

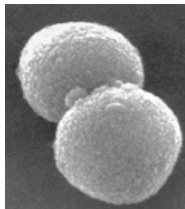
**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI ROMA
"TOR VERGATA"**



**TESI DI DOTTORATO "BIOLOGIA CELLULARE E
MOLECOLARE" XIX CICLO**

Laboratorio di Microbiologia Generale

**"Studio della rete d'interazioni delle proteine di
divisione dei procarioti:
Identificazione del Minimum comune divisoma"**



Relatore

Prof. Luciano Paolozzi

Dottoranda

D'Ulisse Valeria

INDICE

I PARTE

CONFRONTO DEI PATTERN D'INTERAZIONE NEL DIVISOMADELLOSTEPTOCOCCUSPNEUMONIE DELL'ESCHERICHIA COLI CAP 1 PARTE GENERALE

1.1 ORGANIZZAZIONE DEL CLUSTER DCW DEI GENI DI DIVISIONE E DI SINTESI NELLA PARETE NEI BATTERI BASTONELLARI Gram-: <i>E. COLI</i> E COCCOIDI Gram+ <i>S. PNEUMONIAE</i>	9
1.2 ALLINEAMENTO DEL SETTO: ASSEMBLAGGIO DELLE PROTEINE DI DIVISIONE NEI BATTERI GRAM- BASTONCELLARI: <i>E. COLI</i>	11
1.3 ASSEMBLAGGIO E CARATTERIZZAZIONE DELLE PROTEINE DI DIVISIONE A VALLE NELLA SEQUENZA LINEARE DI LOCALIZZAZIONE	15
1.4 ALLINEAMENTO DEL SETTO: ASSEMBLAGGIO DELLE PROTEINE DI DIVISIONE NEI BATTERI GRAM+ COCCOIDI: <i>STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE</i>	18

PARTE SPERIMENTALE

CAP 2 SCOPO 21

CAP 3 MATERIALI E METODI

PREMESSA	29
----------	----

3.1 MATERIALI

3.1.1 TERRENI DI COLTURA	31
3.1.2 CEPPI BATTERICI E PLASMIDI	31

3.2 METODI

3.2.1 CLONAGGIO DEI GENI DI <i>STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE</i> NEI VETTORI DI CLONAGGIO <i>pcI_{p434}</i> ED <i>pcI_{p22}</i>	37
3.2.2 CLONAGGIO DEI GENI DI <i>STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE</i> <i>FTSW</i> , <i>FTSZ</i> , <i>DIVIB</i> ED I GENI <i>FTSW</i> , <i>FTSN</i> , <i>FTSK</i> , <i>FTSQ</i> DI <i>E. COLI</i> NEL VETTORE DI CLONAGGIO <i>PTTQ18GFP</i>	38
3.2.3 CLONAGGIO DEI GENI <i>FTSK</i> , <i>FTSL</i> , <i>DIVIC</i> , <i>FTSW</i> DI <i>S. PNEUMONIAE</i> ED I GENI <i>FTSQ</i> , <i>FTSI</i> DI <i>E. COLI</i> NEL VETTORE DI CLONAGGIO <i>PBADGST</i>	39
3.3 SAGGIO DEL DOPPIO IBRIDO PROCARIOTICO	39
3.4 PREPARAZIONE DEGLI ESTRATTI PER	

GLI ESPERIMENTI DI COIMMUNOPRECIPITAZIONE	40
3.5 ESPERIMENTI DI COIMMUNOPRECIPITAZIONE	41
3.6 WESTERN BLOTTING	41
3.7 COMPLEMENTAZIONE DEL CEPPLO JOE 170	42
3.8 QUANTIFICAZIONE DELLA PROTEINA FTSQ NEL CEPPLO JOE170/PQ E JOE170/PQ PCI ₂₂ DIVIB IN ASSENZA DI ARABINOSIO	42
CAP 4 RISULTATI	
4.1 ANALISI E CONFRONTO DELLE INTERAZIONI PROTEINA-PROTEINA NEL SISTEMA PROCARIOTICO <i>E. COLI</i> e <i>S. PNEUMONIAE</i>	47
4.2 RUOLO E FUNZIONE DELLA PROTEINA FTSQ E DEL SUO ORTOLOGO DIVIB DI <i>STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE</i>	49
4.3 COMPLEMENTAZIONE DEL MUTANTE Δ FTSQ DI <i>E. COLI</i> CON L'ORTOLOGO DIVIB DI <i>S. PNEUMONIAE</i>	50
CAP 5 CONCLUSIONI	59
II PARTE	
STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE DIVIVA LOCALIZZAZIONE E INTERAZIONE IN UN SISTEMA MINCD FREE	64
CAP 1 PARTE GENERALE	66
1.1 IMPORTANZA CLINICA E RESISTENZE ANTIBIOTICHE ACQUISITE DAL BATTERIO GRAM+ <i>STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE</i>	68
PARTE SPERIMENTALE	
CAP 2 SCOPO	74
CAP 3 MATERIALI E METODI	
3.1 MATERIALI	80
3.1. PLAMIDI	80
3.2 METODI	82
3.3 SAGGIO DEL DOPPIO IBRIDO PROCARIOTICO; COIMMUNOPRECIPITAZIONI; WESTER BLOTTING	

3.4 PREPARAZIONE DELLE COLTURE E DEI VETRINI PER L'ANALISI IN FLUORESCENZA

83

CAP 4 RISULTATI

4.1 DIVIVA LOCALIZZA SIA AI POLI CELLULARI CHE NELLA
REGIONE MEDIANA DELLA CELLULA NELLO
STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE e NELL' *ESCHERICHIA COLI*

88

4.2 LA PROTEINA DIVIVA DI *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*
INTERAGISCE CON SE STESSA E CON LE ALTRE PROTEINE
DEL MACCHINARIO DI DIVISIONE

89

4.3 ALTERAZIONI FENOTIPICHE E GENETICHE DEL
MUTANTE DI *S. PNEUMONIAE* PORTATORE DELLA
MUTAZIONE A78T

90

CAP 5 CONCLUSIONI

98

BIBLIOGRAFIA

104

A MIO PADRE CHE HA
SEMPRE CREDUTO
NEL MIO LAVORO

**I PARTE
CONFRONTO DEI
PATTERN
D'INTERAZIONE NEL
DIVISOMA DELLO
STEPTOCOCCUS
PNEUMONIAE
DELL'ESCHERICHIA
COLI**

CAP 1

PARTE GENERALE

1.1 ORGANIZZAZIONE DEL CLUSTER DCW DEI GENI DI DIVISIONE E DI SINTESI NELLA PARETE NEI BATTERI BASTONCELLARI Gram-: *E. COLI* E COCCOIDI Gram+ *S. PNEUMONIAE*

La divisione cellulare se osservata al microscopio risulta ancora un processo molto oscuro nella vita segreta dei batteri: la cellula cresce fino a raggiungere una precisa dimensione in seguito alla quale compare nella regione centrale una costrizione che termina con la definitiva separazione delle due cellule figlie, senza che avvengano altri percettibili cambiamenti. La precisione e la regolarità con la quale questi processi si estrinsecano sono indice di un fine controllo genetico a diversi livelli da parte della cellula.

Lo sviluppo di un macchinario di divisione (DIVISOMA) costituito da diverse proteine capaci di formare un complesso macromolecolare è indispensabile per il processo di divisione cellulare. Il confronto di differenti genomi batterici mostra un'elevata conservazione nei geni della divisione riscontrabile in un certo numero di eventi comuni nel meccanismo di divisione tra i batteri bastoncellari Gram- e quelli bastoncellari-coccoidi Gram+.

Differenti specie batteriche (gram+, gram-) presentano una regione cromosomale altamente conservata a due minuti di mappa (Yura et al., 1992; Ayala et al., 1994). Questa regione denominata *dcw* cluster (division cell wall) (Vincente e Errington, 1996) contiene molti geni codificanti per diverse proteine della divisione e della sintesi della parete cellulare. Un preliminare confronto tra il *dcw* cluster dei batteri bastoncellari Gram- *Escherichia coli* e bastoncellari Gram+ *Bacillus subtilis* mostra un' alto grado di conservazione sia al livello di similarità di sequenza sia al livello di organizzazione e polarità nel loro ordine di trascrizione. Questo cluster è uno dei migliori esempi di regione altamente conservata sopravvissuta ai riarrangiamenti dinamici spesso osservati durante l'evoluzione nei genomi degli eubatteri (Watanabe et al., 1997). La ragione biologica di questa conservazione potrebbe essere attribuita al fatto che questa organizzazione potrebbe facilitare l'espressione coordinata di questi geni che risulta quindi la migliore per un'efficace divisione cellulare (FIG 1).

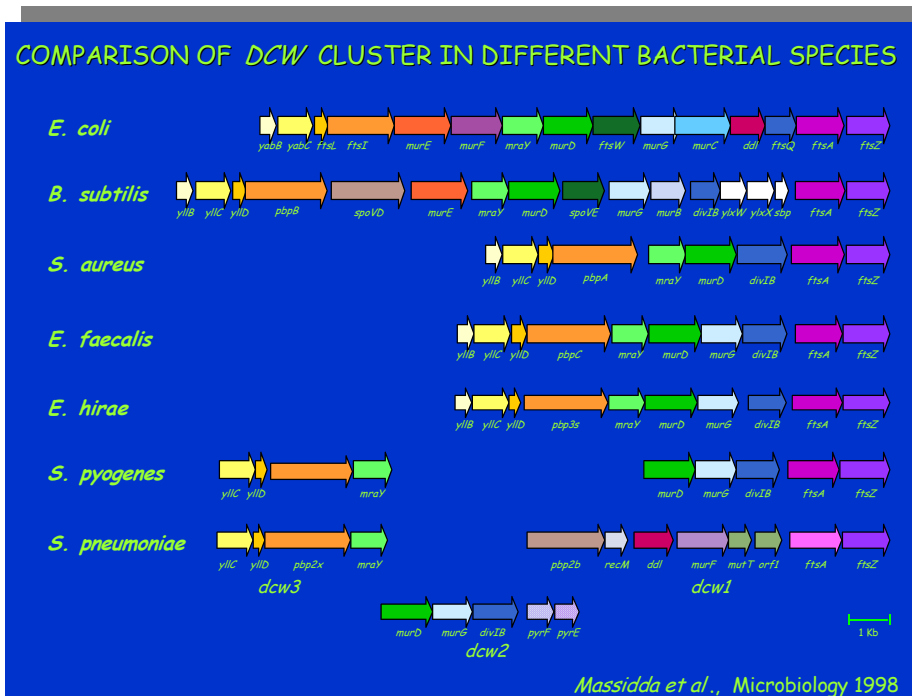


FIG.1 Rappresentazione schematica del DCW cluster

Come si vede dalla figura nei batteri gram+ coccoidi come lo *Streptococcus pneumoniae* o *S. pyogenes* i geni del *dcw* con l'eccezione di *ftsA* e *ftsZ* non si trovano necessariamente associati insieme ma spesso mostrano delle spaziature intergeniche di lunghezza variabile. Ciò è particolarmente evidente nello *S. pneumoniae* dove alcuni dei geni del *dcw* sono localizzati in regioni cromosomali distinte fisicamente. La ragione di questa organizzazione non convenzionale è ancora sconosciuta.

La selezione di mutanti condizionali in *E. coli* e *B. subtilis* incapaci di dividersi in condizioni non permissive (alta temperatura) ha permesso l'identificazione di molti dei geni che codificano per le proteine di divisione cellulare.

Allo scopo di stabilire come queste proteine si assemblino in strutture sovramolecolari più complesse e quindi di elaborare modelli descrittivi di tali processi sono stati intrapresi numerosi studi di interazioni molecolari e localizzazioni intracellulari in diversi sistemi procariotici modello.

1.2 ALLINEAMENTO DEL SETTO: ASSEMBLAGGIO DELLE PROTEINE DI DIVISIONE NEI BATTERI GRAM-BASTONCELLARI: *E.COLI*

Nei batteri bastoncellari come *E. coli* la divisione comporta l'invaginazione della membrana cellulare strettamente seguita dalla sintesi della parete cellulare che determinerà la separazione delle due cellule figlie. La settazione comporta un cambiamento nella direzione di sintesi del peptidoglicano che non influenza l'integrità della parete cellulare. Il taglio nella regione centrale della parete cellulare trasversale avviene in *E. coli* contemporaneamente alla sintesi del setto di divisione e alla costrizione cellulare mentre nel *B. subtilis* avviene in uno stadio successivo.

In *E. coli* questo processo implica la localizzazione di 15 proteine nella zona mediana della cellula (Buddelmeijer and Beckwith., 2002; Bernhardt and de Boer., 2003). Queste proteine vengono reclutate nel sito di divisione secondo una sequenza lineare dedotta mediante studi di localizzazione, condotti utilizzando il gene reporter GFP o studi di immunolocalizzazione in ceppi mutanti per differenti geni della divisione. L'ordine gerarchico con il quale localizzano è:

FtsZ > [FtsA, ZapA, ZipA] > (FtsE, FtsX) > FtsK > FtsQ > (FtsB, FtsL) > FtsW > FtsI > FtsN > AmiC > EnvC

Le proteine in parentesi si assemblano simultaneamente. Sebbene non sia ancora noto se l'incorporazione di un particolare proteina nel setto di divisione richieda la continua presenza di tutte quelle che la precedono nella sequenza lineare di assemblaggio, si è osservato che la mancata localizzazione di una proteina impedisce il corretto assemblaggio delle successive. Il carattere gerarchico di questa localizzazione potrebbe riflettere un'insieme di attività enzimatiche svolte nel sito di divisione, nel quale ogni reazione porta alla modificazione di una o più componenti del setto permettendo così l'entrata delle successive (dimensione temporale) o potrebbe riflettere una sequenza d'interazione proteina-proteina che determina l'assemblaggio di un complesso multiproteico (dimensione spaziale) : il DIVISOMA. In *B. subtilis* la localizzazione non segue una sequenza lineare anche se di natura cooperativa, infatti molte delle proteine di divisione sono interdipendenti per la localizzazione ciò suggerisce una sequenza fisica d'interazione.

Il primo evento nel processo di differenziazione del sito di divisione è la localizzazione della proteina FtsZ. Questa GTPasi omologa delle tubuline eucariotiche polimerizza in un anello intracellulare equidistante dai due poli

cellulari (Lutkenhaus and Additale 1997, Lowe and Amos 1998), in vitro infatti è in grado di generare un grande varietà di polimeri idrolizzando il GTP.

Lo Z-ring ha un ruolo dinamico nella citokinesi infatti si assembla all'inizio della divisione cellulare e si disassembla al termine, costituisce per questo una sorta d'impalcatura su cui si assemblano le altre proteine di divisione.

La proteina FtsA omologa dell'actina e ZipA localizzano successivamente e si legano direttamente al C-terminale di FtsZ ancorando lo Z-ring alla membrana citoplasmatica (FIG. 2).

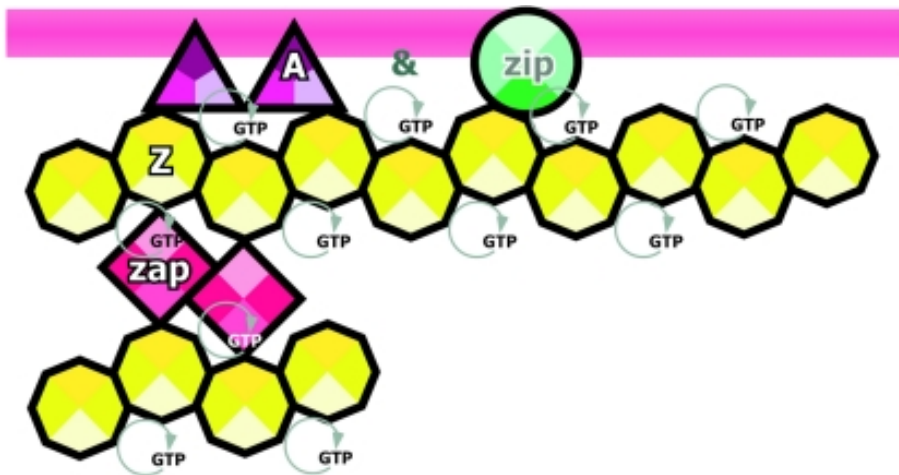


FIG.2 Interazioni e ancoraggio dello Z-ring alla membrana citoplasmatica

Contribuiscono alla stabilità e all'assemblaggio del setto le proteine FtsX ed FtsE che presentano omologia con la superfamiglia dei trasportatori ABC ed un elevato grado di conservazione tra i batteri.

Successivamente vengono reclutate nel setto le altre proteine di membrana alcune bitopiche (FtsQ, FtsL, FtsB, FtsN, FtsI) altre politopiche (FtsK, FtsW). Le proteine appartenenti al primo gruppo sono caratterizzate da un corto dominio N-terminale citoplasmatico, un singolo segmento transmembrana e un grande dominio periplasmatico (Guzman et al., 1992; Dai e Lutkenhaus, 1996; Guzman et al 1997). Del secondo gruppo fanno parte: FtsK una proteina di grosse dimensioni altamente conservata tra i

batteri coinvolta sia nel processo di divisione che in quello di ripartizione del nuclide (Wang e Lutkenaus, 1998) e FtsW un membro della famiglia di proteine SEDS (“ shape, elongation, division and sporulation ”) (Ikeda et al., 1998; Henriques et al., 1998). Infine vengono reclutate nel setto di divisione le proteine AmiC e EnvC due idrolasi del peptidoglicano che rivestono un ruolo fondamentale nella separazione delle due cellule figlie (Heidrich et al., 2001).

Il meccanismo che dirige la localizzazione di queste proteine tardive e come queste sono in grado di assemblarsi nel sito di divisione è tuttora poco conosciuto. Infatti numerosi studi indicherebbero che questo processo potrebbe non essere lineare come si è finora pensato.

Analisi effettuate utilizzando il saggio del “Doppio ibrido procariotico” sviluppato nel nostro laboratorio hanno mostrato una fitta rete d’interazioni intraprese da queste proteine (Di Lallo et al.,2003; Karimova et al., 2005). Tuttavia alcune componenti della divisione, incluse le proteine ZipA e FtsK e possono essere sostituite da mutazioni di soppressione o overespressione di altri componenti del divisoma (Geissler et al., 2003; Geissler and Margolin, 2005).

Goehring et al.,2005 hanno di recente sviluppato un metodo mediante il quale il reclutamento delle proteine a valle nel setto di divisione si può espletare anche senza il preassemblaggio di quelle a monte. Il primo risultato ottenuto utilizzando questa procedura indica che FtsQ può coordinare il reclutamento delle proteine a valle, eccetto FtsN, in assenza delle proteine a monte FtsA e FtsK (Goehring et al.,2005). Una prematura localizzazione di FtsQ, inoltre, può indurre una localizzazione indietro della proteina FtsK anche in assenza della proteina a monte FtsA. Questa osservazione suggerisce una diretta interazione proteina-proteina tra FtsQ e FtsK nel complesso di divisione ed è il primo saggio *in vivo* a mostrare un reclutamento indietro delle proteine di divisione.

Capire come queste proteine interagiscono tra di loro è essenziale per comprendere il meccanismo chiave alla base della localizzazione e l’assemblaggio nel sito di divisione. Dati ottenuti mediante l’utilizzo del saggio di “Doppio ibrido procariotico “ rivelano che esiste un complicata rete d’interazioni tra le proteine di divisione FtsZ, FtsA, ZipA, FtsK, FtsQ, FtsL, FtsW, FtsI e FtsN, l’interazione di FtsQ con FtsB viene descritta proprio nel mio lavoro di dottorato. La figura che segue (FIG. 3) rappresenta schematicamente tutti i dati fino ad ora ottenuti in merito a questi studi:

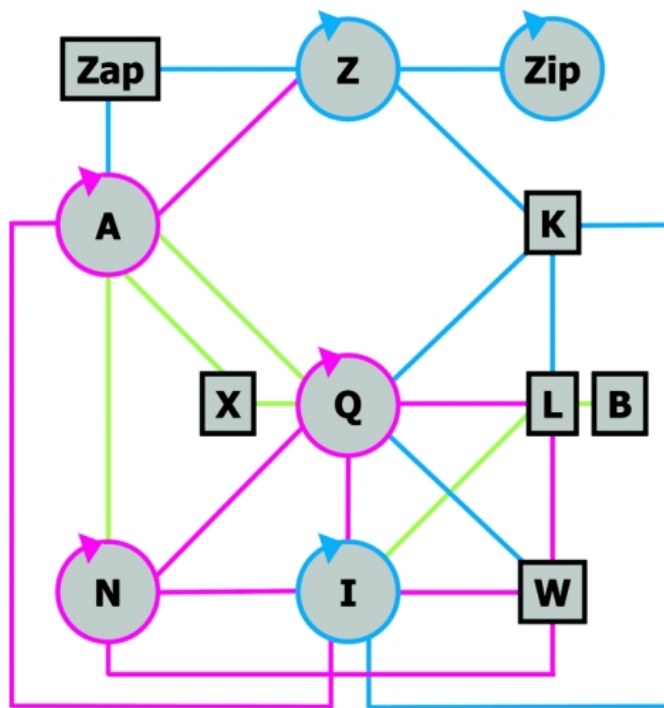


FIG. 3

Le frecce circolari indicano le self-interaction. Le linee blu rappresentano le interazioni descritte da Di Lallo et al, le linee verdi solo quelle descritte da Karimova et al., mentre quelle magenta indicano le interazioni ancora oggetto di studio.

Un'attenta analisi di questi risultati indica che esistono tre gruppi d'interazione: FtsZ, FtsA, ZipA e FtsK appartengono al primo gruppo. Queste proteine sono caratterizzate dal fatto che interagiscono con FtsZ ma non con le altre del gruppo nonostante FtsA e ZipA siano in grado di omodimerizzare. Del secondo gruppo fanno parte: FtsI, FtsN e la proteina politopica di membrana FtsW capaci di eterodimerizzare e omodimerizzare (FtsI, FtsN); FtsW inoltre interagisce con FtsL. FtsL e FtsQ, le proteine del terzo gruppo potrebbero collegare le proteine del primo gruppo a quelle del secondo. FtsL, infatti, eterodimerizza con FtsK (proteina del primo gruppo), FtsW (proteina del secondo gruppo) ed FtsQ. In accordo con questi dati FtsQ e FtsK potrebbero costituire una sorta di ponte tra il primo gruppo e il terzo gruppo di proteine.

La complessità di queste interazioni è imputabile anche alla capacità di alcune proteine della divisione, come FtsQ, di avere numerosi partners

d'interazione. FtsQ, infatti, oltre ad omodimerizzare interagisce con FtsI, FtsN, FtsL, FtsK, FtsW (Di Lallo et al., 2003 Karimova et al., 2005) e FtsB (questo lavoro). L'interazione tra FtsQ, FtsL, FtsB è stata recentemente confermata anche con metodi biochimici (Buddelmeijer e Beckwith, 2004) mentre quelle tra FtsQ e FtsI, FtsL e FtsN con ulteriori esperimenti di "Doppio Ibrido" (Karimova et al., 2005).

1.3 ASSEMBLAGGIO E CARATTERIZZAZIONE DELLE PROTEINE DI DIVISIONE A VALLE NELLA SEQUENZA LINEARE DI LOCALIZZAZIONE

FtsQ (Chen et al., 1999) è una proteina con in breve dominio N-terminale (24 amminoacidi), un singolo segmento transmembrana (25 amminoacidi) ed un grande dominio periplasmatico (227 amminoacidi) (Carson et al., 1991, Guzman et al., 1997). Essa presenta inoltre un dominio associato di trasporto (POTRA) che è funzionalmente coinvolto nelle interazioni proteiche o nel ruolo di chaperone (Sanchez-Pulido et al., 2003).

In *E. coli* FtsQ (FIG. 4) forma con le proteine FtsL ed FtsB un complesso trimerico precedente alla localizzazione (Buddelmeijer e Beckwith 2004) mentre nello *S. pneumoniae* le loro forme omologhe formano un complesso transiente durante la settazione (Noirelclerc-Savoye et al., 2005).

Delle tre proteine FtsL è la più piccola (121 amminoacidi), una proteina transmembrana di sequenza poco conservata. Il dominio N- terminale è citoplasmatico ed è coinvolto nei processi di eterodimerizzazione mentre il dominio C-terminale, mediante un motivo elica-elica, permette l'omodimerizzazione della proteina.

FtsB precedentemente denominato YgbQ è una piccola proteina bitopica di membrana (81 amminoacidi) contenente un motivo Leucine-Zipper nel dominio periplasmatico (Buddelmeijer et al., 2002). Essa forma in vivo un complesso con FtsL che in ceppi deleti per FtsQ non è in grado di stabilirsi, questa proteina infatti è in grado di coprecipitare con il suddetto complesso. Queste osservazioni suggeriscono che è necessaria la proteina FtsQ per stabilizzare il complesso FtsL-FtsB (Buddelmeijer e Beckwith, 2004) queste proteine sono dipendenti l'una dall'altra per la localizzazione ed entrambe dipendono da FtsQ.

Le altre proteine con cui interagisce FtsQ sono FtsK, FtsI, FtsW e FtsN.

FtsK una proteina multifunzionale di membrana di grandi dimensioni che possiede tre domini citoplasmatici (Errington et al., 2001) preceduti da quattro domini transmembrana che ancorano la proteina alla membrana citoplasmatica (Dorazi e Dewar, 2000). Il dominio ammino-terminale è indispensabile per la divisione cellulare (Begg et al., 1995, Yu et al., 1998, Wang e Lutkenhaus, 1998) come il dominio intermedio, il carbossi-terminale è una DNA traslocasi ATP dipendente coinvolta in due attività separate: la segregazione del nucleoide, la risoluzione dei dimeri di DNA (Bigot et al, 2004).

Sia FtsI (PBP3) che FtsW rivestono un ruolo importante nella sintesi del peptidoglicano durante la divisione. La prima è una proteina che lega la penicillina (PBP3) con attività transpeptidasica necessaria per la sintesi del peptidoglicano (Ishino e Matsushashi, 1981). La seconda è presente in tutti i batteri che hanno una parete batterica costituita da peptidoglicano (Boyle, 1997). FtsW è una proteina transmembrana coinvolta nel reclutamento della PBP3 che catalizza la reazione di formazione dei legami crociati del peptidoglicano nella parete e probabilmente anche le interazioni proteina-proteina critiche per la sintesi del peptidoglicano che costituisce il setto (Marrec-Fairley et al 2000; Mercer and Weiss 2002). Studi topologici effettuati in *E. coli* confrontati con studi svolti nello *S. pneumoniae* mostrano che la proteina FtsW è costituita da 10 eliche transmembrana un lungo loop periplasmatico ed i domini N e C- terminali entrambi citoplasmatici (Pastoret et al., 2004).

L'ultima proteina di membrana della sequenza lineare è FtsN, una proteina con un segmento N-terminale transmembrana in grado di dirigere il più grande dominio C-terminale nel sito periplasmatico di membrana. Si pensa infatti che FtsN rivesta il ruolo di ponte tra il divisoma e gli strati di peptidoglicano. Quando il divisoma costringe la membrana interna il legame degli strati di peptidoglicano con FtsN permette la costrizione anche della parete cellulare.

Nonostante il gran numero di interazioni con le altre proteine di divisione ed il suo ruolo nella localizzazione di alcune di queste, la funzione di FtsQ è ancora sconosciuta. FtsQ potrebbe essere una proteina ponte tra le componenti precoci e quelle tardive del divisoma (Di Lallo et al., 2003) o giocare un ruolo importante nella regolazione dell'assemblaggio di queste proteine nel sito di divisione e nell'attività di assemblaggio del macchinario di sintesi del peptidoglicano all'interno del divisoma (Piette et al., 2004). Studi recenti hanno ipotizzato che il dominio POTRA di FtsQ potrebbe funzionare come chaperonina che riconosce in modo specifico forme di

secrezione o di assemblaggio di questi polipeptidi. Da questi risultati si evince che FtsQ potrebbe avere un ruolo di controllo nel corretto assemblaggio del divisoma. Lo scopo della prima parte del mio dottorato è di identificare non solo il dominio di FtsQ coinvolto nell'interazione con le altre proteine di divisione, ma anche quello di capire il significato biologico di queste interazioni allo scopo di chiarire il loro assemblaggio e la loro partecipazione alla costruzione del divisoma per indagare sulla possibilità di complementare mutanti nulli per FtsQ di *Escherichia coli* con proteina ortologhe.

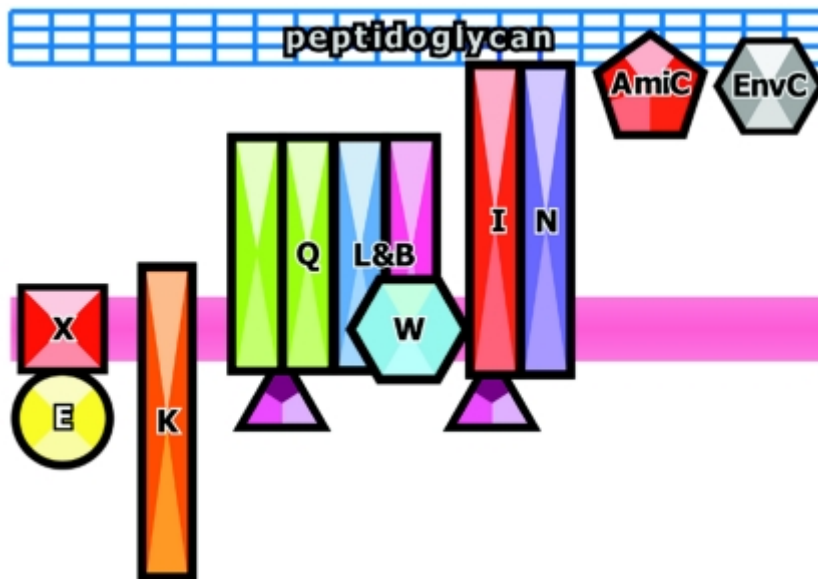


FIG. 4 Rappresentazione schematica dell'assemblaggio delle proteine tardive di divisione della loro relazione con la membrana di divisione (MAGENTA) ed il peptidoglicano (GRIGLIA BLU).

1.4 ALLINEAMENTO DEL SETTO: ASSEMBLAGGIO DELLE PROTEINE DI DIVISIONE NEI BATTERI GRAM+ COCCOIDI: *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*

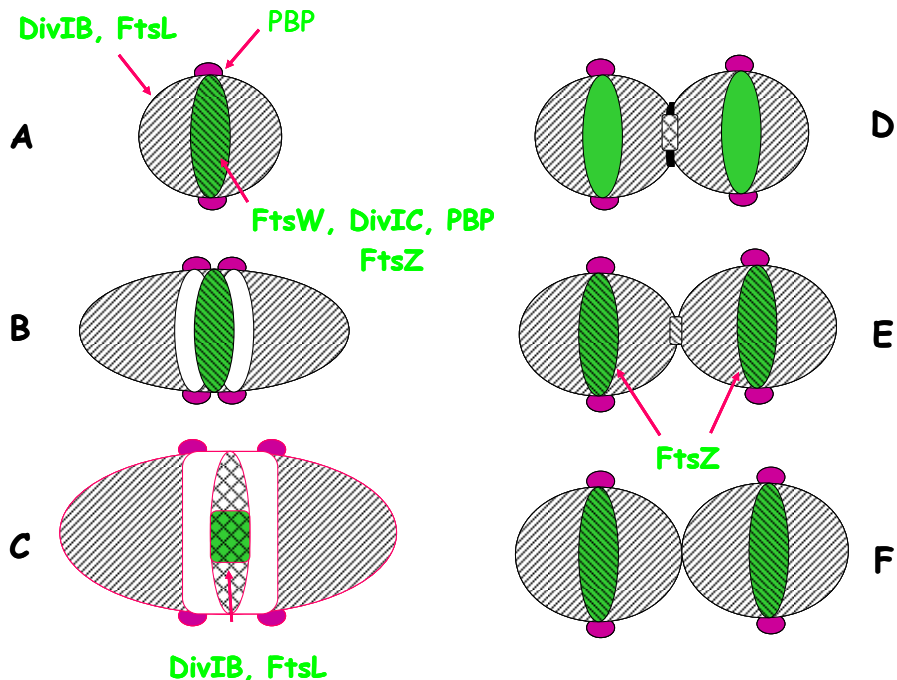
Sebbene la divisione cellulare sia il processo fondamentale della vita è ancora poco conosciuto nei batteri ed in particolare nello *Streptococcus pneumoniae*, dove solo un certo numero di proteine della divisione sono state identificate in quanto capaci di localizzarsi al centro della cellula per formare il settosoma in accordo con quanto è già da tempo noto per i batteri bastoncellari *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis* (Errington et al.,2003; Goehring et al.,2005; Vincente et al.,2006; Weiss.,2004).

Queste proteine includono quelle di divisione che danno inizio alla divisione cellulare FtsZ e FtsA ed alcune delle proteine tardive DivIB/FtsQ, DivIC/FtsB, FtsL, FtsW, PBP2X e PBP1A (Merlot et al.,2003; Noiclerc-Savoye et al.,2005) le quali costituiscono i marker settali nelle cellule dello *S. pneumoniae*. La principale differenza, infatti, nel meccanismo di divisione degli streptococchi gram+ ed i bastoncelli gram- è costituita dal parziale preassemblaggio di alcune componenti del divisoma (FtsW, DivIC, PBP) nei primi, che definiscono il sito di divisione durante tutto il ciclo cellulare a differenza dei batteri bastoncellari Gram- dove invece il sito di divisione scompare durante la fase di allungamento.

DivIB, DivIC e FtsL sono proteine essenziali nel processo di divisione e mostrano una forte interdipendenza per la loro stabilità e la loro localizzazione nello *Streptococcus pneumoniae*. Esse hanno una topologia simile costituita da un corto dominio N-terminale citoplasmatico, un segmento transmembrana ed un lungo dominio extracellulare. DivIC viene degradata in assenza di FtsL in *B. subtilis* (Daniel et al.,1998) che a sua volta è intrinsecamente instabile *in vivo* in quanto stabilizzata solo dalla proteina DivIB (Daniel e Errington.,2000). La ricostituzione *in vitro* del complesso trimetrico mostra che la dimerizzazione di DivIC con FtsL è il prerequisito per il legame di DivIB. Studi di immunofluorescenza effettuati nello *Streptococcus pneumoniae* mostrano inoltre che DivIC è sempre localizzata al centro della cellula mentre DivIB ed FtsL colocalizzano con DivIC solo durante la settazione. Nell'insieme questi dati suggeriscono che l'assemblaggio del complesso trimetrico DivIB/DivIC/FtsL è regolato durante il ciclo cellulare in funzione della formazione dell'eterodimero DivIC/FtsL FIG.5.

Nell'arco temporale corrispondente alla metà del tempo di generazione, FtsZ, DivIC, FtsW e tutte le PBP ad alto peso molecolare deputate alla

polimerizzazione del peptidoglicano della parete longitudinale sono localizzate all'equatore della cellula mentre DivIB ed FtsL si trovano principalmente localizzate nei due emisferi cellulari. Quando il nucleoide inizia a segregare l'anello equatoriale cellulare viene duplicato e nuovo peptidoglicano viene sintetizzato tra i due anelli dalle PBP che rimangono così localizzate con i due nuovi anelli equatoriali. Quando FtsZ inizia a costringersi DivIB e FtsL raggiungono il sito di divisione qui l'apparente anello costituito da DivIB, FtsL, DivIC, FtsW e le PBP deputate alla sintesi del setto trasverso si costringono insieme. FtsZ si rilocalizza nel futuro sito di divisione delle due cellule figlie mentre il processo d'invaginazione diretto dall'anello di DivIB, FtsL, DivIC, FtsW e le PBP si completa. Al termine del ciclo DivIC FtsW e le PBP rilocalizzano all'equatore delle nuove cellule con FtsZ. Da questa analisi è chiaro che DivIB, FtsL localizzano con DivIC FtsW e le PBP durante la fase di sintesi del setto ciò suggerisce che la funzione di DivIB, FtsL e DivIC potrebbe essere legata alla sintesi del peptidoglicano. Questa relazione con la parete cellulare potrebbe spiegare il numero ampiamente maggiore di molecole di DivIB nei Gram⁺ rispetto a quello dei Gram⁻ caratterizzati da una parete più sottile. FIG.5



CAP2

SCOPO

Lo studio della citochinesi nell'ambito microbiologico è un' argomento di estremo interesse. Negli ultimi anni nel nostro laboratorio si sono svolti numerosi studi tesi a capire come questo processo si estrinsechi, i protagonisti che ne fanno parte ed i processi che lo regolano, nei batteri bastoncellari Gram- come *Escherichia coli*. Grazie a questi studi abbiamo potuto chiarire come le dieci proteine di maggior rilievo nel processo di divisione di *E. coli* possano relazionarsi tra loro per costituire il complesso macromolecolare conosciuto con il nome di septosoma o divisoma (Di Lallo et al., 2001). Mediante lo studio delle interazioni contratte da queste proteine abbiamo potuto elaborare un modello sequenziale tridimensionale che descrive questo complesso multiproteico. Studi recenti hanno confermato che la maggior parte degli eventi nella settazione viene conservata nello *Streptococcus pneumoniae* anche se molte poche sono le informazioni in nostro possesso circa il processo di divisione.

Nella prima parte del mio dottorato ho affrontato uno studio comparativo riguardante la strutturazione del setto di divisione nei batteri bastoncellari Gram- *Escherichia coli* e i batteri Gram+ *Streptococcus pneumoniae* allo scopo di identificare un certo numero d'interazioni conservate nelle due specie batteriche e dunque essenziali per la divisione stessa, comprendere il loro ruolo biologico mediante la dimostrazione della capacità delle proteine ortologhe di complementare mutanti nulli di *Escherichia coli*.

La sovrapposizione delle due complesse reti d'interazione che descrivono questi complessi macromolecolari ha portato alla mia attenzione una particolare proteina che in entrambe le specie batteriche contrae ben 6 interazioni 4 delle quali vengono conservate: FtsQ. Questa proteina conserva nei due sistemi procariotici le interazioni con FtsQ, FtsW, FtsL, FtsB ed il suo ruolo fisiologico è ancora sconosciuto nei procarioti. Sulla base di queste osservazioni e delle conoscenze acquisite nel mio laboratorio circa la struttura e le proprietà della proteina FtsQ ho voluto verificare il suo pattern di interazione in *E. coli* come in *S. pneumoniae* ed esaminare la sua capacità di complementare un mutante nullo di FtsQ di *E. coli* per dimostrare il suo ruolo chiave nel processo di divisione.

PARTE SPERIMENTALE

CAP 3

MATERIALI E METODI

Premessa

Per tutti i materiali e metodi del DNA ricombinante si è fatto riferimento a: “ *Molecular cloning a laboratory manual* ” (Sanbrook, Fritsch e Maniatis, CSH laboratory press , 1989).

Per le tecniche di microbiologia generale si è utilizzato “Experimental in molecular genetics ” J. H. Miller CHS laboratory press (1972). In questa tesi verranno descritti solo i terreni e i procedimenti che si discostano da quelli di tipo standardizzato, già noti in letteratura, in quanto si ritiene possano fornire un contributo originale.

3.1 MATERIALI

3.1.1. TERRENI DI COLTURA

Per la crescita batterica sono stati utilizzati LB liquido e solido ed SM per le diluizioni batteriche come descritto da Miller (1972) con l'aggiunta degli antibiotici (Sigma): Ampicillina ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$), Cloramfenicolo ($34 \mu\text{g ml}^{-1}$) e Kanamicina ($30 \mu\text{g ml}^{-1}$).

3.1.2 CEPPI BATTERICI E PLASMIDI

I ceppi batterici, tutti derivanti da *E. coli* K 12, ed i plasmidi utilizzati in questa tesi sono riportati rispettivamente nella tabella 2 e 3 (A e B).

I plasmidi ricombinanti sono stati costruiti clonando i geni di divisione, di ripartizione del nucleotide e quelli coinvolti nella sintesi del peptidoglicano e della parete del ceppo batterico *Streptococcus pneumoniae* nei siti di restrizione Sall e BamHI dei vettori pcI_{p22} e pcI₄₃₄ TAB. 3.2. Il DNA dei geni d'interesse è stato amplificato mediante PCR utilizzando come stampo il DNA cromosomale dello *S. pneumoniae* e specifici oligonucleotidi portatori alle estremità dei compatibili siti di restrizione elencati in tabella 3.4

I geni di *Streptococcus pneumoniae* *ftsW*, *ftsZ*, *divIB* ed i geni *ftsW*, *ftsN*, *ftsK*, *ftsQ* di *E. coli* sono stati inoltre clonati nei siti di restrizione PstI e HindIII nel vettore di clonaggio pTTQ18GFP TAB. 3.3. Il DNA dei geni d'interesse è stato amplificato mediante PCR utilizzando rispettivamente come stampo il DNA cromosomale di *S. pneumoniae* e quello di *E. coli* e specifici oligonucleotidi portatori alle estremità dei compatibili siti di restrizione elencati in tabella 3.4. Allo stesso modo i geni di *S. pneumoniae* *ftsK*, *ftsL*, *divIC*, *ftsW* ed i geni *ftsQ*, *ftsI* di *E. coli* sono stati clonati nel vettore di clonaggio pBADGST mediante l'utilizzo di specifici oligonucleotidi TAB. 3.4 nei siti di restrizione Sall e HindIII.

	Genotipo	Provenienza
71/18	SupE thy Δ (lac proAB) F' (proAB lacIq lacZ Δ M15)	nostro laboratorio
71/21	71/18 glpT::OP _{434/p22} lacZ	nostro laboratorio
α DH5	SupE 44 Δ lacU169 hsdR17 recA1 endA 1 gyrA96 relA1	nostro laboratorio

TAB 3.1. CEPPI BATTERICI UTILIZZATI

	Genotipo
pcI _{p22}	Derivato di pcI32, AmpR, con il dominio N-ter del repressore del fago P22, sotto il promotore plac
pcI _{p434}	Derivato di pACY177, KcR, con il dominio N-ter del repressore del fago 434
pcIp22-FtsZ	Derivato di pcIp22 portante il gene <i>ftsZ</i>
pcIp22-FtsA	Derivato di pcIp22 portante il gene <i>ftsA</i>
pcIp22-ZapA	Derivato di pcIp22 portatore del gene <i>zapA</i>
pcIp22-DivIB	Derivato di pcIp22 portatore del gene <i>divIB</i>
pcIp22-FtsW	Derivato di pcIp22 portatore del gene <i>ftsW</i>
pcIp22-FtsK	Derivato di pcIp22 portatore del gene <i>ftsK</i>
pcIp22-FtsL	Derivato di pcIp22 portatore del gene <i>ftsL</i>
pcIp22-DivIC	Derivato di pcIp22 portatore del gene <i>divIC</i>
pcI _{p22} -ErzA	Derivato di pcI _{p22} , portatore del gene <i>erzA</i>
pcI _{p22} -PBP2X	Derivato di pcI _{p22} , portatore del gene <i>pbp2X</i>
pcI _{p22} -PBP1A	Derivato di pcI _{p22} , portatore del gene <i>pbp1A</i>
pcI _{p22} -PBP2B	Derivato di pcI _{p22} , portatore del gene <i>pbp2B</i>

pcl _{p22} -PscB	Derivato di pcl _{p22} , portatore del gene <i>pscB</i>
pcl _{p22} -MurM	Derivato di pcl _{p22} , portatore del gene <i>murM</i>
pcl ₄₃₄ -FtsZ	Derivato di pcl ₄₃₄ , portatore del gene <i>ftsZ</i>
pcl ₄₃₄ -FtsA	Derivato di pcl ₄₃₄ , portatore del gene <i>ftsA</i>
pcl ₄₃₄ -ZapA	Derivato di pcl ₄₃₄ , portatore del gene <i>zapA</i>
pcl ₄₃₄ -DivIB	Derivato di pcl ₄₃₄ , portante il gene <i>divIB</i>
pcl ₄₃₄ -FtsW	Derivato di pcl ₄₃₄ , portante il gene <i>ftsW</i>
pcl ₄₃₄ -FtsK	Derivato di pcl ₄₃₄ , portante il gene <i>ftsK</i>
pcl ₄₃₄ -FtsL	Derivato di pcl ₄₃₄ , portante il gene <i>ftsL</i>
pcl ₄₃₄ -DivIC	Derivato di pcl ₄₃₄ , portante il gene <i>divIC</i>
pcl ₄₃₄ -PBP2X	Derivato di pcl ₄₃₄ , portante il gene <i>pbp2x</i>
pcl ₄₃₄ -PBP1A	Derivato di pcl ₄₃₄ , portante il gene <i>pbp1A</i>
pcl ₄₃₄ -PBP2B	Derivato di pcl ₄₃₄ , portante il gene <i>pbp2B</i>
pcl ₄₃₄ -PBPscB	Derivato di pcl ₄₃₄ , portante il gene <i>pscB</i>
pcl ₄₃₄ -MurM	Derivato di pcl ₄₃₄ , portante il gene <i>murM</i>
pcl ₄₃₄ -ErzA	Derivato di pcl ₄₃₄ , portante il gene <i>erzA</i>

TAB. 3.2 PLASMIDI COSTRUITI PER IL DOPPIO IBRIDO

Plasmidi	Genotipo
pTTQ18-GFP	Derivato di pTTQ18, <i>lacI^q</i> , Amp ^R , portante il gene <i>GFP</i> , sotto il controllo di <i>ptac</i>
pTTQ18-GFP-FtsW _{str}	Derivato di pTTQ18-GFP portore del gene <i>ftsW</i> di <i>S. pneumoniae</i>
pTTQ18-GFP-FtsZ _{str}	Derivato di pTTQ18-GFP portante il gene <i>ftsZ</i> di <i>S.pneumoniae</i>
pTTQ18-GFP-DivIB	Derivato di pTTQ18-GFP portante il gene <i>ftsZ</i> di <i>S.pneumoniae</i>

pTTQ18-GFP-FtsW _{coli}	Derivato di pTTQ18-GFP portante il gene <i>ftsW</i> di <i>E. coli</i>
pTTQ18-GFP-FtsN _{coli}	Derivato di pTTQ18-GFP portante il gene <i>ftsN</i> di <i>E. coli</i>
pTTQ18-GFP-FtsK _{coli}	Derivato di pTTQ18-GFP portante il gene <i>ftsK</i> di <i>E. coli</i>
pTTQ18-GFP-FtsQ _{coli}	Derivato di pTTQ18-GFP portante il gene <i>ftsQ</i> di <i>E. coli</i>
pBADGST	Derivato di pBAD33 portatore del gene <i>gst</i> di scistosoma
pBADGST-FtsK _{str}	Derivato di pBAD33GST portatore del gene <i>ftsK</i> di <i>S.pneumoniae</i>
pBADGST-FtsL _{str}	Derivato di pBAD33 portatore del gene <i>ftsL</i> di <i>S.pneumoniae</i>
pBADGST-DivIC	Derivato di pBAD33 portatore del gene <i>divIC</i> di <i>S. pneumoniae</i>
pBADGST-FtsW _{str}	Derivato di pBAD33 portatore del gene <i>ftsW</i> di <i>S. pneumoniae</i>
pBADGST-FtsQ _{coli}	Derivato di pBAD33 portatore del gene <i>ftsQ</i> di <i>E.coli</i>
pBADGST-FtsI _{coli}	Derivato di pBAD33 portatore del gene <i>ftsI</i> di <i>E.coli</i>

TAB. 3.3 PLASMIDI COSTRUITI PER COIMMUNOPRECIPITAZIONI *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* E IN *E. COLI*

GENE	SEQUENZA	bp
XhoI F <i>ftsZ</i> _{st}	cgctcgagcATGACATTTTCATTTGATACAGCTG	1360
BamH R <i>ftsZ</i> _{st}	cgggatccCCACTCTCTCGATGAGCACTCA	1360

Sall F ftsA _{st}	gcgtcgaccATGGCTAGAGAAGGCTTTTTTACAG	1442
BamHR ftsA _{st}	cgggatccCTTGAGCAGCAGCTGTATCAAATG	1442
Sall F zapA _{st}	gcgtcgaccGTGAATTTTATGGCAAATCTAAAT	337
BamHR zap _{st}	cgggatccAAGACCAATAGAAGAAGGAATGA	337
Sall F erzA	gcgtcgaccTTGTTTCAAGTAAAAAAGGAGTTT	1787
BamHI R erz	cgggatccTGCTCCTCACACAATAAAATCTT	1787
Sall F ftsK _{st}	gcgtcgaccATGGCAAACAAGAATACAAGTAC	2330
BamHR ftsK _{st}	cgggatccTCCAAACTTGGAAGAAGCTATT	2330
Sall F ftsL _{st}	gcgtcgaccATGGCAGAAAAAATGGAAAAAAC	347
BamHR ftsL _{st}	cgggatccACTCTTTTTGTCCACTTCATATC	347
Sall F divIC	gcgtcgaccATGTCTAAAAATATTGTAC	369
BamHR divIC	cgggatccTCACCTTTGAATCAAGTC	369
XhoI F divIB	cgctcgagcATGTCAAAAGATAAGAAAAATGAG	1192
BamR divIB	cgggatccTGGTCACTAAATAACTATAAGAGA	1192
Sall F ftsW _{st}	gcgtcgaccATGAAGATTAGTAAGAGGCACTT	1260
BamHR ftsW _{st}	cgggatccTGAAGAGACATAAACTATCCTTT	1260
Sall F pbp2X	gcgtcgaccATGAAGTGGACAAAAAGAGTAAT	2280

BamHIR pbp2X	cgggatccATTCCAGCACTGATGGAAATAAA	2280
Sall F pbp1A	gcgtcgaccATGAACAAACCAACGATTCTGCG	2189
BamHR pbp1A	cgggatccATCACCCAGAAAAATCTGGATGA	2189
Sall F pbp2B	gcgtcgaccTTGTTTCAAGTAAAAAAGGAGTTT	2250
BamHR pbp2B _{st}	cgggatccTGGTCACTAAATAACTATAAGAGA	2250
XhoI F MurM	cgctcgagcATGTCAAAAGATAAGAAAAATGAG	1340
BamHI F MurM	cgggatccTGGTCACTAAATAACTATAAGAGA	1340
Sall F pscB	gcgtcgaccATGAAGAAAAAAATCTTAGCGTCA	1206
BamH R pscB	cgggatccAGGGCTCTATTCGAGTCCCT	1206
PstI F divIB	aactgcagATGTCAAAAGATAAGAAAAATGAG	1192
PstI R divIB	aactgcagTGGTCACTAAATAACTATAAGAGA	1192
Sall F ftsI _{coli}	gcgtcgaccATGAAAGCAGCGGCGAAAAC	1768
HindIII R ftsI _{coli}	ccaagcttTTACGATCTGCCACCTGTC	1768
Sall F ftsQ _{coli}	gcgtcgaccATGTGCAGGCTGC	831
PstI F ftsQ _{coli}	aactgcagATGTGCAGGCTGCTCTG	831
HindIII R ftsQ _{coll}	ccaagcttTCATTGTTGTTCTGCCTGTG	831
PstI F ftsW _{coli}	aactgcagATGCGTTTATCTCTCCC	1245

HindIII ftsW _{coli}	R	ccaagcttTCATCGTGAACCTCGTAC	1245
PstI F ftsN _{coli}		aactgcagGTGGCACAACGAGATTATG	1250
HindIII ftsN _{coli}	R	ccaagcttCTTGGTTACGAATACAGAGT	1250
EcoRI ftsK _{coli}	F	cggaattcgTTGAGCCAGGAATACATTG	2172
EcoRI ftsK _{coli}	R	cggaattcTCCAGCAACGCTTTCATTGG	2172

TAB. 3.4 TABELLA OLIGONUCLEOTIDI

3.2 METODI

3.2.1 CLONAGGIO DEI GENI DI STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE NEI VETTORI DI CLONAGGIO *pcI_{p434}* ED *pcI_{p22}*

I geni *ftsZ*, *ftsA*, *zapA*, *divIB*, *ftsW*, *ftsK*, *ftsL*, *pbp2X*, *pbp1A*, *pbp2B*, *pscB*, *murM*, *divIC*, *erzA* di *S. pneumoniae* amplificati con specifici oligonucleotidi riportati in tabella 3.4 sono stati clonati nei vettori di clonaggio *pcI_{p434}* e *pcI_{p22}* rispettivamente digeriti con gli enzimi di restrizione Sall o XhoI all'estremità 5' e BamHI all'estremità 3' i prodotti della reazione di ligasi sono stati trasformati nel ceppo di *E. coli* 7121 e opportunamente trattati come descritto da Miller (1972) e Sambrook (1989) **FIG. 7A 7B**. Le reazioni di PCR sono state eseguite secondo protocollo (promega) ed il programma standard di seguito descritto:

Stage	Step	Temperatura	Tempo
Denaturazione	1	94°C	3'
30 cicli	1. Denaturazione	94°C	50"
	2. Appaiamento	50°C	50"
	3. Estensione	72°C	50"
Estensione	1	72°C	3'
		22°C	50"

3.2.2 CLONAGGIO DEI GENI DI STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE FTSW, FTSZ, DIVIB ED I GENI FTSW, FTSN, FTSK, FTSQ DI E. COLI NEL VETTORE DI CLONAGGIO PTTQ18GFP

I geni *ftsW*, *ftsZ* di *VIB*, e quelli di *E. coli* *ftsW*, *ftsN*, *ftsK*, *ftsQ* amplificati con specifici oligonucleotidi riportati in tabella 3.4 sono stati clonati nel vettore di clonaggio pTTQ8GFP digerito con gli enzimi di restrizione PstI all'estremità 5' e HindIII all'estremità 3' i prodotti della reazione di ligasi sono stati trasformati nel ceppo di *E. coli* DH5 α e opportunamente trattati come descritto da Miller (1972) e Sambrook (1989). **FIG. 6**

Le reazioni di PCR sono state eseguite secondo protocollo (promega) ed il programma standard di seguito descritto:

Stage	Step	Temperatura	Tempo
Denaturazione		94°C	3'
5 cicli	1. Denaturazione 2. Appaiamento 3. Estensione	94°C 50°C 72°C	50" 50" 50"
25 cicli	1. Denaturazione 2. Appaiamento 3. Estensione	94°C 55°C 72°C	50" 50" 50"
Estensione		72°C	50"

3.2.3 CLONAGGIO DEI GENI *FTSK*, *FTSL*, *DIVIC*, *FTSW* DI *S. PNEUMONIAE* ED I GENI *FTSQ*, *FTSI* DI *E. COLI* NEL VETTORE DI CLONAGGIO PBADGST

I geni *ftsK*, *ftsL*, *divIC*, *ftsW* e quelli di *E. coli* *ftsQ* ed *ftsI* amplificati con specifici oligonucleotidi riportati in tabella 3.4 sono stati clonati nel vettore di clonaggio pBADGST digerito con gli enzimi di restrizione Sall all'estremità 5' e HindIII all'estremità 3' i prodotti della reazione di ligasi sono stati trasformati nel ceppo di *E. coli* DH5 α e opportunamente trattati come descritto da Miller (1972) e Sambrook (1989). **FIG.6**

Le reazioni di PCR sono state eseguite secondo protocollo (promega) ed il programma standard precedentemente descritto.

3.3 SAGGIO DEL DOPPIO IBRIDO PROCARIOTICO

Il metodo del doppio ibrido procariotico, messo a punto nel nostro laboratorio (*Di Lallo et al. 2001*, *Di Lallo et al. 2003*), si è dimostrato un potente strumento per l'identificazione e lo studio delle interazioni intracellulari proteina-proteina e per mappare i domini richiesti per le varie associazioni. Nel ceppo di *E. coli* 7121 un promotore chimerico formato dagli emisiti dei fagi 434 e p22 è posto a monte del gene reporter lacZ che controlla la sintesi della β -galattosidasi. Questo promotore può essere riconosciuto e legato solo da un repressore ibrido in cui ogni monomero, è costituito da un dominio N-term del repressore dei fagi p22 e 434 e da un dominio C-term formato dalle proteine di cui si vuole saggiare l' interazione, pù. Se le proteine sono in grado d'interagire si formerà un repressore ibrido funzionale *in vivo* capace di legare l'operatore ibrido p22-434 e bloccare la sintesi della β -galattosidasi.

L'attività della β -galattosidasi è stata misurata come descritto da Miller (1972), ogni ceppo è stato confrontato con il ceppo parentale privo di plasmidi o portatore di uno solo dei due vettori. **FIG. 8**

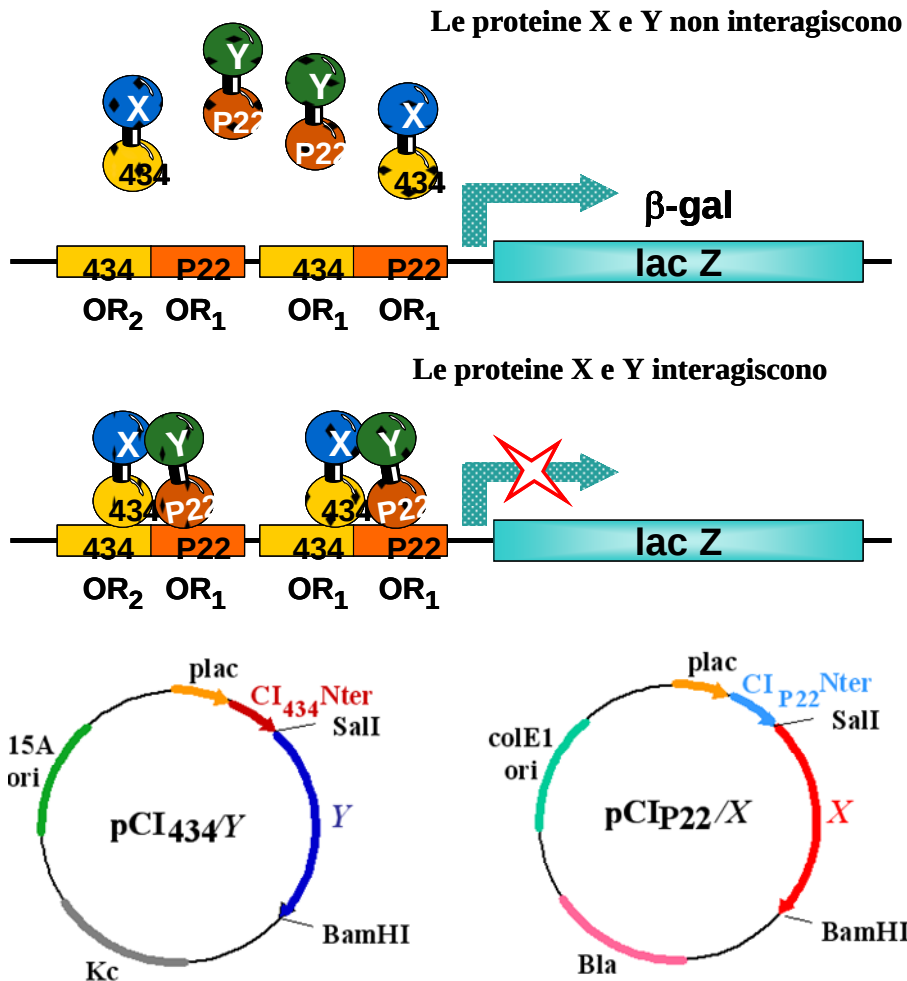


FIG. 8. Rappresentazione schematica del saggio di doppio ibrido. gene reporter.

3.4 PREPARAZIONE DEGLI ESTRATTI PER GLI ESPERIMENTI DI COIMMUNOPRECIPITAZIONE

Culture del ceppo batterico DH5α cotrasformate rispettivamente con i plasmidi contenenti i geni delle proteine in esame fuse alla GST ed alla GFP o alla GFP ed al cI, sono state cresciute in LB ed antibiotici fino alla densità ottica $OD_{600}=0.3-0.4$. Il gene di fusione viene indotto con 1×10^{-4} M PTG

(per le fusioni co GFP o cI) e 0.2% di arabinosio (per le fusioni con GST) per 4 ore. Le colture vengono quindi centrifugate, il pellet risospeso in 1/300 v/v di buffer di lisi (EDTA 1mM pH 8, HEPES 25 mM pH 7.6, 0,1 mg/ml lysozima) viene lasciato in ghiaccio 30 min.

Le frazioni di membrana sono state preparate come descritto da Buddelmeijer e Beckwith (2004).

La frazione solubile è stata preparata centrifugando il campione a 50,000g per 45 minuti e recuperando il supernatante.

3.5 ESPERIMENTI DI COIMMUNOPRECIPITAZIONE

Gli esperimenti di coimmunoprecipitazione sono stati eseguiti come descritto da Duong e Wickner (1997) mentre la concentrazione della proteina determinata con il metodo Bradford.

Le beads (Proteina A-Sepharosio) sono state divise in aliquote da 50-100µl e trasferite in provette Eppendorf; in ogni provetta sono stati aggiunti 10µl dell'anticorpo monoclonale di topo anti GFP diluizione 1/100 o dell'anticorpo monoclonale di topo anti GST diluizione 1/100. I campioni sono stati incubati per 15-60 minuti a temperatura ambiente, centrifugati e lavati con 1 ml di washing buffer (20 mM HEPES buffer pH 7,5, 150 nM NaCl; 0,1% Triton X-100 e 10% glicerolo) in ogni eppendorf è stato poi aggiunto 0,1-1 ml di lisato cellulare corrispondente a circa un mg di proteina. Successivamente i campioni sono stati incubati a 4°C in agitazione da 90 minuti ad o.n. I complessi immunoprecipitati riuniti mediante centrifugazione a 3,000g per 2 minuti a 4°C sono stati poi sottoposti a western blotting.

3.6 WESTERN BLOTTING

La corsa elettroforetica e l'immunoblotting sono stati eseguiti rispettivamente come descritto da Laemmli (1970) e Towbin et al., (1979). Il western blotting è stato eseguito utilizzando anticorpi policlonali di coniglio anti cI diluizione 1:6000 o anticorpi monoclonali di topo anti GST diluizione 1:1000 o anticorpi monoclonali di topo anti GFP diluizione 1:6000 a seconda della proteina di fusione da rilevare ed analizzato in ECF (Amersham Pharmacia).

Per la quantificazione della proteina FtsQ nel ceppo JOE 170 è stato utilizzato l'anticorpo anti FtsQ. L'antisiero contro FtsQ (MV J11) gentilmente messo a disposizione da M. Vincente è stato preassorbito sul

ceppo VIP210 come descritto da Dopazo et al.,(1992) a in seguito purificato come descritto da Sherman e Goldberg (1992).

3.7 COMPLEMENTAZIONE DEL CEPPO JOE 170

Il ceppo JOE170 trasformato il vettore ricombinante $pcI_{p22}DivIB$ cresciuto in agitazione, o.n, in LB arricchito dello 0,2% di arabinosio e 50 $\mu g/ml$ di ampicillina viene successivamente centrifugato e risospeso in SM. Dopo un'ora d'incubazione le cellule vengono piastrate i presenza ed in assenza di di arabinosio allo scopo di determinare le unità formanti colonia (c.f.u). Viene inoltre calcolata l'efficienza di piastramento (e.o.p) corrispondente al rapporto tra il titolo batterico in LB e il titolo batterico in LB più arabinosio

3.8 QUANTIFICAZIONE DELLA PROTEINA FTSQ NEL CEPPO JOE170/PQ E JOE170/PQ $PCI_{22}DIVIB$ IN ASSENZA DI ARABINOSIO

Il ceppo JOE170/pQ viene cresciuto in LB + Arabinosio fino $OD_{600}=0.3$. Un 'aliquota viene prelevata e risospesa in SM senza arabinosio dopo un' ora viene effettuato il primo prelievo e preparato il primo estratto cellulare. Successivamente un'aliquota viene inoculata in LB senza arabinosio ogni ora viene effettuato un prelievo per la preparazione dell'estratto cellulare.

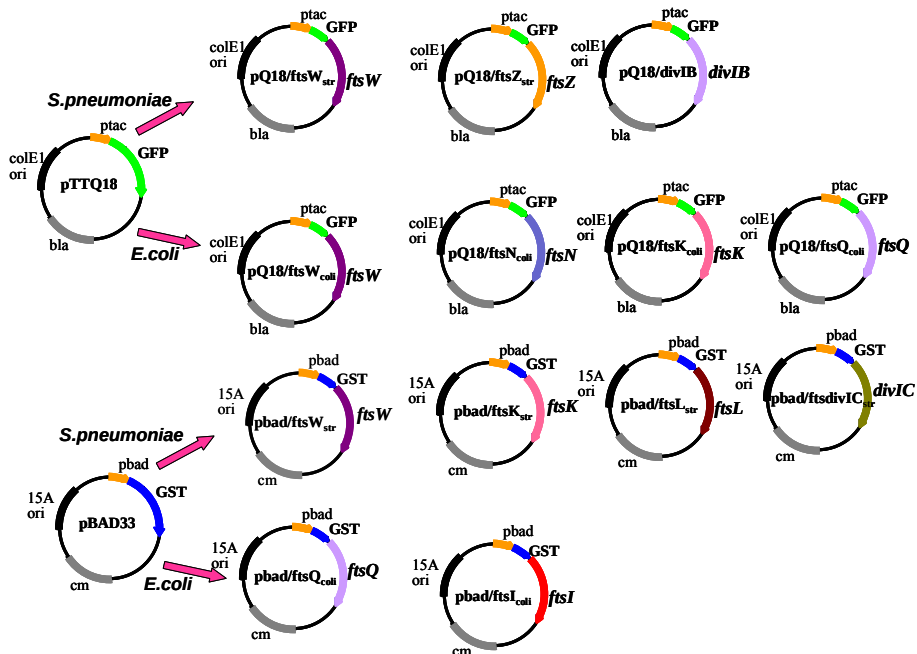
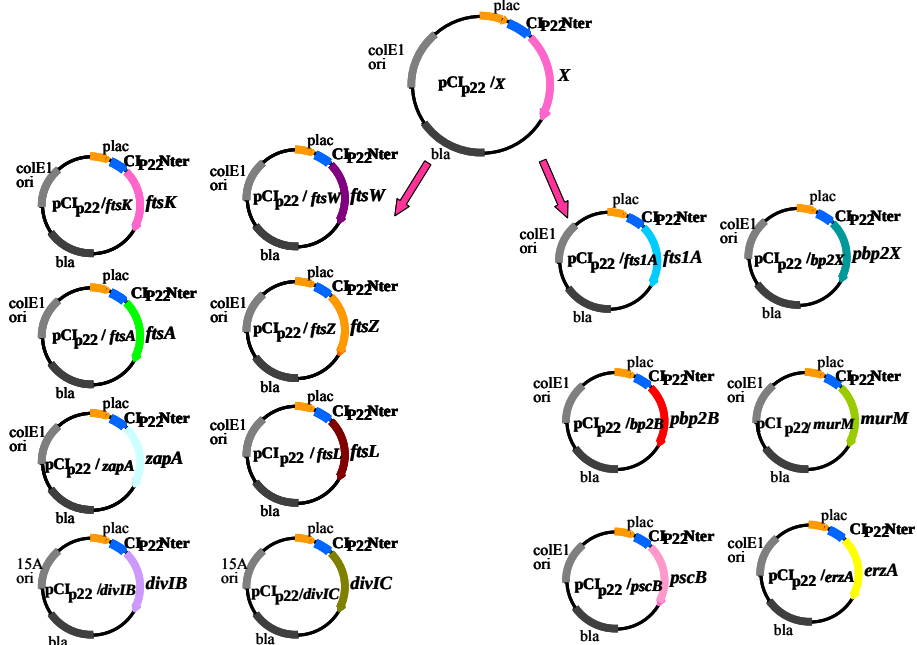


FIG. 6 FIG.7 A Vettori pTTQ18 e pBAD33 pCI₂₂



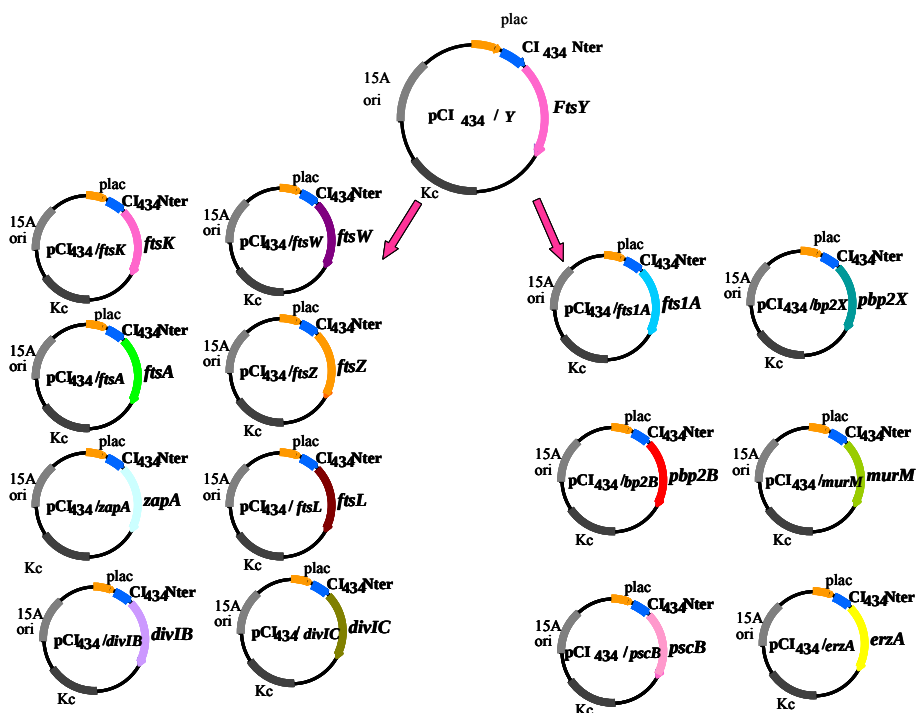


FIG. 7B Vettori *pCI₄₃₄*

CAP 4

RISULTATI

RISULTATI

L'analisi della fitta rete d'interazioni che si instaura durante il processo di formazione del setto di divisione nel sistema procariotico *S. pneumoniae* è descritta nella tabella 4.1. Ogni singola coppia proteica e quindi ogni singola interazione viene analizzata nel “Two-phages” (Sistema del doppio ibrido procariotico) utilizzando entrambi i sistemi vettoriali, e ripetuta in tre esperimenti indipendenti.

4.1 ANALISI E CONFRONTO DELLE INTERAZIONI PROTEINA-PROTEINA NEL SISTEMA PROCARIOTICO *E.COLI* e *S.PNEUMONIAE*

La tabella 4.1 raccoglie tutti i dati che sono necessari per dare un più chiara lettura del meccanismo e dell'ordine di assemblaggio delle proteine coinvolte nella divisione, durante il ciclo cellulare. Infatti se ci soffermiamo sui soli valori d'interazione che interessano le proteine di divisione del setto possiamo ricavare un sottotabella TAB 4.2 che se messa a confronto con quella ricavata da precedenti studi effettuati nel nostro laboratorio TAB. 4.3 evidenzia delle similitudini e delle diversità importanti.

Ben 10 interazioni vengono mantenute nei due sistemi batterici non strettamente correlate TAB. 4.4 quattro delle quali interessano la proteina FtsQ che sembra quindi avere un ruolo chiave nel processo di divisione. Le interazioni specie specifiche più significative riscontrate nello streptococcus pneumoniae TAB 4.4: FtsZ-DivIC, FtsW-DivIC, FtsZ-FtsK, FtsK-FtsW, FtsL-FtsZ sono state inoltre confermate mediante Coimmunoprecipitazione per avvalorare i dati ottenuti mediante il saggio genetico del Two-phages anche con saggi biochimici FIG 4.1.

Sull'analisi delle sequenze di localizzazione ricavate da nostri precedenti studi sull' *E. coli* e di quelle ricavate per sovrapposizione dal *coli* per lo *streptococcoccus pneumoniae* integrate con i dati riportati in Tab. 4.1 possiamo elaborare il sottostante il modello descrittivo di assemblaggio FIG. 4.2. Dall'immagine si evince come il modello descrittivo di assemblaggio nonostante il gran numero di similitudini nella sequenza lineare di reclutamento sia ben diverso nelle due specie batteriche. Nell' *Escherichia coli*, dove il sito di divisione non è ben definito durante tutta la fase di allungamento e tutto il macchinario di divisione si assembla solo poco prima dalla formazione del setto di divisione, il modello ha una struttura più allungata coerentemente con la morfologia bastoncellare del batterio FIG

4.3. Nello streptococcus pneumoniae, dove il sito di divisione è sempre ben definito e durante tutto il ciclo di divisione con parte del macchinario di divisione preassemblato, il modello appare più globulare come la sua stessa morfologia coccoide FIG.4.3.

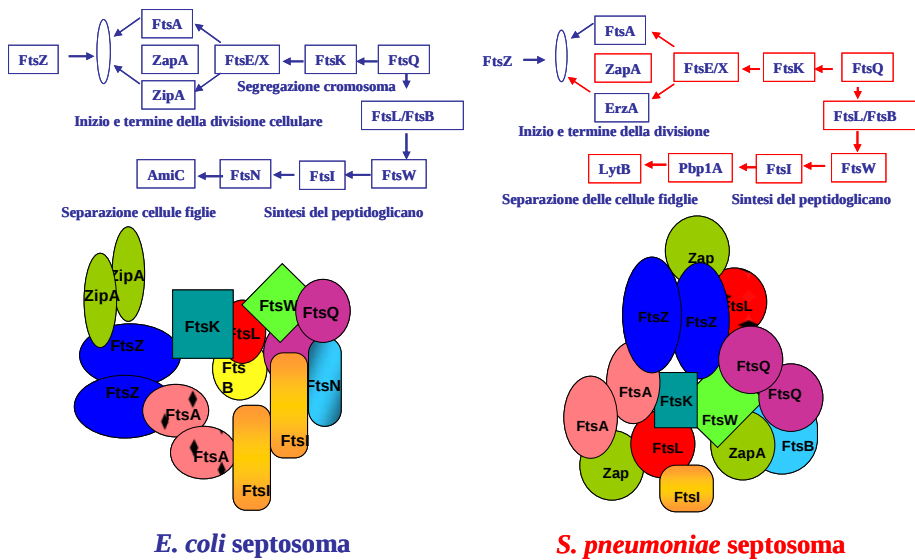


FIG 4.2 Sequenza di reclutamento e modello descrittivo delle proteine di divisione nell' *E. coli* e nello *S. pneumoniae*

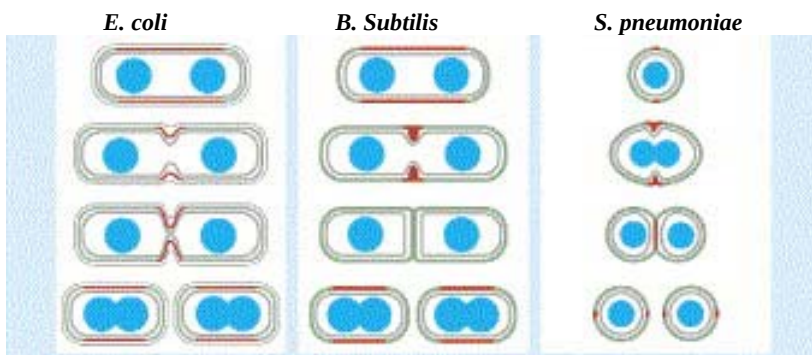


FIG 4.3 Citokinesi in *E. coli*, *B. subtilis*, *S. pneumoniae* in rosso è riportata la crescita del peptidoglicano longitudinale e trasverso

E' possibile che quando molte proteine formano un complesso solo alcune interazioni siano essenziali, mentre altre, sebbene partecipino alla formazione del complesso, siano solo dispensabili. Il loro ruolo potrebbe essere quello di stabilizzare la struttura di cui sono parte integrante. Inoltre è possibile che alcune interazioni siano dovute solamente alla contiguità tra queste proteine nel complesso. Un possibile approccio a questo problema potrebbe essere quello di determinare se sia possibile sostituire *in vivo* i singoli componenti d'un complesso multiproteico con proteine ortologhe di altri batteri conservando la vitalità della cellula.

4.2 RUOLO E FUNZIONE DELLA PROTEINA FTSQ E DEL SUO ORTOLOGO DIVIB DI STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE:

Dall'analisi dei dati precedentemente mostrati appare chiaro che un ruolo di grande importanza nei due sistemi cellulari è rivestito dalla proteina FtsQ, che mantiene inalterato la formazione del trimero FtsQ-FtsB-FtsL nello *S. pneumoniae* quanto nell'*E. coli*: Lo studio più particolareggiato risultante in una fine dissezione della proteina FtsQ portato avanti nel nostro laboratorio e teso a definire

- a) I domini della proteina FtsQ coinvolti nell'interazione con le altre proteine di divisione
- b) Il ruolo fisiologico delle interazioni descritte tra FtsQ e i suoi partner d'interazione

mostra che le interazioni sono tutte localizzate nel dominio periplasmatico della proteina e che quest'ultimo può essere suddiviso in tre sottodomini come mostrato in FIG: 4.4. Nel dominio compreso tra i residui aminoacidici 49-136 sono localizzate le interazioni con FtsQ, FtsI, FtsW, FtsN, in quello compreso tra i residui 136-202 è localizzata la sola interazione con la proteina FtsB, nel dominio compreso tra i residui 202-277 sono localizzate le interazioni con ftsK, FtsL e di nuovo quelle con ftsQ, FtsI, FtsN. La mia analisi di coimmunoprecipitazione conferma i dati precedentemente descritti FIG.4.5. Un'analisi più dettagliata poi, ha rivelato che il frammento costituito dai residui 1-57 è necessario e sufficiente per l'interazione con la proteina intera ftsQ come mostrato anche per coimmunoprecipitazione FIG.4.6. La perdita dei soli residui aminoacidici 49-57 causa l'incapacità della proteina FtsQ di complementare in mutante Δ FtsQ JOE170pQ. I domini d'interazione definiti mediante metodologie genetiche sono perfettamente sovrapponibili a quelli definiti da studi della struttura

tridimensionale della proteina ortologa DivIB di *Geobacillus stearothermophilus* di recente risolta (Robson e King 2006).

In quest'ottica, abbiamo studiato la complementazione del mutante $\Delta ftsQ$ di *E. coli* (Joe170/pQ) con la proteina ortologa DivIB di *S. pneumoniae*

4.3 COMPLEMENTAZIONE DEL MUTANTE $\Delta FTSQ$ DI *E. COLI* CON L'ORTOLOGO DIVIB DI *S. PNEUMONIAE*

La forte omologia strutturale come la capacità di FtsQ di formare *in vivo* un complesso fortemente stabile con le proteine FtsL e FtsB tanto nel *coli* quanto nello *streptococco* conduce alla possibilità che l'ortologo DivIB di *streptococcus pneumoniae* possa avere una pari efficacia nella complementazione del mutante nullo per FtsQ, come nell'interazione con corrispondenti partner ftsL ed ftsB di *E. coli*. In questo caso potremmo identificare i domini proteici conservati durante l'evoluzione e dunque il minimo comune divisore nel processo di divisione cellulare procariotico.

La mia analisi delle interazioni" della proteina DivIB mediante l'utilizzo del "Two phages con i rispettivi partner di *E. coli* riassunto in TAB. 4.5 mostra che le uniche interazioni intra-specie mantenute sono quelle contratte con la proteina FtsI e la proteina FtsQ nessuna interazione è conservata nel trimetro funzionale FtsQ-FtsL-FtsB. Questi sono stati da me confermati anche per coimmunoprecipitazione FIG. 4.7. Sorprendentemente nonostante l'incapacità d'interagire con i partner di FtsQ, DivIB è in grado di sostenere la crescita del mutante $\Delta JOE170pQ$. A tale scopo ho trasformato il vettore di clonaggio in cui il gene selvatico *divIB* è posto sotto il controllo del promotore plac nel ceppo JOE170/pQ ed ho analizzato la sua capacità di sostenere la crescita in funzione del tempo. L'ortologo è in grado di sostenere la crescita del ceppo JOE170/pQ nelle prime due ore di crescita come mostra il grafico di FIG:4.8. Per dimostrare che la complementazione fosse dovuta effettivamente all'espressione dei soli geni d'interesse e non ad una fuga d'espressione de gene selvatico ho eseguito un western blotting utilizzando l'anticorpo anti FtsQ. Come si vede nella FIG 4.9 la proteina FtsQ wt è presente nell'estratto cellulare solo al To già nella prima ora di crescita questa non è più presente nell'estratto cellulare. Ho inoltre analizzato l'efficienza di piastramento misurato come rapporto tra il **titolo batterico in LB/titolo batterico in LB+ara** del ceppo JOE170/pQ, JOE170/pQ, pcI₂₂FtsQ e pcI₂₂DivIB. I risultati ottenuti riportati in TAB. 4.6 mostrano che l'efficienza di piastramento del mutante nullo dell'ordine di 10^{-6} viene aumentata fino ad un valore pari a 10^{-1} se espresso il gene *divIB*

alla concentrazione d'induttore (IPTG) 1×10^{-3} . Questi risultati suggeriscono che DivIB potrebbe localizzare nell'*E. coli* al livello dello Z-ring senza interagire con le proteine con le quali FtsQ contrae interazione normalmente in *E. coli*.

	DivIV A	FtsA	FtsZ	ZapA	EzrA	DivIB	FtsW	FtsK	FtsL	Pbp2X	Pbp1A	Pbp2 B	PscB	Mur M	FtsB
DivIV A	7%														
FtsA	23%	19%													
FtsZ	15%	22%	18%												
ZapA	7%	9%	5%	n.t.											
EzrA	37%	35%	23%	80%	70%										
DivIB	30%	58%	16%	5%	43%	30%									
FtsW	45%	53%	36%	27%	43%	40%	55%								
FtsK	27%	31%	13%	38%	48%	55%	36%	43%							
FtsL	23%	20%	9%	14%	41%	15%	20%	35%	26%						
PBP2X	58%	84%	54%	55%	48%	80%	97%	78%	24%	n.t.					
PBP1A	73%	73%	53%	55%	56%	35%	53%	84%	30%	86%	100%				
PBP2B	67%	100%	18%	25%	42%	96%	53%	100%	17%	100%	52%	84%			
PscB	14%	84%	59%	13%	40%	98%	58%	99%	71%	73%	100%	55%	92%		
MurM	45%	50%	18%	n.t.	51%	50%	64%	62%	93%	57%	84%	39%	98%	100%	
FtsB	38%	71%	18%	17%	46%	35%	35%	53%	53%	70%	67%	37%	100%	70%	50%

TAB. 4.1 I valori percentuale di attività residua di B-galattosidasi riportati in questa tabella sono il risultato della media ponderata di cinque esperimenti indipendenti per i quali viene calcolata anche la deviazione standard qui non riportata per non appesantire la tabella. I valori in rosso inferiori alla soglia stabilita del 50% indicano valori positivi d'interazione . I valori in nero superiori al 50% indicano invece l'assenza d'interazione. I valori in blu indicano interazioni per le quali non possiamo definire nulla in quanto molto prossime al valore soglia del 50%

Streptococcus pneumoniae

	FtsA	FtsZ	ZapA	FtsQ/ DivIB	FtsW	FtsK	FtsL/ YIID	PBP2 X	FtsB
FtsA	19%								
FtsZ	22%	18%							
ZapA	9%	5%	nt						
FtsQ/DivIB	58%	16%	5%	30%					
FtsW	53%	36%	27%	40%	55%				
FtsK	31%	13%	38%	55%	36%	43%			
FtsL/YIID	20%	9%	14%	15%	20%	35%	26%		
PBP2X (FtsI)	84%	54%	55%	80%	97%	78%	24%	nt	
FtsB	71%	18%	17%	35%	35%	61%	53%	70%	50%

Escherichia coli

	FtsA	FtsZ	ZapA	FtsQ/ DivIB	FtsW	FtsK	FtsL/ YIID	PBP2 X	FtsB
FtsA	13%								
FtsZ	25%	17%							
ZapA	32%	29%	nt						
FtsQ/DivIB	82%	84%	100%	23%					
FtsW	93%	92%	77%	24%	90%				
FtsK	90%	34%	96%	40%	87%	35%			
FtsL/YIID	99%	88%	65%	33%	35%	38%	95%		
PBP2X (FtsI)	26%	100%	66%	32%	26%	39%	89%	39%	
FtsB	85%	90%	nt	36%	63%	67%	27%	30%	nt

TAB: 4.2 4.3 Confronto tra i valori d'interazione delle sole proteine di divisione nei due sistemi procariotici in esame *E. coli* e *S. pneumoniae*

INTERAZIONI CONSERVATE	INTERAZIONI SPECIE-SPECIFICHE	
FtsZ-FtsZ	<i>E. coli</i>	<i>S.pneumoniae</i>
FtsZ-FtsA	FtsK-FtsQ	FtsQ-FtsZ
FtsZ-FtsK	FtsI-FtsA	FtsW-FtsZ
FtsQ-FtsQ	FtsI-FtsQ	FtsK-FtsA
FtsQ-FtsW	FtsI-FtsW	FtsK-FtsW
FtsQ-FtsL	FtsL-FtsB	FtsL-FtsA
FtsQ-FtsB	FtsI-FtsB	FtsL-FtsZ
FtsK-FtsK		FtsL-FtsL
FtsL-FtsW		FtsI-FtsL
FtsL-FtsK		FtsB-FtsZ
		FtsB-FtsW

TAB. 4.4 Interazioni conservate e specie specifiche in *E. coli* e *S pneumoniae*

DivIB	% Residual β -galactosidase activity								
	FtsZ	FtsA	FtsB	FtsN	FtsK	FtsL	FtsW	FtsQ	FtsI
	63%	98%	85%	95%	65%	100%	100%	23%	29%

TAB- 4.5 Analisi delle interazioni della proteina DivIB con le proteine partner di FtsQ in *E. coli*. Anche qui i valori % dell'attività residua di B-galattosidasi sono trattati come

Ceppo	Efficienza di piastramento
JOE170 pQ	1.2×10^{-6}
JOE170 pQ/ pcl_{p22} -ftsQ	1
JOE170 pQ / pcl_{p22} -divIB	$\sim 1 \times 10^{-1}$

TAB. 4.6 Efficienza di piastramento espressa come titolo batterico in LB/ titolo batterico in LB e arabinosio.

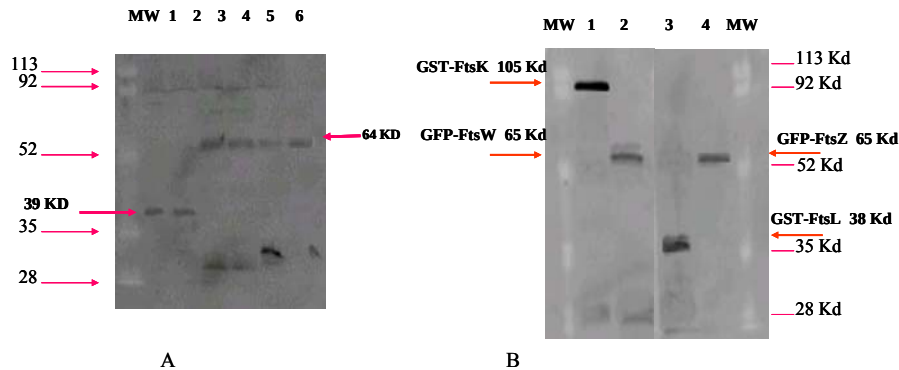


FIG. 4.1 A) Protein extracts were precipitated with anti-GFP and hybridized with anti GST antibodies LANE 1) GFP-FtsZstr GST-DivIC LANE 2) GFP-FtsWstr GST-DivIC LANE 3) GFP-FtsZstr GST-FtsWstr Protein extracts were precipitated with anti-GST and hybridized with anti GFP antibodies LANE 4) GFP-FtsZstr GST-DivIC LANE 5) GFP-FtsWstr GST-DivIC LANE 6) GFP-FtsZstr GST-FtsWstr

FIG. 4.1 B) Proteins extracts were precipitated with anti GFP (lane 1, 3) or anti GST (lane 2,4): LANE 1) Coip GST-FtsK GFP-FtsW detected with anti GST LANE 2) Coip GST-FtsK GFP-FtsW detected with anti GFP LANE 3) Coip GST-FtsL GFP-FtsZ detected with anti GST LANE 4) Coip GST-FtsK GFP-FtsW detected with anti GFP

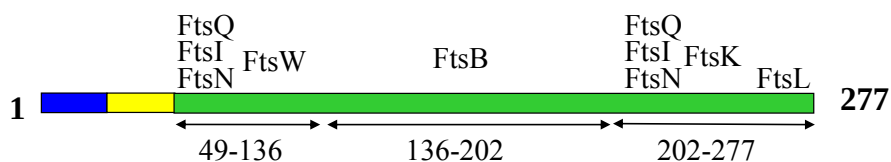


FIG. 4.4 Dissezione del solo dominio periplasmatico della proteina ftsQ nei tre sottodomini essenziali per le interazioni proteiche

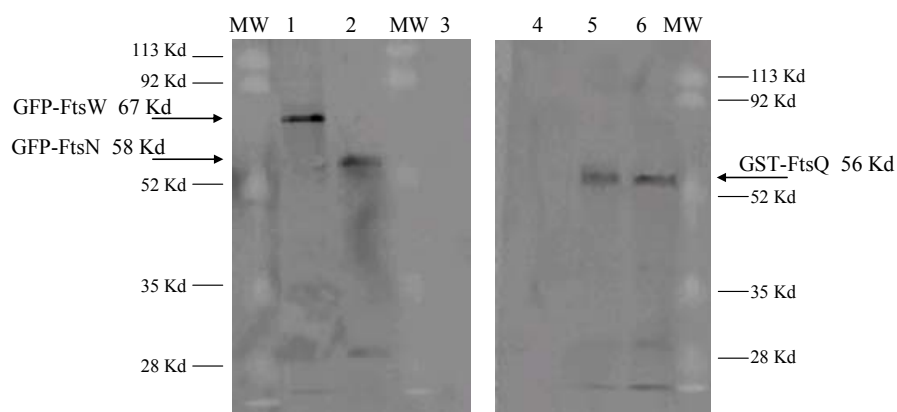


FIG. 4.5 Gli estratti proteici sono stati immunoprecipitati con anticorpi anti-GST (a sinistra) and anti-GFP (a destra). LANES 1 and 5: Coip GFP-FtsW GST-FtsQ ibridati rispettivamente con anti-GFP (lane 1) and anti-GST (lane 5) LANES 2 and 6: Coip GFP-FtsN GST-FtsQ ibridati rispettivamente con anti-GFP (lane 2) and anti-GST (lane 6) LANE 3: Western blotting di GST-FtsQ ibridato con anticorpi anti-GFP antibodies LANE 4: Western blotting of GFP-FtsN ibridato con anticorpi anti-GST

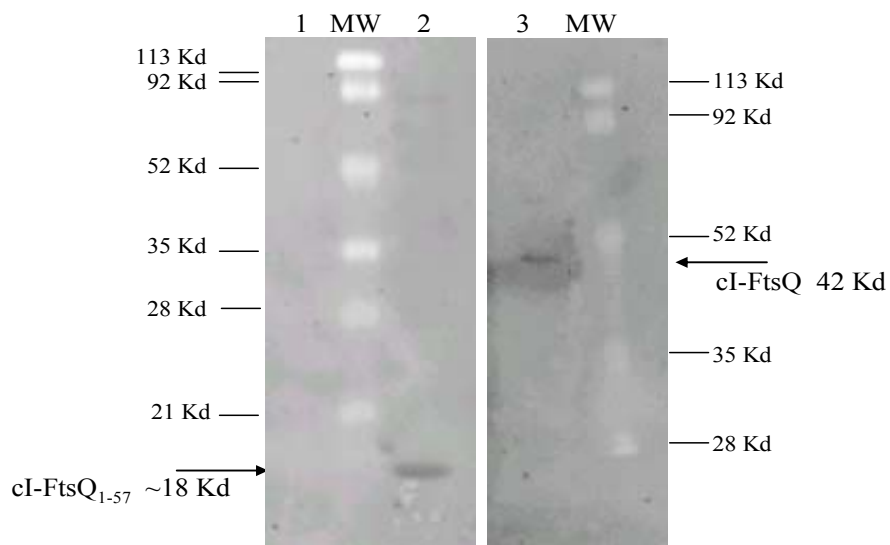


FIG:4.6 Gli estratti proteici sono stati precipitati con anticorpi anti-GFP o anti CI LANE 1: Western blotting di GFP-FtsQ ibridato con anticorpi anti-cI LANE 2: Coip cI-FtsQ₁₋₅₇ GFP-FtsQ ibridato con anticorpi anti cI LANE 3: Coip cI-FtsQ GFP-FtsQ₁₋₅₇ ibridato con anticorpi anti-cI

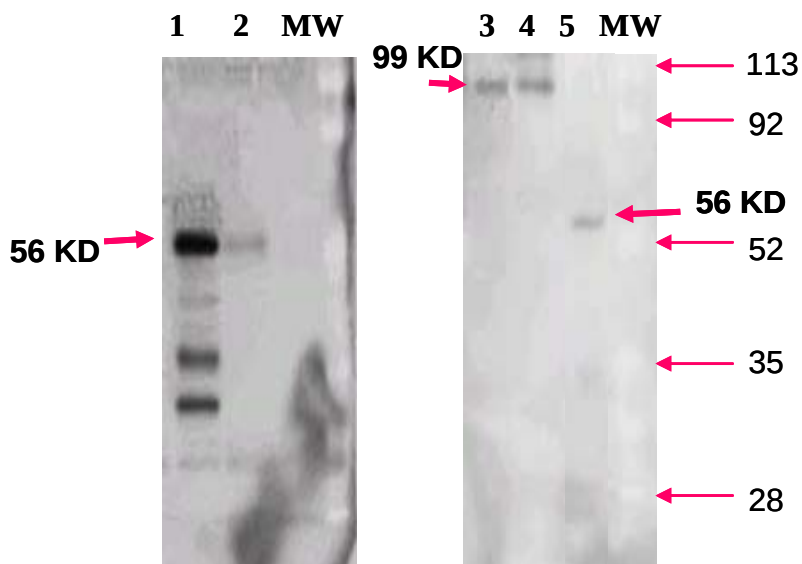
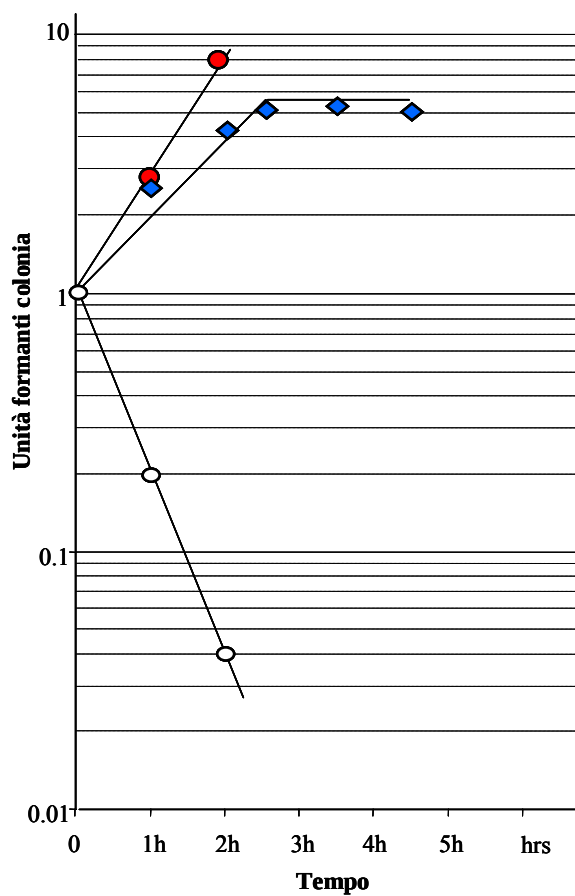


FIG. 4.7 Estratti proteici sono immunoprecipitati con anticorpi anti GFP e ibridati anticorpi anti GST LANE 1) GFP-FtsI GST-DivIB LANE 2) GFP-FtsI GST-FtsQ Estratti proteici immunoprecipitati con anticorpi anti-GST ed ibridati con anticorpi anti GFP LANE 3) GFP-FtsI GST-FtsQ LANE 4) GFP-FtsI GST-DivIB LANE 5) GFP-FtsQ GST-DivIB



◆ JOE170pQ pcI₂₂Div1B ○ JOE170pQ ● JOE170pQ pcI₂₂FtsQ

FIG 4.8 I ceppi batterici sono cresciuti in LB + ara a 37°C fino ad OD₆₀₀=0.2. Ad intervalli regolari, aliquote sono piastrate su piastre di LB + ara. I valori riportati corrispondono alla normalizzazione sul T=0.

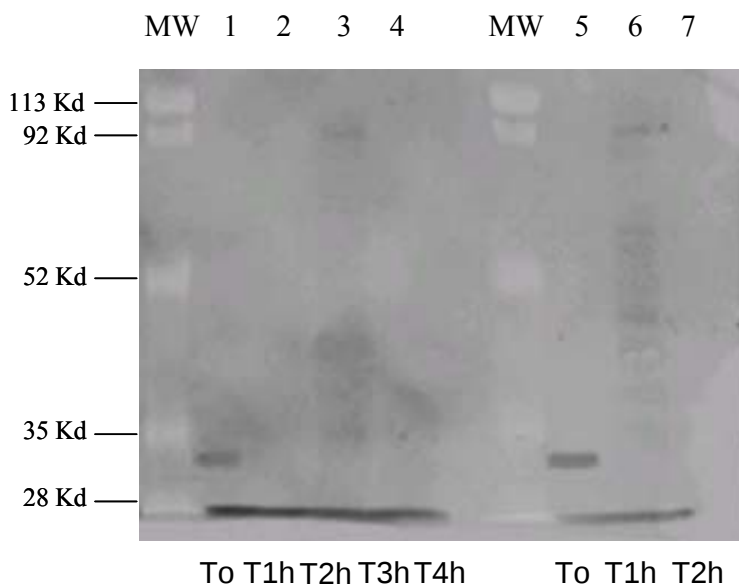


FIG. 4.9 L'estratto proteico dei ceppi JOE170/pQ e JOE170/pQ pcI₂₂DivIB sono stati analizzati mediante Western blotting con anticorpi anti FtsQ: Lane 1: in presenza di arabinosio (T=0 of the experiment) Lane 2: dopo un'ora dalla risospensione in SM senza arabinosio Lanes 3 and 4: dopo la risospensione in LB senza arabinosio a(T=2 ore T=3 ore e T=4 ore)

Lo stesso esperimento è stato ripetuto per il ceppo JOE170/pQ trasformato con il vettore pcI₂₂DivIB Lane 5: in the presence of arabinose (T=0 dell'esperimento) Lane 6: dopo 1 ora dalla risospensione in SM senza arabinosio Lanes 7: dopo la risospensione in LB senza arabinosio (T=2 ore)

CAP5 CONCLUSIONI

Il macchinario di divisione procariotico è un complesso multiproteico di grande fascino e interesse, capire come questo si forma, le componenti che lo caratterizzano e i processi che lo regolano porterebbe ad un'enorme passo avanti nella conoscenza del mondo microbico.

Nell'*Escherichia coli* il divisoma è costituito da 10 proteine estremamente conservate tra i procarioti (Margolin, 2000; Weiss, 2004; Vincente et al, 2006). Sebbene ognuna di esse sia essenziale, il ruolo e l'attività biochimica per la maggior parte di queste rimane ancora sconosciuta. Il mio lavoro di dottorato in cui viene analizzata la fitta rete d'interazioni che intercorre tra le proteine di divisione nello *Streptococcus pneumoniae* e nell'*Escherichia coli* mostra che un certo numero d'interazioni rimangono conservate nei due sistemi cellulari, questo indica certamente che esiste un minimo comune divisore nel tanto complesso processo di divisione. L'elaborazione dei dati raccolti in tabella 4.1 mi ha permesso di teorizzare un modello tridimensionale FIG. 4.2 in cui il complesso multiproteico assume una struttura globulare che richiama alla mente la morfologia batterica coccoide oltre che la sua proprietà di essere parzialmente preassemblato durante la divisione cellulare. Diversamente nel *Coli* batterio bastoncellare in cui l'apparato di divisione subisce cicli di assemblaggio e disassemblaggio, la morfologia del complesso appare più distesa e lineare. Nonostante ciò molte interazioni nelle due specie vengono conservate dall'evoluzione, ciò ad indicare che potrebbero essere essenziali e dunque necessarie e sufficienti per la divisione. L'analisi delle interazione intra-specie conservate può permetterci di definire le interazioni fondamentali e dunque le proteine chiave nel processo di divisione, possibili bersagli per nuovi antibiotici. Determinare infatti, se sia possibile sostituire *in vivo* i singoli componenti d'un complesso multiproteico con proteine ortologhe di altri batteri conservando la vitalità della cellula, ci permette di capire il ruolo biologico di ogni singolo componente

La proteina che da una prima analisi dei dati mostra avere le caratteristiche sopra descritte è la proteina FtsQ. Questa mostra un'elevata omologia strutturale tra lo *S. pneumoniae* e l'*Escherichia coli* inoltre conserva nelle due specie ben quattro delle sue sei interazioni fondamentali. La fine dissezione della proteina in *Escherichia coli* ci ha permesso di definire con maggiore precisione i domini coinvolti nelle singole interazioni allo scopo di dare un'interpretazione della sua funzione e della sua importanza nella strutturazione del complesso multiproteico. Il suo ruolo cardine nella formazione del divisoma è dimostrato inoltre dalla capacità della proteina ortologa di *pneumoniae* di sostituire funzionalmente *in vivo* la

proteina FtsQ selvaggia di *coli*. La proteina ortologa infatti mantiene la crescita per le prime due ore nel ceppo di *E. coli* portatore della delezione del gene codificante per la proteina FtsQ in cui come mostrato nello specifico Western blotting non c'è traccia della proteina wt FIG. 4.9.. Inoltre l'efficienza di piastramento passa da 10^{-6} del ceppo nullo per la proteina FtsQ a 10^{-1} del ceppo in cui viene fatta esprimere la proteina ortologa di *pneumoniae*. L'analisi delle interazioni conservate dalla proteina di *pneumoniae* con le proteine di *coli* ha mostrato che l'unica conservata è quella con la proteina FtsI.

Sulla base di questi importanti risultati possiamo quindi concludere che esiste in minimo comune tra le diverse specie batteriche durante il processo di divisione, che guida la formazione del divisoma e che conferisce ad alcune delle proteine che lo costituiscono un ruolo essenziale e fondamentale. Il mio studio ha permesso di evidenziarne almeno una: la proteina FtsQ ed in particolare mi ha permesso di mettere in rilievo la sua interazione con la proteina FtsI che sembra essere indispensabile per la funzionalità della proteina FtsQ. Dati preliminari concernenti la funzionalità della proteina FtsQ in ceppi di *E. coli* portatori della delezione della proteina FtsI mostrano che FtsQ perde la capacità d'interagire con alcuni dei suoi partner essenziali.

L'obiettivo futuro è quello di andare ad individuare nella sovrapposizione delle due complesse reti d'interazione quelle fondamentali per le quali è possibile sostituire un elemento proteico con il corrispettivo ortologo di altre specie. Questa analisi porterebbe alla luce i processi fondamentali della divisione batterica e i suoi meccanismi di regolazione

II PARTE
Streptococcus pneumoniae DivIVA
Localizzazione e interazione
in un sistema MinCD free

CAP1

PARTE GENERALE

1.2 IMPORTANZA CLINICA E RESISTENZE ANTIBIOTICHE ACQUISITE DAL BATTERIO GRAM+ *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*

L'infezione da *Streptococcus pneumoniae* si presenta con polmonite, batteriemia, otite media, meningite, sinusite, peritonite ed artrite.

Esistono 90 sierotipi di *Streptococcus pneumoniae*; il vaccino polisaccaridico 23-valente comprende l'88% dei sierotipi di pneumococco, mentre il vaccino 7-valente comprende l'80% dei sierotipi responsabili dell'infezione nei bambini al di sotto dei 5 anni.

Negli Usa le infezioni da *Streptococcus pneumoniae* causano ogni anno 100.000- 135.000 ospedalizzazioni per polmonite, 6 milioni di casi di otite media e più di 60.000 casi di malattia invasiva tra cui 3.300 casi di meningite. L'incidenza di mortalità tra i pazienti adulti, ospedalizzati, con malattia invasiva, è del 14%. Sequele neurologiche e/o danni nell'apprendimento possono presentarsi nei pazienti con meningite, mentre i soggetti che manifestano otite media possono andare incontro a danni all'udito. I soggetti a più alto rischio di infezione da *Streptococcus pneumoniae* sono gli anziani ed i bambini al di sotto dei 2 anni.

Lo *Streptococcus pneumoniae* inoltre è il principale responsabile della polmonite acquisita in comunità, questa grave infezione è associata ad un'importante sintomatologia ed anche ad una diffusa mortalità in tutto il mondo.

L'infezione da *S. pneumoniae* può colpire le vie aeree superiori quelle inferiori e addirittura nel peggiore dei casi degenerare in meningite.

La principale causa dell'ampia diffusione di queste infezioni è imputabile alle resistenze antibiotiche che lo smodato utilizzo di queste molecole ha comportato nel corso degli anni. Questo problema di ricaduta mondiale ha spinto il mondo della ricerca in campo microbiologico ad indagare con più accuratezza la divisione cellulare di questo microrganismo per conoscerne i meccanismi base che lo caratterizzano e lo governano FIG.1.1.

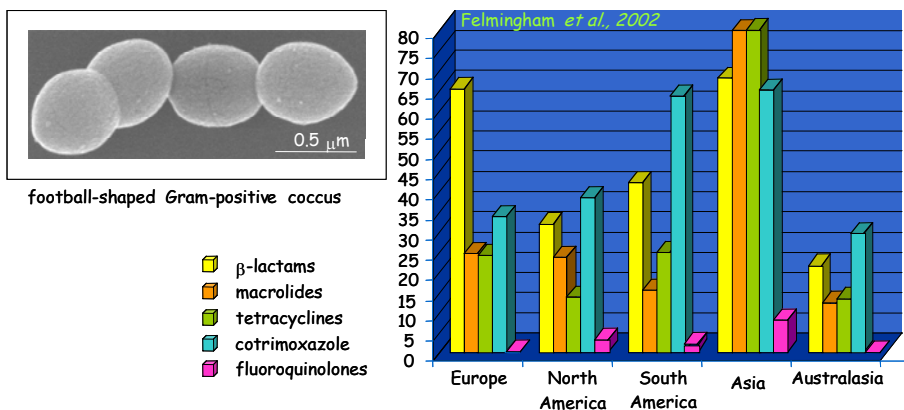


FIG. 1 Schematizzazione delle resistenze sviluppate dallo streptococcus pneumoniae

Nonostante recenti studi (io stessa nella prima parte del mio dottorato) abbiano mostrato che la maggior parte degli eventi nella settazione vengano conservati, numerosi altri aspetti del processo di divisione come: i cambiamenti morfologici, la corretta scelta del sito di divisione, la segregazione del nucleotide e i meccanismi che li regolano rimangono ampiamente sconosciuti. Il gran numero di eventi e proteine che vengono conservati da una specie all'altra fanno pensare che anche il meccanismo di riconoscimento e localizzazione del sito divisione non debba essere troppo diverso tra i gram+ e i gram-.

Durante i miei studi il gruppo dell'Università di Cagliari della professoressa Massidda, con cui ho collaborato durante il mio progetto di dottorato, ha mappato nel cromosoma di *S. pneumoniae* una regione a valle della proteina FtsZ altamente conservata nei batteri Gram+ e fisicamente e trascrizionalmente legata al cluster dei geni di divisione cellulare (*dcw*) descritto nella prima parte della tesi FIG.2.

L'inattivazione funzionale di ognuno dei cinque geni che costituiscono questa regione comporta l'alterazione della morfologia cellulare, della corretta segregazione del nucleotide o della divisione cellulare nello *S. pneumoniae* come in altre specie (Hamoen et al., 2006; Ishikawa et al., 2006; Miyagishima et al., 2005).

COMPARISON OF THE *divIVA* REGION IN DIFFERENT GRAM+

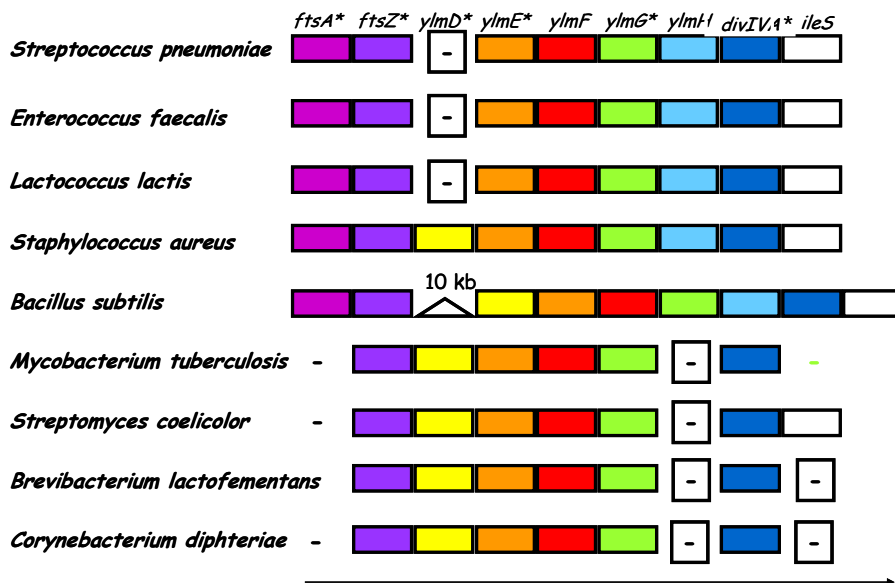


FIG 2 Confronto della regione a valle della proteina FtsZ nei Gram+

Nello *S. pneumoniae* l'effetto più drammatico nella divisione si osserva a seguito dell'inattivazione del gene *divIVA*. Geni ortologhi di *divIVA* sono stati trovati in un gran numero di organismi Gram+ ma anche in specie distinte filogeneticamente come il *Deinococcus radiodurans* e i Cianobatteri. Allineamenti multipli di sequenza di queste proteine, nonostante la variabilità nella loro lunghezza, mostrano che il dominio N-terminale della proteina è altamente conservato mentre il dominio C-terminale è molto più variabile. Malgrado l'elevato grado di omologia di sequenza della proteina DivIVA studi riguardo il suo ruolo fisiologico nella divisione cellulare e nei processi ad essa annessi non hanno rilevato una funzione unica e comune alle varie specie. Infatti è stato ipotizzato che nel *B. subtilis* DivIVA sostituisca MinE, perso in questi microrganismi, per la selezione del corretto sito di divisione attivando in tal modo il solo sito centrale e dirigendo MinCD inibitori della divisione ai poli cellulari (Cha et al, 1997; Edwards et al., 2000; Marston et al., 1999). In aggiunta nel *B. subtilis*, DivIVA riveste un ruolo importante durante la sporulazione nella quale è coinvolto nel processo di segregazione del nucleotide coordinando un complesso proteico costituito

dalla proteina dell'origine di replicazione RacA (DNA-binding protein) SpoOJ e Soj (Ben et al., 2003; Stahlberg et al., 2004; Wu et al., 2004). In *Synechococcus elongatus* che presenta nel suo corredo genetico sia *minE* che *divIVA* la delezione di *minE* causa la filamentazione batterica mentre quella di *divIVA* si traduce nella formazione di cellule due o tre volte più lunghe del batterio selvatico in aggiunta alla riduzione nella frequenza di assemblaggio dello Z-ring (Miyagishima et al., 2005). L'inattivazione o la delezione del gene omologo in altre specie prive del sistema MinCDE hanno mostrato una varietà di altri fenotipi.

In *Streptomyces coelicolor* e in *Brevibacterium glutamicum* DivIVA è essenziale per la crescita la sua inattivazione o sovraespressione influenza sensibilmente la crescita polare e la morfogenesi batterica (Flardh et al., 2003; Ramos et al., 2003).

Nello *S. pneumoniae* la disattivazione del gene *divIVA* comporta la formazione di catene di cellule non separate e caratterizzate da una morfologia cellulare alterata con setti di divisione incompleti spesso prive del nucleoide. Questo complesso fenotipo suggerisce un diretto coinvolgimento della proteina nella determinazione della morfologia cellulare, nell'assemblaggio e completamento del setto di divisione e nel processo di ripartizione del nucleoide attraverso un meccanismo ancora non chiaro. In accordo con quanto finora descritto esperimenti di immunolocalizzazione o localizzazioni della proteina di fusione GFP-DivIVA rivelano che la proteina si localizza al livello del sito di divisione mediano ma viene reclutata o localizza direttamente anche ai poli cellulari (Edwards et al, 1997; 2000; Flardh et al., 2003, Ramos et al., 2003).

Un'altra importante caratteristica della proteina DivIVA è la sua capacità di oligomerizzare *in vitro* (Muchova et al., 2002; Stahlberg et al., 2004) e interagire con se stessa *in vivo* (Ramirez et al., 2005) nulla ancora è noto delle sue interazioni con altre proteine della divisione.

PARTE SPERIMENTALE

CAP 2

SCOPO

Nella prima parte del mio lavoro di dottorato ho cercato di dare una più chiara visione dei meccanismi alla base della divisione dello *Streptococcus pneumoniae* andando ad analizzare le relazioni intraprese dalle componenti fondamentali della divisione stessa: le proteine di divisione. La domanda che chiaramente ne consegue è come queste proteine sono in grado di capire il momento durante la divisione ed il luogo all'interno della cellula in cui devono assemblarsi affinché si possa completare la divisione. A questa domanda non si è riusciti ancora a dare una risposta. Allo scopo di ricercare una possibile proteina chiave capace di dirigere questo riconoscimento e posizionare in modo corretto il setto di divisione, in collaborazione con l'Università di Cagliari, abbiamo intrapreso lo studio della proteina precedentemente descritta DivIVA.

I loro studi di immunofluorescenza e immunoelettromicroscopia mostrano che la proteina si localizza simultaneamente nella regione mediana della cellula ed ai due poli cellulari. L'analisi di immunofluorescenza doppia suggerisce che la proteina viene reclutata nel sito di divisione successivamente a FtsZ e viene trattenuta ai poli durante la separazione delle due cellule figlie. Tutte le altre proteine di divisione localizzano correttamente nel mutante deleto di *divIVA* sebbene la percentuale di cellule che mostrano una costrizione dell'anello di FtsZ è decisamente ridotta. In accordo con il suo profilo di localizzazione e la sua struttura biochimica (coiled-coiled protein) DivIVA sono i risultati ottenuti dalla mia analisi delle interazioni contratte da questa proteina nel sistema *streptococcus*.

Nella seconda parte del mio progetto di ricerca infatti ho analizzato mediante l'utilizzo del "Two-phages" e delle coimmunoprecipitazioni le interazioni contratte da DivIVA con le altre proteine della divisione e della ripartizione del nucleoide. La selezione di mutanti amber e missenso di *divIVA* ottenuti mediante sostituzioni alleliche dal gruppo di Cagliari mi hanno permesso di definire inoltre i domini d'interazione e le interazioni chiave necessarie per mantenimento della vitalità e della corretta morfologia cellulare. L'analisi della localizzazione intracellulare della proteina GFP-DivIVA nell'*Escherichia* mostra sorprendentemente un'immagine completamente sovrapponibile a quella ottenuta nello *S. pneumoniae*. La sua natura oscillante tra i poli ed il centro è mantenuta anche in un sistema batterico in cui sono presenti i geni MinC MinD e MinE. Dunque la funzionalità della proteina DivIVA è totalmente indipendente dal sistema Min e non ne viene in alcun modo influenzata, potrebbe forse addirittura sostituirlo.

CAP3

MATERIALI E METODI

3.1 MATERIALI

I terreni gli antibiotici ed i ceppi batterici utilizzati sono stati già descritti nei materiali e metodi della I PARTE della tesi

3.1.2 PLAMIDI

I vettori di clonaggi come già descritto nella prima parte sono il pCI₂₂ e pCI₄₃₄ in cui sono stati clonati i geni *divIVA*, *A78T*, #5, #30, #40, *lytB*, *spoOJ*, *prfA* nei siti di restrizione Sall al 5' e BamHI al 3' TAB. 3.1 ed il pTTQ18 in cui è stato clonato il gene *divIVA* nei siti di restrizione PstI al 5' e HindIII al 3' TAB. 3.2 Il DNA dei geni d'interesse è stato amplificato mediante PCR utilizzando come stampo il DNA cromosomale di *S. pneumoniae* e specifici oligonucleotidi portatori alle estremità dei compatibili siti di restrizione elencati in tabella 3.3. Allo stesso modo il gene *divIVA* è stato clonato nel vettore di clonaggio pTTQ18 mediante l'utilizzo di specifici oligonucleotidi TAB. 3.3 nei siti di restrizione PstI e HindIII.

	Genotipo
pCI _{p22}	Derivato di pCI32, AmpR, con il dominio N-ter del repressore del fago P22, sotto il promotore plac
pCI _{p434}	Derivato di pACY177, KcR, con il dominio N-ter del repressore del fago 434
pCIp22-DivIVA	Derivato di pCIp22 portante il gene <i>divIVA</i>
pCIp22-A78T	Derivato di pCIp22 portante il gene <i>A78T</i>
pCIp22-#5	Derivato di pCIp22 portatore del gene #5
pCIp22-#30	Derivato di pCIp22 portatore del gene #30
pCIp22-#40	Derivato di pCIp22 portatore del gene #40
pCIp22-LytB	Derivato di pCIp22 portatore del gene <i>lytB</i>
pCIp22-SpoOJ	Derivato di pCIp22 portatore del gene <i>spoOJ</i>
pCIp22-PrfA	Derivato di pCIp22 portatore del gene <i>prfA</i>

pcl ₄₃₄ -DivIVA	Derivato di pcl ₄₃₄ ,portatore del gene <i>divIVA</i>
pcl ₄₃₄ -A78T	Derivato di pcl ₄₃₄ ,portatore del gene <i>A78T</i>
p c l _{4 3 4} - # 5	Derivato di pcl ₄₃₄ ,portatore del gene #5
p c l _{4 3 4} - # 3 0	Derivato di pcl ₄₃₄ ,portante il gene #30
p c l _{4 3 4} - # 4 0	Derivato di pcl ₄₃₄ ,portante il gene #40
pcl ₄₃₄ -LytB	Derivato di pcl ₄₃₄ ,portante il gene <i>lytB</i>
pcl ₄₃₄ -SpoOJ	Derivato di pcl ₄₃₄ ,portante il gene <i>spoOJ</i>
pcl ₄₃₄ -PrfA	Derivato di pcl ₄₃₄ ,portante il gene <i>prfA</i>

TAB 3.1 plasmidi pCl₂₂ e pCl₄₃₄

Plasmidi	Genotipo
pTTQ18-GFP	Derivato di pTTQ18, <i>lacI</i> ^q , Amp ^R , portante il gene <i>GFP</i> , sotto il controllo di <i>ptac</i>
pTTQ18-GFP-DivIVA	Derivato di pTTQ18-GFP portore del gene <i>divIVA</i>

TAB. 3.2 Plasmidi pTTQ18

GENE	SEQUENZA	bp
Sal F DivIVA	gcgtcgaccATGCCAATTACATCATTAGAA	848
BamRDivIVA	cgggatccAGTTTCTGTAGCTGGTGTGGAC	848
Sall F A78T	gcgtcgaccATGCCAATTACATCATTAGAA	831
BamHR A78T	cgggatccAGTTTCTGTAGCTGGTGTGGAC	831
Sall F LytB	gcgtcgaccATGAATTTAGGAGAATTTTGG	2166
BamHR LytB	cgggatccCTAATCTTTGCCACCTAGC	2166

Sall F SpoOJ	gcgtcgaccATGGAAAATTTGAAATGATT	760
BamR SpoOJ	cgggatccTTATTTCAAGGCTGTTGATAAT	760
Sall F PrfA	gcgtcgaccATGGTCAACTATCCACATA	597
BamHR PrfA	cgggatccTCATCTTGTTTTACCACC	597
PstI F DivIVA	aactgcagATGCCAATTACATCATTAGAA	848
HindIII DivIVA	R ccaagcttAGTTTCTGTAGCTGGTGTGGAC	848

TAB. 3.3 Oligonucleitidi

3.2 METODI

3.2.1 CLONAGGIO DEI GENI DI STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE NEI VETTORI DI CLONAGGIO pcI_{p434} pcI_{p22} E PTTQ18

I geni *divIVA*, *A78T*, #5, #30, #40, *lytB*, *spoOJ*, *prfA* di *S. pneumoniae* amplificati con specifici oligonucleotidi riportati in tabella 3.3 sono stati clonati nei vettori di clonaggio pcI_{p434} e pcI_{p22} rispettivamente digeriti con gli enzimi di restrizione Sall all'estremità 5' e BamHI all'estremità 3' i prodotti della reazione di ligasi sono stati trasformati nel ceppo di *E. coli* 7121 e opportunamente trattati come descritto da Miller (1972) e Sambrook (1989) FIG. 3A e 3B mentre il gene *divIVA* amplificato con gli specifici oligonucleotidi riportati in tabella 3.1 è stato clonato con la medesima metodica nel vettore pTTQ8 FIG 4. I programmi di PCR utilizzati sono gli stessi già descritti nei metodi della prima parte della tesi

3.3 SAGGIO DEL DOPPIO IBRIDO PROCARIOTICO; COIMMUNOPRECIPITAZIONI; WESTER BLOTTING

Gli esperimenti di doppio ibrido coimmunoprecipitazione e western blotting sono stati eseguiti come descritto nei metodi della I PARTE della tesi

3.4 PREPARAZIONE DELLE COLTURE E DEI VETRINI PER L'ANALISI IN FLUORESCENZA

Cellule di *Escherichia coli* DH5 α sono state trasformate mediante elettroporazione con il plasmide ricombinanti, portatore della fusione GFP-DivIVA riportate in tabella 3.2B, e piastrate su LB agar contenente Amp.

Singoli cloni recuperati dalle piastre di trasformazione sono stati fatti crescere o.n in 10 ml di LB con antibiotico a 37°C e in agitazione.

Le colture ottenute sono state diluite, inoculate in 8 ml di LB con Amp e lasciate crescere sino ad una D.O.₆₀₀, compresa tra 0.2 – 0.3, al raggiungimento della quale sono state indotte mediante aggiunta di IPTG 0.1 mM.. Dopo circa 1.20 h, 1 ml di ogni coltura è stato centrifugato a 9000 rpm per 5 minuti ed il sedimento risospeso in 400 μ l di AM; 5 μ l sono stati prelevati e posti sul vetrino per l'osservazione al microscopio a fluorescenza. L'immagine è stata acquisita al microscopio a fluorescenza tramite una telecamera Nikon, real time in tempi fissi ed ad intervalli di tempo regolari (ogni 15 minuti) allo scopo di localizzare nel tempo e nello spazio la proteina DivIVA all'interno della cellula.

E' stata utilizzata per l'analisi in fluorescenza l' EGFP, una GFP mutata nei suoi residui Phe-64 $\rightarrow$ Leu e Ser-65 $\rightarrow$ Thr poiché caratterizzata da un'emissione più intensa se eccitata con luce blu e da un'emivita media più alta. Inoltre la sua espressione non è tossica per la cellula batterica (Cinelli e al., 2000).

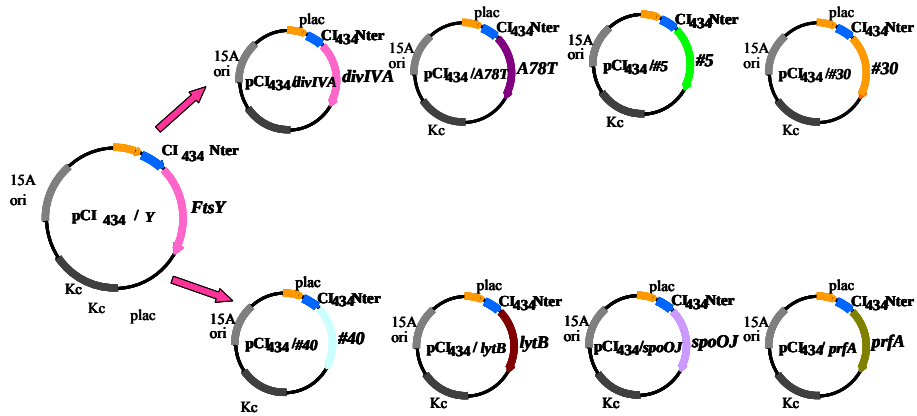


FIG. 3A Plasmidi pCI₄₃₄

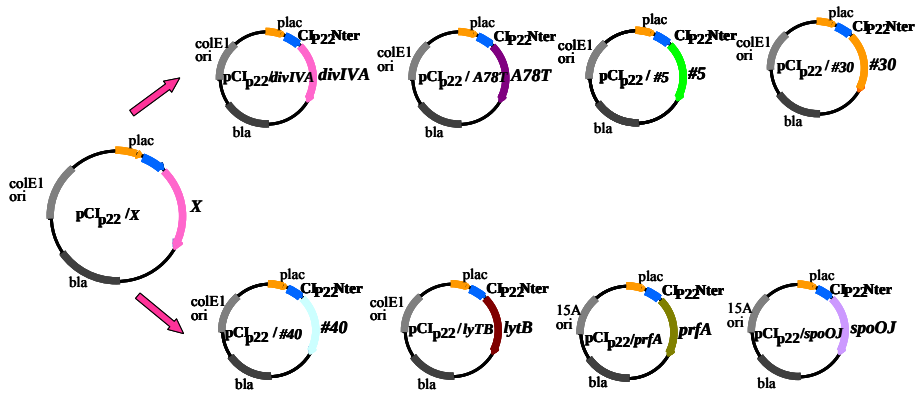


FIG. 3B Plasmidi pCI₂₂

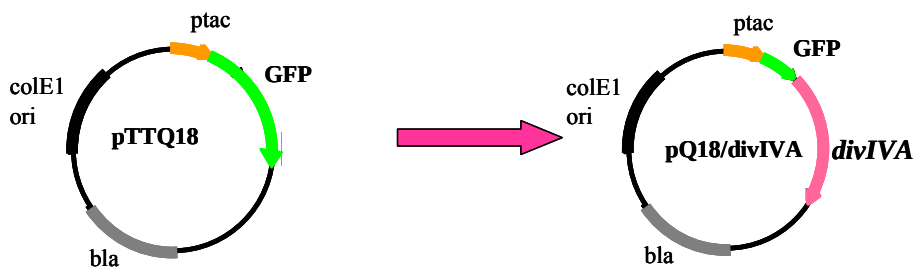


FIG. 4 Plasmidi pTTQ18

CAP4 RISULTATI

La seconda parte del mio progetto di dottorato è stato svolto in collaborazione con l'Università di Cagliari dove già da tempo si studia la proteina DivIVA.

4.1 DIVIVA LOCALIZZA SIA AI POLI CELLULARI CHE NELLA REGIONE MEDIANA DELLA CELLULA NELLO *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* e NELL' *ESCHERICHIA COLI*

La localizzazione subcellulare ottenuta mediante esperimenti di immunofluorescenza e immunoelettromicroscopia eseguiti presso l'università di Cagliari ha rivelato che in cellule in crescita esponenziale la proteina si localizza principalmente ai poli ma anche all'equatore della cellula. Un'analisi più specifica della localizzazione nel ceppo Rx1 di streptococco eseguita allo scopo di determinare la sua posizione intracellulare durante le sei fasi che lo caratterizzano ha mostrato che nelle prime fasi in cui il cromosoma occupa ancora la regione centrale DivIVA si trova localizzata ai soli poli cellulari durante la segregazione del nucleotide la proteina progressivamente si sposta nelle regioni centrali. Questo pattern di localizzazione è caratteristico di un sistema min-free pertanto ho voluto analizzare la localizzazione della proteina anche in un sistema come *Escherichia coli* che invece possiede tali geni. La localizzazione della proteina GFP-DIVIVA nel ceppo di DH5 α lasciato crescere in terreno ricco per circa 1 ora in presenza di 10^{-4} M di IPTG è sovrapponibile a quella osservata anche nello *Streptococcus pneumoniae*. La proteina infatti in una popolazione cellulare mista (in differenti stadi della divisione) si localizza ai poli ed al centro della cellula FIG.5. Se asaminiamo poi il segnale di fluorescenza all'interno di una singola cellula troviamo che la proteina si dispone al TO ad un polo cellulare dopo 15 min raggiunge il centro per posizionarsi in seguito all'altro polo cellulare FIG.6.

La natura oscillante della localizzazione potrebbe significare che la proteina DivIVA dirige FtsZ nel corretto sito di divisione. Lo studio però della colocalizzazione delle due proteine mostra che DivIVA localizza nel futuro sito di divisione solo dopo che l'anello di FtsZ si è assemblato. Anche la localizzazione delle altre proteine della divisione FtsA, DivIC, DivIB, FtsL, PBP2X, PBP1A in ceppi deleti per il gene *divIVA* avviene normalmente. In questi mutanti però la percentuale di cellule che mostrano una costrizione dello Z-ring è notevolmente ridotto.

Questi risultati indicano che la cellula si arresta durante la divisione perché DivIVA è necessaria per il corretto assemblaggio e chiusura del setto di divisione

4.2 LA PROTEINA DIVIVA DI *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* INTERAGISCE CON SE STESSA E CON LE ALTRE PROTEINE DEL MACCHINARIO DI DIVISIONE

L'immagine di localizzazione ricavata dagli studi eseguiti all'università di Cagliari unitamente ai miei fanno pensare che DivIVA potrebbe interagire con gli altri componenti del macchinario di divisione come con quelli del processo di ripartizione del nucleoide a causa della sua localizzazione anche periferica.

Pertanto mediante l'utilizzo del "Two-phages" e delle coimmunoprecipitazioni ho esaminato le interazioni contratte da DivIVA con le altre proteine del divisoma e con quella coinvolte nel processo di ripartizione del nucleoide. Ho testato l'interazione proteica di DivIVA con tutte le proteine della divisione di cui è nota la partecipazione alla formazione del divisoma nello *S. pneumoniae* come: FtsZ, FtsA, FtsK, FtsL, DivIB, DivIC, FtsW, PBP2X, PBP1A e quelle omologhe che mostrano avere un ruolo importante nella divisione di altri batteri come: ZapA, ErzA. In aggiunta ho analizzato le interazioni di DivIVA anche con le proteine LytB e PcsB, la prima è coinvolta nel processo di separazione delle due cellule figlie la seconda invece è una idrolisi della mureina essenziale. Infine ho esaminato le possibili interazioni con gli omologhi SpoOJ e PrfA i cui ortologhi nel *B. subtilis* sono coinvolti nel processo di segregazione del nucleoide. Ogni interazione come già descritto nella prima parte della tesi è stata ripetuta cinque volte testando i geni su entrambi i vettori di clonaggio; i valori di riferimento sono calcolati sul ceppo privo di plasmide e su quello portatore di uno dei due plasmidi. Per ogni valore viene calcolato un valore medio e una deviazione standard in tabella sono riportati solo i valori medi significativi TAB 4.1.

Come si vede dalla prima colonna della tabella 4.1 è in grado d'interagire con se stessa e contrarre forti interazioni anche con le proteine precoci della divisione FtsZ, FtsA, ZapA ma anche con FtsK, FtsL con SpoOJ proteina del processo di segregazione del nucleoide e PscB determinante morfogenico. Bassi ma ugualmente significativi sono i valori d'interazione di DivIVA con ErzA, DivIC, DivIB, FtsW e LytB. Nessuna interazione viene contratta con PBP2X, PBP1A o PrfA. I dati ottenuti dagli esperimenti di localizzazione e

di doppio ibrido potrebbero essere sufficienti ad indicare e dimostrare delle relazioni intraprese tra queste proteine; per ulteriore conferma ho comunque eseguito esperimenti di coimmunoprecipitazione per corroborare i dati appena descritti. Pertanto ho selezionato le due interazioni più significative di DivIVA, in particolare quella con la proteina FtsZ e quella con la proteina SpoOJ; il controllo negativo è stato effettuato con la proteina PrfA con la quale infatti non contrae interazione FIG 7A e 7B.

4.3 ALTERAZIONI FENOTIPICHE E GENETICHE DEL MUTANTE DI *S. PNEUMONIAE* PORTATORE DELLA MUTAZIONE A78T

Studi effettuati nel *B. subtilis* hanno rivelato che la mutazione A78T nel gene *divIVA* comporta un'alterazione fenotipica simile a quella determinata dal mutante nullo per questo gene. Questo residuo, localizzato nel cuore idrofobico della struttura elica-elica tanto importante per le proprietà biochimiche della proteina, è identico nell'allineamento del gene *divIVA* indicando in tal modo che potrebbe rivestire un ruolo molto importante nello *S. pneumoniae* come in altre specie strettamente correlate.

Il mutante *divIVA*: Rx1 A78T di *S. pneumoniae* mostra un fenotipo intermedio tra quello osservato nel ceppo selvatico e quello portatore della delezione del gene *divIVA*: Rx1 *divIVA*::*cat* FIG 8. Mentre la morfologia cellulare rimane solo parzialmente uguale, infatti non sono presenti cellule anucleate o morte, le caratteristiche catenelle cellulari sono uguali a quelle osservate nel ceppo deleto del gene.

La variazione della morfologia cellulare del ceppo mutato potrebbe essere correlata anche ad un'alterazione del pattern d'interazione. Ho quindi esaminato le interazioni del mutante A78T con le proteine precedentemente elencate. Sebbene il mutante possa ancora omodimerizzare, interagire con le proteine della divisione precoci: FtsZ, FtsA, ErzA e ZapA con PcsB e con SpoOJ, le interazioni con FtsK e con le proteide della divisione tardive: FtsL, FtsQ, FtsB, FtsW e LytB sono significativamente ridotte FIG 9.

In una fase successiva sono stati selezionati dal gruppo della professoressa Massida tre mutanti soppressori intragenici del gene *divIVA* A78T capaci di ripristinare il fenotipo selvatico: #5, #30, #40. Il ripristino della funzionalità potrebbe anche in questo caso rispecchiarsi nella riacquisizione di alcune delle interazioni perse dal mutante. I test eseguiti con il Two-phages mostrano che sia il mutante #30 che il mutante #40

ripristinano le interazioni con le proteine FtsK ed FtsL mentre solo il mutante #30 recupera l'interazione con DivIB FIG. 11

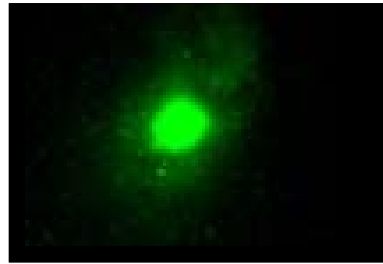
Il mutante #5, che il successivo sequenziamento ha mostrato essere un doppio mutante in cui alla mutazione A78T si aggiunge una mutazione amber in posizione 235, ci permette di localizzare le interazioni osservate fra DivIA e le proteine della divisione. Infatti, le interazioni mantenute sono localizzate nella parte N-terminale della proteina, prima della mutazione amber, in particolare, la self-interaction, le interazioni con FtsZ, Zap, FtsB. Le interazioni con FtsA, ErzA, PscB, perse in # 5 e mantenute in A78T, sono localizzabili nella parte C terminale FIG.10.

Nulla si può dire sulla localizzazione delle interazioni con FtsK, YIID, DivIB e MurM perché queste vengono perse anche nel mutante A78T.



FIG.5 Localizzazione della proteina GFP-DivIVA. Le immagini di fluorescenza mostrano un gradiente proteico della proteina DivIVA che oscilla tra i poli e il centro come mostrato per la proteina MinE di *E.coli*

T=0



T=15

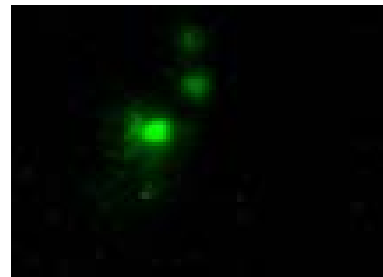


FIG:6 Oscillazione DivIVA in *E. coli* la fluorescenza all'interno della stessa cellula al T0 si trova localizzata tutta ad un polo dopo 15 minuti si sposta al polo opposto

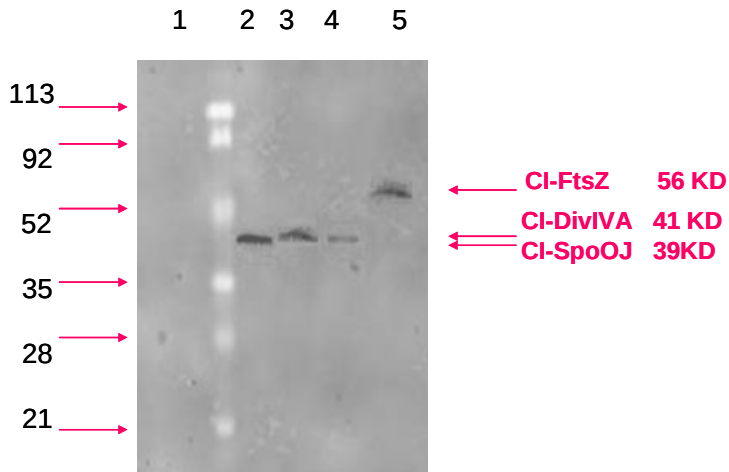


FIG.7A I campioni vengono immunoprecipitati con anticorpo anti GFP e i western-blotting eseguiti con anticorpi anti CI: LANE 1) GFPDivIVA - CISpoOJ LANE 2) GFPSpoOJ CIDivIVA LANE 3) GFPFtsZ - CIDivIVA LANE 4) GFPDivIVA - CIFtsZ complex

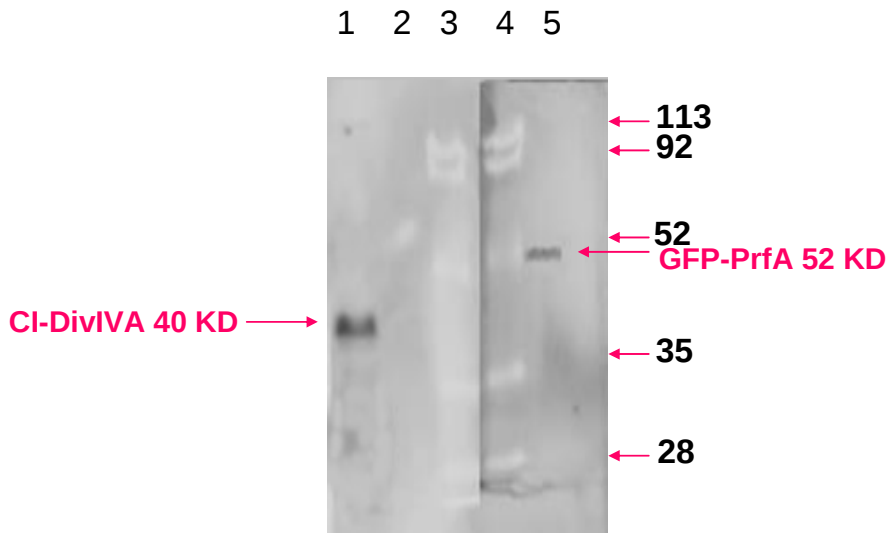
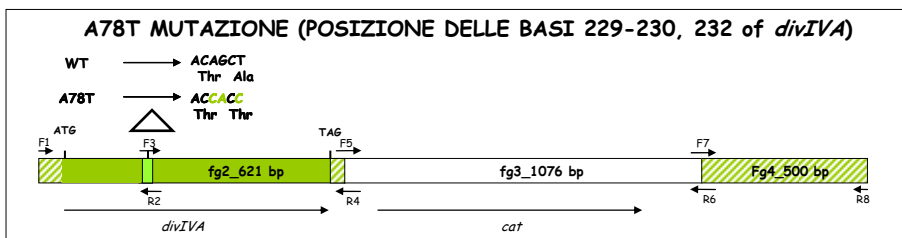


FIG.7B LANE 1) Western dell'estratto totale DH5a CI-DivIVA con anti DivIVA LANE 2) Coip CI-DivIVA GFP-PRFA immunoprecipitato con Anti GFP western con Anti DivIVA LANE 3) Western dell'estratto totale DH5a GFP-PrfA con anti GFP



transformazione Rx1 selezione per cm^R



FIG.8 Sostituzione allelica nel gene *divIVA*. Morfologia assunta dal mutante *divIVA* A78T e *divIVA::cat* rispetto al batterio selvatico.

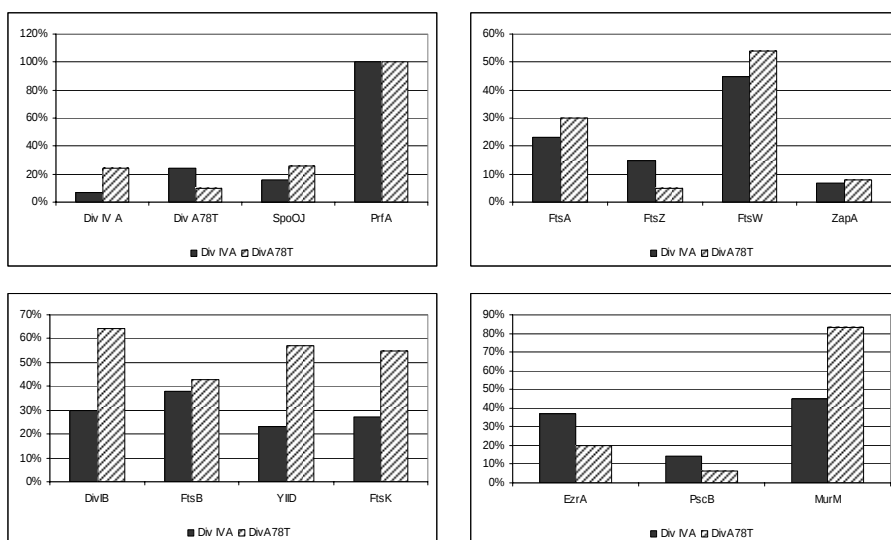


FIG. 9 Schematizzazione delle interazioni perse e mantenute nel mutante A78T rispetto a *DivIVA*

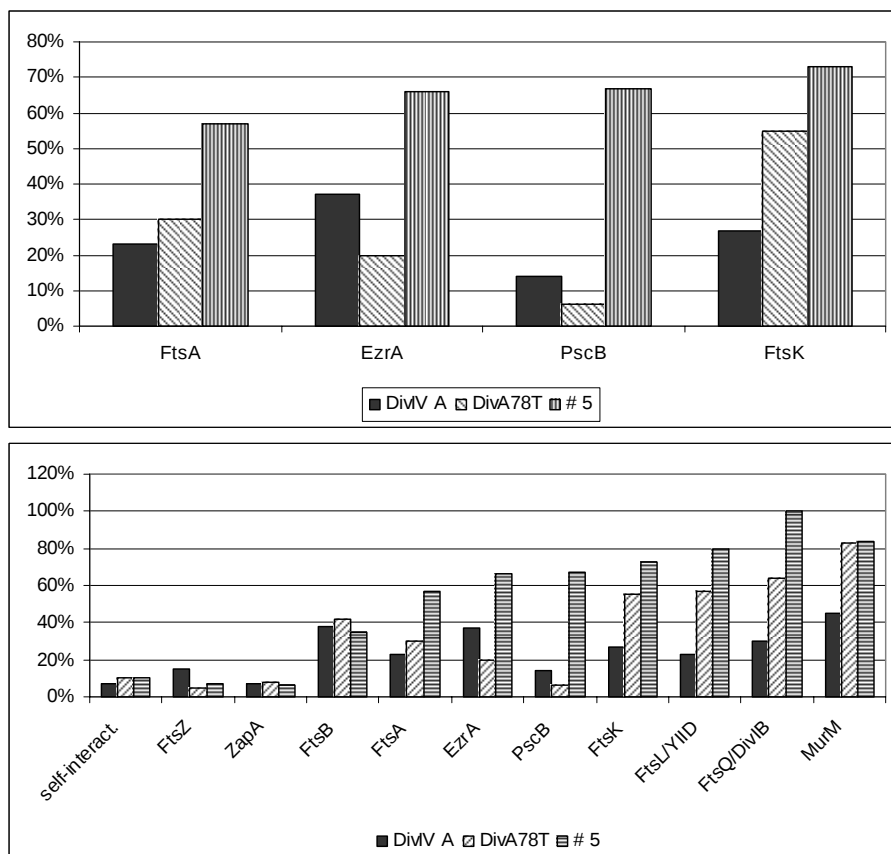


FIG.10 Schematizzazione delle interazioni perse (in alto) dal mutante *A78T* amber in posizione 235 #5 e recuperate (in basso) rispetto al solo mutante *A78T*.

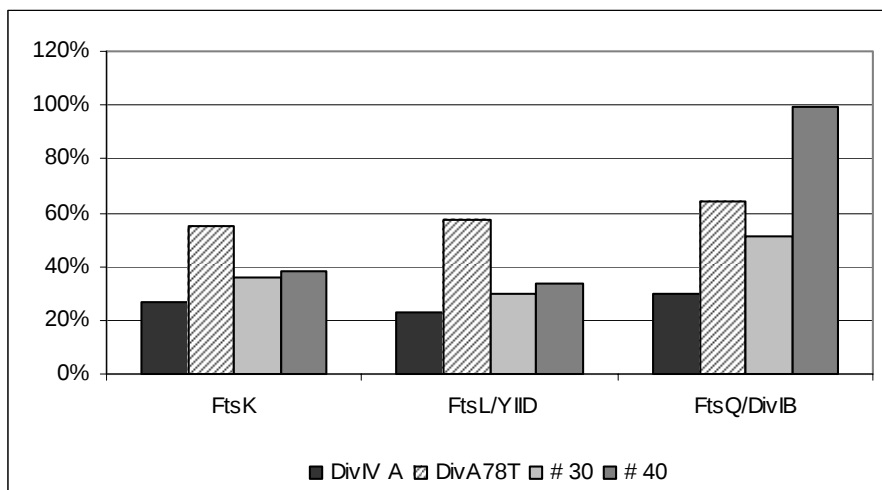


FIG.11 Schematizzazione delle interazioni recuperate dei mutanti #30 e #40 rispetto al mutante A78T.

CAP5 CONCLUSIONI

La natura oscillante della localizzazione della proteina DivIVA nel tempo e nello spazio all'interno della cellula batterica in unione alla sua capacità di interagire in modo molto importante con le altre proteine della divisione conosciute nello *Streptococcus pneumoniae* suggerisce che questa proteina potrebbe rivestire un ruolo importante nel processo di divisione batterico.

La natura così particolare della sua localizzazione (molto simile a quella già ben nota nell'*Escherichia coli* della proteina MinE), caratterizzata dalla simultanea presenza della proteina ai poli ed al centro della cellula in alcuni momenti della divisione e nella sola zona equatoriale in altri momenti della divisione, la collocherebbe nel meccanismo di riconoscimento del sito di divisione. L'analisi della localizzazione delle proteine di divisione in batteri Rx1 portatori della delezione del gene *divIVA* mostra però che questa avviene regolarmente anche se la divisione non viene completata in modo efficace. Infatti si riduce sensibilmente la percentuale di cellule in cui lo Z-ring si costringe comportando in tal modo un'alterazione morfologica dei batteri e addirittura una perdita della vitalità cellulare.

Il profilo di localizzazione suggerisce fortemente che la proteina è necessaria al setto per strutturarsi completamente cioè è supportato dall'analisi delle interazioni che risultano essere tutte molto significative quelle intraprese con le proteine del setto. La mutazione allelica A78T oltre che l'alterazione della morfologia cellulare causa anche la perdita da parte della proteina delle interazioni con alcune delle proteine della divisione in particolare con DivIB, DivIC, FtsL, FtsK oltre che con la proteina MurM coinvolta nella sintesi del peptidoglicano. Queste interazioni vengono recuperate però nei mutanti di soppressione intragenici #30 e #40.

DivIVA interagisce quindi con le proteine precoci della divisione ma anche come visto con enzimi della biosintesi del peptidoglicano settale come PBP2X e le PBP1A. Inoltre interagisce con PcsB e LytB entrambi fortemente coinvolti nella determinazione della morfologia cellulare. Si ipotizza infatti che queste due proteine cooperino per mantenere l'integrità della membrana e della parete cellulare. Il mutante A78T perde l'interazione con la proteina LytB. DivIVA è in grado di interagire anche con le proteine coinvolte nel processo di ripartizione del nucleoide come SpoOJ.

La complicata rete d'interazioni che caratterizzano la proteina DivIVA indica che questa riveste un ruolo multifaccettato nel controllo della morfologia cellulare nel completamento del processo di divisione e nella separazione delle cellule figlie e del corredo cromosomico.

Possiamo ipotizzare che DivIVA sia una proteina del citoscheletro che agisce da impalcatura per la formazione del setto di divisione e la

maturazione dei poli cellulari. Inoltre poiché si trova localizzata anche ai poli in modo stabile potrebbe anche collaborare con il sistema di segregazione di cui fa parte anche SpOJ nella ripartizione del cromosoma batterico.

Un possibile modello che descriva l'azione di DivIVA potrebbe essere quello in cui la proteina si localizza in alcuni momenti della divisione al livello del setto con il quale si assembla. Inoltre la sua presenza è importante per il corretto posizionamento degli enzimi idrolitici del peptidoglicano che catalizzano la separazione delle due cellule figlie e delle proteine della divisione tardive importante per la maturazione dei poli cellulari.

In assenza di DivIVA questa organizzazione viene persa con la conseguente alterazione della morfologia cellulare del corretto assemblaggio e chiusura del setto oltre che della separazione del nucleoide.

Ringrazio i miei professori Luciano Paolozzi e Patrizia Ghelardini per avermi sostenuto nella progettazione e stesura dei miei tre lavori di cui vado estremamente fiera.

Un ringraziamento profondo va alla mia professoressa Patrizia che ha sempre coordinato durante questi tre anni il mio lavoro, guidandomi negli esperimenti e nell'elaborazione dei dati oltre che nella stesura dei miei lavori.

Un pensiero speciale va alla mia collega nonché cara amica Simona con cui ho condiviso questi tre anni di lavoro e di vita.

A mio padre devo tutto ciò che ho ottenuto in questi anni per la sua tenacia nell'incoraggiarmi ogni giorno a continuare il mio percorso.

Pubblicazioni D'Ulisse Valeria

1)

D'Ulisse V. Faggioli M. Ghelardini P. Paolozzi L.

Three functional subdomains of the Escherichia coli FtsQ protein are involved in its interaction with the other division proteins. Microbiology 2007 Jan;153(Pt 1):124-38. PMID: 17185541 [PubMed - in process]

2)

Fadda D. Santona A. D'Ulisse V. Ghelardini P. Ennas MG. Whalen MB. Massidda O. Streptococcus pneumoniae DivIVA: Localization and Interactions in a MinCD-Free Context. J Bacteriol. 2007 Feb;189(4):1288-98. Epub 2006 Nov 10. PMID: 17098892 [PubMed - in process]

- Aarsman, M. E., Piette A., Fraipont C., Vinkenvleugel T. M., Nguyen-Disteche M., & den Blaauwen, T. (2005).** Maturation of the *Escherichia coli* divisome occurs in two steps. *Mol. Microbiol.* **55**, 1631-1645.
- Begg, K. J., Dewar S. J., & Donachie, W. D. (1995).** A new *Escherichia coli* cell division gene, *ftsK*. *J. Bacteriol.* **177**, 6211-6222.
- Bernhardt, T. G., & de Boer, P. A. (2003).** The *Escherichia coli* amidase AmiC is a periplasmic septal ring component exported via the twin-arginine transport pathway. *Mol. Microbiol.* **48**, 1171-1182.
- Bi, E. F., & Lutkenhaus, J. (1991).** FtsZ ring structure associated with division in *Escherichia coli*. *Nature.* **354**, 161-164.
- Bigot, S., Corre J., Louarn J. M., Cornet F., & Barre, F. X. (2004).** FtsK activities in Xer recombination, DNA mobilization and cell division involve overlapping and separate domains of the protein. *Mol. Microbiol.* **54**, 876-886.
- Bowler, L. D., & Spratt, B. G. (1989).** Membrane topology of penicillin-binding protein 3 of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **3**, 1277-1286.
- Boyle, D. S., Khatrar M. M., Addinall S. G., Lutkenhaus J., & Donachie, W. D. (1997).** *ftsW* is an essential cell-division gene in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **24**, 1263-1273.
- Buddelmeijer, N., & Beckwith, J. (2002).** Assembly of cell division proteins at the *E. coli* cell center. *Curr. Opin. Microbiol.* **5**, 553-557.
- Buddelmeijer, N., & Beckwith, J. (2004).** A complex of the *Escherichia coli* cell division proteins FtsL, FtsB and FtsQ forms independently of its localization to the septal region. *Mol. Microbiol.* **52**, 1315-1327.
- Buddelmeijer, N., Aarsman M. E., Kolk A. H., Vicente M., & Nanninga, N. (1998).** Localization of cell division protein FtsQ by immunofluorescence microscopy in dividing and nondividing cells of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **180**, 6107-6116.
- Buddelmeijer, N., Judson N., Boyd D., Mekalanos J. J., & Beck, J. (2002).** YgbQ, a cell division protein in *E. coli* and *Vibrio cholerae*, localizes in codependent fashion with FtsL to the division site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 6316-6321.
- Buddelmeijer, N., Judson N., Boyd D., Mekalanos J. J., & Beckwith, J. (2002).** YgbQ, a cell division protein in *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae*, localizes in codependent fashion with FtsL to the division site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **99**, 6316-6321.
- Carson, M. J., Barondess J., & Beckwith, J. (1991).** The FtsQ protein of *Escherichia coli*: membrane topology, abundance, and cell division

phenotypes due to overproduction and insertion mutations. *J Bacteriol.* **173**, 2187-2195.

Chen, J. C., & Beckwith, J. (2001). FtsQ, FtsL and FtsI require FtsK, but not FtsN, for co-localization with FtsZ during *Escherichia coli* cell division. *Mol. Microbiol.* **42**, 395-413.

Chen, J. C., Minev M., & Beckwith, J. (2002). Analysis of ftsQ mutant alleles in *Escherichia coli*: complementation, septal localization, and recruitment of downstream cell division proteins. *J. Bacteriol.* **184**, 695-705.

Chen, J. C., Weiss D. S., Ghigo J. M., & Beckwith, J. (1999). Septal localization of FtsQ, an essential cell division protein in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **181**, 521-530.

Corbin, B. D., Geissler B., Sadasivam M., & Margolin, W. (2004). Z-ring-independent interaction between a subdomain of FtsA and late septation proteins as revealed by a polar recruitment assay. *J. Bacteriol.* **186**, 7736-7744.

Dai, K., & Lutkenhaus, J. (1992). The proper ratio of FtsZ to FtsA is required for cell division to occur in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **174**, 6145-6151.

Dai, K., Xu Y., & Lutkenhaus, J. (1996). Topological characterization of the essential *Escherichia coli* cell division protein FtsN. *J. Bacteriol.* **178**, 1328-1334.

Dai, K., Xu Y., & Lutkenhaus, J. (1993). Cloning and characterization of ftsN, an essential cell division gene in *Escherichia coli* isolated as a multicopy suppressor of ftsA12(Ts). *J. Bacteriol.* **175**, 3790-3797.

Di Lallo, G, Castagnoli L., Ghelardini P., & Paolozzi, L. (2001). A two-hybrid system based on chimeric operator recognition for studying protein homo/heterodimerization in *Escherichia coli*. *Microbiology.* **147**, 1651-1656.

Di Lallo, G., Fagioli M., Barionovi D., Ghelardini P., & Paolozzi, L. (2003). Use of a two-hybrid assay to study the assembly of a complex multicomponent protein machinery: bacterial septosome differentiation. *Microbiology.* **149**, 3353-3359.

Draper, G. C., McLennan N., Begg K., Masters M., & Donachie, W. D. (1998). Only the N-terminal domain of FtsK functions in cell division. *J. Bacteriol.* **180**, 4621-4627.

Duong, F., & Wickner, W. (1997). Distinct catalytic roles of the SecYE, SecG and SecDFyajC subunits of preprotein translocase holoenzyme. *EMBO J.* **16**, 2756-2768.

- Errington, J., Daniel R. A., & Sheffers, D. J. (2003).** Cytokinesis in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**, 52-65.
- Geissler, B., & Margolin, W. (2005).** Evidence for functional overlap among multiple bacterial cell division proteins: compensating for the loss of FtsK. *Mol Microbiol.* **58**, 596-612.
- Ghigo, J. M., & Beckwith, J. (2000).** Cell division in *Escherichia coli*: role of FtsL domains in septal localization, function, and oligomerization. *J. Bacteriol.* **182**, 116-129.
- Goehring, N. W., & Beckwith, J. (2005).** Diverse paths to midcell: assembly of the bacterial cell division machinery. *Curr. Biol.* **15**, 514-526.
- Goehring, N. W., González, M. D., & Beckwith, J. (2006).** Premature targeting of cell division proteins to midcell reveals hierarchies of protein interactions involved in divisome assembly. *Mol. Microbiol.* doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05206.x.
- Goehring, N. W., Gueiros-Filho F., & Beckwith, J. (2005).** Premature targeting of a cell division protein to midcell allows dissection of divisome assembly in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* **19**, 127-137.
- Ishino, F., & Matsubashi, M. (1981).** Peptidoglycan synthetic enzyme activities of highly purified penicillin-binding protein 3 in *Escherichia coli*: a septum-forming reaction sequence. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **101**, 905-911.
- Karimova, G., Dautin N., & Ladant, D. (2005).** Interaction network among *Escherichia coli* membrane proteins involved in cell division as revealed by bacterial two-hybrid analysis. *J. Bacteriol.* **187**, 2233-2243.
- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of head bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lara, B., & Ayala, J. A. (2002).** Topological characterization of the essential *Escherichia coli* cell division protein FtsW. *FEMS Microbiol Lett.* **216**, 23-32.
- Lutkenhaus, J., & Addinall, S. G. (1997).** Bacterial cell division and the Z ring. *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 93-116.
- Margolin, W. (2000).** Themes and variations in prokaryotic cell division. *FEMS Microbiol Rev.* **24**, 531-548.
- Massidda, O., Anderluzzi D., Friedli L., & Feger, G. (1998).** Unconventional organization of the division and cell wall gene cluster of *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiology.* **144**, 3069-3078.
- Mercer, K. L., & Weiss, D. S. (2002).** The *Escherichia coli* cell division protein FtsW is required to recruit its cognate transpeptidase, FtsI (PBP3), to the division site. *J. Bacteriol.* **184**, 904-912.

Noirclerc-Savoye, M., Le Gouellec A., Morlot C., Dideberg O., Vernet T., & Zapun, A. (2005). In vitro reconstitution of a trimeric complex of DivIB, DivIC and FtsL, and their transient co-localization at the division site in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* **55**, 413-424.

Robson, S. A., & King, G. F. (2006). Domain architecture and structure of the bacterial cell division protein DivIB. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **103**, 6700-6705.

Sambrook, J., Fritsch E. F., & Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

Sanchez-Pulido, L., Devos D., Genevrois S., Vicente M., & Valencia, A.(2003). POTRA: a conserved domain in the FtsQ family and a class of beta-barrel outer membrane proteins. *Trends Biochem. Sci.* **28**, 523-526.

Sherman, M. Yu, & Goldberg, A. L. (1992). Involvement of the chaperonin dnaK in the rapid degradation of a mutant protein in *Escherichia coli*. *EMBO J.* **11**, 71-77.

Towbin, H., Staehelin T., & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **76**, 4350-4354.

Vicente, M., & Rico, A. I. (2006). The order of the ring: assembly of *Escherichia coli* cell division components. *Mol. Microbiol.* **61**, 5-8.

Vicente, M., Rico A. I. , Martinez-Arteaga R., & Mingorance, J. (2006). Septum enlightenment: assembly of bacterial division proteins. *J. Bacteriol.* **188**, 19-27.

Wang, L., & Lutkenhaus, J. (1998). FtsK is an essential cell division protein that is localized to the septum and induced as part of the SOS response. *Mol. Microbiol.* **29**, 731-740.

Weiss, D. S. (2004). Bacterial cell division and the septal ring. *Mol. Microbiol.* **54**, 588-597.

Yu, X. C., Tran A. H., Sun O., & Margolin, W. (1998). Localization of cell division protein FtsK to the *Escherichia coli* septum and identification of a potential N-terminal targeting domain. *J. Bacteriol.* **180**, 1296-1304.

Ben-Yehuda, S., D. Z. Rudner, and R. Losick. 2003. RacA, a bacterial protein that anchors chromosomes to cell poles. *Science* **299**:532-6

Buddelmeijer, N., and J. Beckwith. 2004. A complex of the *Escherichia coli* cell division proteins FtsL, FtsB and FtsQ forms independently of its localization to the septal region. *Mol. Microbiol.* **52**:1315-1327.

- Cha, J. H., and G. C. Stewart.** 1997. The divIVA minicell locus of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 179:1671-1683.
- Cole, R. M., and J. J. Hahn.** 1962. Cell wall replication in *Streptococcus pyogenes*. *Science.* 135:722-724.
- Di Lallo, G., L. Castagnoli, P. Ghelardini, and L. Paolozzi.** 2001. A two-hybrid system based on chimeric operator recognition for studying protein homo/heterodimerization in *Escherichia coli*. *Microbiology.* 147:1651-6.
- Di Lallo, G., M. Fagioli, D. Barionovi, P. Ghelardini, and L. Paolozzi.** 2003. Use of a two-hybrid assay to study the assembly of a complex multicomponent protein machinery: bacterial septosome differentiation. *Microbiology.* 149:3353-9.
- Edwards, D. H., and J. Errington.** 1997. The *Bacillus subtilis* DivIVA protein targets to the division septum and controls the site specificity of cell division. *Mol. Microbiol.* 24:905-915.
- Edwards, D. H., H. B. Thomaides, and J. Errington.** 2000. Promiscuous targeting of *Bacillus subtilis* cell division protein DivIVA to division sites in *Escherichia coli* and fission yeast. *EMBO J.* 19:2719-27.
- Errington, J., R. A. Daniel, and D.-J. Scheffers.** 2003. Cytokinesis in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67:52-65.
- Fadda, D., C. Pischedda, F. Caldara, M. B. Whalen, D. Anderluzzi, E. Domenici, and O. Massidda.** 2003. Characterization of divIVA and other genes located in the chromosomal region downstream of the dcw cluster in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 185:6209-6014.
- Flärdh, K.** 2003. Essential role of DivIVA in polar growth and morphogenesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol. Microbiol.* 49:1523–1536.
- Goehring, N. W., and J. Beckwith.** 2005. Diverse paths to midcell: assembly of the bacterial cell division machinery. *Curr. Biol.* 15:R514-26.
- Higgins, M. L., and G. D. Shockman.** 1970. Model for cell wall growth of *Streptococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* 101:643-648.
- Ishikawa, S., Y. Kawai, K. Hiramatsu, M. Kuwano, and N. Ogasawara.** 2006. A new FtsZ-interacting protein, YlmF, complements the activity of FtsA during progression of cell division in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 60:1364-80.
- Lara, B., A. I. Rico, S. Petruzzelli, A. Santona, J. Dumas, J. Biton, M. Vicente, J. Mingorance, and O. Massidda.** 2005. Cell division in cocci: localization and properties of the *Streptococcus pneumoniae* FtsA protein. *Mol. Microbiol.* 55:699-711.

- Levin, P. A., I. G. Kurtser, and A. D. Grossman.** 1999. Identification and characterization of a negative regulator of FtsZ ring formation in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 96:9642–9647.
- Massidda, O., D. Anderluzzi, L. Friedli, and G. Feger.** 1998. Unconventional organization of the division and cell wall gene cluster of *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiology*. 144:3069–3078.
- Morlot, C., A. Zapun, O. Dideberg, and T. Vernet.** 2003. Growth and division of *Streptococcus pneumoniae*: localization of the high molecular weight penicillin-binding proteins during the cell cycle. *Mol. Microbiol.* 50:845–55.
- Morlot, C., M. Noirclerc-Savoye, A. Zapun, O. Dideberg, and T. Vernet.** 2004. The D,D-carboxypeptidase PBP3 organizes the division process of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* 51:1641–8.
- Miyagishima, S. Y., C. P. Wolk, and K. W. Osteryoung.** 2005. Identification of cyanobacterial cell division genes by comparative and mutational analyses. *Mol. Microbiol.* 56:126–43.
- Muchova, K., E. Kutejova, D. J. Scott, J. A. Brannigan, R. J. Lewis, A. J. Wilkinson, and I. Barak.** 2002. Oligomerization of the *Bacillus subtilis* division protein DivIVA. *Microbiology*. 148:807–813.
- Ng, W. L., K. M. Kazmierczak, and M. E. Winkler.** 2004. Defective cell wall synthesis in *Streptococcus pneumoniae* R6 depleted for the essential PcsB putative murein hydrolase or the VicR (YycF) response regulator. *Mol. Microbiol.* 53:1161–75.
- Ng, W. L., H. C. Tsui, and M. E. Winkler.** 2005. Regulation of the *pspA* virulence factor and essential *pcsB* murein biosynthetic genes by the phosphorylated VicR (YycF) response regulator in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol.* 187:7444–59.
- Noirclerc-Savoye, M., A. Le Gouellec, C. Morlot, O. Dideberg, T. Vernet, and A. Zapun.** 2005. In vitro reconstitution of a trimeric complex of DivIB, DivIC and FtsL, and their transient co-localization at the division site in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* 55:413–24.
- Pinho, M. G., and J. A. Errington.** 2004. A *divIVA* null mutant of *Staphylococcus aureus* undergoes normal cell division. *FEMS Microbiol. Lett.* 240:145–9.
- Ramirez-Arcos, S., M. Liao, S. Marthaler, M. Rigden, and J. A. Dillon.** 2005. *Enterococcus faecalis divIVA*: an essential gene involved in cell division, cell growth and chromosome segregation. *Microbiology*. 151:1381–93.

- Ramos, A., M. P. Honrubia, N. Valbuena, J. Vaquera, L. M. Mateos, and J. A. Gil.** 2003. Involvement of DivIVA in the morphology of the rod-shaped actinomycete *Brevibacterium lactofermentum*. *Microbiology*. 149:3531–3542.
- Stahlberg, H., E. Kutejova, K. Muchova, M. Gregorini, A. Lustig, S. A. Muller, V. Olivieri, A. Engel, A. J. Wilkinson, and I. Barak.** 2004. Oligomeric structure of the *Bacillus subtilis* cell division protein DivIVA determined by transmission electron microscopy. *Mol. Microbiol.* 52:1281-90.
- Stark, M. J.** 1987. Multicopy expression vectors carrying the lac repressor gene for regulated high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Gene*. 51:255-67.
- Thomaides, H. B., M. Freeman, M. El Karoui, and J. Errington.** 2001. Division site selection protein DivIVA of *Bacillus subtilis* has a second distinct function in chromosome segregation during sporulation. *Genes Dev.* 15:1662-1673.
- Vicente, M., A. I. Rico, R. Martinez-Arteaga, and J. Mingorance.** 2006. Septum enlightenment: assembly of bacterial division proteins. *J. Bacteriol.* 188:19-27.
- Weiss, D. S.** 2004. Bacterial cell division and the septal ring. *Mol. Microbiol.* 54:588–597.
- Wu, L. J., and J. Errington.** 2003. RacA and the Soj-Spo0J system combine to effect polar chromosome segregation in sporulating *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 49:1463-