940 x g, durante 5 min, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento celular lavado com 10 ml de ddH₂O estéril. As células foram sujeitas a nova centrifugação, nas condições anteriores, e novamente lavadas com ddH₂O estéril. Centrifugou-se novamente, nas condições descritas anteriormente, e o sedimento celular foi posteriormente lavado com 1 ml de 0,1 M

LiAc e 1X TE. As células foram novamente centrifugadas e o sedimento celular ressuspenso em 200 µl da solução de 0,1 M LiAc e 1X TE, incubando-se 1h em gelo.

Para a transformação das células, colocou-se 2,5 µl de cada DNA plasmídico num tubo e adicionou-se 6,4 µl de DNA de esperma de salmão (Sigma). De seguida adicionou-se 50 µl das células competentes, homogenizando bem. À suspensão de células adicionou-se 200 µl de uma solução 0,1 M LiAc, 0,1X TE (ver o anexo 3) e PEG 3350 40% (w/v) e incubou-se 30 min, a 30°C. A suspensão foi de seguida incubada a 42°C durante 15 min, e centrifugada a 3020 x g durante 2 min. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 800 µl de meio SD-2 líquido (ver o anexo 1). A suspensão celular foi centrifugada nas condições anteriores, retirando-se 650 µl do sobrenadante. O sedimento celular foi ressuspenso no restante sobrenadante, e a suspensão plaqueada em meio SD-2 (ver o anexo 1), incubando-se a 30°C, 48h.

2.3. Manipulações enzimáticas

Todas as manipulações enzimáticas do DNA durante procedimentos de clonagem molecular foram realizadas de acordo com os métodos gerais descritos por Sambrook *et al.* (77). Para a realização das reacções de polimerização em cadeia (PCR) foi utilizada a polimerase do DNA Phusion (Finnzymes; obtida de Thermo Fisher Scientific Inc.), segundo as instruções do fabricante.

Tabela 1 - Estirpes utilizadas neste estudo.

Estirpes	Genótipo / características relevantes	Marca de selecção*	Origem ou referência
<i>E. coli</i>			
BL21 (DE3)			Novagen
AH4333	BL21(DE3) / pAP1	Amp	Este trabalho
AH4334	BL21(DE3) / pAP4	Amp	“
AH4361	BL21(DE3) / pAP8	Amp	“
AH4362	BL21(DE3) / pAP9	Amp	“
<i>B. subtilis</i>			
MB24	<i>trpC2 metC3</i>		Estirpe do laboratório
AH4263	MB24 / $\Delta rodZ::sp pgsA::P_{spac} pgsA$	Neo	(22)
AH4319	AH4263 / $\Delta amyE::P_{xyl-yfp-rodZ_{1-304}}$	Neo /Sp	(22)
AH4322	AH4263 / $\Delta amyE::P_{xyl-yfp-rodZn}$	Neo /Sp	(22)
AH4323	AH4263 / $\Delta amyE::P_{xyl-yfp-rodZc}$	Neo /Sp	(22)
AH4370	AH4263/ $\Delta amyE::P_{xyl-yfp-rodZ^{G265A}}$	Neo /Sp	Este trabalho
AH4388	AH4263/ $\Delta amyE::P_{xyl-yfp-rodZ^{N275A}}$	Neo /Sp	“
AH4406	AH4263 / $\Delta amyE::P_{xyl-yfp-rodZ^{Y32A}}$	Neo /Sp	“
AH4407	AH4263 / $\Delta amyE::P_{xyl-yfp-rodZ^{L33A}}$	Neo /Sp	“
AH4408	AH4263 / $\Delta amyE::P_{xyl-yfp-rodZ^{Y49A}}$	Neo /Sp	“
AH4409	AH4263 / $\Delta amyE::P_{xyl-yfp-rodZ^{F53A}}$	Neo /Sp	“
<i>S. cerevisiae</i>			
NMY32	MATa <i>his3</i> Δ 200 <i>trp1</i> -901 <i>leu2</i> -3, 112 <i>ade2</i> LYS::(<i>lexAop</i>) ₄ -HIS3 URA3::(<i>lexAop</i>) ₈ – <i>lacZ ade2</i> ::(<i>lexAop</i>) ₈ – ADE2 GAL4		DUALmembrane kit 2 (Dualsystem Biotech)
AH4389	NMY32 x pAP7 x pAl-Alg5	-leu, -trp	Este trabalho
AH4392	NMY32 x pAP7 x pDL2-Alg5	-leu, -trp	“
AH4395	NMY32 x pAP7 x pAP6	-leu, -trp	“

*Ver o anexo 2.

2.4. Extracção de DNA

2.4.1. Extracção de DNA plasmídico

A extracção de DNA plasmídico de células de *E. coli* para a identificação de clones por perfis de restrição (mini-preparações) foi realizada do seguinte modo. Centrifugou-se 2 ml de uma cultura celular da estirpe desejada em meio LB (OD₆₀₀ ~1.8-2.0), a 13000 rpm (numa microcentrífuga), 1 min à TA e ressuspendeu-se o

sedimento em 360 µL de tampão STET (ver o anexo 3). Adicionou-se 0,6 mg/ml lisozima e 0,25 mg/ml de RNAase A, incubando-se a 37°C durante 15 min. Ferveu-se a amostra a 100°C, 1 min, centrifugando-se de seguida a 13000 rpm (numa microcentrífuga), à TA, durante 15 min. Removeu-se o sedimento e adicionou-se ao sobrenante isopropanol na proporção de 0,8X. Procedeu-se a nova centrifugação durante 30 min a 4°C, 13000 rpm (numa microcentrífuga), de modo a precipitar o DNA. Desprezou-se o sobrenadante, secou-se o sedimento de DNA plasmídico a 37°C e ressuspendeu-se em 30 µL de ddH₂O. Os DNAs extraídos foram conservados a -20°C.

Alternativamente, para a obtenção de DNA plasmídico mais puro para sequenciação, recorreu-se ao kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN), de acordo com o protocolo disponibilizado pelo fabricante.

2.4.2. Extracção do DNA genómico de *B. subtilis*

Para a extracção de DNA cromossomal de células de *B. subtilis*, foram centrifugados 4 ml de cultura AH4263 (Tabela 1), durante 10 min, a 13000 rpm (numa microcentrífuga), à TA, e o sedimento celular ressuspendido em 500 µL de SET (ver o anexo 3). De seguida foram adicionados 0,5 mg/ml de lisozima e 0,05 mg/ml RNAse A, incubando-se a 37°C, durante 15 min. Adicionou-se 12,5 µL de 10% Sarcosyl e 0,03 mg/ml de Proteinase K e incubou-se novamente a 37°C durante 15 min. O DNA foi então purificado por extracção com 500 µL de uma mistura de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), com agitação suave durante 5 min seguida de centrifugação a 13000 rpm (numa microcentrífuga), durante 10 min. Dialisou-se 100 µL da fase aquosa (contendo o DNA) contra ddH₂O durante 30 min. O DNA extraído foi conservado a 4°C.

2.5. Construções para a super-produção dos domínios RodZn e RodZc

Os plasmídeos codificantes para as formas truncadas recombinantes dos domínios citoplasmático (His₆-RodZ₁₋₉₃) e extracitoplasmático (RodZ₂₀₁₋₃₀₄-His₆) foram construídas do seguinte modo. A região codificante para os aminoácidos 1-93 de

RodZ (RodZn), fundida a uma cauda de 6 histidinas na sua porção C-terminal, foi obtida a partir do DNA da respectiva região do *rodZ* da estirpe de *B. subtilis* MB24 por amplificação por PCR com os primers rodZ1F e rodZ93hisR (ver o anexo 4, Tabela S4). O produto de PCR foi cortado com as enzimas de restrição NcoI e XhoI (Fermentas), e inserido entre os mesmos locais do plasmídeo pET16b (Novagen), obtendo-se o vector pAP1. O plasmídeo pAP4, que codifica para os resíduos 201-304 de RodZ (RodZc) fundidos a uma cauda de histidinas na sua porção N-terminal, foi obtido por amplificação por PCR da respectiva região de *rodZ* da estirpe de *B. subtilis* MB24, com os primers his-rodZ201F e rodZstopR (ver o anexo 4, Tabela S4). O produto de PCR foi cortado com as enzimas NcoI e XhoI (Fermentas), e inserido entre os mesmos locais do pET16b (Novagen). As estirpes AH4333 e AH4334 (Tabela 1) foram obtidas pela transformação de células competentes de *E. coli* BL21(DE3) com os plasmídeos pAP1 e pAP4, respectivamente.

2.6. Introdução de mutações pontuais no domínio citoplasmático de RodZ

O plasmídeo pTC236 (22), que contém a região codificante para a proteína RodZ completa fundida ao gene codificante para a proteína fluorescente amarela (YFP), sob comando do promotor P_{xylA} indutível pela xilose (P_{xylA} -*yfp-rodZ*₁₋₃₀₄), foi usado como molde para mutagénesse por *overlapping extension* PCR (OE-PCR), tal como descrito por Ho *et al* (40) para realização de substituições simples para alanina de resíduos conservados no domínio citoplasmático de RodZ. Para o primeiro ciclo de PCR, que introduz a mutação, foram utilizados os seguintes pares de primers: para a substituição Y32A, P_{xyl}-379F/rodZnY32Ar e rodZnY32Af/rodZ+906R; para L33A, P_{xyl}-379/rodZnL33Ar e rodZnL33Af/rodZ+906R; para Y49A, P_{xyl}-379F/rodZnY49Ar e rodZnY49Af/rodZ+906R; e para F53A, P_{xyl}-379F/rodZnF53Ar e rodZnF53Af/rodZ+906R (anexo 4, Tabela S4). Na segunda amplificação (*overlapping*), utilizaram-se os primers P_{xyl}-379F/rodZ+906R (anexo 4, Tabela S4), em todos os casos, utilizando como DNA molde os produtos de PCR anteriores. Todos os fragmentos de PCR resultantes foram digeridos com as enzimas BamHI (New England Biolabs) e EcoRI (Fermentas), e inseridos em pMLK83 (*stock* do

laboratório; 47), digerido com as mesmas enzimas, originando pAP14, pAP15, pAP16 e pAP17, respectivamente. Cada um dos plasmídeos foi inserido no locus *amyE* da estirpe de *B. subtilis* MB24 originando estirpes deficientes para a produção da α -amilase (*amyE*-). Estas estirpes foram posteriormente transformadas com DNA cromossomal da estirpe AH4263 ($\Delta rodZ::sp\ pgsA::P_{spac}-pgsA$; Tabela 1) para inserção da mutação de eliminação do gene *rodZ* no locus nativo, originando as estirpes AH4398, AH4399, AH4400 e AH4401 (Tabela 1), respectivamente, segundo o protocolo de transformação acima descrito.

2.7. Introdução de mutações pontuais no domínio extra-citoplasmático de RodZ

Para alterar substituir os resíduos conservados G265 e N275 no domínio extra-citoplasmático de RodZ por A, foi usado como molde para mutagénesis por OE-PCR o plasmídeo pTC236 (que contém uma fusão $P_{xylA}-YFP-rodZ_{1-304}$; 22). Foram utilizados os conjuntos de primers P_{xyl}-379F/rodZcG265Ar e rodZcG265Af/rodZ+906R (para a substituição G265A) e P_{xyl}-379F/rodZcN275Ar e rodZcN275Af/rodZ+906R (para a substituição N275A; ver o anexo 4, Tabela S4). Na segunda amplificação (*overlapping*), utilizaram-se os primers P_{xyl}-379F/rodZ+906R (ver o anexo 4, Tabela S4), em todos os casos, utilizando como DNA molde os produtos de PCR anteriores. Ambos os produtos de PCR foram cortados com as enzimas de restrição BamHI (New England Biolabs) e EcoRI (Fermentas), e introduzidos no vector pMLK83 (*stock* do laboratório; 47), cortado com as mesmas enzimas de restrição, originando pAP10 e pAP11, respectivamente. Cada um dos plasmídeos foram inseridos no locus *amyE* da estirpe de *B. subtilis* MB24 e posteriormente transformadas com DNA cromossomal da estirpe AH4263 ($\Delta rodZ::sp\ pgsA::P_{spac}-pgsA$; Tabela 1), originando as estirpes AH4370 e AH4388, respectivamente (Tabela 1), segundo o protocolo de transformação acima descrito.

2.8. Construções para a produção de NubG-RodZ e de Cub-RodZ

As construções para a produção das proteínas NubG-RodZ e Cub-RodZ foram realizadas de acordo com o sistema de dois híbridos *Split-Ubiquitin* do DUALmembrane kit 2 (*Dualsystems Biotech*). Para a construção de um plasmídeo capaz de expressar uma fusão NubG-RodZ a sequência codificante para *rodZ* foi amplificada por PCR a partir de DNA genómico da estirpe de *B. subtilis* MB24, com os primers NubG-RodZf e NubG-RodZr (ver o anexo 4, Tabela S4). O produto de PCR obtido foi digerido com as enzimas EcoRI e ClaI (Fermentas) e inserido entre os mesmos locais do plasmídeo pDSL-Nx (DUALmembrane kit 2), designando-se o vector obtido por pAP6. Para a produção da proteína Cub-RodZ, a sequência codificante para *rodZ* foi igualmente amplificada por PCR a partir de DNA genómico da estirpe de *B. subtilis* MB24, com os primers Cub-RodZf e Cub-RodZr (ver o anexo 4, Tabela S4). O produto de PCR foi digerido com as enzimas PstI e NcoI (Fermentas) e clonado entre os mesmos locais no plasmídeo pNCW (DUALmembrane kit 2), produzindo o vector pAP7.

A transformação da estirpe de *S. cerevisiae* NMY32 foi realizada segundo o protocolo de transformação descrito anteriormente. A estirpe usada para controlo positivo do ensaio (AH4389, Tabela 1), foi co-transformada com os plasmídeos pAl-Alg5, que codifica para a proteína Nub-Alg5, e com o plasmídeo pAP7 (Cub-RodZ). Para controlo negativo foi utilizada a estirpe AH4392 (Tabela 1), obtida por co-transformação de *S. cerevisiae* NMY32, com os plasmídeos pDL2-Alg5 (que codifica para NubG-Alg5), e com o plasmídeo pAP7 (Cub-RodZ). A estirpe AH4395 (Tabela 1), utilizada para testar a interação de NubG-RodZ com Cub-RodZ, foi obtida por co-transformação de NMY32 com pAP6 e pAP7 (ver acima, Tabela 1).

2.9. Super-produção e purificação dos domínios RodZn e RodZc

As proteínas His₆-RodZ₁₋₉₃ e RodZ₂₀₁₋₃₀₄-His₆ foram super-produzidas por adição de 1 mM de isopropil-β-tiogalactósido (IPTG) a 200 ml de culturas das estirpes AH4333 e AH4334 (Tabela 1), em meio LB, a uma DO₆₀₀ entre 0,4 e 0,6. As estirpes foram induzidas durante 3h a 37°C com agitação de 150 rpm. De seguida, as células foram colhidas por centrifugação (7520 x g, durante 10 min a 4°C) e ressuspensas

em 20 ml de Tampão de ligação (ver o anexo 3) suplementado com 100 mM de PMSF e de um *cocktail* de outros inibidores de proteases (Complete Mini, EDTA-free, Roche Applied Science), segundo as instruções do fabricante. As células na suspensão foram lisadas mecanicamente por passagem na prensa de French, a 19000 PSI. O extracto proteico total assim obtido foi centrifugado a 13000 rpm (numa microcentrífuga), 4°C durante 10 min, para separação das fracções insolúvel (sedimento) e solúvel (sobrenadante). A fracção insolúvel foi posteriormente ressuspendida em igual volume de tampão de ligação.

As proteínas foram purificadas por cromatografia de afinidade IMAC (*Immobilized Metal Affinity Chromatography*) utilizando colunas HisTrap Chelating HP de 1 ml de ácido nitrilo-tri-acético (GE Healthcare), segundo as instruções do fabricante. As proteínas retidas na resina foram eluídas com concentrações crescentes de imidazol (Tampões de eluição; ver o anexo 3), e quantificadas pelo método de Bradford (Bio-Rad) ou pelo método do biureto (Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific).

2.10. TSDS-PAGE e detecção imunológica de proteínas

As várias amostras proteicas (25 µl de cada) foram resolvidas e analisadas por electroforese em géis desnaturantes de Tris-tricina contendo SDS (TSDS-PAGE; 84), em paralelo com 5 µl de um marcador de pesos moleculares conhecidos (Bio-Rad Precision Plus Protein Standard, All Blue).

Os géis desnaturantes de TSDS, foram realizados com a transferência de 7 ml de solução do gel de resolução 12,5% (ver o anexo 3) rapidamente para o sistema Mini-Protean[®]3 (Bio-Rad). Após polimerização do gel, foi adicionada a solução do gel de concentração 4,5% (ver o anexo 3), sobre o gel de resolução, e aplicado o pente adequado. Logo que o gel polimerizou, o pente é retirado e o sistema é transferido para a câmara de electroforese, adicionando-se tampão de electroforese (ver o anexo 3), até cobrir a cassette. Às amostras foi adicionado tampão de amostra (1:1, ver o anexo 3), sendo depois fervidas a 100°C durante 5 min, e aplicadas no gel. A electroforese decorreu a 30V durante 1h e depois a 150V durante 1h e 30 min.

Após separação electroforética, e dependendo do objectivo, os géis eram corados ou utilizados para detecção imunológica da proteína. A coloração dos géis foi

realizada numa solução com 50% (v/v) de Etanol, 10% (v/v) de ácido acético e 0,1% de azul de Coomassie R-250, durante 30 min. De seguida foram descorados com uma solução de 30% (v/v) de Etanol e 10% (v/v) de ácido acético, e digitalizado o resultado.

Para a detecção imunológica das proteínas, foi realizada transferindo as proteínas imobilizadas nos géis, para membranas de nitrocelulose usando o sistema MiniTransBlot da BioRad, na presença de tampão de electroforese (ver o anexo 3) durante 90 min, a uma diferença de potencial constante de 100V. Após a transferência, a membrana foi incubada durante 30 min, com agitação orbital, em 50 ml de solução de bloqueio (ver o anexo 3), e lavadas, duas vezes em 10 ml de solução de lavagem (ver o anexo 3). De seguida, as membranas foram incubadas em solução de anticorpo (ver o anexo 3) na presença dos anticorpos policlonais anti-RodZn ou anti-RodZc (75), a uma diluição final de 1:1000, a 4°C durante a noite. Após três lavagens de 5 min em 10 ml de solução de lavagem (ver o anexo 3), as membranas foram incubadas durante 30 min com agitação orbital e à TA, com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado à *Horseradish peroxidase* (HRP, Sigma), diluído de 1:10000 em 10 ml de solução de anticorpo (ver o anexo 3). Após três novas lavagens de 10 min cada, a detecção dos antígenos proteicos foi realizada por incubação em 2 ml de solução de detecção (SuperSignal west Pico Chemiluminescent Substrate, Pierce) segundo as instruções do fabricante, seguida de exposição das membranas a um filme de auto-radiografia (Hyperfilm, GE Healthcare), numa cassete de revelação. Os tempos de exposição variaram entre 1 e 30s. As chapas foram depois reveladas em solução de revelação e de fixação (Kodak).

2.11. Cromatografia de exclusão molecular por filtração em gel

A cromatografia por filtração em gel foi realizada numa coluna Superose® 12 HR10/30 utilizando o sistema AKTA-FPLC (GE Healthcare), segundo as instruções do fabricante. Todos os tampões utilizados foram filtrados (0,22 µm, Milipore) e desarejados. A coluna foi inicialmente lavada com 2 volumes de coluna (VC) de ddH₂O e equilibrada durante a noite com tampão 150 mM NaCl, 20mM HEPES/NaOH, pH 7,6. As proteínas His₆-RodZ₁₋₉₃ e RodZ₂₀₁₋₃₀₄-His₆ purificadas,

foram dialisadas (Snake-Skin 3,5 MW, Pierce) contra o mesmo tampão e filtradas (Acrodis 0,2 μm ; Millipore), tendo sido injectadas na coluna amostras de 200 μl . Entre cada amostra a coluna foi equilibrada com 2 a 3 VC. A eluição das proteínas foi realizada a um fluxo de 0,5 ml/min, recolhendo-se fracções de 0,5 ml. A presença de proteínas nas fracções eluídas foi determinada automaticamente pelo equipamento, por leitura da densidade óptica a 280 nm (mAU). A coluna foi calibrada com base numa mistura de proteínas (Bio-gel A; Biorad) de peso molecular (em kDa) e raio de Stokes (R_s) conhecidos: tiroglobulina (640 kDa, $R_s = 8,5\text{nm}$), globulina gama bovina (158 kDa, $R_s = 5,34\text{ nm}$), ovalbumina de galinha (44 kDa, $R_s = 3,05\text{nm}$), mioglobina de cavalo (17,5 kDa, $R_s = 2,05\text{ nm}$) e vitamina B12 (1,35 kDa, $R_s = 0,16\text{ nm}$). Os pesos moleculares das espécies proteicas eluídas em cada um dos diferentes ensaios foram calculados segundo a equação $MW = 10^{(K_{av}-b)/m}$. Nesta equação, MW é o peso molecular e K_{av} é dado pela expressão $K_{av} = (V_e - V_0)/(V_t - V_0)$, onde V_e é o volume de eluição de uma proteína, V_0 é o volume vazio da coluna (que corresponde ao volume de eluição da tiroglobulina, que tem um peso molecular superior à capacidade de retenção da coluna) e V_t é o volume total da coluna (volume de eluição determinado para uma solução de 4% de acetona); m e b correspondem ao declive e ao coeficiente linear, respectivamente, da equação da recta de regressão linear obtida do logaritmo de base 10 do peso molecular das proteínas em função de K_{av} , com recta de equação $y = 1569,3e^{-7,71x}$ ($r^2 = 0,998$). Os valores de R_s foram determinados de acordo com a expressão $(-\log K_{av})^{1/2}$ (16), para as proteínas de calibração. A recta da equação resultante, é representada pela expressão $y = 9,2966x - 1,949$ ($r^2 = 0,92$), em que x representa os valores de R_s e y o $(-\log K_{av})^{1/2}$. O peso molecular das proteínas foi obtido de uma recta que representa os valores de MW (em kDa) em função do R_s obtido para as proteínas de calibração, de acordo com a expressão $y = 2,7934e^{0,6981x}$ ($r^2 = 0,93$), onde x representa o MW (em kDa) e y o R_s .

2.12. Digestão controlada pela Tripsina

As amostras de proteína purificada RodZ₁₃₁₋₃₀₄-His₆ (75) e RodZ₂₀₁₋₃₀₄-His₆, assim como uma amostra da proteína utilizada como controlo, Albumina de Soro Bovino (BSA, Sigma-Aldrich), em tampão 20 mM fosfato de sódio pH 7,6 com 150 mM de

NaCl, foram quantificadas e diluídas para 0,1 mg/ml. A digestão por Tripsina (Promega) foi realizada, numa razão proteína:protease de 1:1000, durante 2h a 37°C. A reacção foi parada a diferentes tempos, por adição de tampão de amostra TSDS (ver o anexo 3) e sujeitas a análise por electroforese em gel de TSDS-PAGE, como descrito anteriormente.

2.13. Ensaio de estabilidade térmica

As amostras de proteína purificada His₆-RodZ₁₋₉₃, His₆-RodZ₁₋₁₀₃ (75), RodZ₁₃₁₋₃₀₄-His₆ (75) e RodZ₂₀₁₋₃₀₄-His₆, assim como a BSA (Sigma-Aldrich), como controlo, foram dialisadas contra tampão 20 mM fosfato de sódio pH 7,6 com 150 mM de NaCl, quantificadas e diluídas para 0,1 mg/ml. Foram depois incubadas a 100 °C, durante 20 min, e sujeitas a ultracentrifugação a 112000 x g, durante 40 min a 4°C. O sobrenadante foi recolhido e adicionado o tampão de amostra TSDS (ver o anexo 3), sendo posteriormente sujeitas a análise por electroforese em gel de TSDS-PAGE, como descrito anteriormente.

2.14. Análise estrutural dos domínios RodZn e RodZc por espectroscopia de dicroísmo circular e *Diffusion ordered* NMR

As proteínas His₆-RodZ₁₋₉₃ e RodZ₂₀₁₋₃₀₄-His₆ super-produzidas e purificadas foram dialisadas (Snake-Skin 3,5 MW, Pierce) em tampão 20 mM HEPES/NaOH a pH 7,6 com 150 mM de NaCl. His₆-RodZ₁₋₉₃ e RodZ₂₀₁₋₃₀₄-His₆ (a concentrações de 1,13 mg/ml e 3,5 mg/ml, respectivamente) bem como as formas His₆-RodZ₁₋₁₀₄ e RodZ₁₃₁₋₃₀₄-His₆ (1,12 mg/ml e 1,65 mg/ml, respectivamente; 75) foram analisadas por espectroscopia de dicroísmo circular, pelo Dr. Cláudio Gomes, do laboratório de *Protein Biochemistry Folding & Stability*. Para a realização de experiências de *Diffusion Ordered NMR*, as quatro proteínas (de concentração 1,5 mg/ml, 1,17 mg/ml, 2 mg/ml e 2,34 mg/ml, respectivamente), foram dialisadas contra um tampão deuterado (D₂O) pelo Dr. Patrick groves, do laboratório de *Molecular Interactions and NMR*.

2.15. Análise estrutural do domínio citoplasmático de RodZ por NMR

A proteína His₆-RodZ₁₋₉₃ foi super-produzida na estirpe AH4333 (Tabela 1). Inicialmente foi realizado uma pré-cultura em meio LB, incubada a 37°C, durante a noite com agitação orbital de 100 rpm, que foi posteriormente diluída 1:2500 em 500 ml de meio mínimo M9 (ver o anexo 1), suplementado com os antibióticos necessários. O meio mínimo M9 utilizado contém carbono-14 e azoto-15, permitindo assim a marcação radioactiva das proteínas produzidas. A cultura celular foi incubada a 37°C com agitação orbital de 140 rpm, até atingir uma DO₆₀₀ entre 0,4 e 0,6, após a qual se induziu a produção da proteína por adição de 1 mM de isopropil-β-tiogalactósido (IPTG) durante 14h, a 37°C, com uma agitação orbital de 150 rpm. Os processos de preparação dos extractos proteicos, purificação e quantificação da proteína foram realizadas como descrito anteriormente. Após quantificação, o tampão foi substituído por 20 mM fosfato de sódio pH 7,6 com 150 mM de NaCl, em colunas de exclusão molecular PD-10 (Amersham Biosciences). As amostras foram ultracentrifugadas a 112000 x g, durante 40 min a 4°C para remoção de precipitados, e novamente quantificadas. A proteína His₆-RodZ₁₋₉₃ marcada (12,2 mg/ml) foi analisada por 1D ¹H NMR (Dr. Patrick Groves, *Molecular Interactions and NMR*, e Dr. Manolis Matzapetakis, *Biomolecular NMR Laboratory*) e também sujeita a análise para determinação da sua estrutura em solução (Dr. Manolis Matzapetakis, *Biomolecular NMR Laboratory*). Durante os processos de indução, purificação e análise estrutural, foram recolhidas e analisadas amostras para controlo de qualidade por TSDS-PAGE, como descrito anteriormente.

2.16. Microscopia de fluorescência

Para observação de células por microscopia, foram preparadas pré-culturas das várias estirpes de *B. subtilis* estudadas em 10 ml de meio LB, com os antibióticos adequados. As culturas foram incubadas a 37°C, 120 rpm, durante 16h e diluídas 1:200 em 5 ml de meio mínimo SMS/SMM (ver o anexo 1; 30) contendo 0,5% de xilose e 100 μM de IPTG. As culturas foram de seguida incubadas a 37°C e 160 rpm,

durante cerca de 5h (meio da fase exponencial de crescimento). Foram recolhidas amostras de 1 ml de cultura e as células colhidas por centrifugação a 6000 rpm (numa microcentrífuga), à TA, durante 3 min. O sedimento celular foi ressuspendido em 100 µl do sobrenadante suplementado com 1 µl de DAPI (0,2 µg/ml) e 1 µl de FM4-64 (5 µg/ml). Após nova centrifugação a 6000 rpm (numa microcentrífuga), à TA durante 1 min, as células foram ressuspensas em cerca de 20 µl do sobrenadante. De seguida foram transferidos 2 µl da suspensão para lâminas de microscopia cobertas com uma camada fina de 1,7% de agarose. As imagens de contraste de fase e de fluorescência foram adquiridas com uma câmara digital arrefecida iXonEM+ 885 (Andor Technology, Connecticut, USA) acoplada a um microscópio DMR6000 (Leica). As imagens de fluorescência foram obtidas com filtros *standard* para a YFP e o FM4-64, a uma ampliação de 1600x. Para a aquisição e a análise das imagens foi usado o programa Metamorph v4 (Molecular Devices, Berks, UK) e para o seu processamento foi utilizado o Adobe Photoshop CS versão 8.0 (Adobe Systems Incorporated).

2.17. Sistema de dois híbridos *Split-Ubiquitin*

2.17.1. Detecção de interacção por ensaios de actividade da enzima β-galactosidase

A actividade da β-galactosidase foi monitorizada em meio sólido (YPAD) contendo o substrato cromogénico X-Gal (5-bromo-4-cloro-indolil-β-D-galactopiranosídeo; 50 µg/ml), e quantificada após crescimento em meio YPAD líquido, com o substrato ONPG (*orto*-nitrofenil-β-D-galactosídeo; CLONTECH Laboratories). A actividade da β-galactosidase foi calculada usando a fórmula abaixo indicada, e representada em unidades de Miller:

$$\text{Unidades de } \beta\text{-galactosidase} = 1000 \times DO_{420} / (t \times V \times DO_{600})$$

t = tempo de incubação em minutos

V = volume da cultura celular

3. Resultados

3.1. Super-produção e purificação de RodZ₁₋₉₃-His₆ e His₆-RodZ₂₀₁₋₃₀₄

A determinação do estado oligomérico de RodZn e de RodZc é uma questão importante, porque RodZ é uma proteína muito abundante e forma estruturas em banda ao longo do eixo longitudinal da célula (22). Trabalho preliminar realizado no Laboratório, mostrou que os domínios individualizados de RodZ (sem o segmento TM), têm um comportamento anómalo quando analisados por cromatografia de exclusão molecular (SEC; 75). Os pesos moleculares obtidos para as proteínas utilizadas, RodZ₁₋₁₀₄-His₆ (RodZn) e His₆-RodZ₁₃₁₋₃₀₄ (RodZc), eram superiores aos pesos moleculares previstos (Tabela 3; 75). Para RodZn, o peso molecular calculado foi uma vez e meia superior ao valor estimado (14 kDa), e RodZc apresentou um peso molecular duas vezes superior ao peso previsto (22,6 kDa; Tabela 3; 75). Os resultados poderiam ser compatíveis com espécies monoméricas com uma forma alongada ou diméricas com uma estrutura compacta (75). No início desta investigação, revisitámos a questão do estado oligomérico de RodZn e de RodZc, tentando identificar regiões nos dois domínios responsáveis pelo comportamento anómalo em SEC. Para tal, foram analisadas duas novas formas de RodZn e de RodZc, RodZ₁₋₉₃-His₆ e His₆-RodZ₂₀₁₋₃₀₄ (Fig. 6A).

A purificação das proteínas foi realizada em colunas de Ni²⁺-NTA e foram analisadas diversas amostras recolhidas ao longo do processo de purificação, por TSDS-PAGE, como se pode observar na Fig. 6, painéis B e C. As proteínas RodZ₁₋₉₃-His₆ (Fig. 6B) e His₆-RodZ₂₀₁₋₃₀₄ (Fig. 6C), foram eluídas na presença de 300 e 500 mM de imidazol, respectivamente, apresentando um elevado grau de pureza e concentração (2,3 mg/ml e 3,5 mg/ml, respectivamente). O rendimento foi de cerca de 10 e 12 mg/L de cultura, respectivamente. A detecção imunológica (com um anticorpo específico para RodZ; 22, 75); confirmou a identidade das duas proteínas.

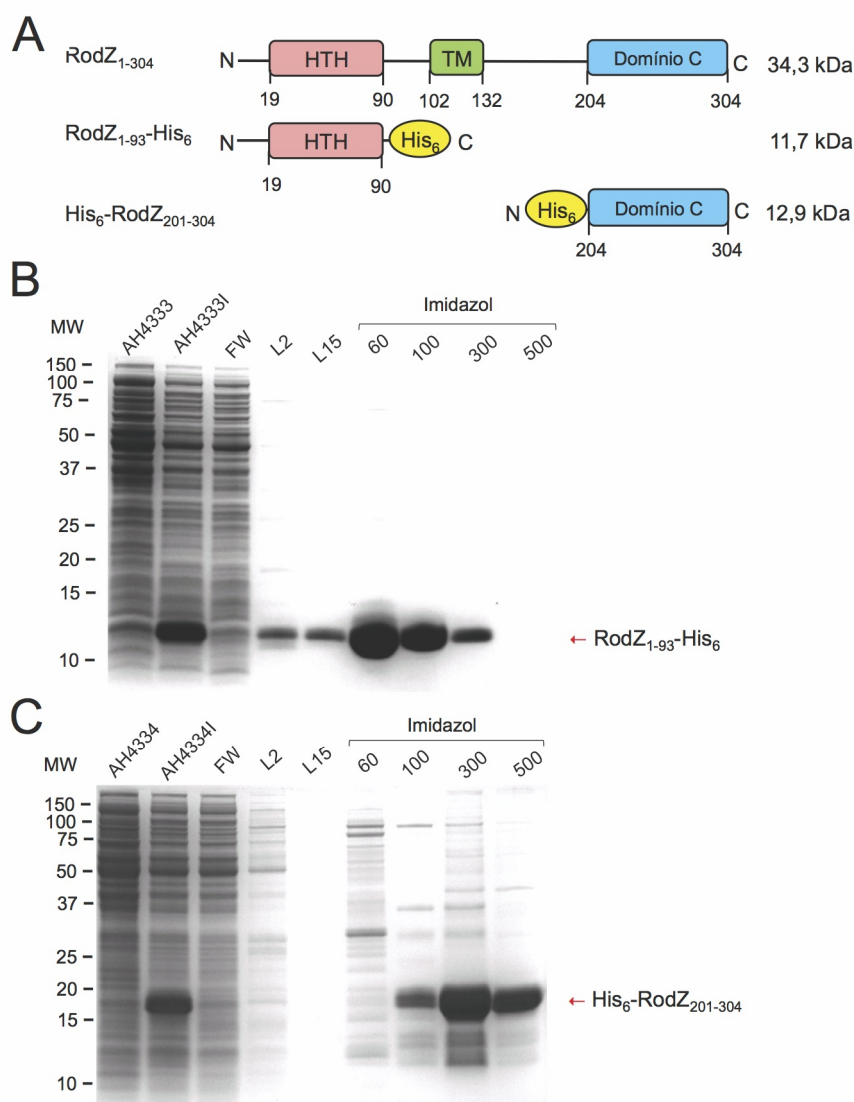


Figura 6 - Purificação das proteínas RodZ₁₋₉₃-His₆ e His₆-RodZ₂₀₁₋₃₀₄ por cromatografia de afinidade em colunas de Ni²⁺-NTA. A) Representação esquemática da proteína RodZ inteira (RodZ₁₋₃₀₄) e das proteínas RodZ₁₋₉₃-His₆ e His₆-RodZ₂₀₁₋₃₀₄, assim como os respectivos pesos moleculares estimados. B e C) Análise da super-produção e purificação das proteínas RodZ₁₋₉₃-His₆ (B) e His₆-RodZ₂₀₁₋₃₀₄ (C) por electroforese em géis de TSDS-PAGE corados com Azul de Comassie. No primeiro poço de cada gel mostra-se uma amostra do extracto proteico solúvel das estirpes AH4333 (B) e AH4334 (C) não induzidas, respectivamente. No segundo poço de ambos os painéis B e C, mostra-se uma amostra do extracto proteico solúvel das mesmas estirpes induzidas para super-produção das proteínas RodZ₁₋₉₃-His₆ e His₆-RodZ₂₀₁₋₃₀₄ (AH4333I e AH4334I, respectivamente), respectivamente. As restantes amostras de ambos os painéis representam a segunda fracção recolhida do *flow-through* (FT), a segunda e décima-quinta fracções recolhidas da etapa de lavagem (L2 e L15) e as segundas fracções recolhidas das eluições com diferentes concentrações de Imidazol (60, 100, 300 e 500 mM). A posição das proteínas RodZ₁₋₉₃-His₆ e His₆-RodZ₂₀₁₋₃₀₄ está indicada por uma seta a vermelho do lado direito dos painéis e a posição dos marcadores de peso molecular (em kDa) representada do lado esquerdo.

3.2. Os domínios RodZn e RodZc são monoméricos em solução

3.2.1. Análise por cromatografia de exclusão molecular

De modo a determinar o estado oligomérico, as proteínas RodZ₁₋₉₃-His₆ e His₆-RodZ₂₀₁₋₃₀₄ purificadas foram analisadas por cromatografia de exclusão molecular numa coluna analítica de Superose 12HR 10/30 (GE Healthcare).

RodZ₁₋₉₃-His₆ foi detectada em apenas um pico para todas as concentrações de proteína usadas (200 μ M, 20 μ M, 10 μ M, 5 μ M e 2 μ M; Fig. 7A), sugerindo a presença de uma espécie monomérica. A presença de RodZ₁₋₉₃-His₆ no pico de eluição foi confirmada por *Western-blot* (Fig. 7A). Em todos os casos, observa-se que os picos são simétricos, indicando a ausência de interações com a matriz cromatográfica. O valor de Kav determinado para RodZ₁₋₉₃-His₆ foi de 0,59. Este valor corresponde a um peso molecular de 16,6 kDa, 1,5x superior ao peso molecular estimado (11,7kDa; Fig. 7A, seta vermelha) e um raio de Stokes (Rs) de 2.5. Se RodZ₁₋₉₃-His₆ fosse globular, o seu Rs seria de 2,05.

Do mesmo modo, His₆-RodZ₂₀₁₋₃₀₄ originou um único pico maioritário para todas as concentrações de proteína testadas (275 μ M, 25 μ M, 12,5 μ M, 7,5 μ M e 5 μ M; Fig. 7B). A presença de His₆-RodZ₂₀₁₋₃₀₄ no pico de eluição foi confirmada por detecção imunológica (Fig. 7B). Neste caso, o pico apresenta um arrastamento para a direita, possivelmente causado por interações inespecíficas da proteína com a matriz da coluna e/ou degradação da amostra. À semelhança de RodZ₁₋₉₃-His₆, os resultados sugerem também que His₆-RodZ₂₀₁₋₃₀₄ seja monomérica em solução. Pois o valor de Kav obtido (0,53), corresponde a um peso molecular de 21,6 kDa, cerca de 1,5x superior ao teórico (12,9 kDa). A este valor de Kav corresponde um Rs de 2.9. Se His₆-RodZ₂₀₁₋₃₀₄ fosse globular, o seu Rs seria de 2.19.

Na sua globalidade, os resultados sugerem que qualquer das formas de RodZn e RodZc testadas são monómeros alongados em solução.

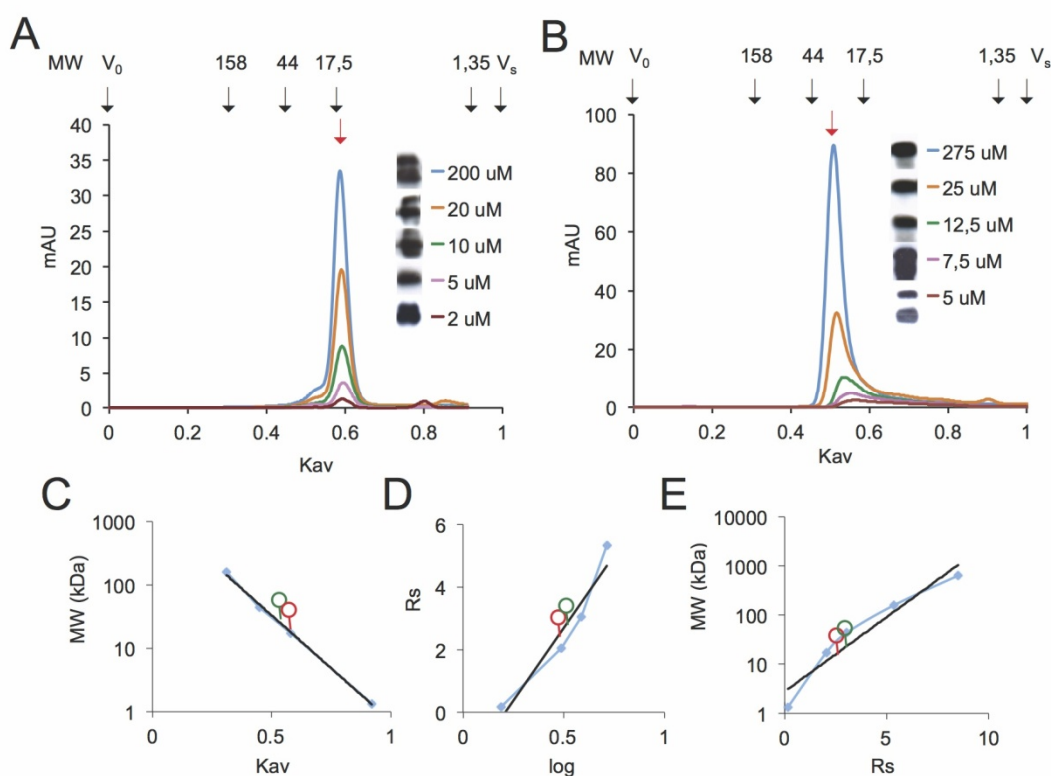


Figura 7 – Peso molecular e raio hidrodinâmico de RodZ₁₋₉₃-His₆ e His₆-RodZ₂₀₁₋₃₀₄. A e B) Perfis de eluição obtidos por cromatografia de exclusão molecular (SEC) da proteína RodZ₁₋₉₃-His₆ (A) e His₆-RodZ₂₀₁₋₃₀₄ (B). Em cada gráfico do lado direito dos painéis, estão indicadas as concentrações de proteína analisada e a respectiva análise por *Western-blot* das fracções correspondentes ao pico de eluição. No topo de ambos os cromatogramas estão representados os pesos molecular (MW, em kDa) das proteínas padrão utilizadas. A proteína RodZ₁₋₉₃-His₆ foi eluída num pico com um valor de Kav de 0,59 (que corresponde a 1,5x o peso molecular estimado para o monómero com base na estrutura primária), e o perfil de eluição da proteína His₆-RodZ₂₀₁₋₃₀₄ originou dois picos, um maioritário com um valor de Kav aproximado de 0,53, que corresponde a um peso molecular 1,5x vezes superior ao peso molecular estimado para o monómero com base na estrutura primária. C) Representação dos valores de MW (em kDa), em função de Kav. D) Representação dos valores de Rs em função de $(-\log Kav)^{1/2}$. E) Representação dos valores de MW (em kDa), em função de Rs. Nos painéis C, D e E estão representadas a proteína RodZ₁₋₉₃-His₆ a vermelho e His₆-RodZ₂₀₁₋₃₀₄ a verde.

3.2.2. Análise por *Diffusion-ordered* NMR (DOSY)

Os resultados descritos na secção anterior sugerem que ambas as proteínas, RodZ₁₋₉₃-His₆ e His₆-RodZ₂₀₁₋₃₀₄, são monómeros alongados em solução. Numa tentativa para confirmar independentemente esta inferência, recorreremos a *Diffusion-ordered* (DOISY) NMR. Esta análise foi levada a cabo pelo Dr. Patrick Groves, no laboratório *Molecular Interactions and NMR*. Os pesos moleculares determinados por NMR para as proteínas RodZ₁₋₉₃-His₆, RodZ₁₋₁₀₄-His₆ (75), His₆-RodZ₁₃₁₋₃₀₄ (75) e His₆-RodZ₂₀₁₋₃₀₄ foram semelhantes aos resultados obtidos por cromatografia de

exclusão molecular (Tabela 2). No entanto, para RodZ₁₋₉₃-His₆ obteve-se um valor de peso molecular mais próximo do estimado (Tabela 2). Estes resultados apoiam a sugestão de que em solução, todas as proteínas aqui analisadas são monómeros de estrutura alongada.

Tabela 2 – Pesos moleculares estimados e determinados por SEC e NMR das diferentes formas de RodZ.

	Estimado	SEC	NMR
His ₆ -RodZ ₁₋₁₀₄ *	14	22	22
His ₆ -RodZ ₁₋₉₃	11,7	16,8	12,8
RodZ ₁₃₁₋₃₀₄ -His ₆ *	22,6	40	47
RodZ ₂₀₁₋₃₀₄ -His ₆	12,9	26	34,7

*Dados de Rodrigues (75)

3.3. Estabilidade térmica e proteolítica de RodZn e de RodZc

3.3.1. Previsão de estrutura secundária

Uma análise de previsão de estrutura secundária (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred>) revela que RodZn é composto por hélices α , bem como algumas regiões curtas não estruturadas (resultados não apresentados). Estas observações estão de acordo com a estrutura geral do motivo *helix-turn-helix* (HTH) e em particular com a estrutura da região citoplasmática da proteína RodZ de *T. maritima* (90). A conclusão de que RodZ₁₋₉₃-His₆ e RodZ₁₋₁₀₄-His₆ (75) são moléculas alongadas parece sugerir que este motivo não é canónico (por exemplo, poderá não assumir o *fold* esperado quando em solução). Em alternativa, o carácter alongado é conferido pela região carregada localizada na porção C-terminal da proteína (resíduos 94 a 104), já que esta região, localizada entre o domínio HTH e o segmento TM, está ausente da construção RodZ₁₋₉₃-His₆.

RodZc, pelo contrário, é maioritariamente não estruturado, e os únicos segmentos da proteína que parecem ter estrutura secundária organizam-se em folha β (Fig. 8C). A incidência das regiões desprovidas de estrutura secundária em RodZc sugerem que esta proteína possa ser intrinsecamente desordenada (*intrinsically disordered protein*, ou IDP). Para testar esta ideia, foram realizadas previsões de ordem/desordem para a proteína RodZ completa, com recurso ao algoritmo PONDR (*Predictors of Natural Disordered Regions* VL-XT; <http://www.pondr.com/>; Fig. 8B). Neste tipo de análise,

as regiões de uma proteína que apresentam valores superiores a 0,5 são consideradas desordenadas, i.e., não apresentam estrutura terciária. Os resultados desta análise indicam que a região citoplasmática (RodZn) da proteína é maioritariamente ordenada, ao passo que a região extra-citoplasmática (RodZc) apresenta segmentos com forte probabilidade de serem intrínsecamente desordenados.

3.3.2. Estabilidade térmica

Para testar estas ideias, e ainda para tentar perceber a função dos domínios ou regiões específicas de RodZn e RodZc, as proteínas RodZ₁₋₉₃-His₆ e His₆-RodZ₂₀₁₋₃₀₄ (deste trabalho) bem como RodZ₁₋₁₀₄-His₆ e His₆-RodZ₁₃₁₋₃₀₄ (22, 75), foram sujeitas a desnaturação térmica (Fig. 9A). De uma maneira geral, as proteínas globulares sujeitas a desnaturação térmica agregam quando a temperatura é diminuída, e podem ser removidas por ultracentrifugação (46, 50, 86, 88). Pelo contrário, a desnaturação térmica não leva à agregação de IDP's (46, 50, 86, 88). O fenómeno de agregação pode ser detectado em SDS-PAGE comparando a quantidade de proteína solúvel, presente antes e depois do passo de desnaturação e de ultra-centrifugação (46, 50, 86, 88). Os nossos resultados revelam que nenhuma das formas de RodZn ou de RodZc agrega após desnaturação térmica (Fig. 9A). O mesmo não acontece com a proteína BSA, que foi utilizada como um controlo nesta experiência por apresentar um *fold* globular complexo. Cerca de 70% da BSA presente na amostra inicial é desnaturada irreversivelmente e removida da solução por ultra-centrifugação (Fig. 9A). Estes resultados são consistentes com a sugestão de que RodZc é largamente não estruturado. Em alternativa, RodZc poderá possuir um *fold* simples, podendo renaturar espontaneamente. Presume-se que o *fold* relativamente simples de RodZn permita a renaturação de RodZ₁₋₁₀₄-His₆ e de RodZ₁₋₉₃-His₆. Estes resultados são compatíveis com a inferência de que as formas isoladas de RodZn e RodZc sejam moléculas alongadas.

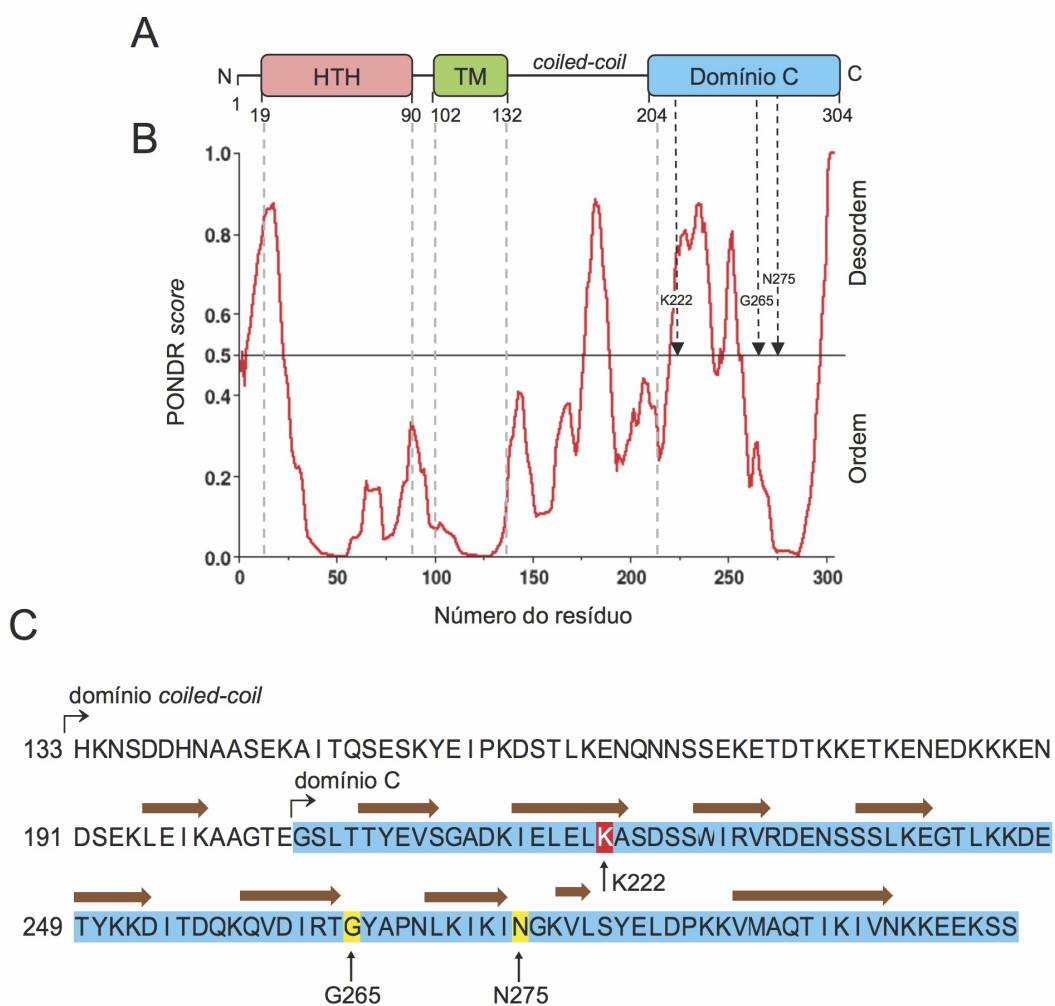


Figura 8 – Estrutura secundária de RodZ. A) Diagrama da organização estrutural de RodZ. HTH, domínio (*helix-turn-helix*); TM, segmento transmembranar; domínio *coiled coil* e domínio C. B) Previsão do nível de ordem e de desordem ao longo da sequência de RodZ, dos aminoácidos 1 ao 304, de acordo com o programa PONDNR VL-XT (www.pondr.com). As regiões acima do *threshold* 0,5 correspondem a segmentos desordenados. C) Previsão de elementos de estrutura secundária em RodZc (resíduos 132-304) de acordo com o servidor PSIPRED (www.psipred.com). As setas a castanho representadas acima da sequência mostram a posição de segmentos em folha β . O início da região *coiled-coil* e do domínio C são indicados. Nos painéis B e C, é indicada a posição dos resíduos K222, G265 e N275. O primeiro pode representar um local sensível a proteólise (ver também a figura 11); os demais são estritamente conservados entre ortólogos de RodZ (ver a figura 13A).

3.3.3. Susceptibilidade à tripsina

Para testar independentemente a ideia de que RodZc é maioritariamente não estruturado quando isolado em solução, procedemos a estudos de proteólise controlada. RodZc, em paralelo com a BSA, foram expostos à tripsina. Amostras da reacção, recolhidas ao longo do tempo, foram analisadas por TSDS-PAGE. Neste ensaio, uma proteína com um *fold* estável e complexo, como a BSA, resiste à

proteólise (46, 50, 86, 88). Pelo contrário, uma proteína intrínsecamente desordenada, ou com um *fold* simples deverá ser susceptível à tripsina (46, 50, 86, 88). A susceptibilidade à tripsinólise foi testada para as proteínas His₆-RodZ₁₃₁₋₃₀₄ (75) e His₆-RodZ₂₀₁₋₃₀₄. O resultado desta análise é ilustrado na figura 9B. Como esperado, a BSA manteve-se estável durante o ensaio (Fig. 9B). Pelo contrário, a proteína His₆-RodZ₁₃₁₋₃₀₄ apresentou alguma digestão pela tripsina a partir dos 15 min de reacção, originando um produto de proteólise de cerca de 22 kDa (Fig. 9B). Presume-se que este produto, que se manteve até ao final da experiência, corresponda a um domínio estável da proteína. Em qualquer caso, a diferença de peso molecular aparente entre His₆-RodZ₁₃₁₋₃₀₄ e o produto de proteólise mostra que a maior parte da cadeia polipeptídica não é acessível à proteólise. Interessantemente, a digestão de His₆-RodZ₂₀₁₋₃₀₄ originou um produto de cerca de 12 kDa a partir dos 5 min de reacção (Fig. 9B). Este fragmento acumula concomitantemente com a redução da forma completa da proteína His₆-RodZ₂₀₁₋₃₀₄, e é visível até aos 30 min de reacção (Fig. 9B). Após este tempo, este fragmento bem como a forma completa da proteína deixam de ser detectados. A análise por espectrometria de massa (LC-MS/MS) do fragmento tríptico de 12 kDa, sugere que His₆-RodZ₂₀₁₋₃₀₄ é cortada no resíduo K222 (resultados não apresentados). O fragmento tríptico de 12 kDa obtido de His₆-RodZ₂₀₁₋₃₀₄ poderá corresponder a um domínio da proteína, parcialmente resistente à tripsinólise (Fig. 9B). Em conjunto, estas observações permitem várias elações: *i*) o domínio *coiled-coil* (resíduos 133 a 203) parece conferir estabilidade ao domínio extra-celular; *ii*) RodZc apresenta alguma estrutura secundária e terciária; *iii*) RodZc pode ser dividido em dois domínios, um dos quais é parcialmente resistente à tripsinólise.

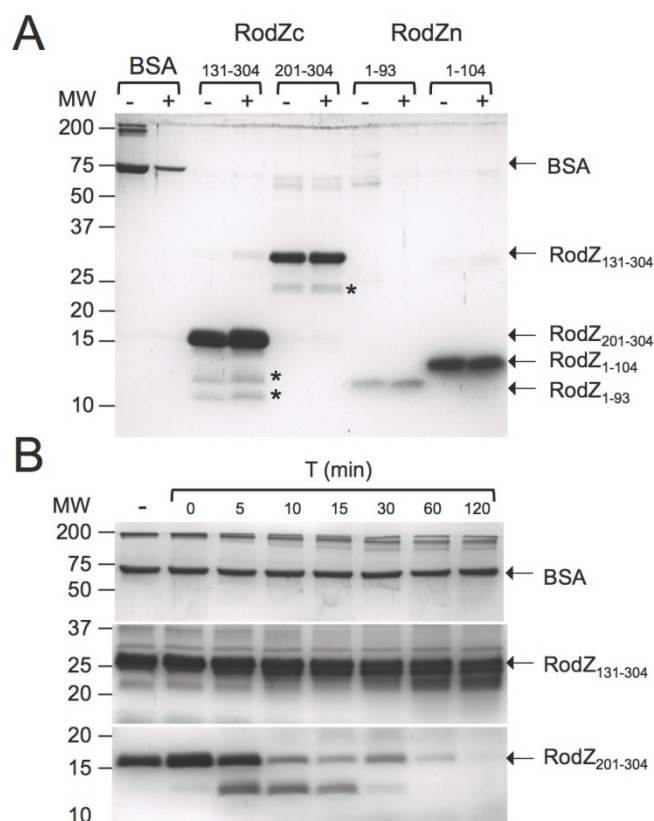


Figura 9 – Estabilidade térmica e susceptibilidade à tripsinólise dos domínios RodZn e RodZc.
 A) Estabilidade térmica das proteínas RodZ₁₋₉₃-His₆, RodZ₁₋₁₀₄-His₆ (75), His₆-RodZ₂₀₁₋₃₀₄ e His₆-RodZ₁₃₁₋₃₀₄ (75) após incubação de 50 µg de proteína a 100°C durante 20 min. A proteína BSA (globular) foi usada como controlo. Nenhuma das proteínas, à excepção da BSA (coluna 1), apresentou perda irreversível de conformação. B) 50 µg das proteínas BSA (66,7 kDa), His₆-RodZ₁₃₁₋₃₀₄ (22,6 kDa) e His₆-RodZ₂₀₁₋₃₀₄ (12,9 kDa) foram incubadas com tripsina (1:1000), durante 120 min. Os produtos com o peso molecular esperado estão indicados pelas setas pretas. A digestão da proteína His₆-RodZ₂₀₁₋₃₀₄ originou um fragmento aos 5 minutos de reacção, que se manteve até aos 30 minutos, acabando por ser totalmente digerido (assinalados com asterisco). Os pesos moleculares (em kDa) encontram-se assinalados à esquerda de cada painel.

3.4. Estrutura de RodZn e de RodZc: análise por CD e 1D ¹H NMR

De forma a obter informação estrutural adicional sobre os domínios RodZn e RodZc, as proteínas RodZ₁₋₉₃-His₆, RodZ₁₋₁₀₄-His₆ (75), His₆-RodZ₁₃₁₋₃₀₄ (75) e His₆-RodZ₂₀₁₋₃₀₄, foram analisadas por espectroscopia de dicroísmo circular (CD; no laboratório de *Protein Biochemistry Folding & Stability*, pelo Dr. Cláudio M. Gomes) e por 1D ¹H NMR (no laboratório *Molecular Interactions and NMR*, pelo Dr. Patrick Groves e no laboratório de *Biomolecular NMR Laboratory*, pelo Dr. Manolis Matzapetakis). Estes resultados são aqui descritos brevemente.

3.4.1. RodZn é um domínio estruturado e maioritariamente em hélice α

O espectro de CD obtido para a proteína RodZ₁₋₉₃-His₆, na região *far-UV* produziu uma assinatura espectroscópica típica de uma proteína estruturada, rica em hélice α , com mínimos de 208 e 222 nm (ver o anexo 5, Fig. S1A). Uma estimativa da estrutura secundária sugere que as proteínas estão organizadas maioritariamente (~50%) em hélice α (resultados não apresentados). A desnaturação térmica, seguindo o sinal de CD a 222 nm mostra uma transição abrupta compatível com uma transição de uma conformação estruturada para uma conformação não estruturada com um *midpoint* que corresponde a uma temperatura de *melting* (T_m) de 77°C (ver o anexo 5, Fig. S1A). A transição é completamente reversível, compatível com a organização estrutural de RodZ₁₋₉₃-His₆. Foram obtidos resultados semelhantes para RodZ₁₋₁₀₄-His₆ (75) que, no entanto, apresentou uma temperatura de *melting* inferior (T_m = 74°C; ver o anexo 5, Fig S1A). Este decréscimo pode resultar do facto do segmento adicional, que liga RodZ à membrana, ser menos organizado. A análise espectroscópica por 1D ¹H NMR obtida para RodZ₁₋₉₃-His₆ corrobora a conclusão de que este polipeptídeo é predominantemente estruturado e α -helicoidal. Esta conclusão tem por base a dispersão e a definição dos picos correspondentes ao sinal das amidas (numa região de mais de 3 ppm), bem como a presença de ressonâncias correspondentes aos grupos metilo na região entre 0,5 e 1 ppm, ambos fortes indicadores de geometrias bem organizadas (ver o anexo 5, Fig. S1B). Estas observações estão de acordo com a presença em RodZn de um motivo HTH ligado à membrana mediante um segmento *linker* menos estruturado.

3.4.2. RodZc é parcialmente estruturado e estabilizado pelo domínio *coiled-coil*

As propriedades estruturais de RodZc foram investigadas usando as formas His₆-RodZ₁₃₁₋₃₀₄ (75) e His₆-RodZ₂₀₁₋₃₀₄. Neste caso, a espectroscopia de CD produziu espectros correspondentes a proteínas solúveis com baixo grau de organização estrutural, com um mínimo a 208 nm e assinaturas adicionais na região entre 215 e 230 nm, compatíveis com estrutura em folha β (ver o anexo 6, Fig. S2A). Além disso, para His₆-RodZ₁₃₁₋₃₀₄ (75) foi também observado um sinal alargado centrado a 215 nm (ver o anexo 6, Fig. S2A). A diferença entre os espectros das duas

proteínas, His₆-RodZ₁₃₁₋₃₀₄ (75) e His₆-RodZ₂₀₁₋₃₀₄, mostra que a assinatura característica para folha β é mais marcada para a região entre os resíduos 131 e 201 (ver o anexo 6, Fig. S2A). Esta possibilidade foi testada por desnaturação térmica. A desnaturação térmica de His₆-RodZ₂₀₁₋₃₀₄ revelou-se monotónica, sem transição observável, e irreversível (*i.e.*, o abaixamento da temperatura para a TA, não restaurou a assinatura espectroscópica inicial (ver o anexo 6, Fig. S2B). Em conjunto, estes resultados sugerem que His₆-RodZ₂₀₁₋₃₀₄ é não estruturado. Por outro lado, a desnaturação térmica de His₆-RodZ₁₃₁₋₃₀₄ produziu uma transição reversível de pequena amplitude, com um T_m aparente de 45°C (ver o anexo 6, Fig. S2B). Interessantemente, esta transição não resultou em perda de estrutura, mas antes sugere a reorganização dos elementos estruturados na proteína numa nova conformação. Esta observação sugere que His₆-RodZ₂₀₁₋₃₀₄ é estruturalmente flexível.

A análise por 1D ¹H NMR confirma e estende as diferenças entre His₆-RodZ₁₃₁₋₃₀₄ e His₆-RodZ₂₀₁₋₃₀₄. O espectro obtido His₆-RodZ₂₀₁₋₃₀₄ é característico de uma proteína não estruturada, com os sinais das amidas agrupados à volta de 8.2 ppm, enquanto que não são observadas ressonâncias para os grupos metilo perto dos 0 ppm (ver o anexo 6, Fig. S3B). O espectro obtido para a forma mais longa, His₆-RodZ₁₃₁₋₃₀₄ parece corresponder a uma mistura de dois tipos estruturais, ordenado e não ordenado. As ressonâncias das amidas entre 6 e 10.5 ppm, bem como as ressonâncias dos grupos metilo perto de 0 ppm, são consistentes com uma proteína estruturada (ver o anexo 6, Fig. S3A). Além disso, os sinais perto de 5 ppm são consistentes com sinais de estrutura em folha β, com a excepção dos picos à volta de 8.2 ppm (ver o anexo 6, Fig. S3A). Todas estas características estão ausentes de His₆-RodZ₂₀₁₋₃₀₄ (ver o anexo 6, Fig. S3B). Os resultados sugerem que pelo menos uma fracção tenha um *fold* simples ou uma estrutura aberta. Em consonância com a análise de susceptibilidade à tripsina, os resultados sugerem ainda que a região *coiled-coil* promove a estruturação de RodZc.

3.5. Estrutura de RodZn e de RodZc: modelos estruturais

3.5.1. Um modelo para RodZn

De seguida, para tentar validar independentemente os resultados da análise estrutural e bioquímica expostos acima, tentámos obter um modelo estrutural para RodZn (resíduos 1-103), com recurso ao servidor *Phyre* (*Protein Homology/analogy Recognition Engine*, <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre/>; 49). Em resumo, neste servidor a sequência submetida é primeiro comparada com uma base de sequências não redundante e é construído um perfil de semelhanças. São depois usadas 5 interações por PSI-Blast de modo a reunir homólogos próximos e distantes. Os alinhamentos *pairwise* gerados pelo PSI-Blast são combinados num único alinhamento usando a sequência inicial como molde. Depois da produção deste perfil, a estrutura secundária é prevista com base em três algoritmos diferentes (Psi-Pred, SSPro e JNets), sendo gerado um perfil consensual (são representadas regiões em hélice α , folha β , e *coil*). São ainda identificadas regiões na sequência original com forte probabilidade de serem ordenadas ou desordenadas. O perfil e a previsão de estrutura secundária são então comparados com uma biblioteca de *folds* e são produzidos vários alinhamentos com um *score* associado. Os 10 alinhamentos com um *score* mais elevado são então utilizados para gerar modelos 3D da proteína original.

Como esperado, RodZn revelou-se estruturalmente semelhante a proteínas contendo motivos HTH, em particular aquelas que são semelhantes ao repressor do fago λ (78). A homologia estrutural entre o domínio citoplasmático das proteínas RodZ tinha já sido notado (2). Em particular RodZn é muito semelhante ao repressor SinR de *B. subtilis* (SCOP³ code: d1b0na2), ela própria estruturalmente relacionada com o repressor do fago λ (58, 79), e a proteínas de função desconhecida semelhantes a SinR. Exemplos são um putativo ortólogo de SinR de *B. caldolyticus* (d2b5aa1), um regulador de um sistema de restrição/modificação de *Aeromonas hydrophila* (d1y7ya1), ou o domínio N-terminal do regulador transcricional VC1968 de *Vibrio cholerae* (d1y9qa1). O modelo estrutural representado na Fig. 10 foi obtido

³ SCOP: structural classification of proteins database (<http://scop.mrc-lmb.cam.ac.uk/scop/>).

com base na estrutura de SinR (111 aminoácidos). O modelo exibe um grau de confiança de 100% ($E=1.6e^{-9}$), e o alinhamento entre SinR e RodZn corresponde uma percentagem de identidade de 19% (resultados não apresentados). O modelo sugere que RodZn é composto por 5 hélices α ($\alpha 1$ a $\alpha 5$; Fig. 10). RodZ possui um domínio HTH multi-helicoidal, uma modificação do domínio HTH nuclear (ao qual correspondem as hélices $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$) resultante da adição de duas novas hélices ($\alpha 4$ e $\alpha 5$; Fig. 10; 3). Este tipo de modificação do domínio tri-helicoidal HTH ancestral, é pouco frequente em bactérias (3). Dentro do domínio HTH de RodZn, o motivo HTH é formado pelas hélices $\alpha 2$ (L19-T26), a volta (K27-Q29) e $\alpha 3$ (K30-E38; Fig. 10). Se RodZn ligar ao DNA de um modo canónico, então a hélice de reconhecimento seria $\alpha 3$. O terminal carboxílico de $\alpha 2$, a volta e o terminal amínico de $\alpha 3$ são estritamente conservados entre ortólogos de RodZ encontrados nas espécies do género *Bacillus*, o que está de acordo com o padrão de conservação observado para o motivo HTH (resultados não apresentados).

Na estrutura do complexo entre RodZ e MreB de *T. maritima*, a hélice $\alpha 4$ (resíduos F48-V61 em RodZ de *B. subtilis*) contém resíduos essenciais para a interacção entre as duas proteínas (90). Os resíduos 1 e 2, e 83 a 103 não puderam ser modulados e não são representados no modelo. Os resíduos 76 em diante, representados a vermelho na Fig. 10, parecem formar um *loop* não estruturado. Esta região corresponde ao *linker* que liga RodZn à membrana. O modelo estrutural está de acordo com a análise bioquímica e biofísica reportada nas secções precedentes.

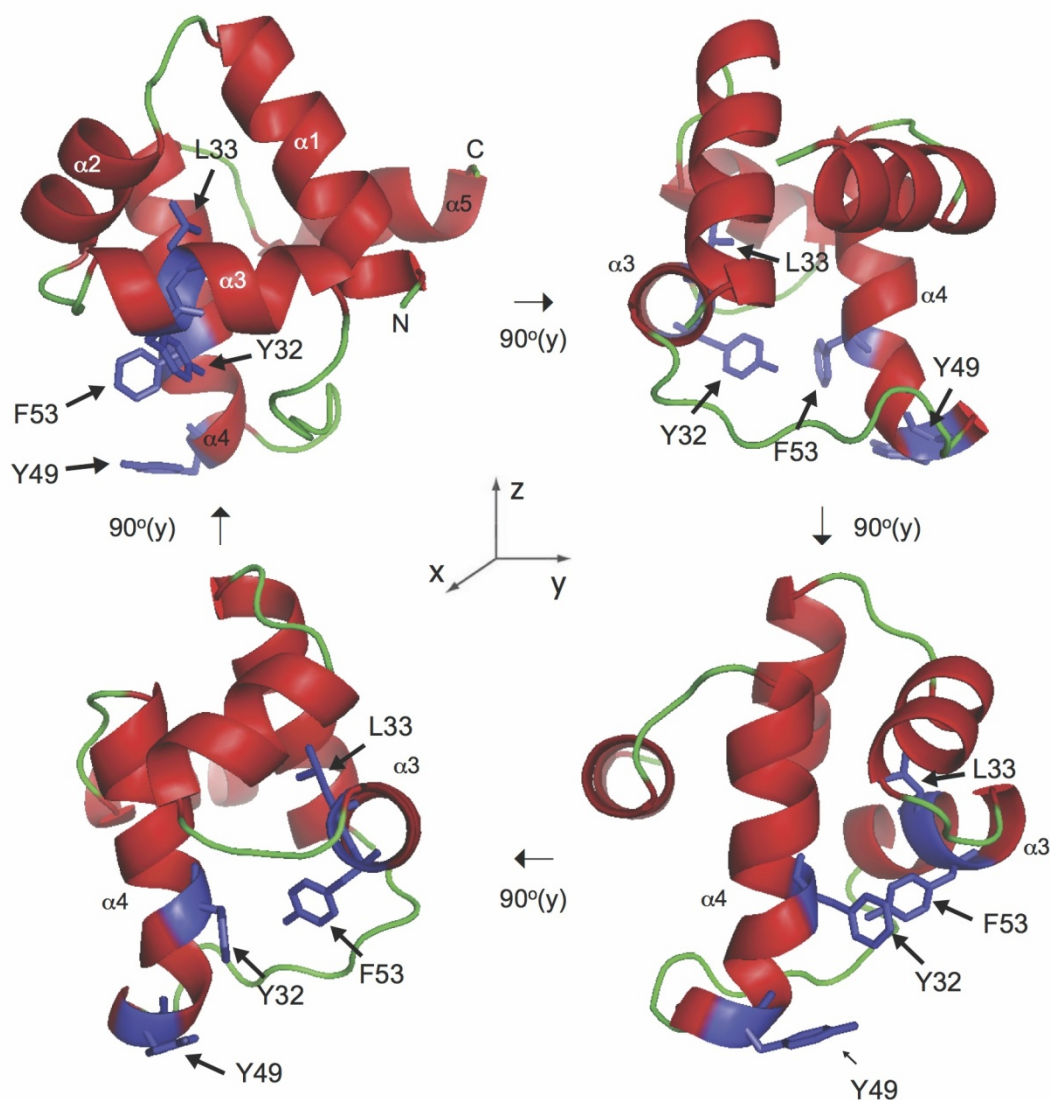


Figura 10 – Modelo estrutural de RodZn. Representação do modelo para RodZn obtido com base na estrutura da proteína SinR de *B. subtilis* com recurso ao servidor *Phyre* (www.phyre.com). A estrutura é representada em *cartoon* com as regiões não estruturadas a verde e as hélices α a vermelho. Cada *cartoon* representa uma rotação de 90° no eixo dos y, do *cartoon* anterior. As hélices são numeradas de 1 a 5, da extremidade amínica para a extremidade carboxílica. O motivo HTH é formado pelas hélices $\alpha 2$ e $\alpha 3$, e o domínio HTH contém ainda $\alpha 1$, $\alpha 4$ e $\alpha 5$. Os resíduos que foram substituídos por alanina no decurso deste trabalho estão assinalados a azul, e as suas cadeias laterais representadas no modo *stick*. N e C representam os terminais amínico e carboxílico, respectivamente. O tratamento da figura foi realizada com recurso ao *software* Pymol (www.pymol.com).

3.5.2. A estrutura de RodZc é remanescente de NCX1

A sequência de RodZc (resíduos 201 a 304) foi também analisada com recurso ao servidor *Phyre*. Apenas 2 dos modelos gerados exibiram um grau de confiança igual ou superior a 70%. A proteína que produziu o modelo estrutural com o grau de

confiança mais elevado (75%) foi a bomba de transporte de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ NCX1 de mamíferos (código SCOP: d2fwua1; código pdb: 2fws; 11, 39, 65). O alinhamento com RodZc estende-se por 157 resíduos, que corresponde ao primeiro domínio de ligação de Ca^{2+} de NCX1 (resíduos 370-502), e exibe 75% de identidade (resultados não apresentados). Foi ainda detectada homologia com o segundo domínio de ligação de Ca^{2+} (resíduos 501-657) da bomba de transporte de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (código SCOP: c2qvmA; *score* de 65%; 173 resíduos alinhados, para uma identidade de 10%; 10). A segunda proteína da lista foi a invasina produzida por *Yersinia pseudotuberculosis* e que liga às integrinas das células do hospedeiro com elevada afinidade (pdb code: 1cwv; identidade de 69%; 37). Também na casa dos 65% de confiança para o modelo, foram detectados o domínio fn3 da cadeia α -1 do colagénio humano de tipo 2 (c2dkmA), o domínio C-terminal da PBP5 de *E. coli* (SCOP: d1z6fa1), e o módulo G da laminina (uma proteína semelhante às lectinas do tipo da concanavalina A; SCOP: d1d2sa). Interessantemente, já que a análise estrutural sugere que RodZc pode ser largamente não estruturado mas com algum conteúdo em folha β (ver acima), todas as seis proteínas consideradas pertencem à classe SCOP *all β proteins* e ao *fold immunoglobulin-like β -sandwich* (<http://scop.mrc-lmb.cam.ac.uk/scop>).

O modelo obtido com base no transportador NCX1 sugere que o domínio RodZc consiste numa proteína de estrutura simples, que contem dois domínios separados pela linha a tracejado na Fig. 11. O primeiro domínio corresponde à região *coiled-coil* e possui 2 conjuntos de folhas β (1 a 4) num arranjo anti-paralelo (Fig 11). O segundo domínio corresponde ao domínio C identificado por Alyahya *et al.* (2) e inclui as folhas β 5 e β 6. Este domínio forma uma estrutura em gancho. O resíduo K222 (representado pela linha a tracejado) representa o hipotético local de corte de His₆-RodZ₂₀₁₋₃₀₄ pela tripsina (Fig. 11). A tripsina parece pois remover a porção N-terminal deste domínio, pouco estruturado, do resto do domínio, contendo o gancho e as folhas β 5 e β 6, que parece mais estruturado. Dois resíduos estritamente conservados entre ortólogos de RodZ encontrados num grupo representativo de espécies do género *Bacillus* (Fig. 13A), parecem importantes para a estrutura e possivelmente para a função de RodZc. Um deles, G265, situa-se no final da folha β 4, e presumimos que possibilite a dobra da cadeia polipeptídica que está no início do elemento em gancho. Este gancho fecha sobre a região do domínio C formada

pelas folhas $\beta 5$ e $\beta 6$, em arranjo anti-paralelo. O resíduo N275 situa-se na volta entre estas duas folhas β e de acordo com o modelo pode ser essencial para a interação com a extremidade carboxílica do domínio C, de modo a fechar o elemento em gancho (Fig. 11). Presumimos que o elemento em gancho represente um motivo de ligação a um componente da parede celular.

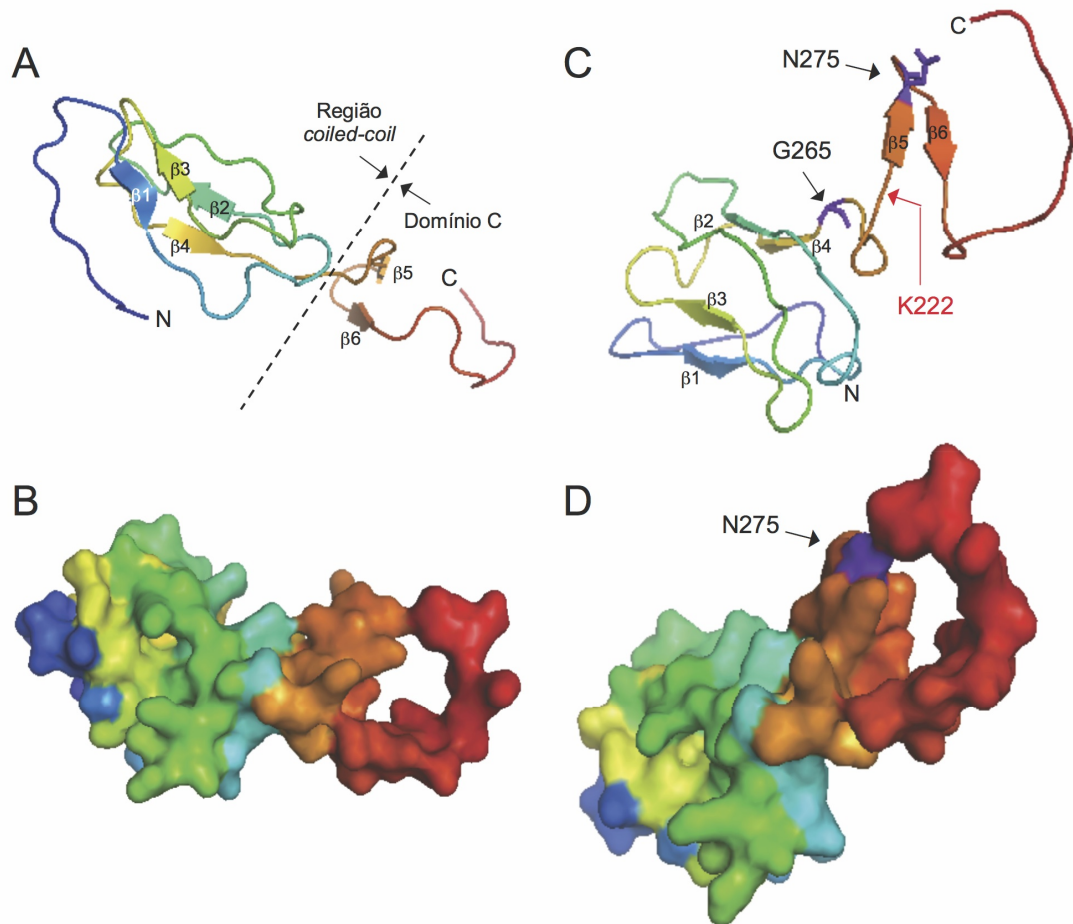


Figura 11 – Modelo estrutural de RodZc. Representação do modelo para RodZc obtido com base na estrutura da primeiro domínio de ligação de Ca^{2+} de NCX1 de mamíferos, com recurso ao programa *Phyre* (www.phyre.com). A) Representação em *cartoon* do modelo de RodZc, com coloração do azul a vermelho, do terminal amínico ao terminal carboxílico, respectivamente, segundo *Rainbow e.c* (software *Pymol*, www.pymol.com). As folhas β são numeradas de 1 a 6, da extremidade amínica para a extremidade carboxílica. O domínio *coiled-coil* e o domínio C encontram-se assinalados. B) Representação da superfície do modelo representado em A. C) Rotação da representação do modelo em A. Os resíduos que foram substituídos por alanina no decurso deste trabalho estão assinalados a azul, e as suas cadeias laterais representadas no modo stick. O local de corte K222 encontra-se assinalado com uma seta a vermelho. D) Representação da superfície do modelo representado em C, com resíduo N275 assinalado. O tratamento da figura foi realizada com recurso ao software *Pymol* (www.pymol.com).

Apesar das proteínas utilizadas como molde para a construção dos modelos estruturais possuírem funções diversas, estas têm em comum o facto de serem desprovidas de hélices α , e possuírem regiões extensas em *coiled-coil* e folha β , tal como antecipado nos estudos bioquímicos e biofísicos. Além disso, o modelo prevê papéis importantes para os únicos resíduos estritamente conservados em RodZc entre espécies de *Bacillus*, G265 e N275. Assim, embora do grau de confiança não seja muito elevado, consideramos o modelo estrutural obtido para RodZc como uma boa aproximação à estrutura deste domínio.

3.6. Mutações pontuais no domínio HTH afectam a localização subcelular de RodZ

A estrutura do complexo entre RodZ e MreB de *T. maritima* mostra que a interacção envolve resíduos localizados no motivo HTH de RodZ. Estes resíduos, K36, Y53 e Y57 são conservados em *E. coli* (T44, F60 e Y64), sugerindo que nestas duas espécies o motivo HTH não esteja envolvido em interacções com o DNA, mas sim proteína-proteína, com MreB (8, 90). Em *B. subtilis*, apesar de RodZ e MreB estarem presentes num complexo, não há evidência para uma interacção directa entre estas proteínas (22). Numa tentativa para aprofundar este ponto importante, procurámos primeiro saber se RodZ de *B. subtilis* possuiria resíduos homólogos a T44, F60 e Y64 de *E. coli* e num segundo passo, avaliar o efeito de mutações nestes resíduos. As sequências das proteínas RodZ de *E. coli* e de *B. subtilis* foram alinhadas utilizando o programa ClustalW2 (*Multiple Sequence Alignment* ClustalW2; <http://www.clustal.org/clustal2>). O alinhamento sugere que os resíduos tirosina 32 (Y32), tirosina 49 (Y49) e fenilalanina 53 (F53) da proteína de *B. subtilis* são homólogos de RodZ de *E. coli* (Fig. 12A). Cada um destes resíduos foi individualmente substituído por um resíduo de alanina numa construção destinada a produzir uma fusão funcional YFP-RodZ_n em *B. subtilis*, de modo a avaliar simultaneamente a sua relevância funcional e o seu efeito sobre a localização subcelular de RodZ. Em paralelo, o resíduo de leucina 33 (L33) foi também substituído por alanina. Apesar de não corresponder a um aminoácido envolvido na

interacção com MreB em *T. maritima* e presumivelmente em *E. coli*, L33 é conservado (resultados não apresentados) e adjacente a Y32 (Fig.12A).

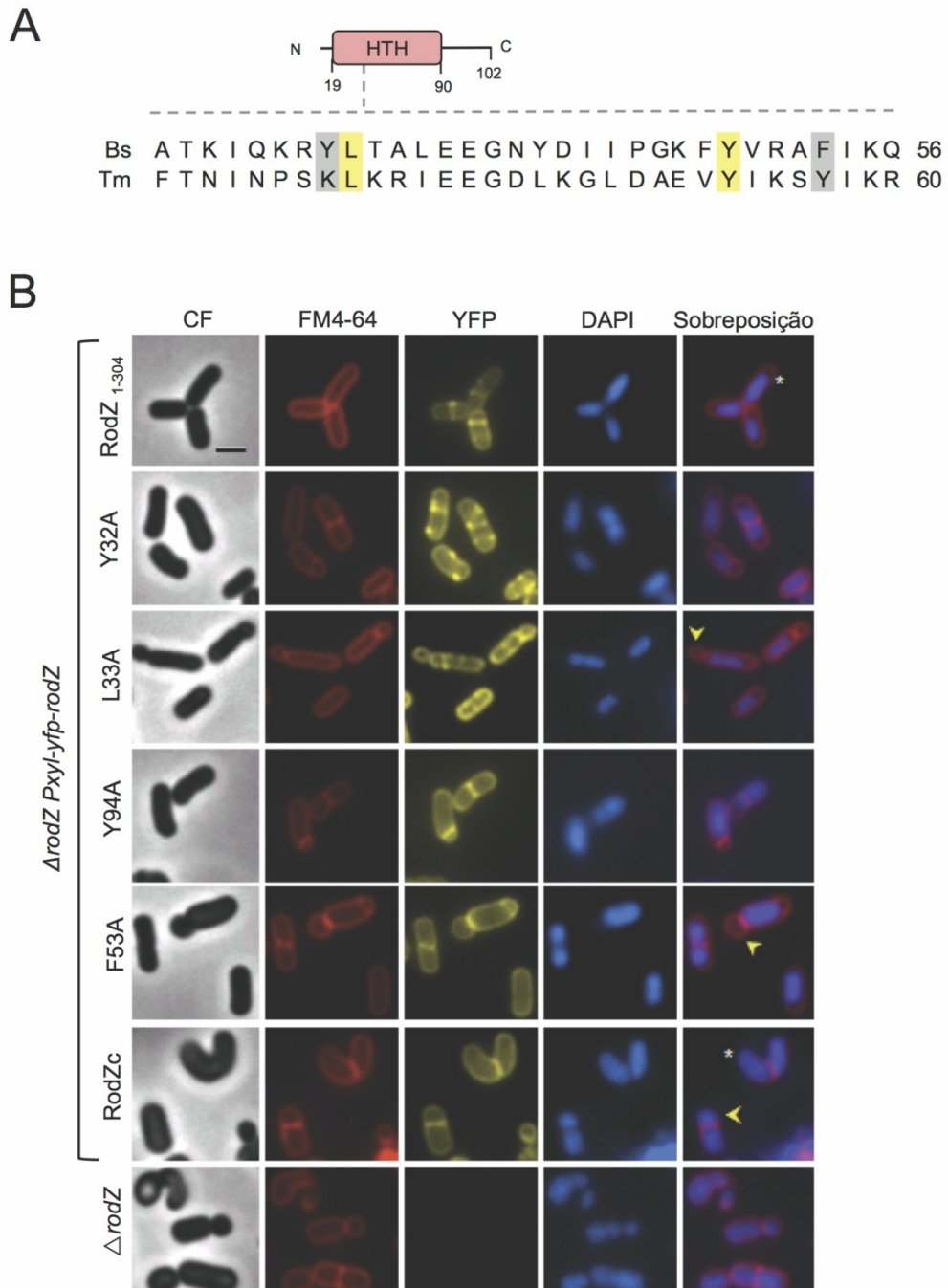


Figura 12 – Substituições simples para alanina separam as interações funcionais de RodZn. A) A sequência de RodZc de *Bacillus subtilis* (Bs) e de *Thermotoga maritima* (Tm) foram alinhadas com recurso ao programa informático ClustalW2. Os aminoácidos marcados a amarelo (Y32, Y49 e F53) são homólogos daqueles envolvidos na interacção com MreB em *T. maritima* (K36, Y53 e Y57). Outros resíduos conservados são indicados a cinzento. B) Microscopia de células de *B. subtilis* das estirpes AH4319 (YFP-RodZ₁₋₃₀₄), AH4263 ($\Delta rodZ$), estirpe AH4323 (YFP-RodZc), AH4406 (YFP-RodZ^{Y32A}), AH4407 (YFP-RodZ^{L33A}), AH4408 (YFP-RodZ^{Y94A}), e AH4409 (YFP-RodZ^{F53A}). As culturas cresceram na presença de IPTG e de 0,5% Xilose, que assegura a sua viabilidade e a produção das formas mutantes de RodZ, respectivamente (ver Tabela 1). As células das estirpes

controle AH4263 e AH4323 que apresentam morfologia anormal encontram-se assinaladas com uma seta vermelha. As imagens de microscopia apresentadas correspondem a contraste de fase (CF), marcação com FM4-64 (membranas), YFP associada a RodZ, marcação com DAPI (cromossoma), e a sobreposição das imagens de FM4-64 e DAPI. A barra representa 1 μm .

Os diferentes mutantes de *B. subtilis* foram observados por microscopia de fluorescência (Fig. 12B) e os diferentes fenótipos quantificados (Tabela 4). Como controle foi utilizado um mutante de eliminação do gene *rodZ* (AH4263, Tabela 1), uma que produz uma fusão funcional YFP-RodZ₁₋₃₀₄ (AH4319, Tabela 1), e uma estirpe que produz uma versão truncada de RodZ, YFP-RodZc, da qual foi eliminado o domínio citoplasmático (RodZn; Tabela 1). Estas três estirpes foram anteriormente contruídas no Laboratório (22). As células produtoras de YFP-RodZ₁₋₃₀₄, apresentam uma morfologia em forma de bastonete idêntica às células da estirpe selvagem de *B. subtilis* MB24 e a proteína apresenta o padrão em bandas, como esperado (Fig. 4 e 12B; Tabela 3). O cromossoma, marcado com DAPI, encontra-se posicionado entre os quartos do eixo longitudinal na totalidade das células observadas, e a coloração das membranas com FM4-64 permite constatar que a maioria divide normalmente a meio da célula (85%; Tabela 3). Pelo contrário, em células mutantes que não produzem RodZ ($\Delta rodZ$), aumenta a frequência de divisão assimétrica (55%) e o nucleóide encontra-se estendido até às regiões polares (em 96,4% das células observadas; Fig 12B, Tabela 3). A divisão assimétrica resulta na formação de células polares de dimensões menores que na sua maioria contêm DNA (31%; Fig. 12B, Tabela 3). As células do mutante de eliminação para *rodZ* são em geral mais curtas e largas que as células da estirpe selvagem (Fig. 12B, seta vermelha; Tabela 3). Este tipo de alteração morfológica é daqui em diante referido como “morfologia anormal”.

Na estirpe (AH4323) que produz a forma YFP-RodZc (da qual o domínio RodZn foi eliminado), uma percentagem significativa de células exhibe morfologia anormal (23,7%) e RodZ perde o padrão de localização em bandas, para se distribuir uniformemente ao longo da membrana celular (Fig. 12B, Tabela 3). Tal como no mutante $\Delta rodZ$ (AH4263), uma percentagem elevada de células exhibe divisão assimétrica (54%) e muitas das células polares (36%) contêm DNA. Esta percentagem está de acordo com o número de células em que o nucleóide se encontra

estendido (100%; Tabela 3). As observações efectuadas para estas três estirpes controlo estão em concordância com observações anteriores (22).

Tal como na estirpe AH4319 (YFP-RodZ₁₋₃₀₄), nas estirpes mutantes AH4406 (YFP-RodZ^{Y32A}), AH4407 (YFP-RodZ^{L33A}), AH4408 (YFP-RodZ^{Y49A}) e AH4409 (YFP-RodZ^{F53A}) não se detectaram alterações significativas na morfologia celular (Fig. 12B, Tabela 3). A mutação Y32A, não alterou o padrão normal de localização em bandas de RodZ mas causou um fenótipo de divisão assimétrica (36%). De modo semelhante, a mutação L33A não provocou alterações na localização de RodZ mas causou também um fenótipo de divisão assimétrica (55%). Interessantemente, em ambos os mutantes a quase totalidade das células polares não contém DNA (Y32A, 31%; L33A, 52%), relativamente ao mutante $\Delta rodZ$ (24%; Fig.12, Tabela 3). Em linha com a ausência de DNA nas células polares, o nucleóide não se encontra estendido nos mutantes Y32A e L33A. Já as mutações Y49A e F53A resultaram na deslocalização de RodZ, que aparece distribuído uniformemente por toda a superfície da membrana celular. Estas mutações causaram ainda fenótipo de divisão assimétrica (Y49A, 58%; F53A, 56%) sendo que a maioria das células polares não contém DNA (Y49A, 42%; F53A, 46%; Fig.12, Tabela 3). Também em linha com a ausência de DNA nas células polares, o nucleóide não se encontra estendido nos mutantes Y49A e F53A (Fig.12, Tabela 3). Estes resultados permitem várias relações. Em primeiro lugar, os resíduos Y32, L33, Y49 e F53 de RodZ são funcionalmente importantes: a sua substituição para alanina reproduz largamente o fenótipo dos mutantes de eliminação do domínio citoplasmático. A eliminação do gene *rodZ* ou da região codificante para o domínio citoplasmático resulta na extensão do nucleóide, numa frequência elevada de divisão assimétrica, e no caso da eliminação de RodZ, na perda de localização da proteína. As substituições Y32A e L33A localizam-se na suposta hélice de reconhecimento do DNA ($\alpha 3$) e não afectam a localização sub-celular de RodZ. Pelo contrário, as mutações na hélice $\alpha 4$, afectam a localização sub-celular de RodZ. A segunda relação portanto, é de que a hélice $\alpha 4$, mas não a hélice $\alpha 3$, contem determinantes importantes para a localização sub-celular de RodZ. A terceira conclusão é que ambas as hélices possuem determinantes importantes para assegurar o padrão normal de divisão celular. Finalmente, concluímos que a divisão

assimétrica não é uma consequência da extensão do nucleóide até às regiões polares da célula.

Tabela 3 - Quantificação dos fenótipos observados para estirpes com diferentes mutações em RodZn.

Estirpes*	Morfologia anormal**	% Células				
		Sem localização de RodZ	Com cromossoma entre ¼ e ¾	Divisão celular		
				A meio da célula	Polar (com DNA)	Polar (sem DNA)
AH4263(<i>ΔrodZ</i>) n= 246	30,0	0,0	3,6	45	31	24
AH4319 (RodZ ¹⁻³⁰⁴) n= 251	0,6	7,6	96,8	85	7	8
AH4323 (RodZc) n= 200	23,7	100,0	0,0	46	36	18
AH4406 (RodZ ^{Y32A}) n= 244	3,7	4,5	96,9	64	5	31
AH4407 (RodZ ^{L33A}) n= 252	9,8	14,6	98,2	45	3	52
AH4408 (RodZ ^{Y49A}) n= 232	5,0	100,0	96,9	42	16	42
AH4409 (RodZ ^{F53A}) n= 228	7,4	100,0	88,9	44	10	46

* n = número de células observadas

** Morfologia anormal – células mais curtas e largas que as células da estirpe selvagem

3.7. Mutações pontuais em resíduos conservados do domínio C afectam a forma celular

De seguida, quisemos avaliar a importância funcional dos resíduos G265 e N275 localizados no domínio C de RodZc. A importância funcional destes resíduos é sugerida pela sua localização no modelo estrutural de RodZc (Fig. 11) e pelo facto de num alinhamento da sequência de aminoácidos do domínio extra-citoplasmático de espécies seleccionadas de *Bacillus*, apenas estes serem estritamente conservados, o resíduo de glicina na posição 265 (G265) e o resíduo de asparagina na posição 275 (N275), de acordo com a numeração da proteína RodZ de *B. subtilis* (Fig. 13A). Interessantemente, ambos os resíduos parecem ser importantes de um ponto de vista estrutural de acordo com o modelo para RodZc (Fig. 11). Se estes resíduos desempenham um papel estrutural importante, como sugerido pela sua conservação e posição no modelo, então também deveriam ser importantes funcionalmente. Para testar esta previsão, os dois resíduos foram individualmente substituídos por alaninas, numa construção codificante para uma fusão YFP-RodZ sob o comando do promotor P_{xyIA}, indutível pela xilose. As construções desenhadas para produzir a

proteína wt ou as formas YFP-RodZ^{G265A} e YFP-RodZ^{N275A} foram transferidas para *B. subtilis* e as estirpes obtidas foram analisadas por microscopia de fluorescência. Em paralelo, foi também introduzida em *B. subtilis* uma construção para a produção de uma forma de RodZ sem o domínio extra-citoplasmático (YFP-RodZn; i.e., apenas o domínio RodZn seguido do segmento TM é produzido). A forma wt de YFP-RodZ exibe o padrão helicoidal esperado em células que na sua maioria mantêm a forma normal em bastonete (apenas 0,7% das células apresentam forma alterada; Fig. 13B). Verificamos que na ausência do domínio extra-celular, 82,5% da forma das células é grosseiramente alterada sendo que a maior parte da população celular consiste de esferóides de diâmetro muito aumentado (Fig. 13B). Nestas células, YFP-RodZn não exibe um padrão em bandas de localização, em vez disso acumulando uniformemente na membrana da célula (Fig. 13B). Estas observações estão de acordo com estudos prévios realizados no laboratório (22). Nas estirpes AH4370 (YFP-RodZ^{G265A}) e AH4388 (YFP-RodZ^{N275A}) foram observadas 9,9% e 25,8%, respectivamente, de células com morfologia alterada, curtas e de diâmetro aumentado (Fig. 13B). A alteração morfológica é numericamente mais importante para o mutante N275A, onde também se observam formas esferóides que se aproximam das observadas para a estirpe YFP-RodZn. É interessante notar que a fracção de células dos dois mutantes que ainda mantêm a forma de bastonete, difere quanto à localização de RodZ. Nestas células, o padrão helicoidal da proteína não se discerne para o mutante G265A, ao passo que nas células em bastonete do mutante N275A esse padrão é observado (Fig. 13B). Os resultados sugerem que ambas as mutações são *leaky*: a mutação N275A é globalmente mais drástica, mas nas células onde a proteína mantém funcionalidade, esta parece mais próxima da selvagem. Ao contrário dos mutantes no domínio RodZn, nenhum dos três mutantes analisados no domínio RodZc (G26A, N275A, e o mutante de eliminação da totalidade deste domínio) causaram divisão assimétrica. Estes resultados evidenciam a importância e a especificidade do domínio RodZc na manutenção da morfologia celular, assim como dos aminoácidos G265A e N275A. Estes resultados emprestam ainda credibilidade ao modelo estrutural para RodZc.

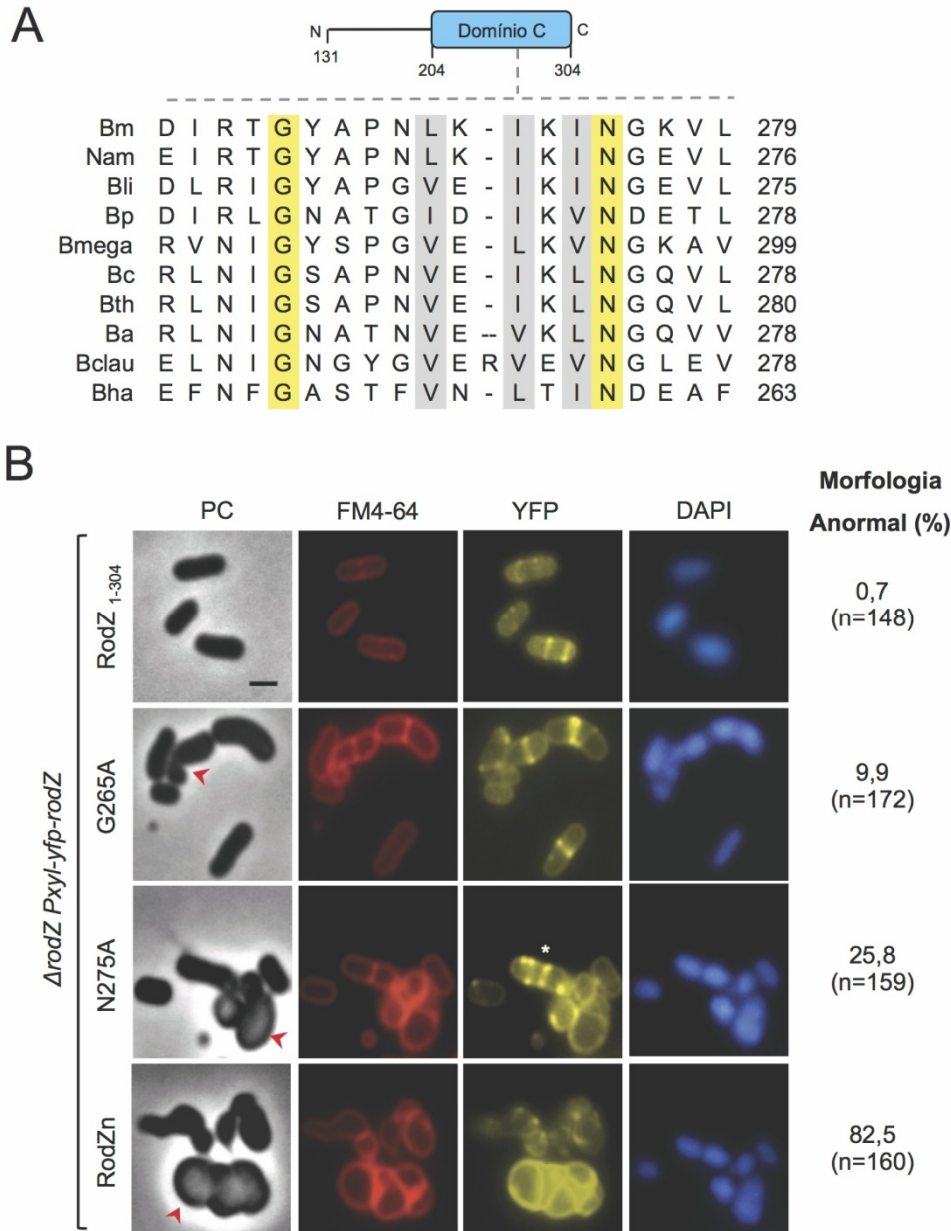


Figura 13 – Substituições simples para alanina de resíduos conservados em RodZc afetam a morfologia celular. A) Alinhamento (pelo programa informático ClustalW2) da região extracitoplasmática de RodZ em diversas espécies de *Bacillus*: *B. subtilis* 168 (Bs), *B. amyloliquefaciens* DSM7 (Nam), *B. licheniformis* 14580 (Bli), *B. pumilus* 7061 (Bp), *B. megaterium* 319 (Bmega), *B. cereus* AH1134 (Bc), *B. thurigiensis* IBL 200 (Bth), *B. anthracis* CI (Ba), *B. clausii* KSM-K16 (Bclau), e *B. halodurans* C-125 (Bha). A amarelo estão indicados os aminoácidos idênticos e a cinzento os conservados. B) Microscopia das células de *B. subtilis* produzidas pelas estirpes AH4319 (YFP-RodZ₁₋₃₀₄), AH4322 (YFP-RodZn; sem o domínio extracitoplasmático), AH4370 (YFP-RodZ^{G265A}), e a AH4388 (YFP-RodZ^{N275A}). As respectivas proteínas de fusão foram produzidas em células mutantes para *rodZ* sob o comando do promotor P_{xyIA}, indutível pela xilose. As culturas cresceram na presença de IPTG e 0,5% Xilose, que assegura a sua viabilidade e a produção das proteínas de fusão, respectivamente. As células que apresentam morfologia anormal (células mais curtas e largas que as células da estirpe selvagem) encontram-se assinaladas com uma seta vermelha. As imagens de microscopia apresentadas correspondem a contraste de fase (CF), marcação com FM4-64 (membranas), YFP associada a RodZ, e da marcação com DAPI (cromossoma). A barra representa

1 μm . Do lado direito das imagens de microscopia, encontram-se indicadas as percentagens de células com morfologia anormal, e o número total de células observadas (n).

3.8. RodZ interage consigo própria num contexto membranar

Na sua totalidade, os resultados aqui descritos sugerem um modelo estrutural e funcional para os domínios de RodZ em *B. subtilis*. Um aspecto particular a que regressamos aqui diz respeito ao estado oligomérico de RodZ. Os estudos realizados (acima descritos) mostraram que RodZn e RodZc são monoméricos em solução e essa informação é importante para a interpretação de alguns resultados bioquímicos e biofísicos. Contudo, *in vivo* YFP-RodZ forma estruturas em bandas. Estas estruturas podem dever-se à interacção de RodZ com uma proteína do citosqueleto, presumivelmente MreB, mas tal não exclui que RodZ possa oligomerizar na célula, quando inserida na membrana. Para testar esta possibilidade utilizámos um sistema de dois híbridos com base na *Split Ubiquitin* que permite detectar interacções na membrana em células de *Sacharomyces cerevisiae* (83). A ubiquitina (Ub) é uma proteína conservada, que em células eucariotas é utilizada para marcar proteínas destinadas a degradação proteolítica. A degradação é da responsabilidade de proteases específicas dependentes de Ub. A Ub consiste em dois domínios, o N-terminal (Nub) e o C-terminal (Cub), que quando separados e co-expressos interagem fortemente (83). No entanto, a substituição da isoleucina na posição 3 para glicina (I3G) no domínio Nub (NubG), impede a interacção entre os dois domínios (83). Estas propriedades permitem determinar a interacção entre proteínas de interesse fundidas ao N-terminal de NubG e Cub. A detecção de interacção ocorre quando se dá a libertação do factor de transcrição LexA-VP16, clivado pelas proteases específicas de Ub, o que permite a transcrição do gene reporter *lacZ*, codificante para a enzima β -galactosidase. Na presença de um substrato cromogénico como o X-Gal, a ocorrência de uma interacção entre as proteínas em estudo pode ser detectada (83).

Neste estudo utilizaram-se células de levedura produtoras das proteínas recombinantes RodZ-Cub e Alg5-Nub (controlo positivo, C+), RodZ-Cub e Alg5-NubG (controlo negativo, C-) e RodZ-Cub e RodZ-NubG (par de proteínas sob teste – I). As células co-transformadas com os dois plasmídeos (para a produção das duas

proteínas sob teste), originaram sempre uma mistura de colónias brancas e azuis na presença de X-Gal (resultados não apresentados). No entanto, para as colónias azuis, esta tonalidade foi sempre mais forte para as estirpes expressando o par RodZ-Cub e NubG-RodZ (Fig. 14A). Em ensaios realizados após crescimento em meio líquido, as proteínas teste apresentaram níveis de produção de β -galactosidase ($19,3 \pm 1,1$ Unidades Miller) superiores ao controlo positivo ($13,5 \pm 0,3$ Unidades Miller; Fig. 14B). Estes resultados apoiam fortemente a ideia de que existe uma interacção entre moléculas de RodZ quando esta se encontra inserida na membrana.

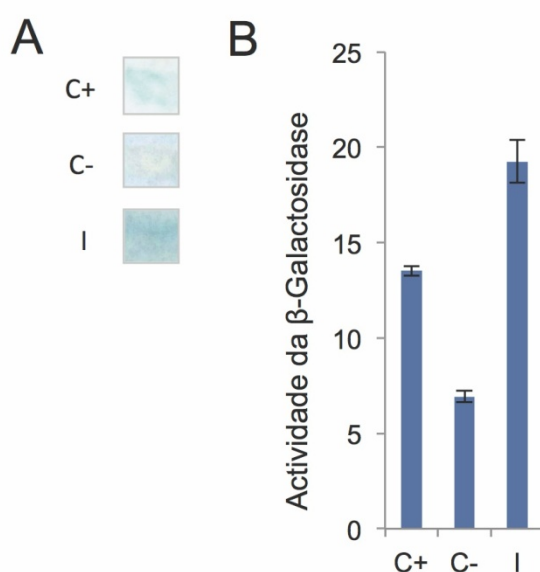


Figura 14 – RodZ interage consigo própria *in vivo*. A interacção entre moléculas de RodZ foi testada através da capacidade das proteínas recombinantes NubG-RodZ e Cub-RodZ interagirem em células de levedura usando o DUALmembrane kit 2 (DualSystems Biotech; ver a secção de Material e Métodos). A) Ensaio em meio sólido para detecção da actividade da β -galactosidase por hidrólise do substrato cromogénico X-Gal. Estão indicadas colónias representativas para cada estirpe. B) Quantificação da actividade da enzima β -galactosidase em ensaios em meio líquido, com substrato ONPG. C-: estirpe de controlo negativo AH4392 (RodZ-Cub e Alg5-NubG); C+: estirpe de controlo positivo AH4389 (Cub-RodZ e Alg5-Nub); I: estirpe com as proteínas testadas AH4395 (RodZ-Cub e RodZ-NubG). A actividade enzimática é representada em Unidades de Miller.

4. Discussão e Conclusão

A função de RodZ tem sido investigada com algum pormenor em bactérias Gram-negativas. Em *E. coli* e em *C. crescentus*, *rodZ* é um gene essencial, e a sua função central para a morfogénese celular (2, 8, 82). A super-expressão ou a eliminação de *rodZ* em *B. subtilis* produz alterações na forma celular, pelo que tem sido aceite que a função deste gene seja conservada em organismos alongados Gram-positivos (2). Contudo, não foi ainda publicada uma análise pormenorizada da função deste gene em *B. subtilis*.

Resultados ainda não publicados deste Laboratório confirmam que *rodZ* é um componente importante do sistema morfogenético neste organismo. Um mutante de eliminação do gene *rodZ* é viável, mas em meio mínimo as células apresentam alterações morfológicas importantes (22). O nucleóide também sofre alterações, apresentando-se alongado, com a região *oriC* do cromossoma deslocada da posição normal (a $\frac{1}{4}$ e $\frac{3}{4}$ do comprimento da célula) para uma localização mais perto dos pólos. Verifica-se ainda uma reversão completa do padrão de divisão celular. Enquanto que numa estirpe selvagem a maioria das células divide a meio para produzir células irmãs de dimensão idêntica, um mutante *rodZ* divide assimetricamente, e preferencialmente perto do pólo velho da célula (i.e. o pólo oposto ao originado em consequência da última divisão celular; (22)). O mutante *rodZ* difere de outros mutantes que formam células polares (por exemplo mutantes *minCD*), em dois aspectos importantes: não só a frequência de divisão polar é muito mais elevada como grande parte das mini-células formadas contêm DNA (22).

RodZ exhibe um padrão de localização em bandas ao longo do eixo longitudinal da célula (22). Este padrão é dependente do homólogo da actina MreB, mas não dos seus parálogos Mbl e MreBH (22). Como é uma proteína abundante, sugere que sob a condução de MreB, possa formar estruturas poliméricas na célula. A porção citoplasmática de RodZ, imobilizada numa coluna, retém MreB presente em extractos proteicos solúveis, mas não foi ainda possível demonstrar uma interacção directa entre as duas proteínas (22). Claramente, RodZ parece ligar vários aspectos essenciais da fisiologia celular, nomeadamente a forma da célula, a estrutura, a

segregação do nucleóide, e a divisão celular. Contudo, a forma como RodZ controla estas funções não é ainda compreendida.

Como referido anteriormente, RodZ possui uma região citoplasmática (RodZn), e uma região extra-citoplasmática (RodZc) separadas por um segmento TM único (2, 8, 22). Neste trabalho, explorámos em primeiro lugar a estrutura das regiões citoplasmática e extra-citoplasmática de RodZ de forma a adquirirmos pistas sobre a forma como a proteína funciona na célula.

A primeira questão que abordámos prende-se com o estado oligomérico da proteína. Esta é questão importante porque ao mesmo tempo que MreB recruta RodZ para o citosqueleto, o número de moléculas de RodZ na célula, cerca de 40,000, excede em muito o número de macromoléculas determinado para MreB (45, 75). Resultados preliminares do Laboratório tinham indicado um comportamento anómalo para as regiões RodZn e RodZc em SEC (75). As formas utilizadas, RodZ₁₋₁₀₄-His₆ e His₆-RodZ₁₃₁₋₃₀₄ (75), deixaram em aberto a questão de saber se haveria uma região particular dos domínios que seria responsável pelo comportamento anómalo, e que talvez com a remoção dessa região os resultados fossem mais claros.

Os resultados aqui descritos das duas novas formas da proteína, RodZ₁₋₉₃-His₆ e His₆-RodZ₂₀₁₋₃₀₄, que foram analisadas por SEC e por *Diffusion-Ordered* NMR, indicam que ambas as regiões da proteína, RodZn e RodZc, são em solução moléculas monoméricas e alongadas, *i.e.*, com um raio hidrodinâmico superior ao esperado com base na massa calculada (26, 46, 50, 86, 88). Em particular, o facto de ambos os domínios terem sido analisados para uma gama de concentrações que variou por um factor de 100x, parece excluir a possibilidade de um equilíbrio monómero-multímero (99). As novas formas de RodZn e de RodZc utilizadas contêm apenas o domínio HTH, ou o domínio C, respectivamente, o que indica que estas regiões devem manter o carácter alongado.

A estratégia de eliminar a região *coiled-coil* (resíduos 133 a 203) de RodZc foi delineada com base nos estudos efectuados com MreC, de *Streptococcus pneumonia* (60). O domínio extra-celular de MreC possui uma região *coiled-coil* seguida de um domínio C-terminal. Ao contrário de RodZc, a região extra-citoplasmática de MreC dimeriza em solução, de uma forma que depende da presença da região *coiled-coil* (60).

Ao mesmo tempo, estudos *in vivo* num sistema de dois híbridos na levedura, sugerem que a proteína RodZ, completa e no contexto da membrana, interage consigo própria. Assim sendo, será interessante determinar se a interacção decorre da sequência específica do domínio TM, ou se pelo contrário a inserção na membrana impõe às regiões RodZn e RodZc uma conformação particular que facilite a interacção destas regiões. Uma maneira de abordar a questão é substituir o domínio TM por uma sequência transmembranar que se saiba não interagir no plano da membrana. Uma possibilidade seria o primeiro segmento TM da proteína MalF de *E. coli* (12). RodZ, com este domínio a substituir o segmento TM nativo será testada para uma interacção na levedura *S. cerevisiae*. Esta forma da proteína será também produzida em *B. subtilis*, para teste de complementação de um mutante *rodZ* de eliminação. Se RodZ dimerizar no plano da membrana, a interacção de uma forma solúvel da proteína, artificialmente dimérica por substituição do segmento TM por um fecho de leucinas, com MreB será revisitada.

Os resultados da análise bioquímica, biofísica e bio-informática das regiões RodZn e RodZc apoiam a conclusão de que ambos os polipeptídeos são alongados. As experiências de CD e de 1D ¹H NMR mostram que RodZn é uma proteína estruturada e maioritariamente em hélice α , ao passo que RodZc parece ser largamente não estruturado mas com algum conteúdo em folha β (ver os anexos 5 e 6).

O teste de susceptibilidade à tripsina sugeriu que His₆-RodZ₁₃₁₋₃₀₄ (75) é parcialmente estruturada (Fig. 9B), e de acordo com a análise de CD e 1D ¹H NMR, inferimos que o domínio *coiled-coil* de RodZc é importante para a estruturação da proteína. Muitas vezes, a manutenção de uma proteína em solução após desnaturação a 100°C é considerada indicativa de proteínas não-estruturadas (46, 50, 86, 88). No entanto, este comportamento também pode ser observado para proteínas que possuam um *fold* simples, podendo voltar à conformação nativa aquando o abaixamento da temperatura (26, 46). Tendo em consideração os resultados de susceptibilidade à tripsina, de CD e 1D ¹H NMR, inferimos que este será o caso de RodZc. A este propósito, a análise de CD sugere que a desnaturação His₆-RodZ₁₃₁₋₃₀₄ (forma longa de RodZc) leva à aquisição de uma nova conformação aquando o

abaixamento da temperatura (ver o anexo 6). Presumivelmente, RodZc tem uma estrutura flexível podendo adoptar diferentes conformações.

A manutenção de RodZn em solução após desnaturação está em conformidade com as propriedades do domínio HTH, que possui um *fold* relativamente simples, e pode assumir rápida e espontaneamente a sua conformação nativa (74).

O modelo molecular obtido por homologia para RodZn está de acordo com os resultados bioquímicos e biofísicos. O modelo de RodZn é uma representação altamente provável da conformação da proteína, o que reflecte o elevado grau de semelhança com outros domínios HTH (Fig.10). RodZn consiste de 5 hélices α , com o motivo HTH formado pelas hélices $\alpha 2$ e $\alpha 3$, sendo $\alpha 3$ a hélice putativamente envolvida no reconhecimento do DNA (3). A estrutura do complexo entre RodZ e MreB de *T. maritima* mostra que a região formada pela hélice $\alpha 4$ consiste no ponto de contacto principal de RodZ com MreB, com alguns contactos adicionais estabelecidos pela hélice $\alpha 3$ (90). Substituições singulares para alanina dos resíduos K36 (na segunda hélice do motivo HTH), e Y53 e Y57 (na hélice $\alpha 4$ do domínio HTH), em *T. maritima*, afectam severamente a ligação de RodZ a MreB, monomérico ou polimerizado (90). Y53 encaixa numa cavidade relativamente hidrofóbica de MreB, formada pelos resíduos L141, N149, R279, G280, F282 e I306⁴ (Fig.15). A substituição de I306 para triptofano elimina a ligação de RodZ a MreB *in vitro* (90). Os autores deste estudo mostram que a formação de um complexo com MreB exclui a ligação de RodZ ao DNA. Em *E. coli*, um organismo muito próximo de *T. maritima*, todos os resíduos em RodZ e em MreB envolvidos na interacção são conservados (8, 90). Neste organismo, RodZ interage directamente com MreB, e não existe evidência de que possa ligar ao DNA (8, 90). Aparentemente, nestes dois organismos, e presumivelmente noutras espécies filogeneticamente próximas, o motivo HTH em RodZ é utilizado para a interacção com MreB. Existem vários exemplos, bem estudados, de utilização do domínio HTH para interacções proteína-proteína (3). Em *B. subtilis*, a situação parece ser diferente.

⁴ Outros resíduos (menos importantes) em MreB de *T. maritima*, que contribuem para a superfície de ligação a RodZ são S139, N140, N142, I277, E278, D294, G302, S304, V305, E309.

A localização sub-celular de RodZ depende de MreB, e as duas proteínas podem formar um complexo, apesar de ainda não ter sido possível demonstrar uma interação directa entre as duas proteínas (22). No entanto, na ausência de RodZ, o nucleóide assume uma conformação estendida, chegando aos pólos da célula (Fig. 4). Esta observação sugere que RodZ liga o DNA à membrana, e que é a quebra dessa ligação que permite a extensão do nucleóide.

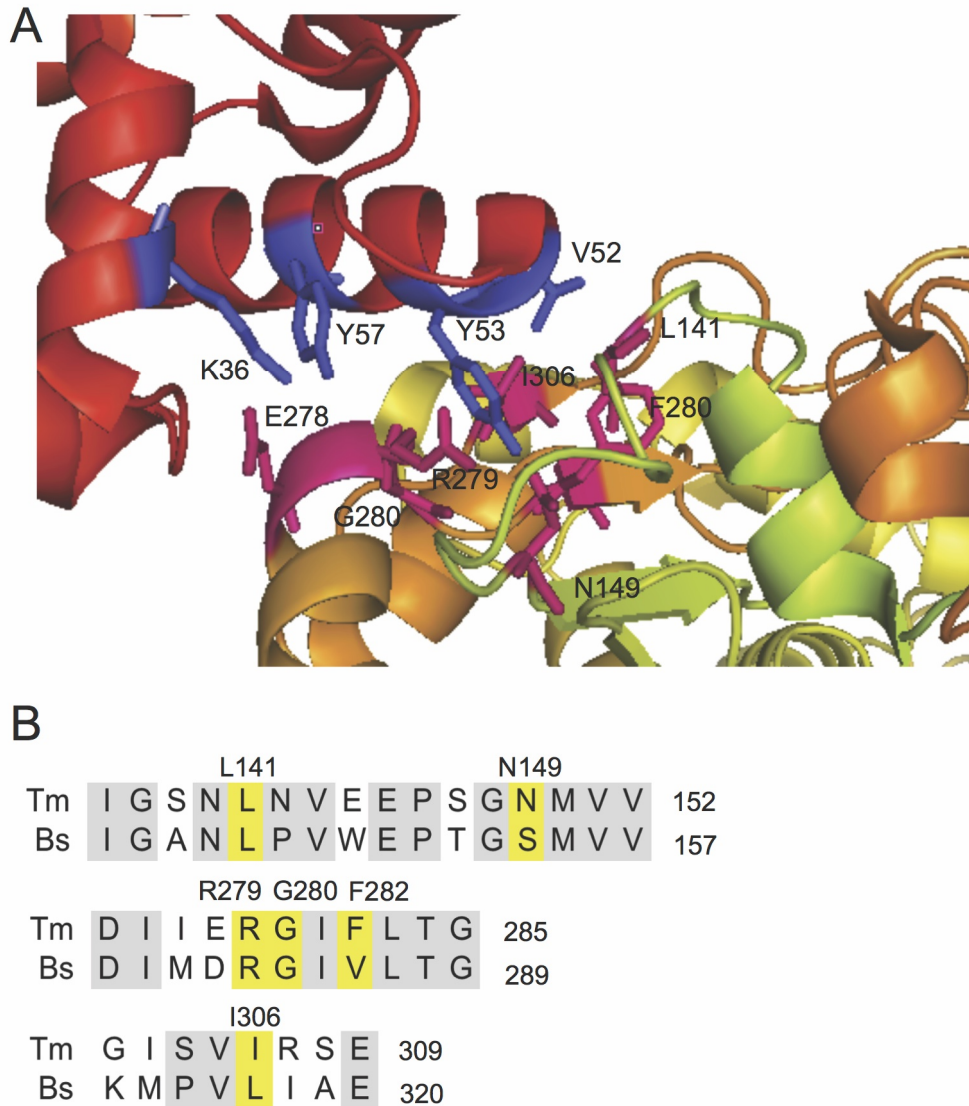


Figura 15 – Análise da interação de RodZ com MreB. A) Estrutura do complexo entre RodZ (no topo, a vermelho) e MreB de *T. maritima*, na região de interface entre as duas proteínas (89). Os resíduos envolvidos na interação são indicados e as suas cadeias laterais (a azul para RodZ e a rosa para MreB) representadas no modo *stick*. O tratamento da imagem foi realizada com recurso ao *software* Pymol (www.pymol.com) com base nas coordenadas da estrutura de cristal do complexo (código pdb: 2WUS). B) Alinhamento entre as sequências das proteínas MreB de *B. subtilis* (Bs) e de *T. maritima* (Tm) na região que contém os resíduos envolvidos na interação entre RodZ e MreB, (tal como representado em A). Os resíduos estão destacados a amarelo e identificados. Outros resíduos idênticos entre as duas proteínas são assinalados contra um fundo cinzento. O alinhamento entre as sequências completas, das duas proteínas foi gerado com o programa ClustalW (www.ebi.ac.uk).

A substituição para alanina dos resíduos Y32, Y49 e F53 (que ocupam posições homólogas a K36/R43, Y53/F60 e Y57/F53 nas proteínas de *T. maritima* e *E. coli*, respectivamente) bem como o resíduo L33, produziu mutantes que, tal como o mutante *rodZ* de eliminação, dividem assimetricamente mas que, ao contrário do mutante, produzem mini-células anucleadas. Inesperadamente, as substituições L33A e Y32A não causam a deslocalização de YFP-RodZ, enquanto que nos mutantes Y49A e F53A a deslocalização é total (Fig. 13B).

Um modelo possível é que de alguma forma, RodZ forme um complexo ternário com MreB e o DNA. As mutações na hélice $\alpha 4$ (Y49A e F53A; Fig.13), que eliminam a localização em bandas de YFP-RodZ, devem afectar mais especificamente um contacto com MreB (Fig. 15). Pelo contrário, todas as mutações parecem afectar a capacidade do complexo putativo RodZ-MreB-DNA de manter o padrão normal de divisão a meio da célula. Um precedente para a formação de um complexo ternário entre uma proteína contendo um domínio HTH, um componente do citosqueleto e o DNA, é o de TubR (63). TubR é uma proteína codificada por uma plasmídeo de *B. thuringiensis* que também especifica uma NTPase aparentada com FtsZ. TubR forma um complexo ternário com TubZ e com um local centromérico no DNA plasmídico, que promove a sua segregação (63). TubR é um dímero cuja formação envolve as hélice de reconhecimento, tornando a interacção HTH-DNA canónica impossível. De facto, o domínio HTH de TubR é do tipo *winged*, e as interacções com o DNA envolvem aminoácidos nas “asas”, bem como na região N-terminal das hélices de reconhecimento (63).

A ligação entre o DNA, RodZ e MreB, assim como a divisão celular, é ainda pouca clara. Como um mutante de eliminação *mreB* não parece dividir assimetricamente, é possível que RodZ seja um inibidor da polimerização de FtsZ, um papel que RodZ partilharia com MinCD no pólo novo, e que assumiria sozinho no pólo velho (22). Contrariamente ao mutante $\Delta rodZ$ onde a ligação do DNA à membrana se perde, levando à extensão do nucleóide, é possível que nenhuma das substituições para alanina elimine completamente a capacidade de RodZ ligar ao DNA. Ainda que afectada, a ligação de RodZ ao DNA evitaria a extensão do nucleóide, explicando a ausência de DNA nas mini-células. Em qualquer caso, os resultados mostram que a divisão assimétrica não depende da extensão do nucleóide

até aos pólos da célula. Esta inferência, por sua vez, elimina um modelo no qual a extensão do nucleóide colocaria uma região do cromossoma com baixa incidência de locais de ligação para Noc perto dos quartos da célula, permitindo a formação do anel Z. Esta possibilidade foi sugerida anteriormente para explicar a formação do septo assimétrico que ocorre sobre o DNA, no início da esporulação (96).

Pouco após a iniciação da replicação do cromossoma, as regiões *oriC* irmãs, separam-se rapidamente e ficam localizadas nos quartos da célula (33, 54, 81, 92, 93). Os mecanismos envolvidos na localização de *oriC* não são conhecidos, mas a rapidez do movimento das duas cópias de *oriC* para lados opostos da célula sugere que deve haver um mecanismo activo de segregação (33, 54, 57, 81, 87, 92, 93). Contudo, sabe-se que este posicionamento não depende de qual região do cromossoma é replicada primeiro, e que a sequência de *oriC*, inserida em diferente locais do cromossoma, não é necessária para o posicionamento de uma região particular nos quartos da célula (9). Estas observações sugerem que existam locais no cromossoma, ainda não identificados, que estão envolvidos no movimento da região *oriC* para os quartos da célula, e na sua manutenção nessa localização (9). É possível que RodZ ligue ao longo do cromossoma e esteja envolvido neste processo.

Com a excepção de L33A, que pode afectar o núcleo hidrofóbico da proteína, as mutações que testámos nas hélices $\alpha 3$ e $\alpha 4$ são em resíduos hidrofóbicos que parecem partilhar a mesma orientação, possivelmente de forma a interagirem com a bolsa hidrofóbica em MreB (Fig. 15). Se isto for verdade, então deverá ser possível isolar mutantes nesta região de MreB que afectem especificamente a interacção com RodZ. A ideia de que as mutações em $\alpha 4$ afectam mais especificamente a interacção com MreB pode ser testada em ensaios de *pull-down*; espera-se que as formas Y32A e L33A de RodZn, mas não as formas Y49A ou F53A, ainda formem um complexo com MreB. A figura 16 mostra que existem outros resíduos em $\alpha 3$ e $\alpha 4$ cujas cadeias laterais estão expostas ao solvente. De realçar os resíduos K30, R31, E37 e E38, em extremidades opostas da hélice “de reconhecimento” $\alpha 3$. A cadeia lateral destes resíduos, ao contrário de Y32, está orientada na direcção oposta à da região que supostamente interage com MreB. É possível que estes resíduos estejam mais especificamente envolvidos na ligação ao DNA. Em trabalho futuro estes novos resíduos serão substituídos por alanina, e os mutantes caracterizados em pormenor.

Em trabalho anterior, como referido anteriormente, não foi possível demonstrar uma interacção directa entre RodZ e MreB (22). De futuro, será testada a interacção de RodZ selvagem e das formas mutantes que aqui descrevemos, com MreB na presença de DNA. Se RodZ dimerizar quando inserida na membrana, então estes estudos podem envolver a forma solúvel, artificialmente dimérica de RodZ obtida por meio de um fecho de leucinas (ver acima). Ao contrário de TubR, RodZ não contém um domínio HTH *winged* (ver acima). Se RodZ formar um complexo ternário com MreB e o DNA, prevemos que o modo de ligação ao DNA seja novo, ou pelo menos diferente daquele reportado para o complexo TubR-TubZ-DNA (63).

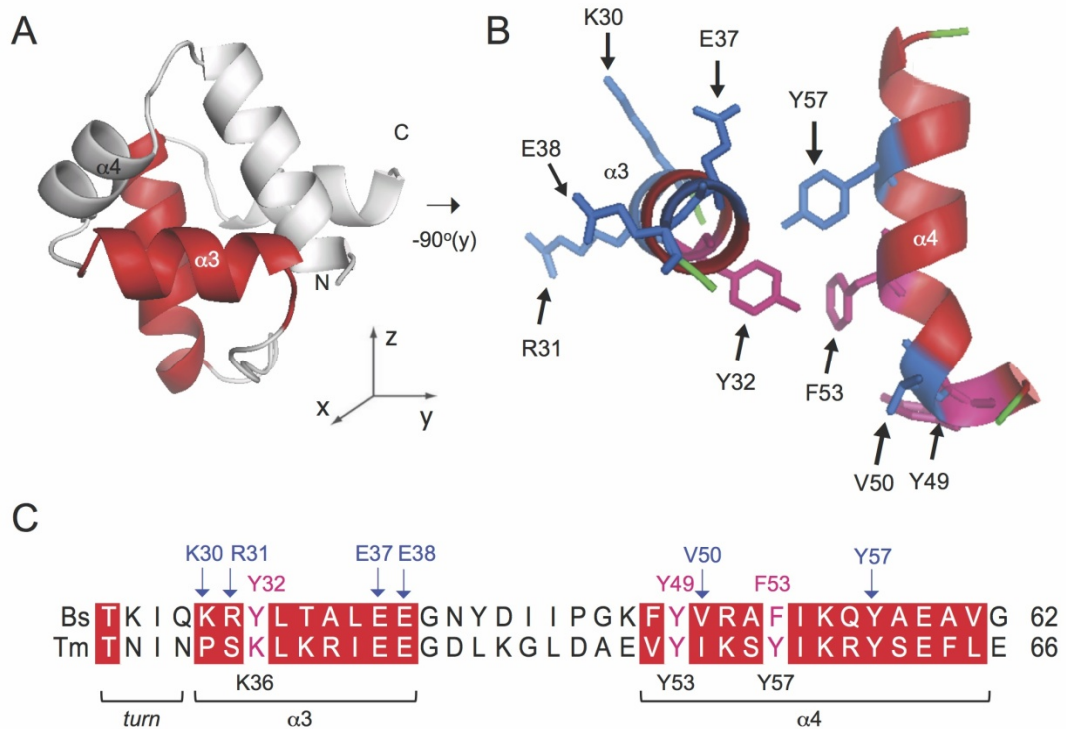


Figura 16 – Mutagénese de *scanning* para alanina do domínio HTH de RodZn. A) Modelo estrutural obtido para RodZn (ver Fig. 10) com as hélices $\alpha3$ e $\alpha4$ destacadas a vermelho, e as restantes hélices a branco. B) O painel representa uma rotação de 90° no eixo dos y , do modelo representado em A, de modo a visualizar melhor a $\alpha3$ e $\alpha4$. Com a excepção de L33, os demais aminoácidos substituídos por alanina no decurso deste trabalho (Y32, Y49 e F53) estão representados a rosa. Os resíduos a substituir por alanina em trabalho futuro são indicados a azul. O tratamento das figuras em A e B foram realizadas com o *software* Pymol (www.pymol.com). C) Alinhamento entre as sequências de RodZ de *T. maritima* (Tm) e de *B. subtilis* (Bs) para a região representada em B. Os aminoácidos conservados entre as duas proteínas são representados. O código de cores é o mesmo utilizado para os painéis A e B. O alinhamento foi obtido com recurso ao programa ClustalW (www.ebi.ac.uk).

O modelo molecular para RodZc é mais questionável, de acordo com a ideia de que a região C constitui um domínio novo (2). De qualquer modo, e de acordo com os estudos bioquímicos e biofísicos, todas as proteínas que revelaram homologia estrutural com RodZc apresentam uma organização de tipo *Immunoglobulin-like β sandwich* (21). O maior grau de semelhança estrutural foi obtido para o primeiro domínio de ligação a Ca^{2+} da proteína NCX1 da membrana plasmática dos miócitos cardíacos, que mantém a homeostase do Ca^{2+} e é essencial para a contractilidade do músculo cardíaco (39). O transporte de Ca^{2+} é regulado por este metal, através de dois domínios regulatórios, CBD1 e CBD2 (39). Ambos os domínios são citoplasmáticos, ligando duas hélices transmembranares (39). E ambos apresentam homologia estrutural com RodZc, mais robusta para CBD1, que é o principal domínio sensor de Ca^{2+} . Na ausência de Ca^{2+} este domínio perde estrutura (*unfold*), ao passo que a ligação de Ca^{2+} induz alterações conformacionais que induzem a extrusão do metal pela bomba de transporte (19, 65).

No contexto de RodZc, a capacidade deste domínio apresentar diferentes estados conformacionais, dependendo da presença de Ca^{2+} , parece interessante, já que a análise de CD mostrou que após desnaturação o domínio assume uma conformação estável mas diferente da inicial. Neste momento, não se sabe se RodZc liga Ca^{2+} ou qualquer outro metal, mas esta possibilidade será testada de futuro.

O *fold* apresentado pelas proteínas que revelaram alguma homologia estrutural com RodZc (*Immunoglobulin-like β sandwich*) é muitas vezes utilizado para interações proteína-proteína (21). Um exemplo é o da invasina de *Y. pseudotuberculosis* que promove a entrada da bactéria em células animais em cultura, mediante ligação às cadeias $\beta 1$ de cinco integrinas (76). A estrutura de cristal da região extra-citoplasmática da invasina revela uma molécula alongada, com afinidade estrutural com regiões da fibronectina (o ligando natural; 37, 76). As superfícies de ligação à integrina da invasina e da fibronectina incluem resíduos críticos localizados em posições equivalentes das duas moléculas, mas num contexto estrutural diferente (37).

É possível que RodZc utilize a região extra-citoplasmática para ligação a um componente polimérico do envelope celular. O motivo em gancho exibido no modelo (Fig.11) sugere um mecanismo de ligação semelhante ao “abraço do colagénio”,

ilustrado pela proteína de ligação ao colagénio CNA de *Staphylococcus aureus* (100). CNA possui dois sub-domínios (N1 e N2) com *fold* de tipo IgG, separados por um linker (100). Esta estrutura é estabilizada por interações hidrofóbicas inter-domínios, e pela extensão C-terminal do sub-domínio N2, que complementa uma folha β no sub-domínio N1 (100). Peptídeos com estrutura em hélice tripla são envolvidos num túnel esférico formado pelos sub-domínios N1 e N2 e o linker (100). Foi proposto que este arranjo estrutural seria otimizado para ligação a um ligando em forma de cabo estendido (100).

Em qualquer caso, a conservação dos resíduos G265 e N275 entre ortólogos de RodZc, a posição destes resíduos no modelo e o efeito fenotípico das substituições G265A e N275, sugerem um papel estrutural importante (Fig.11 e 13). Se a extremidade carboxílica de RodZc contacta a região do resíduo N275, talvez então a substituição simultânea destes resíduos para cisteína permite o cross-linking da molécula nesta região.

Não sabemos ainda se RodZc liga a peptidoglicano ou a ácidos teicóicos presentes na parede celular, mas estas experiências, envolvendo o domínio selvagem e as formas N265A e N275A, constituem desígnios futuros. Esta possibilidade é atractiva porque RodZc é particularmente importante para a manutenção da forma da célula, presumindo-se que de alguma forma interaja física e funcionalmente com componentes envolvidos na síntese da parede celular (2, 22, 82).

A determinação experimental da estrutura de RodZn e de RodZc deverá ser uma ajuda preciosa para novas experiências de mutagénese dirigida. Ao tempo a que se concluiu a escrita desta Dissertação, a estrutura de RodZn foi já determinada em solução, por NMR (69). A sua análise ultrapassa o âmbito desta Dissertação, mas abre uma avenida de investigação importante. Tal como esperávamos, a estrutura é muito semelhante ao modelo representado na Figura 10, mas a posição das cadeias laterais de certos resíduos críticos não é totalmente coincidente (69). A obtenção da estrutura foi possível porque conseguimos produzir RodZn em grandes quantidades em meio mínimo contendo aminoácidos marcados (resultados não apresentados). Por seu lado, os nossos esforços para produzir RodZc em meio mínimo numa forma solúvel (como acontece em LB), foram infrutíferas. No entanto, recentemente, foi possível obter RodZc solúvel em meio mínimo contendo 1% de peptona (resultados

não apresentados). Este resultado excitante abre a porta para a determinação da estrutura deste domínio que, antecipamos, será um passo fundamental para a elucidação da função de RodZc.

Por fim, apresentamos um modelo, representado na Fig. 17, onde está representado RodZ associado à membrana, como um dímero, segundo os ensaios de *Split-Ubiquitin*. Supõe-se que RodZ interaja com MreB e com o DNA via a sua região citoplasmática. A interacção com o DNA pode envolver preferencialmente a hélice α_3 , ao passo que a interacção com MreB deve envolver principalmente a hélice α_4 (Fig. 17). Esta interacção poderá ser o determinante primário da localização sub-celular de RodZ num padrão em bandas ao longo da célula. Todas as funções conhecidas para RodZ dependem contudo da formação correcta do provável complexo MreB/RodZ/DNA. A estrutura deste complexo é essencial para o posicionamento do nucleóide e para a divisão celular (ver resultados acima). A região extra-citoplasmática de RodZ aparenta interagir com um componente da parede celular mediante o domínio C, tendo um função importante na manutenção da morfologia celular.

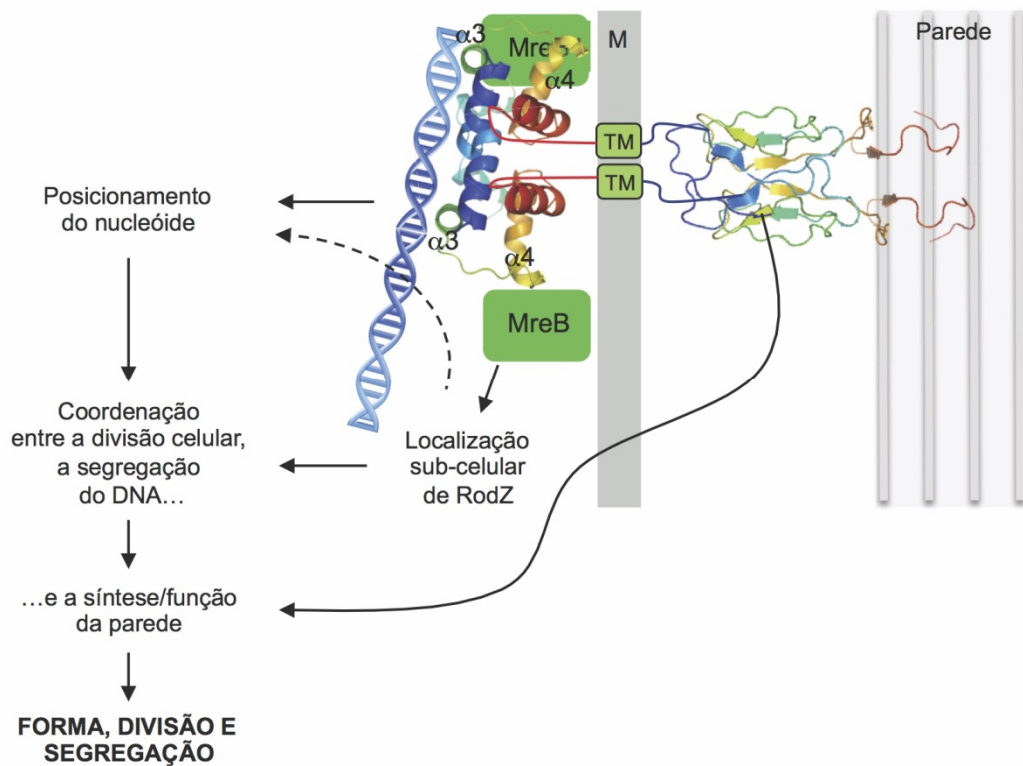


Figura 17 – Modelo para a função de RodZ com MreB. O modelo representa um dímero de RodZ associado à membrana. Supõe-se que RodZ interaja com MreB e com o DNA via a sua região citoplasmática. A interação com o DNA pode envolver preferencialmente a hélice $\alpha 3$, ao passo que a interação com MreB deve envolver principalmente a hélice $\alpha 4$ (esta interação poderá ser o determinante primário da localização sub-celular de RodZ num padrão em bandas ao longo da célula). Todas as funções conhecidas para RodZ dependem contudo da formação correcta do complexo MreB/RodZ/DNA. A estrutura deste complexo é essencial para a forma celular, o posicionamento do nucleóide e a divisão. Pensa-se que a região extra-celular de RodZ interaja com um componente da parede celular mediante o domínio C. Esta interação poderá permitir informação sobre o estado da parede ao citosqueleto.

5. Bibliografia

1. **Adams, D. W., and J. Errington.** 2009. Bacterial cell division: assembly, maintenance and disassembly of the Z ring. *Nat Rev Microbiol* **7**:642-653.
2. **Alyahya, S. A., R. Alexander, T. Costa, A. O. Henriques, T. Emonet, and C. Jacobs-Wagner.** 2009. RodZ, a component of the bacterial core morphogenic apparatus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* **106**:1239-1244.
3. **Aravind, L., V. Anantharaman, S. Balaji, M. M. Babu, and L. M. Iyer.** 2005. The many faces of the helix-turn-helix domain: transcription regulation and beyond. *FEMS Microbiology Reviews* **29**:231-262.
4. **Ausmees, N., J. R. Kuhn, and C. Jacobs-Wagner.** 2003. The bacterial cytoskeleton: an intermediate filament-like function in cell shape. *Cell* **115**:705-713.
5. **Barak, I., and A. J. Wilkinson.** 2007. Division site recognition in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Reviews* **31**:311-326.
6. **Ben-Yehuda, S., and R. Losick.** 2002. Asymmetric cell division in *B. subtilis* involves a spiral-like intermediate of the cytokinetic protein FtsZ. *Cell* **109**:257-266.
7. **Ben-Yehuda, S., D. Z. Rudner, and R. Losick.** 2003. RacA, a bacterial protein that anchors chromosomes to the cell poles. *Science N.Y.* **299**:532-536.
8. **Bendezu, F. O., C. A. Hale, T. G. Bernhardt, and P. A. de Boer.** 2009. RodZ (*YfgA*) is required for proper assembly of the MreB actin cytoskeleton and cell shape in *E. coli*. *The EMBO Journal* **28**:193-204.
9. **Berkmen, M. B., and A. D. Grossman.** 2007. Subcellular positioning of the origin region of the *Bacillus subtilis* chromosome is independent of sequences within *oriC*, the site of replication initiation, and the replication initiator DnaA. *Molecular Microbiology* **63**:150-165.
10. **Berlatzky, I. A., A. Rouvinski, and S. Ben-Yehuda.** 2008. Spatial organization of a replicating bacterial chromosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* **105**:14136-14140.

11. **Besserer, G. M., M. Ottolia, D. A. Nicoll, V. Chaptal, D. Cascio, K. D. Philipson, and J. Abramson.** 2007. The second Ca²⁺-binding domain of the Na⁺ Ca²⁺ exchanger is essential for regulation: crystal structures and mutational analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* **104**:18467-18472.
12. **Bordignon, E., M. Grote, and E. Schneider.** 2010. The maltose ATP-binding cassette transporter in the 21st century - towards a structural dynamic perspective on its mode of action. *Molecular Microbiology* **77**:1354-1366.
13. **Bramkamp, M., and S. van Baarle.** 2009. Division site selection in rod-shaped bacteria. *Current Opinion in Microbiology* **12**:683-688.
14. **Burton, B. M., K. A. Marquis, N. L. Sullivan, T. A. Rapoport, and D. Z. Rudner.** 2007. The ATPase SpoIIIIE transports DNA across fused septal membranes during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Cell* **131**:1301-1312.
15. **Cabeen, M. T., and C. Jacobs-Wagner.** 2010. The bacterial cytoskeleton. *Annual Review of Genetics* **44**:365-392.
16. **Cabre, F., E. I. Canela, and M. A. Canela.** 1989. Accuracy and precision in the determination of Stokes radii and molecular masses of proteins by gel filtration chromatography. *J Chromatogr* **472**:347-356.
17. **Carballido-Lopez, R., and A. Formstone.** 2007. Shape determination in *Bacillus subtilis*. *Current Opinion in Microbiology* **10**:611-616.
18. **Carballido-Lopez, R., A. Formstone, Y. Li, S. D. Ehrlich, P. Noirot, and J. Errington.** 2006. Actin homolog MreBH governs cell morphogenesis by localization of the cell wall hydrolase LytE. *Dev Cell* **11**:399-409.
19. **Chaptal, V., M. Ottolia, G. Mercado-Besserer, D. A. Nicoll, K. D. Philipson, and J. Abramson.** 2009. Structure and functional analysis of a Ca²⁺ sensor mutant of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger. *The Journal of Biological Chemistry* **284**:14688-14692.
20. **Chung, K. M., H. H. Hsu, H. Y. Yeh, and B. Y. Chang.** 2007. Mechanism of regulation of prokaryotic tubulin-like GTPase FtsZ by membrane protein EzrA. *The Journal of Biological Chemistry* **282**:14891-14897.

21. **Clarke, J., E. Cota, S. B. Fowler, and S. J. Hamill.** 1999. Folding studies of immunoglobulin-like beta-sandwich proteins suggest that they share a common folding pathway. *Structure* **7**:1145-1153.
22. **Costa, T., Henriques, A. O.** 2011. Manuscrito em preparação.
23. **Daniel, R. A., and J. Errington.** 2003. Control of cell morphogenesis in bacteria: Two distinct ways to make a rod-shaped cell. *Cell* **113**:767-776.
24. **Defeu Soufo, H. J., and P. L. Graumann.** 2005. *Bacillus subtilis* actin-like protein MreB influences the positioning of the replication machinery and requires membrane proteins MreC/D and other actin-like proteins for proper localization. *BMC Cell Biology* **6**:10.
25. **den Blaauwen, T. d. P., M. A.; Nguyen-Distèche, M. A.; Ayala, Juan.** 2008. Morphogenesis of rod-shape sacculi. *FEMS Microbiology Reviews* **32**:321-433.
26. **Dyson, H. J., and P. E. Wright.** 2005. Intrinsically unstructured proteins and their functions. *Nature Reviews* **6**:197-208.
27. **Erickson, H. P., D. E. Anderson, and M. Osawa.** 2010. FtsZ in bacterial cytokinesis: cytoskeleton and force generator all in one. *Microbiol Mol Biol Rev* **74**:504-528.
28. **Errington, J.** 2003. Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Nat Rev Microbiol* **1**:117-126.
29. **Errington, J.** 2001. Septation and chromosome segregation during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Current Opinion in Microbiology* **4**:660-666.
30. **Formstone, A., and J. Errington.** 2005. A magnesium-dependent mreB null mutant: implications for the role of mreB in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* **55**:1646-1657.
31. **Galli, E., and K. Gerdes.** 2010. Spatial resolution of two bacterial cell division proteins: ZapA recruits ZapB to the inner face of the Z-ring. *Molecular Microbiology* **76**:1514-1526.
32. **Gitai, Z., N. A. Dye, A. Reisenauer, M. Wachi, and L. Shapiro.** 2005. MreB actin-mediated segregation of a specific region of a bacterial chromosome. *Cell* **120**:329-341.

33. **Glaser, P., M. E. Sharpe, B. Raether, M. Perego, K. Ohlsen, and J. Errington.** 1997. Dynamic, mitotic-like behavior of a bacterial protein required for accurate chromosome partitioning. *Genes & Development* **11**:1160-1168.
34. **Gregory, J. A., E. C. Becker, and K. Pogliano.** 2008. *Bacillus subtilis* MinC destabilizes FtsZ-rings at new cell poles and contributes to the timing of cell division. *Genes & Development* **22**:3475-3488.
35. **Gueiros-Filho, F. J., and R. Losick.** 2002. A widely conserved bacterial cell division protein that promotes assembly of the tubulin-like protein FtsZ. *Genes & Development* **16**:2544-2556.
36. **Haeusser, D. P., R. L. Schwartz, A. M. Smith, M. E. Oates, and P. A. Levin.** 2004. EzrA prevents aberrant cell division by modulating assembly of the cytoskeletal protein FtsZ. *Molecular Microbiology* **52**:801-814.
37. **Hamburger, Z. A., M. S. Brown, R. R. Isberg, and P. J. Bjorkman.** 1999. Crystal structure of invasin: A bacterial integrin-binding protein. *Science N.Y.* **286**:291-295.
38. **Henriques, A. O., P. Glaser, P. J. Piggot, and C. P. Moran, Jr.** 1998. Control of cell shape and elongation by the *rodA* gene in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* **28**:235-247.
39. **Hilge, M., J. Aelen, and G. W. Vuister.** 2006. Ca²⁺ regulation in the Na⁺/Ca²⁺ exchanger involves two markedly different Ca²⁺ sensors. *Mol Cell* **22**:15-25.
40. **Ho, S. N., H. D. Hunt, R. M. Horton, J. K. Pullen, and L. R. Pease.** 1989. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77**:51-59.
41. **Holtje, J. V.** 1998. Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**:181-203.
42. **Hong, H. A., J. M. Huang, R. Khaneja, L. V. Hiep, M. C. Urdaci, and S. M. Cutting.** 2008. The safety of *Bacillus subtilis* and *Bacillus indicus* as food probiotics. *J Appl Microbiol* **105**:510-520.
43. **Huang, K. C., and K. S. Ramamurthi.** 2010. Macromolecules that prefer their membranes curvy. *Molecular Microbiology* **76**:822-832.

44. **Ireton, K., N. W. Gunther, and A. D. Grossman.** 1994. Spo0j Is Required for Normal Chromosome Segregation as Well as the Initiation of Sporulation in *Bacillus-Subtilis*. *Journal of Bacteriology* **176**:5320-5329.
45. **Jones, L. J., R. Carballido-Lopez, and J. Errington.** 2001. Control of cell shape in bacteria: helical, actin-like filaments in *Bacillus subtilis*. *Cell* **104**:913-922.
46. **Kalthoff, C., J. Alves, C. Urbanke, R. Knorr, and E. J. Ungewickell.** 2002. Unusual structural organization of the endocytic proteins AP180 and epsin 1. *The Journal of Biological Chemistry* **277**:8209-8216.
47. **Karow, M. L., and P. J. Piggot.** 1995. Construction of *gusA* transcriptional fusion vectors for *Bacillus subtilis* and their utilization for studies of spore formation. *Gene* **163**:69-74.
48. **Kawai, Y., K. Asai, and J. Errington.** 2009. Partial functional redundancy of MreB isoforms, MreB, Mbl and MreBH, in cell morphogenesis of *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* **73**:719-731.
49. **Kelley, L. A., and M. J. Sternberg.** 2009. Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nature Protocols* **4**:363-371.
50. **Kovacs, D., E. Kalmar, Z. Torok, and P. Tompa.** 2008. Chaperone activity of ERD10 and ERD14, two disordered stress-related plant proteins. *Plant Physiology* **147**:381-390.
51. **Kruse, T., B. Blagoev, A. Lobner-Olesen, M. Wachi, K. Sasaki, N. Iwai, M. Mann, and K. Gerdes.** 2006. Actin homolog MreB and RNA polymerase interact and are both required for chromosome segregation in *Escherichia coli*. *Genes & Development* **20**:113-124.
52. **Leaver, M., and J. Errington.** 2005. Roles for MreC and MreD proteins in helical growth of the cylindrical cell wall in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* **57**:1196-1209.
53. **Lee, P. S., and A. D. Grossman.** 2006. The chromosome partitioning proteins Soj (ParA) and Spo0J (ParB) contribute to accurate chromosome partitioning, separation of replicated sister origins, and regulation of replication initiation in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* **60**:853-869.

54. **Lee, P. S., D. C. Lin, S. Moriya, and A. D. Grossman.** 2003. Effects of the chromosome partitioning protein Spo0J (ParB) on *oriC* positioning and replication initiation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **185**:1326-1337.
55. **Levin, P. A., and A. D. Grossman.** 1998. Cell cycle and sporulation in *Bacillus subtilis*. *Current Opinion in Microbiology* **1**:630-635.
56. **Levin, P. A., J. J. Shim, and A. D. Grossman.** 1998. Effect of minCD on FtsZ ring position and polar septation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **180**:6048-6051.
57. **Lewis, P. J., and J. Errington.** 1997. Direct evidence for active segregation of *oriC* regions of the *Bacillus subtilis* chromosome and co-localization with the Spo0J partitioning protein. *Molecular Microbiology* **25**:945-954.
58. **Lewis, R. J., J. A. Brannigan, W. A. Offen, I. Smith, and A. J. Wilkinson.** 1998. An evolutionary link between sporulation and prophage induction in the structure of a repressor:anti-repressor complex. *Journal of Molecular Biology* **283**:907-912.
59. **Lin, D. C. H., and A. D. Grossman.** 1998. Identification and characterization of a bacterial chromosome partitioning site. *Cell* **92**:675-685.
60. **Lovering, A. L., and N. C. Strynadka.** 2007. High-resolution structure of the major periplasmic domain from the cell shape-determining filament MreC. *Journal of Molecular Biology* **372**:1034-1044.
61. **Ma, X., and W. Margolin.** 1999. Genetic and functional analyses of the conserved C-terminal core domain of *Escherichia coli* FtsZ. *Journal of Bacteriology* **181**:7531-7544.
62. **Marston, A. L., and J. Errington.** 1999. Selection of the midcell division site in *Bacillus subtilis* through MinD-dependent polar localization and activation of MinC. *Molecular Microbiology* **33**:84-96.
63. **Ni, L., W. Xu, M. Kumaraswami, and M. A. Schumacher.** 2010. Plasmid protein TubR uses a distinct mode of HTH-DNA binding and recruits the prokaryotic tubulin homolog TubZ to effect DNA partition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* **107**:11763-11768.

64. **Nicholson, W. L.** 2002. Roles of *Bacillus* endospores in the environment. Cellular and molecular life sciences : CMLS **59**:410-416.
65. **Nicoll, D. A., M. Ottolia, and K. D. Philipson.** 2002. Toward a topological model of the NCX1 exchanger. Ann Ny Acad Sci **976**:11-18.
66. **Niki, H., and S. Hiraga.** 1998. Polar localization of the replication origin and terminus in *Escherichia coli* nucleoids during chromosome partitioning. Genes & Development **12**:1036-1045.
67. **Niki, H., and S. Hiraga.** 1997. Subcellular distribution of actively partitioning F plasmid during the cell division cycle in *E. coli*. Cell **90**:951-957.
68. **Patrick, J. E., and D. B. Kearns.** 2008. MinJ (YvjD) is a topological determinant of cell division in *Bacillus subtilis*. Molecular Microbiology **70**:1166-1179.
69. **Pereira, A. C., Paiva, A., Costa, T., Henriques, A. O., Matzapetakis, M.** 2011. NMR investigation of the *Bacillus subtilis* morphogenic factor RodZ. *Interbio Summer School on Structural Biology - NMR applications in Protein Research*. Setembro 22-30. Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Oeiras, Portugal
70. **Piggot, P. J., and D. W. Hilbert.** 2004. Sporulation of *Bacillus subtilis*. Current Opinion in Microbiology **7**:579-586.
71. **Pogliano, J., N. Osborne, M. D. Sharp, A. Abanes-De Mello, A. Perez, Y. L. Sun, and K. Pogliano.** 1999. A vital stain for studying membrane dynamics in bacteria: a novel mechanism controlling septation during *Bacillus subtilis* sporulation. Molecular Microbiology **31**:1149-1159.
72. **Pogliano, J., M. D. Sharp, and K. Pogliano.** 2002. Partitioning of chromosomal DNA during establishment of cellular asymmetry in *Bacillus subtilis*. Journal of Bacteriology **184**:1743-1749.
73. **Ramamurthi, K. S., and R. Losick.** 2009. Negative membrane curvature as a cue for subcellular localization of a bacterial protein. Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A. **106**:13541-13545.
74. **Religa, T. L., C. M. Johnson, D. M. Vu, S. H. Brewer, R. B. Dyer, and A. R. Fersht.** 2007. The helix-turn-helix motif as an ultrafast independently folding

- domain: The pathway of folding of Engrailed homeodomain. Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A. **104**:9272-9277.
75. **Rodrigues, J.** 2010. Estudo da oligomerização dos domínios citoplasmático e extra-celular da proteína morfogenética RodZ. Instituto de tecnologia Química e Biológica da Universidade Nova de Lisboa, Lisboa.
 76. **Saltman, L. H., Y. Lu, E. M. Zaharias, and R. R. Isberg.** 1996. A region of the *Yersinia pseudotuberculosis* invasin protein that contributes to high affinity binding to integrin receptors. Journal of Biological Chemistry **271**:23438-23444.
 77. **Sambrook, J. R., D. W.** 2001. Molecular Cloning: a laboratory manual, 3 ed. Cold Spring Harbor Press, N. Y.
 78. **Scheffers, D. J., and M. G. Pinho.** 2005. Bacterial cell wall synthesis: new insights from localization studies. Microbiol Mol Biol Rev **69**:585-607.
 79. **Scott, D. J., S. Leejeerajumnean, J. A. Brannigan, R. J. Lewis, A. J. Wilkinson, and J. G. Hoggett.** 1999. Towards deconvoluting the interaction of the *Bacillus subtilis* sporulation proteins SinR and SinI using tryptophan analogue incorporated proteins. Prog Coll Pol Sci S **113**:209-211.
 80. **Setlow, P.** 2003. Spore germination. Current Opinion in Microbiology **6**:550-556.
 81. **Sharpe, M. E., and J. Errington.** 1998. A fixed distance for separation of newly replicated copies of *oriC* in *Bacillus subtilis*: implications for coordination of chromosome segregation and cell division. Molecular Microbiology **28**:981-990.
 82. **Shiomi, D., M. Sakai, and H. Niki.** 2008. Determination of bacterial rod shape by a novel cytoskeletal membrane protein. The EMBO Journal **27**:3081-3091.
 83. **Snider, J., S. Kittanakom, D. Damjanovic, J. Curak, V. Wong, and I. Stagljar.** 2010. Detecting interactions with membrane proteins using a membrane two-hybrid assay in yeast. Nature Protocols **5**:1281-1293.
 84. **Speicher, D. W.** 1998. Electrophoresis, p. 10.10.11-10.11.29. In J. E. Coligan, B. M. Dunn, H. L. Ploegh, D. W. Speicher, P. T. Wingfield (ed.), Current Protocols in Protein Science, vol. 2. John Wiley and Sons, Inc. .

85. **Stricker, J., and H. P. Erickson.** 2003. In vivo characterization of *Escherichia coli ftsZ* mutants: effects on Z-ring structure and function. *Journal of Bacteriology* **185**:4796-4805.
86. **Szollosi, E., M. Bokor, A. Bodor, A. Perczel, E. Klement, K. F. Medzihradzky, K. Tompa, and P. Tompa.** 2008. Intrinsic structural disorder of DF31, a *Drosophila* protein of chromatin decondensation and remodeling activities. *Journal of Proteome Research* **7**:2291-2299.
87. **Teleman, A. A., P. L. Graumann, D. C. Lin, A. D. Grossman, and R. Losick.** 1998. Chromosome arrangement within a bacterium. *Curr Biol* **8**:1102-1109.
88. **Tompa, P.** 2002. Intrinsically unstructured proteins. *Trends in Biochemical Sciences* **27**:527-533.
89. **Toro, E., and L. Shapiro.** 2010. Bacterial chromosome organization and segregation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **2**:a000349.
90. **van den Ent, F., C. M. Johnson, L. Persons, P. de Boer, and J. Lowe.** 2010. Bacterial actin MreB assembles in complex with cell shape protein RodZ. *The EMBO Journal* **29**:1081-1090.
91. **van den Ent, F., and J. Lowe.** 2000. Crystal structure of the cell division protein FtsA from *Thermotoga maritima*. *The EMBO Journal* **19**:5300-5307.
92. **Webb, C. D., P. L. Graumann, J. A. Kahana, A. A. Teleman, P. A. Silver, and R. Losick.** 1998. Use of time-lapse microscopy to visualize rapid movement of the replication origin region of the chromosome during the cell cycle in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* **28**:883-892.
93. **Webb, C. D., A. Teleman, S. Gordon, A. Straight, A. Belmont, D. C. Lin, A. D. Grossman, A. Wright, and R. Losick.** 1997. Bipolar localization of the replication origin regions of chromosomes in vegetative and sporulating cells of *B. subtilis*. *Cell* **88**:667-674.
94. **Wu, L. J., and J. Errington.** 2004. Coordination of cell division and chromosome segregation by a nucleoid occlusion protein in *Bacillus subtilis*. *Cell* **117**:915-925.

95. **Wu, L. J., and J. Errington.** 2003. RacA and the Soj-Spo0J system combine to effect polar chromosome segregation in sporulating *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* **49**:1463-1475.
96. **Wu, L. J., S. Ishikawa, Y. Kawai, T. Oshima, N. Ogasawara, and J. Errington.** 2009. Noc protein binds to specific DNA sequences to coordinate cell division with chromosome segregation. *The EMBO Journal* **28**:1940-1952.
97. **Young, K. D.** 2007. Bacterial morphology: why have different shapes? *Current Opinion in Microbiology* **10**:596-600.
98. **Young, K. D.** 2010. Bacterial shape: two-dimensional questions and possibilities. *Annual Review of Microbiology* **64**:223-240.
99. **Yu, C. M., S. Mun, and N. H. Wang.** 2006. Theoretical analysis of the effects of reversible dimerization in size exclusion chromatography. *Journal of Chromatography* **1132**:99-108.
100. **Zong, Y. N., Y. Xu, X. W. Liang, D. R. Keene, A. Hook, S. Gurusiddappa, M. Hook, and S. V. L. Narayana.** 2005. A 'collagen hug' model for *Staphylococcus aureus* CNA binding to collagen. *Embo Journal* **24**:4224-4236.

6. Anexos

6.1. Anexo 1 – Meios de cultura

Tabela S1 - Composição dos meios de cultura utilizados neste estudo

Meio de cultura	Composição
Luria – Bertanni (LB/LA)	10 g/L Triptona 5 g/L Extracto de levedura 5 g/L NaCl Se sólido adicionar 16g/L de agar (LA)
<i>Growth Medium 1</i> (GM1)	96% (v/v) sais B&W* 1 mM MgSO ₄ 0,5% (w/v) Glucose 0,1% (w/v) extracto de levedura 0,05X aminoácidos B&W* Conservar a 4°C.
<i>Growth Medium 2</i> (GM2)	A GM1 adicionar: 0,28 mM de CaCl ₂ 2,8 mM de MgCl ₂
Meio mínimo SMS/SMM (30)	1X SMS* 50% Glucose 50 µg /ml Metionina 50 µg/ml Triptofano 1X SMM*
<i>Yeast Extract-Peptone-Dextrose</i> (YPAD)	1% Bacto Yeast Extract 2% Bacto peptone 2% Glucose 0,004% Sulfato de Adenina Se sólido adicionar 2% de Bacto Agar
<i>Synthetic Dextrose</i> sem leucina e sem triptofano (SD-2)	0,7% Yeast Nitrogen Base 0,1% Dropout mix (-leu, -trp) 2% Glucose Se sólido adicionar 2% de Bacto Agar

Meio mínimo M9

H₂O MiliQ
1X sais M9
0,002 M MgSO₄
0,025 μM CaCl₂
0,3X Solução de metais*
0,01% (v/v) Mistura de vitaminas (Sigma)
100 μg/ml Ampicilina
0,08% (v/v) Fonte de Carbono (Glucose, ¹⁴C)
0,005% (v/v) Fonte de Azoto (NH₄Cl, ¹⁵N)

* ver o anexo 3 - Soluções

6.2. Anexo 2 – Antibióticos

Tabela S2 – Antibióticos utilizados neste trabalho e respectivas concentrações de utilização e de stock

Antibiótico	Concentração Stock (mg/ml)	Concentração de utilização (µg/ml)
Ampicilina (Amp)	100	100
Espectinomicina (Sp)	100	100
Neomicina (Neo)	10	1/3*
Canamicina (Kan)	10	10/30*

* meio líquido / meio sólido

Todos os antibióticos são dissolvidos em ddH₂O e armazenados a -20°C.

6.3. Anexo 3 – Soluções utilizadas neste trabalho

Tabela S3 – Soluções utilizados neste trabalho

Solução	Composição / Preparação
Extracção de DNA	
STET	8% sacarose, 0,5% TritonX-100, 50 mM EDTA e 10 mM Tris-HCl; pH 8.0
SET	20% Sacarose; 20 mM Tris pH 8.0; 10 mM EDTA
Super-Produção e purificação de proteínas recombinates	
Tampão fosfato 8X	2.87% (w/v) de Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O, 1.25% (w/v) NaH ₂ PO ₄ .12H ₂ O e 23.38% (w/v) NaCl; pH 7,4. Filtração (0,45µm)
Tampão de Ligação	Tampão fosfato 1x, 10 mM Imidazol, 10% de glicerol 98%
Tampão de eluição 60 mM	Tampão fosfato 1x, 60 mM Imidazol, 10% de glicerol 98%
Tampão de eluição 100 mM	Tampão fosfato 1x, 100 mM Imidazol, 10% de glicerol 98%
Tampão de eluição 300 mM	Tampão fosfato 1x, 300 mM Imidazol, 10% de glicerol 98%
Tampão de eluição 500 mM	Tampão fosfato 1x, 500 mM Imidazol, 10% de glicerol 98%
TSDS-PAGE e Detecção Imunológica de Proteínas	
Gel de Resolução 12,5%	12,5% Acrilamida (29:1); 1M Tris.Cl/SDS pH 8,45; 9,3% Glicerol; 0,8% APS e 5×10^{-4} % (v/v) TEMED em ddH ₂ O.
Gel de Concenração 4,5%	4,5% Acrilamida (29:1); 0,7M Tris.Cl/SDS pH 8,45; 0,01% APS e 8×10^{-4} % (v/v) TEMED em ddH ₂ O.

Tampão de electroforese 1X	1,2% (w/v) Tris-base, 1,8% (w/v) Tricina e 0,1% (w/v) SDS, em ddH ₂ O.
Tampão de amostra	0,8X <i>Upper Tris</i> , 21% Glicerol, 8% (w/v) SDS, 3% (w/v) DTT e 0,02% (w/v) Coomassie G-250, em ddH ₂ O
Tris.Cl/SDS pH 8,45	3M Tris.Cl; pH 8,45.; filtração (0,45µm); 0,3% SDS
4X <i>Upper Tris</i>	0,5 M Tris.Cl, 0,4% SDS; pH 6,8
PBS 10X	1,37 M NaCl; 27 mM KCl; 43 mM Na ₂ HPO ₄ e 14 mM de KH ₂ PO ₄
Tampão de transferência	25 mM Tris; 192 mM Glicina e 10% Etanol
Solução de bloqueio	10% de leite magro em pó comercial em solução de lavagem
Solução de anticorpo	0,5% de leite magro em pó comercial em solução de lavagem
Solução de lavagem	PBS 1X; 0,001% Tween-20
Persulfato de ammonia (APS)	1,6% (w/v) em ddH ₂ O. Manter a 4°
Tetrametil-etileno-diamida (TEMED)	Solução a 99% (Sigma). Manter protegida da luz.
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	10% (w/v) em ddH ₂ O.
Meios	
Sais Bott and Wilson (B&W)	1,24% (w/v) K ₂ HPO ₄ , 0,76% % (w/v) KH ₂ PO ₄ , 0,1% (w/v) citrato tri-sódico e 0,6% (w/v) (NH ₄) ₂ SO ₄ ; pH 7,6
5X aminoácidos B&W	2,5 mg/ml de trp, arg, lys, gly, met, his, val, thr e asp
10X <i>Spizizen's minimal salts</i> (SMS)	14% (w/v) K ₂ HPO ₄ ; 2% (w/v) (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 6% (w/v) KH ₂ PO ₄ ; 1% (w/v) Na ₃ citrato.2H ₂ O e 0,2% (w/v) MgSO ₄ . 7H ₂ O.
2X SMM	0,5 M Sucrose, 16,9 mM ácido maleico e 20mM MgCl ₂ pH 7,0
10X Sais M9	12,8% (w/v) Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O, 3% (w/v) KH ₂ PO ₄ e

	0,5% (w/v) de NaCl, em ddH ₂ O; pH a 7,4. Autoclavar e manter a 4°C
10X Solução de metais	0,4M HCl; 8,3% (w/v) FeSO ₄ .7H ₂ O; 0,6% (w/v) H ₃ BO ₄ ; 0,02% (w/v) CoCl ₂ .6H ₂ O; 0,004% (w/v) CuCl ₂ .2H ₂ O; 0,34% (w/v) ZnCl ₂ ; 0,61% (w/v) Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O e 0,04% (w/v) MnCl ₂ .4H ₂ O

6.5. Anexo 5 – Análise da espectroscopia de RodZn

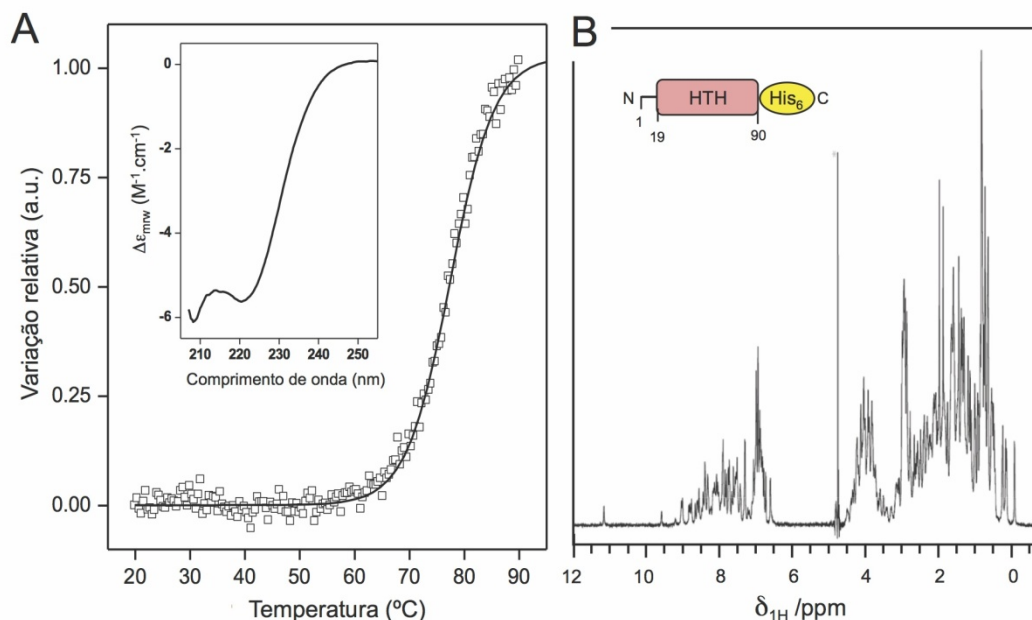


Figura S118 – Espectroscopia de CD e de 1D ^1H NMR de RodZ₁₋₉₃. A) O espectro de CD de RodZ₁₋₉₃ entre 190 e 250 nm revela uma assinatura espectroscópica típica de uma proteína estruturada, em hélice α , com mínimos a 208 and 222 nm (inserto). A desnaturação térmica, seguida a 222 nm, revela uma transição abrupta, compatível com a passagem de uma conformação estruturada para uma conformação não estruturada. O ponto médio da transição corresponde a uma temperatura de *melting* (T_m) de 77°C. Esta transição é completamente reversível, o que é compatível com uma estrutura bem organizada para RodZ₁₋₉₃. Foram obtidos resultados equivalentes para RodZ₁₋₁₀₄ (resultados não apresentados), no entanto a temperatura de *melting* observada foi de 74°C. Este decréscimo no T_m pode ser atribuído à presença da extensão C-terminal, menos organizada. B) O espectro de 1D ^1H NMR também sugere que RodZ₁₋₉₃ é predominantemente estruturada e possivelmente α -helicoidal. Esta conclusão é baseada na definição e no espalhamento dos sinais das amidas (distribuídos por uma região superior a 3ppm) em conjunto com a presença de ressonâncias dos grupos metilo nas regiões entre 0,5 e 1ppm..

6.6. Anexo 6 – Análise da espectroscopia de RodZc

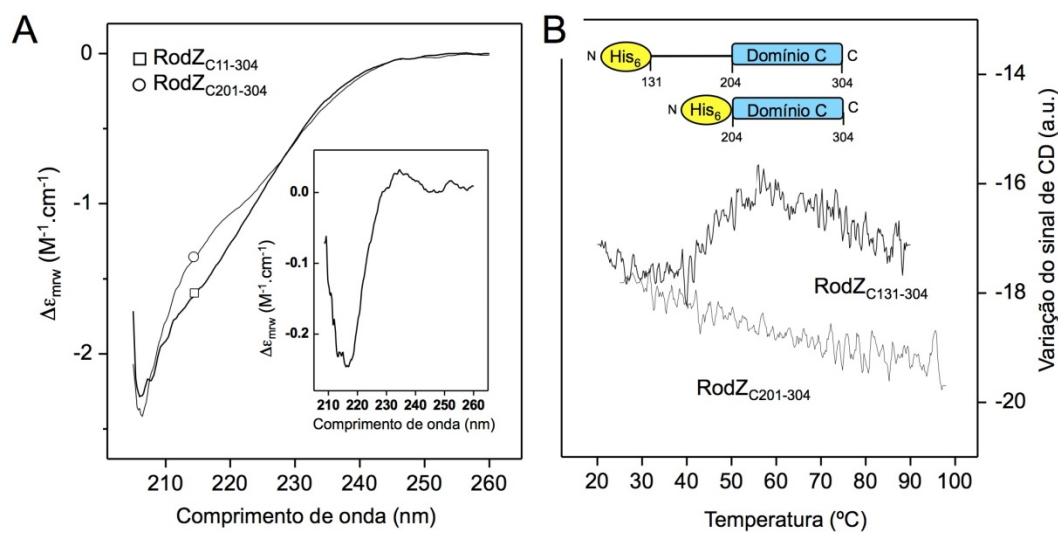


Figura S2 - Espectroscopia de CD de RodZ₁₃₁₋₃₀₄ e de RodZ₂₀₄₋₃₀₄. A) A análise por espectroscopia de CD para comprimentos de onda nos UV distantes, sugere que ambas as proteínas são pouco estruturadas, com mínimos a 208 nm e sinais adicionais entre 215 e 230 nm compatíveis com alguma estrutura em folha β . Para RodZ₁₃₁₋₃₀₄, uma banda larga centrada a 215 nm sugere que o segmento entre os resíduos 131 e 201 pode ser mais rico em folhas β , ou alternativamente induzir estrutura no resto da proteína. A diferença entre os espectros obtidos para RodZ₁₃₁₋₃₀₄ e RodZ₂₀₁₋₃₀₄ (inserto) sugere de facto que esta região possui (ou produz) uma assinatura mais rica em folha β . B) A desnaturação térmica de RodZ₂₀₁₋₃₀₄ é monotónica, e irreversível (o arrefecimento da amostra para a temperatura ambiente não restaurou a assinatura espectroscópica inicial). Pelo contrário, a desnaturação térmica de RodZ₁₃₁₋₃₀₄ revelou uma transição de baixa magnitude e reversível, com um Tm aparente de 45°C. Esta transição não leva à perda de estrutura, mas antes sugere uma reorganização dos elementos estruturais na proteína (que mantém estrutura secundária a alta temperatura). Os resultados sugerem que RodZ₂₀₁₋₃₀₄ é largamente não estruturado, e que RodZ₁₃₁₋₃₀₄ possui alguma estrutura, com elementos em folha β . Possivelmente, o segmento entre os resíduos 131 e 201 confere estrutura a RodZc.

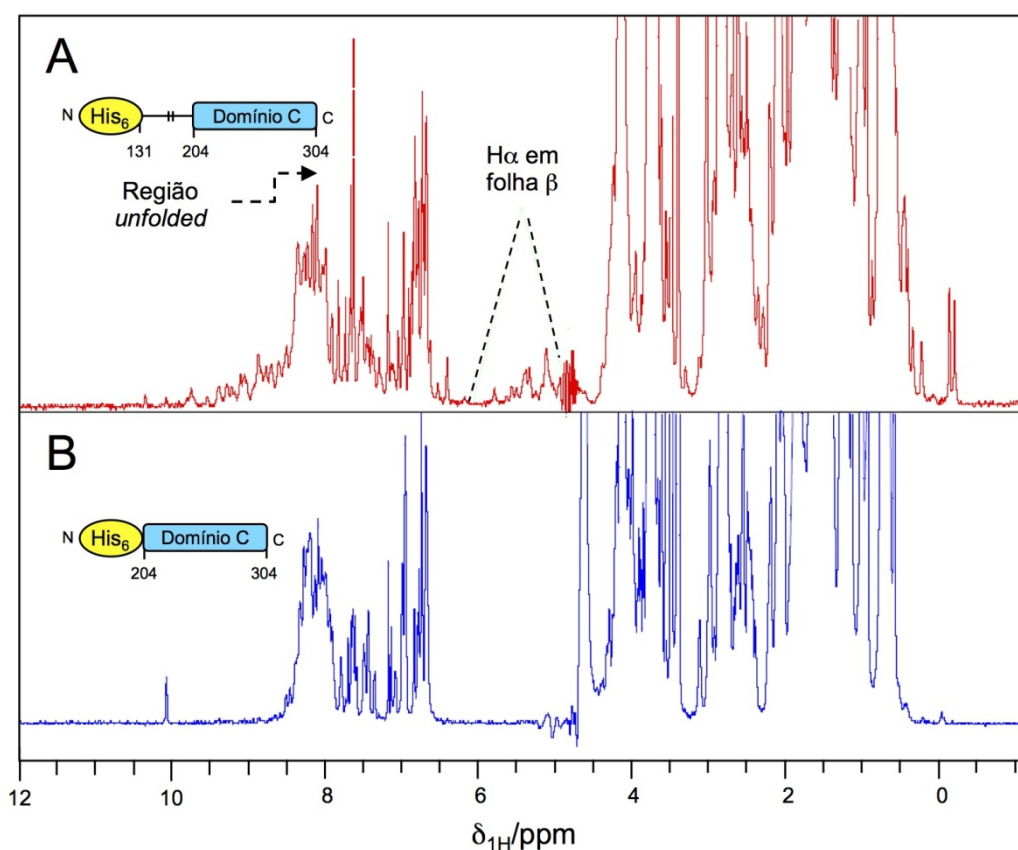


Figura 19 – Espectros 1D ^1H NMR para RodZc. Espectro de 1D ^1H NMR de RodZ₁₃₁₋₃₀₄ (A), e de RodZ₂₀₄₋₃₀₄ (B). Em geral, as ressonâncias das amidas, entre 6 e 10,5 ppm são consistentes com uma proteína maioritariamente não estruturada (comparar com a figura S1B). No entanto, no espectro obtido para RodZ₁₃₁₋₃₀₄ (A), são vários as indicações de alguma estrutura: *i*) os sinais das amidas estão bem resolvidos e espalham-se por uma região de mais de 2 ppm; *ii*) as ressonâncias à volta de 5 ppm são consistentes com sinais $\text{H}\alpha$ correspondentes a uma conformação em folha β ; *iii*) os sinais de ressonância dos grupos metilo perto ou abaixo de 0 ppm são também indicativos de alguma estrutura. Nenhuma destas características pode ser associada com o espectro obtido para RodZ₂₀₄₋₃₀₄ (B). O grupo de ressonâncias à volta de 8.2 ppm no painel A pode ser atribuído a uma região não estruturada perto do terminal carboxílico de RodZ₁₃₁₋₃₀₄.