

University of Groningen

Interactions of cell division protein FtsZ with large and small molecules

Cendrowicz, Ewa

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

2016

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Cendrowicz, E. (2016). *Interactions of cell division protein FtsZ with large and small molecules*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. University of Groningen.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Appendices



SAMENVATTING

De eerste bekende fase in de bacteriële celdeling is de vorming van de zogenaamde Z-ring in het midden van de cel. Deze Z-ring is samengesteld uit FtsZ eiwitten en de vorming ervan is een zeer complex proces, wat onder meer de polymerisatie van FtsZ eiwitten tot lange protofilamenten inhoudt. Deze protofilamenten worden gekoppeld aan de binnenmembraan door middel van andere eiwitten, bijvoorbeeld FtsA en ZipA. Daaropvolgend worden de enkelvoudige FtsZ filamenten gecrosslinked met behulp van andere eiwitten of ze interageren met elkaar via laterale verbindingen. Op die manier wordt er een dikkere structuur gevormd.

Tijdens de vorming van deze complete Z-ring structuur worden andere celdelingseiwitten gerekruteerd wat resulteert in het ontstaan van het divisoom, een groot eiwitcomplex. Het divisoom is verantwoordelijk voor de vernauwing van het membraan en het ingroeien van de celwand, met de splitsing van de oorspronkelijke moeder cel in twee precies even grote dochtercellen als gevolg.

FtsZ is de belangrijkste pion in dit gehele proces. Het is een zeer geconserveerd essentieel eiwit, en de opbouw en de afbraak van de Z-ring wordt zeer sterk gereguleerd door andere eiwitten met een correcte scheiding van de cellen als resultaat. In aanwezigheid van FtsZ remmers of wanneer de hoeveelheid FtsZ eiwitten te laag wordt, zijn cellen niet meer in staat om te delen, waardoor ze verder groeien tot lange filamenten en uiteindelijk doodgaan.

171

HET FTSZ EIWIT

FtsZ bestaat uit 5 domeinen die allemaal cruciaal zijn voor de correcte werking van het eiwit zelf maar ook van het celdelingsapparaat. In aanwezigheid van GTP kan FtsZ lange protofilamenten vormen door longitudinale interacties tussen de globulaire domeinen van de FtsZ eiwitten, die zodanig op elkaar worden gezet. Deze interacties activeren GTP hydrolyse. Laterale interacties tussen protofilamenten van FtsZ vertegenwoordigen een ander soort interacties. Het C-terminale uiteinde van FtsZ is hierbij betrokken, meer in het bijzonder de laatste 4 tot 6 aminozuren van het eiwit (CTV). Van het CTT domein,

een korte α -helix van 9 aminozuren gelegen vóór het CTV, is aangetoond dat deze betrokken is bij verschillende interacties met bindingspartners van FtsZ. Het CTT en CTV domein zijn verbonden met het globulaire domein via een van nature ongestructureerde C-terminale linker die belangrijk is voor de vorming van protofilamenten en de architectuur van de Z-ring *in vivo*.

In **hoofdstuk 2** worden protocollen beschreven om op biochemische wijze FtsZ te bestuderen in verschillende buffers. De polymerisatie van FtsZ afkomstig uit twee modelorganismen, *E. coli* (FtsZ_{Ec}) en *B. subtilis* (FtsZ_{Bs}) bij verschillende pH (6.5, 6.8 en 7.5) en bij verschillende KCl concentraties (50 en 300 mM) wordt met elkaar vergeleken. Sommige methoden beschreven in **hoofdstuk 2** worden in de volgende drie hoofdstukken toegepast. Door ervaring op te doen over het gedrag van FtsZ in verschillende condities kon men snel tot een selectie komen van de beste condities voor interactiestudies met andere eiwitten (**hoofdstuk 3 en 4**) en kleine molecuulremmers (**hoofdstuk 5**). Deze protocollen zijn ook met succes in ons laboratorium aangepast om FtsZ uit andere organismen te bestuderen.

FTSZ INTERAGERENDE EIWITTEN

Zeker 9 eiwitten reguleren rechtstreeks de opbouw van FtsZ tot een Z-ring in *B. subtilis*. FtsA, EzrA en SepF vormen een membraananker in de cel voor FtsZ tijdens vegetatieve groei. SpolIE vormt ook een membraananker voor FtsZ, nodig voor de migratie van de Z-ring van het midden van de cel naar de celpolen tijdens sporulatie. De meeste van deze eiwitten reguleren de opbouw van FtsZ op positieve wijze, bijgevolg stimuleren ze de polymerisatie of de bundeling van FtsZ. Nog zo een positieve FtsZ regulator is het cytoplasmatische eiwit ZapA, dat FtsZ structuren stabiliseert door het crosslinken van de protofilamenten. Negatieve regulatoren daarentegen verhinderen FtsZ polymerisatie op plaatsen waar of op momenten wanneer de Z-ring niet gevormd zou mogen worden. Bijvoorbeeld, MinC voorkomt dat FtsZ polymeriseert aan de celpolen waardoor correcte lokalisatie van de Z-ring in het midden van de cel wordt verzekerd tijdens vegetatieve groei.

Veel eiwitten die interactie aangaan met FtsZ binden aan het C-terminale uiteinde van FtsZ (CTT+/-CTV). In **hoofdstuk 3** wordt een pull-down methode

beschreven die het mogelijk maakt om zulke eiwitten te vinden. De laatste 69 aminozuren van FtsZ, die de niet-geconserveerde linker en de CTT+CTV sequenties bevatten, werden gefuseerd met een HaloTag. De HaloTag bestaat uit een gemodificeerde dehalogenase dat een covalente binding kan aangaan met sepharosekorrels via een chloroalkaanligand. Gelyseerde *E. coli* culturen waarin EzrA, MinC en SepF tot overexpressie gebracht zijn, werden vervolgens samen met sepharosekorrels, die het C-terminale uiteinde van FtsZ gebonden hadden, geïncubeerd. Na afloop van dit pull-down experiment werd enkel SepF teruggevonden, alhoewel van zowel EzrA en MinC voorheen werd aangetoond dat ze ook interactie kunnen aangaan met het C-terminale uiteinde van FtsZ. Om na te gaan welke aminozuren van de C-terminus betrokken zijn bij de interactie met SepF, werd elk aminozuur in de C-terminus gemuteerd tot een alanine en hetzelfde pull-down experiment werd met deze collectie enkelvoudige mutanten uitgevoerd. Mutatie van twee zeer geconserveerde residuen P372 en P374 zorgde voor een volledige remming van de binding van SepF met de C-terminus. Zeer verrassend was dat de mutatie van de meeste andere aminozuren (11 tot 16) ook een zekere invloed had op deze binding. Hieruit kan men concluderen dat waarschijnlijk de secundaire en tertiaire structuur van de C-terminus belangrijk is voor de interactie met SepF.

173

Een bindingspartner van FtsZ die nog niet in detail bestudeerd werd, is het sporulatie-gerelateerde eiwit SpolIE. SpolIE is een membraaneiwit en zou uit drie domeinen bestaan: het membraandomein I, het oligomerisatiedomein II, dat interactie aangaat met FtsZ en het fosfatasedomein III. Sinds lange tijd is bekend dat FtsZ en SpolIE *in vivo* co-lokaliseren en dat SpolIE betrokken is bij de relokalisatie van FtsZ van het midden van de cel naar de celpolen tijdens sporulatie in *B. subtilis*. In **hoofdstuk 4** worden de interacties tussen FtsZ en SpolIE bestudeerd. Het cytoplasmatische domein van SpolIE (domein II en III) werd gezuiverd met behulp van een MBP fusie om de oplosbaarheid te verbeteren en een Strep-tag voor de daadwerkelijke zuivering (Ms-SpolIE_{cyt}). Het gezuiverde eiwit kon goed aan metaalionen binden die gedurende de vouwing in het eiwit werden ingebouwd in *E. coli*. Hieruit werd afgeleid dat het SpolIE_{cyt} domein correct gevouwen en waarschijnlijk actief is. Binding aan metalen verbetert de oligomerisatie van strep-SpolIE_{cyt}. Dit zou kunnen betekenen dat domein II, wat betrokken is bij de oligomerisatie van SpolIE en het

mangaan-afhankelijk fosfatasedomein III niet volledig onafhankelijk van elkaar zijn maar elkaar kunnen beïnvloeden. In **hoofdstuk 4** wordt aangetoond dat de vorming van het asymmetrische septum vertraagd is in afwezigheid van Mn^{2+} en dat minder asymmetrische Z-ringen worden gevormd in vergelijking met wanneer Mn^{2+} in het medium aanwezig is. Dit fenotype lijkt erg op het fenotype van de SpolIE knock-out. Dit resultaat doet vermoeden dat metaalbinding door SpolIE niet alleen vereist is voor zijn fosfatase activiteit maar ook zeer belangrijk is voor de rol van SpolIE in asymmetrische celdeling, en dit door invloed te hebben op ofwel de vouwing van SpolIE, de oligomerisatie en/of de interactie met FtsZ. Welke van deze processen wordt beïnvloed, is echter nog niet duidelijk. Omdat Ms-SpolIE_{cyt} in aanzienlijke hoeveelheden gezuiverd kon worden en stabiel was in een grote verscheidenheid van buffers, werd dit eiwit gebruikt om de interacties met FtsZ te bestuderen met behulp van de analyses beschreven in **hoofdstuk 2**. Interacties tussen FtsZ en Ms-SpolIE_{cyt} werden enkel geobserveerd in aanwezigheid van GDP, terwijl interacties tussen FtsZ protofilamenten en Ms-SpolIE_{cyt} in aanwezigheid van GTP in geen enkele standaard analyse gedetecteerd kon worden. Nochtans is een directe interactie tussen SpolIE en FtsZ duidelijk en de conclusies beschreven in hoofdstuk 4 kunnen van belang zijn bij andere studies over de interactie tussen FtsZ en SpolIE.

KLEINE MOLECUULREMMERS VAN FTSZ

Veel onderzoek wordt verricht naar FtsZ als een aantrekkelijk doelwit voor de ontwikkeling van nieuwe antibiotica. De meeste aandacht gaat naar humane pathogenen, meer in het bijzonder de groep van multidrug-resistente pathogenen zoals *S. aureus* of *M. tuberculosis*. In **hoofdstuk 5** wordt de mogelijke werking van semi-synthetische verbindingen, alkylgallaten, tegen FtsZ onderzocht. Alkylgallaten zijn derivaten van galluszuur, wat een intermediair is van de tannine biosynthetische route in planten. Ze worden gemakkelijk gehydrolyseerd tot galluszuur en overeenkomstige alcoholen. Alhoewel deze alkylgallaten beperkt toegepast worden in de geneeskunde, kunnen ze als een milieuvriendelijk alternatief voor pesticiden in de landbouw gebruikt worden.

In **hoofdstuk 5** wordt de rol van pentyl-, hexyl-, heptyl- en octylgallaten verder onderzocht in het modelorganisme *B. subtilis*. Om celdeling te visual-

iseren in levende cellen werd een FtsZ-eYFP fusie gemaakt. Na behandeling met alkylgallaten was de celdeling in *B. subtilis* aangetast. De cellen waren significant langer vergeleken met de controlecellen en FtsZ-eYFP lokaliseerde niet meer op de plaats van de Z-ring maar op random verspreide plekken in het cytoplasma.

EM analyse toonde aan dat de alkylgallaten verantwoordelijk zijn voor de clustering van FtsZ en de bundeling van voorgevormde FtsZ polymeren. Bovendien kunnen deze verbindingen zeer effectief de GTPase activiteit van FtsZ remmen. Er is een verband aangetoond tussen de activiteit van alkylgallaten *in vivo* en *in vitro* aangezien heptylgallaat de laagste MIC, de laagste bindingsconstante en de hoogste activiteit tegen FtsZ *in vitro* had. Deze bevindingen tonen gezamenlijk aan dat FtsZ een direct doelwit voor alkylgallaten is. In een onderzoek van Takai *et al.* werd aangetoond dat alkylgallaten zich kunnen richten op celmembranen, wat ook hier door middel van een membraanpermeabiliteitsanalyse aangetoond werd. Omdat de delokalisatie van FtsZ-eYFP van het midden van de cel door alkylgallaten niet een gevolg is van de verstoring van de integriteit van het celmembraan, kan worden besloten dat alkylgallaten bacteriën doden door een combinatie van mechanismen: verstoring van de integriteit van het celmembraan en het belemmeren van de celdeling.

De resultaten beschreven in dit proefschrift geven nieuwe informatie voor het FtsZ onderzoek in drie verschillende gebieden: de interacties tussen FtsZ en eiwitpartners, FtsZ als doelwit voor de ontwikkeling van antibiotica en de normalisering van de condities in FtsZ analyses.

ABOUT THE AUTHOR

Ewa Cendrowicz (fam. Król), born on 8th May, 1986 in Łódź, Poland. In personal life, she is a content wife and a mother of two children. Her professional career is connected to biotechnology and biochemistry.



EDUCATION AND RESEARCH

Biochemist, MABION S. A. Konstantynów Łódzki, Poland (2016 - ...)

PhD in the Department of Molecular Microbiology at the University of Groningen, The Netherlands

Research field: Interactions of cell division protein FtsZ from *Bacillus subtilis* with large and small molecules. (2011-2015)

176 Erasmus and Master internship at the Instituto de Tecnologia Quimica e Biologica, Oeiras, Portugal

Research field: Purification of subunit B of Cholera Toxin from *Vibrio cholerae*. (2010)

Internship at the Institute of Medical Sciences in Aberdeen, Scotland (2009)

Internship at the Institute of Agricultural and Food Biotechnology in Łódź, Poland (2008)

International exchange program "Campus Europae" at the Department of Biotechnology at the University of Aveiro, Portugal (2007-2008)

Master of Science degree and the Department of Biotechnology and Food Technology at Technical University of Lodz, Poland (2005-2010)

LIST OF PUBLICATIONS

- Król, E.**, de Sousa Borges, A., da Silva, I., Polaquini, C. R., Regasini, L. O., Ferreira, H., & Scheffers, D. J. (2015). Antibacterial activity of alkyl gallates is a combination of direct targeting of FtsZ and permeabilization of bacterial membranes. *Frontiers in microbiology*, 6.
- Król, E.**, & Scheffers, D. J. (2013). FtsZ polymerization assays: simple protocols and considerations. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (81), e50844-e50844.
- Król, E.**, van Kessel, S. P., van Bezouwen, L. S., Kumar, N., Boekema, E. J., & Scheffers, D. J. (2012). *Bacillus subtilis* SepF binds to the C-terminus of FtsZ. *PloS one*, 7(8), e43293.

ACKNOWLEDGMENTS

So many things have happened in only 5 years in the city of Groningen! A PhD was the goal of my staying in The Netherlands, but next to the delightful moments in Molmic group, hard work and grand time with wonderful people in the green building, my private life was also very abundant. Marriage, arrival of two beautiful children, developing friendships, that I hope will last my whole life. My time here, in Groningen, was filled with hard work, wonderful time with family and friends and a lot of love and happiness. Now, is the right time to thank all of the people who were part of my staying here. Without all of you, these 5 years would not be the same.

PROMOTORS

First of all, I would like to give many thanks to my promotor and daily supervisor **Dirk-Jan**. Thank you for encouraging me to apply (while still in Portugal) and for selecting me for this vacancy. You taught me all FtsZ techniques already during the first week of my contract. You gave me more supervision in the beginning and less and less as my experience increased. It brought me to some level of independence in my work. Even if it was sometimes difficult and caused many mistakes, I appreciate your way of leading me to my future professional life. Thank you for interesting projects and all of the possibilities of collaborations. During the biggest panic attacks in the last year of my PhD studies, you always told me: "don't worry, Ewa". In the end, I want to thank you very much for many talks we had considering the matter of staying on the path of science, finding a work-life balance and many more. Usually, all of it did not make taking a decisions easier or more clear 😊, but they definitely encouraged me to take a broader view on things.

Arnold. Thank you very much for your advice and patience, especially in difficult tasks. I appreciate your encouragement to think more about my own projects. It was a real pleasure to be a part of your group.

MY DEAR PARANIMFS

ANA! At work, I spend most of my time with you. I think around 85% (the remaining 15% is our holidays which, unfortunately, we could not spend together).

Office, lab, lunch breaks, “I am going to ..., do you want to walk with me?”, “sure!”. Laughs, tears, jokes, complains... Very quickly you became my close friend. Thank you for all the time spent together and your priceless support during this time. You are very special to me! **Elke**. You are a supermom! I am very happy I have met you. Thank you for small chats and advice. It was always nice to stop by your office on the way to coffee machine. Thank you for the Dutch summary. Girls, thank you for your help with the preparation of my defence day.

COLLABORATORS AND STUDENTS

Eve, Sebas. It was a pleasure to work with you. You are both very smart. You caught all the methods very quickly and produced many many good results. **Isa, Raquel**. Thank you for working with me in the lab and for the nice projects which you brought to our group. Raquel, we had intensive time finishing experiments. Spending the whole evening in the lab, only with you! **Laura**, we worked on two projects together. It was always intensive and successful work. And it was pleasure for me. **Mariana Pinho, Henrique Ferreira, Egbert Boekema, Tanneke den Blaauwen**. Thank you for the possibilities of joining your interesting projects. Not always everything worked out, but everything I learned from it is priceless. Egbert, thank you for your trust. **Gert**, thank you for looking at my projects with a careful eye of an expert. **Marc**, your advice are always the best. You thought me everything I know about electron microscopy. But, you also helped me to find my way as a PhD student. Thank you for all the talks!

Hania. Thank you for all conversations about “these stupid metalloenzymes”. Thank you for all your advice , e-mails etc. Without you it would not go that far. **Marysia**, thank you for advice on LICs.

ALL MOLMIC MEMBERS

Ana, thank you for the ideas, help and advice when I was not sure about the exact direction. Thank you for successful experiments in our projects. **Gosia K**. Thank you for many evenings with finding good solutions for difficult projects. **Sabrina**. Thank you for days in front of nanotemper and advice on labelling protein, **Marteen** for your fluorescence advice. **Ilja, Samta, Jeanine, Alexej**. Your help was priceless, especially at the beginning of my PhD. It is very good to have post-docs – experts in the group. **Janny, Greetje, Anne-Bart, Stefan**,

thank you for technical support, which I needed often. **Juke, Intan, Irfan, Antonella, Reto, Ciprian, Erik, Jan-Pieter, Lito**, thank you for small and big advice. **Bea!** Have I already told you that you are simply the best? Without you, I would not survive all the difficult days and matters at the university. Each time I asked you for help or advice, you solved my problems in 10 seconds. How was it possible? A superwoman? **Anmara** and **Manon**, thank you for your support. Other Molmic members with whom I spent wonderful time. And to these who always greeted me with smile on the corridor: **Annarita, Amalina, Yang, Ciprian, Min, Danae, Hyun, Susan, Jeroen, Zsofia, Yanping, Carsten** (thank you for switching off fluorimeter at 1 a.m.;)), **Fabiola, Loes, Magda. Reto, Sasha, Ciprian**, thank you for small talks about life. **Gosia A.**, your office had a very good location! It was always within reach! Thank you for all your advices on maternity, work, life in Groningen, life choices. I appreciate becoming close friends so quickly. When you left the group, it became quite empty. Other Molmic members and students: **Menno, Yvonne, Andre, Yannick, Sandra, Niels, Marta, Marta S., Fernando, Riccardo, Javier, Tomek, Ali, Jelger**. It was a very good time in the Molmic group. Thanks to all of you.

181

MY DEAR POLISH FRIENDS FROM GRONINGEN

Marysia and Maciek, I have never met people like you before. You are just amazing people and a great example for others. You quickly became my family's best friends in here and you are people that I will miss the most when I leave. Thank you for your friendship, dinners, meetings, and for all the help you offered many times when me and my family were in trouble. **Gosia, Sławek, Jagódka**, we also became good friends so quickly. Gosia, I missed you in the group and outside the laboratory, after you made the decision about moving back to Poland. Especially, I miss your jokes and comments straight to the point with a small glimpse of ironic remarks. **Agata, Gosia** and **Magda** were first Polish people in Molmic that I met when arrived for my job interview. Agata, thank you for introducing me to the Polish group and being a big support during my first days in Groningen. **Hania**, you are a special person, always very nice and helpful. Thank you for your support with my projects. It was always nice to talk to you. **Gosia M**, another Gosia but a special Gosia☺. Thanks to you and your prayers, I finished my thesis. Thank you very much for your time, friendship and

our prayers together. Another Polish people with whom I spent splendid time here in Groningen are: **Pani Isia, Pani Krysia, Weronika, Gabrysia, Paweł, Kasia, Maciek, Dawidek, Ola, Maciek, Hubercik, Jacek, Wojtek, Justyna, Agata, Piotrek, Monika, Adam i Oskarek.** You were a very important part of my and my family's life here, in Groningen. With you, it always felt like being at home.

Gosia, Janek, Marysia i Olafek, thanks for a very good time together. It's a pity we have met so late. Polish parish in Groningen with our priest **Józef Okonek.** Thank you for having a place where I could pray in my own language and nice community where, together with my family, I felt safe.

MORE FRIENDS...

Opstap mothers, thank you for teaching me Dutch, so pity it was just for a few months. My friends in Poland: **Ania, Marysia, Kasia,** thank you for having time for me every time I was back in Łódź. I want to thank all other people which I met here, with whom I spend a great time but were not mentioned here.

182

MY PARENTS

Kochani rodzice, bardzo Wam dziękuję za wsparcie, pomoc, wychowanie. Dziękuję Wam za czas, który poświęciliście, żeby udało mi się skończyć doktorat. **Mamo!** Jesteś wyjątkowa. Dziękuję, że zawsze znajdowałaś czas, kiedy Cię potrzebowaliśmy, i za miłość, którą dajesz nam i naszym dzieciom. Dziękuję mojej **teściowej** za pomoc przy opiece nad Milenką. Rodzeństwu: **Łukaszowi, Marcie, Beacie,** za pomoc przy załatwianiu spraw w Polsce. Łukasz, dziękuję Ci za pomoc przy naszym mieszkaniu i służenie radą. **Babciu, dziadku!** Dobrze, że jesteście.

AND MY DEAR CLOSEST FAMILY.

My dear husband, **Łukasz.** Thank you for coming with me to Groningen. Thank you for your patience, support and love. Thank you for all the drawings you have made and patience to read my thesis so carefully. I love you and I am very happy with you! Moje Kochane Dzieciaczki: **Milenusia i Mieszkuś.** Dziękuję Wam za cierpliwość, za Wasze cudowne uśmiechy i szczerłość. Nauczyłam się od Was i dzięki Wam bardzo wiele. Kocham Was bardzo! Milenko, dziękuję za

prześliczny rysunek na okładkę. Together, we have built a place to which it is always so nice to come back after a difficult day at work. Our home is a safe place where I always feel fantastic. Thank you Łukasz, Milenka and Mieszko for being with me all the time. I love you!

Drogi Boże, dziękuję Ci za opiekę. Bez Ciebie nic nie byłoby tak jak jest.