OK

INSTITUTO DE QUÍMICA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

**Análise funcional das proteínas HrcA,
GroES/GroEL e DnaK/DnaJ
em *Caulobacter crescentus***

Michelle Fernanda Susin
Tese de Doutorado

Orientadora: Profa. Dra. Suely Lopes Gomes

São Paulo
2005

DEDALUS - Acervo - CQ

30100011193

Ficha Catalográfica

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

Susin, Michelle Fernanda

S964a Análise funcional das proteínas HrcA, GroES/GroEL e
DnaK/DnaJ em *Caulobacter crescentus* / Michelle Fernanda
Susin. - São Paulo, 2005.
104p

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

Orientador : Gomes, Suely Lopes

1. Regulação gênica 2. Fisiologia : Bactéria 3. Proteína :
Bioquímica I. T. II. Gomes, Suely Lopes, orientador

574.88 CDD

“Análise funcional das proteínas HrcA, GroES/GroEL e DnaK/DnaJ em *Caulobacter crescentus*”

MICHELLE FERNANDA SUSIN

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

Aprovado(a) por:

Profa. Dar. SUELY LOPES GOMES
IQ – USP
(Orientadora e Presidente)

Profa. Dra. ALINE MARIA DA SILVA
IQ – USP

Prof. Dr. BENY SPIRA
ICB – USP

Profa. Dra. MARCIA GIAMBIAGI DE MARVAL
UFRJ

Profa. Dra. LEDA SATIE CHUBATSU
UFPR

SÃO PAULO
15 DE AGOSTO 2005

Aos meus pais, Vitor e Jeanine,
exemplos de amor e dedicação
aos filhos e neto.

Ao meu querido filho Eduardo,
razão da minha vida.

Ao meu Giampaolo, companheiro
de todas as horas.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Suely Lopes Gomes, apresento o meu especial agradecimento pela orientação competente, pelo apoio, pela compreensão e principalmente pelo exemplo de dedicação.

Ao Prof. Dr. Frederico Gueiros Filho pela parceria na realização dos experimentos de microscopia, pelas discussões, sugestões e incentivo.

À Profa. Dra. Marílis do Valle Marques pelas valiosas sugestões e incentivo durante todo o decorrer do trabalho.

À Regina L. Baldini, por ter iniciado este trabalho, pela disponibilidade e pela enorme ajuda no início e na conclusão da minha pós-graduação.

À Rita C. G. Simão pela ótima parceria de trabalho, pelas discussões, pelo incentivo e pela grande amizade.

À Sandra e a Luci, pelo apoio técnico eficiente e pelos conselhos e amizade.

Aos colegas de laboratório que já tomaram outros rumos, Rita, Regina, Marcelo, Luciana, Luciano e Antônio Carlos, pelo suporte dado a minha integração no laboratório e em São Paulo, pelo apoio, colaboração, paciência e carinho.

Aos colegas atuais, Silvia, Tie, Karina, Cristina, Rogério, Raphaela e Humberto pelo bom ambiente de trabalho, pela convivência e colaboração.

Aos colegas do laboratório da Profa. Dra. Marílis do Valle Marques: Valéria, Vânia, Elza, Lígia, Luiz Fernando e José, pela colaboração e pelo carinho.

Às minhas amigas, Silvia, Raquel, Daniela Beton, Daniela Gonzáles, Juliana, Fabiana e Edlaine pelo companheirismo, pela torcida e sobretudo por terem compartilhado comigo as dificuldades e vitórias durante os vários anos de convívio.

Aos meus amigos de longa data, Thirza, Flávia, Máira, Renata, Edite, Leonardo e aos meus familiares, pela força mesmo à distância. Especialmente à minha prima Juliana pela “mão”, ou melhor, mãos...

Ao meu avô Eduardo pela sabedoria e lição de vida.

Ao Giam, pela confiança, amor e por estar ao meu lado, me apoiando, incentivando e dando coragem para que eu pudesse finalizar este trabalho com sucesso.

Aos meus pais, meus primeiros e melhores professores, que nunca mediram esforços para a minha formação pessoal e profissional, pela fonte inesgotável de amor e especialmente por dispensarem parte de suas existências à minha existência.

Ao meu filho Eduardo por tornar a minha vida mais colorida e pelo sorriso mais lindo do mundo.

À FAPESP pelo apoio financeiro.

RESUMO.....	VIII
ABSTRACT.....	IX
INTRODUÇÃO.....	1
1. O ciclo celular de <i>Caulobacter crescentus</i>	1
2. Proteínas de choque térmico.....	5
3. Regulação da resposta ao choque térmico.....	8
3.1. Fator σ^{32}	8
3.2. O sistema CIRCE/HrcA.....	13
OBJETIVOS.....	18
MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
1. Linhagens e plasmídeos.....	19
2. Meios e condições de cultura.....	20
3. Isolamento de DNA, digestão com enzimas de restrição, desfosforilação, ligação e sequenciamento.....	21
4. Oligonucleotídeos.....	22
5. Transformação.....	22
6. Conjugação.....	23
7. “Western blot”.....	23
8. Mutagênese sítio-dirigida.....	24
9. Clonagem dos genes <i>hrcA</i> mutados no vetor de expressão pPROEX-1.....	26
10. Expressão e purificação de HrcA recombinante.....	26
11. Ensaio de retardamento de migração em gel de poliacrilamida (ERMGP).....	27
12. Ensaio de co-eluição HrcA-GroEL usando HrcA imobilizada em coluna de Ni-agarose.....	28
13. Ensaio de atividade de β -galactosidase.....	28
14. Teste de sobrevivência a diferentes condições de estresse.....	29
15. Marcação de células com pulsos [35 S]-metionina.....	30
16. Preparação de células para microscopia óptica.....	30
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
1. Análise funcional da proteína repressora HrcA.....	32
1.1. Ligação específica da proteína HrcA recombinante ao elemento CIRCE.....	32

1.2. Níveis alterados de GroES/GroEL afetam a atividade promotora de <i>groESL in vivo</i>	36
1.3. Interação de GroEL e HrcA <i>in vitro</i>	41
1.4. Análise de mutantes pontuais de HrcA.....	41
1.4.1. As mutantes HrcA Pro81Ala e HrcA Arg87Ala apresentam capacidade reduzida de ligação ao elemento CIRCE.	43
1.4.2. A mutante HrcA Ser56Ala produz um fenótipo dominante-negativo.....	43
1.5. Discussão.....	47
2. Caracterização das linhagens mutantes condicionais em <i>groESL</i> (SG300) e em <i>dnaKJ</i> (SG400) de <i>Caulobacter crescentus</i>	52
2.1. Análise dos níveis de GroEL e DnaK nas linhagens SG300 e SG400 de <i>C. crescentus</i>	52
2.2. Análise do crescimento das linhagens SG300 e SG400 de <i>C. crescentus</i>	54
2.3. Análise da sobrevivência ao choque térmico das linhagens SG300 e SG400 de <i>C. crescentus</i>	56
2.4. Análise da sobrevivência na temperatura letal de 48°C e aquisição de termotolerância nas linhagens SG300 e SG400 de <i>C. crescentus</i>	58
2.5. Análise da sobrevivência a estresse oxidativo nas linhagens SG300 e SG400 de <i>C. crescentus</i>	61
2.6. Análise da sobrevivência à exposição a alta concentração de etanol nas linhagens SG300 e SG400 de <i>C. crescentus</i>	63
2.7. Análise da sobrevivência a estresse salino e osmótico nas linhagens SG300 e SG400 de <i>C. crescentus</i>	65
2.8. Análise da sobrevivência nas linhagens SG300 e SG400 de <i>Caulobacter crescentus</i> ao congelamento.....	67
2.9. Análise dos níveis das proteínas GroEL, DnaK e do fator sigma 32 em resposta aos diversos estresses ambientais estudados.....	69
2.10. Análise da morfologia e viabilidade das células das linhagens SG300 e SG400 em condições permissivas ou restritivas.....	71
2.11. Análise da formação do anel Z nas linhagens SG300 e SG400.....	78
2.12. Discussão.....	81
CONCLUSÕES FINAIS.....	90
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	93
CURRICULUM VITAE.....	104

Análise funcional das proteínas HrcA, GroES/GroEL e DnaK/DnaJ em *Caulobacter crescentus*.

O operon *groESL* de *C. crescentus* apresenta dupla regulação. A indução deste operon por choque térmico é dependente do fator sigma de choque térmico σ^{32} . A temperaturas fisiológicas, a expressão de *groESL* apresenta regulação temporal durante o ciclo celular da bactéria e o controle envolve a proteína repressora HrcA e o elemento CIRCE (controlling inverted repeat of chaperonin expression). Para estudar a atividade da proteína repressora *in vitro*, produzimos e purificamos de *E. coli* a HrcA de *C. crescentus* contendo uma cauda de histidinas e a ligação específica ao elemento CIRCE foi analisada em ensaios de migração retardada em gel de poliacrilamida (EMRGP). A quantidade de DNA retardada pela ligação a HrcA aumentou significativamente na presença de GroES/GroEL, sugerindo que estas proteínas modulam a atividade de HrcA. Corroboração desta modulação foi obtida analisando fusões de transcrição da região regulatória de *groESL* com o gene *lacZ*, em células de *C. crescentus* produzindo diferentes quantidades de GroES/EL. HrcA contendo as substituições Pro81Ala e Arg87Ala, aminoácidos que se localizam no domínio putativo de ligação ao DNA da proteína, mostraram ser deficientes na ligação a CIRCE, tanto *in vitro* como *in vivo*. Em adição, HrcA Ser56Ala expressa na mesma célula juntamente com a proteína selvagem produziu um fenótipo dominante-negativo, indicando que a HrcA de *C. crescentus* liga-se a CIRCE como um oligômero, provavelmente um dímero.

As tentativas de obtenção de mutantes nulos para os genes *groESL* ou *dnaKJ* falharam, indicando que as proteínas GroES/GroEL e DnaK/DnaJ são essenciais em *C. crescentus*, mesmo a temperaturas normais. Foram então construídas no laboratório as linhagens mutantes condicionais SG300 e SG400 de *C. crescentus*, onde a expressão de *groESL* e de *dnaKJ*, respectivamente, está sob controle de um promotor induzido por xilose (P_{xyx}). Estas linhagens foram caracterizadas quanto à sua morfologia em condições permissivas ou restritivas, assim como quanto à capacidade de sobrevivência frente a vários tipos de estresse. As células da linhagem SG300, exauridas de GroES/GroEL, são resistentes ao choque térmico a 42°C e são capazes de adquirir alguma termotolerância. Entretanto, estas células são sensíveis aos estresses oxidativo, salino e osmótico. As células da linhagem SG400, exauridas de DnaK/J, são sensíveis ao choque térmico, à exposição a etanol e ao congelamento, e são incapazes de adquirir termotolerância. Além disso, tanto as células exauridas de GroES/GroEL quanto as exauridas de DnaK/DnaJ apresentam problemas na sua morfologia. As células de SG300 exauridas de GroES/GroEL formam filamentos longos que possuem constrictões fundas e irregulares. As células de SG400 exauridas de DnaK/DnaJ são apenas um pouco mais alongadas que as células pré-divisionais selvagens e a maioria das células não possuem septo. Estas observações indicam bloqueio da divisão celular, que deve ocorrer em diferentes estágios em cada linhagem.

Functional analysis of HrcA, GroES/GroEL and DnaK/DnaJ proteins in *Caulobacter crescentus*.

In *Caulobacter crescentus*, the *groESL* operon presents a dual type of control. Heat shock induction of the operon is dependent on the heat shock sigma factor σ^{32} . At physiological temperatures, *groESL* expression is cell cycle regulated and the control involves the repressor protein HrcA and the element CIRCE (controlling inverted repeat of chaperonin expression). To study the activity of HrcA *in vitro*, we produced and purified from *E. coli* a histidine-tagged version of the protein, and specific binding to the CIRCE element was analyzed in electrophoretic mobility shift assays (EMSA). The amount of retarded DNA increased significantly in the presence of GroES/GroEL, suggesting that these proteins modulate HrcA activity. Further evidence of this modulation was obtained using lacZ transcription fusions with the *groESL* regulatory region in *C. crescentus* cells producing different amounts of GroES/GroEL. The mutants proteins HrcA Pro81Ala and HrcA Arg87Ala, that contain amino acid substitutions in the putative DNA-binding domain of the protein, were found to be deficient in binding to CIRCE *in vitro* and *in vivo*. Furthermore, HrcA Ser56Ala expressed together with the wild type protein within the same cell, produced a dominant-negative phenotype, indicating that *C. crescentus* HrcA binds to CIRCE in an oligomeric form, most likely as a dimer.

Attempts to obtain null mutants for *groESL* or *dnaKJ* were unsuccessful indicating the importance of GroES/GroEL and DnaK/DnaJ to the survival of *C. crescentus* cells. Conditional mutants were then constructed in our laboratory in which *groESL* and *dnaKJ* expression is under the control of a xylose inducible promoter (P_{xyIX}), giving rise to strains SG300 and SG400, respectively. These strains were characterized in regard to their morphology under permissive and restrictive conditions, as well as their viability under different types of environmental stresses. SG300 cells depleted of GroES/GroEL are resistant to heat shock at 42°C and can acquire some thermotolerance, but they are sensitive to oxidative, saline and osmotic stresses. SG400 cells depleted of DnaK/J are quite sensitive to heat shock, ethanol and freezing, and are unable of acquiring thermotolerance. Cells depleted of either GroES/EL or DnaK/J also present morphological problems. SG300 cells depleted of GroES/EL form long and pinched filaments. SG400 cells depleted of DnaK/J are only somewhat more elongated than wild-type predivisional cells and most cells do not present septum. These observations indicate a cell division arrest, which should occur at different stages in each strain.

1. O CICLO CELULAR DE *Caulobacter crescentus*

As bactérias aquáticas do grupo das *Caulobacters* são encontradas em praticamente todos os ambientes aquáticos e em muitos tipos de solo. São bactérias Gram-negativas, do grupo α das bactérias púrpuras; aeróbicas obrigatórias, que são caracterizadas pela presença de um apêndice derivado da parede celular, a prosteca, denominada também de talo quando apresenta material adesivo em sua extremidade (Poindexter, 1981).

No ambiente oligotrófico onde vivem, as *Caulobacters* são importantes na reciclagem de carbono, utilizando fontes deste elemento encontradas em baixas concentrações e liberando-o ao sistema como CO₂. Apesar de sua larga distribuição e importância ecológica, a maioria dos estudos sobre essas bactérias tem explorado seu peculiar ciclo de vida (Poindexter, 1981).

O seu ciclo celular se inicia com a célula móvel, que é incapaz de replicar o seu DNA até que se diferencie na célula talo. A diferenciação da célula móvel na célula talo, que equivale a transição de G1-S no ciclo celular, é marcada pela perda do flagelo polar e das fímbrias para o meio e a síntese de um talo no mesmo pólo previamente ocupado pelo flagelo. O talo, que consiste no prolongamento da membrana e da parede celular, capacita a célula a fixar-se ao substrato. Com a progressão da replicação, a célula talo se alonga, dando origem à célula pré-divisional e constrói um novo flagelo no pólo oposto ao talo. Após o término da replicação do DNA e a segregação dos cromossomos, a célula se divide produzindo uma nova célula móvel e uma célula talo, células que são morfológica e bioquimicamente distintas (figura 1). A célula talo imediatamente entra em um novo ciclo de replicação e divisão celular, enquanto a célula móvel deve se diferenciar primeiramente em célula talo (Ryan e Shapiro, 2003).

A divisão celular é um processo essencial, altamente regulado e coordenado com muitos outros eventos do ciclo celular de *C. crescentus*. O mecanismo pelo qual a célula percebe a progressão do ciclo celular é ainda desconhecido, mas alguns “checkpoints” já identificados, garantem uma fina coordenação entre os processos que ocorrem durante o ciclo de vida desta bactéria (Martin *et al.*, 2004).

A localização de FtsZ no meio da célula é o primeiro estágio da divisão celular (Bi e Lutkenhaus, 1991). FtsZ é uma GTPase essencial e altamente conservada, homóloga à tubulina, um componente do citoesqueleto eucariótico (Lowe e Amos, 1998). Essa proteína é responsável pela montagem de uma estrutura em anel no sítio onde ocorrerá a divisão celular, o anel Z (Bi e Lutkenhaus, 1991). A associação do anel Z com a membrana citoplasmática e possivelmente a força contráctil gerada pela hidrólise de GTP durante a despolimerização permitem que ocorra a constrição da célula (Chen *et al.*, 1999). Além disso, FtsZ recruta outros componentes do complexo de divisão, como FtsA e FtsQ em *C. crescentus* (Martin *et al.*, 2004). FtsA é uma proteína citoplasmática cuja estrutura lembra a da actina, outra proteína do citoesqueleto eucariótico (van den Ent e Lowe, 2000). O papel desta proteína durante a divisão celular não está completamente esclarecido. Entretanto, a energia gerada durante a hidrólise de ATP pela FtsA provavelmente contribui para a constrição da célula ou então, promove interações com outras proteínas no sítio de divisão celular. FtsA é também responsável pelo recrutamento de outras proteínas de divisão celular, incluindo FtsQ (Chen *et al.*, 1999). FtsQ é composta por um domínio periplasmático requerido para a divisão celular, um pequeno domínio N-terminal citoplasmático e um domínio transmembranar (Chen *et al.*, 1999). FtsQ de *C. crescentus* apresenta também motivos conservados que são encontrados em proteínas que ligam peptidoglicanos (Martin *et al.*, 2004).

A formação do anel ocorre antes da invaginação celular e da separação dos nucleóides em *E. coli* e antes da conclusão da replicação do DNA em *C. crescentus*. Em células de uma população sincrônica de células móveis de *C. crescentus* nas quais a replicação do DNA foi inibida, verificou-se a formação do anel Z em localizações subpolares.

Por outro lado, se a replicação é iniciada antes da sua inibição, o anel Z localiza-se no meio das células, indicando que os eventos iniciais de replicação do DNA são requeridos para o correto posicionamento destes anéis (Quardokus *et al.*, 2003). O objetivo deste “checkpoint” provavelmente é retardar a formação do anel Z no local correto até que a replicação do DNA esteja completa, ou seja, impedir a secção do cromossomo pelo fechamento prematuro do septo (Martin *et al.*, 2004).

O segundo “checkpoint” acopla a replicação do DNA à divisão celular por intermédio da proteína regulatória CtrA. O operon *ftsQA* de *C. crescentus* é transcrito em um estágio mais tardio do ciclo celular, consistente com o provável papel destas proteínas. O promotor *Pqa* é ativado pelo regulador CtrA (Wortinger *et al.*, 2000) sendo o pico de transcrição na célula pré-divisional (Kelly *et al.*, 1998). Em células onde a replicação do DNA foi inibida, CtrA não é sintetizada após a diferenciação da célula móvel para célula talo e a transcrição de *ftsQA* pelo promotor *Pqa*, conseqüentemente não ocorre (Wortinger *et al.*, 2000). O acoplamento da transcrição de *ftsQA* com a replicação fornece um “checkpoint” que coordena a divisão celular com a progressão do ciclo de replicação do DNA, assegurando que cada célula-filha receba uma cópia cromossômica completa (Martin *et al.*, 2004)

Figura 1- **Ciclo celular de *Caulobacter crescentus***: (a) célula móvel; (b) célula talo; (c) célula pré-divisional (Kelly *et al.*, 1998).

2. PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO.

Todos os organismos já estudados respondem ao estresse de temperatura sintetizando de forma rápida e transitória um grupo específico de proteínas conhecidas como proteínas de choque térmico (Hsps), que apresentam um elevado grau de conservação na estrutura primária, sugerindo uma função comum para estas proteínas nos diferentes organismos. Desta forma, sabe-se que as proteínas Hsp10 , Hsp60, Hsp70, Hsp90 e Hsp104 de eucariotos são homólogas às proteínas de *E. coli*, GroES, GroEL, DnaK, HtpG e ClpB, respectivamente (revisado por Lindquist e Craig, 1998).

A indução de Hsps em condições de estresse permite que a célula possa se recuperar da desnaturação protéica, seja por preveni-la, impedindo a formação de agregados, ou por possibilitar que formas desnaturadas possam voltar à conformação nativa, ou ainda por degradar aquelas irreversivelmente desnaturadas. Assim, várias Hsps são chaperones moleculares e outras são proteases (Craig *et al.*, 1993).

Apesar das chaperones moleculares terem sido identificadas inicialmente devido à sua indução por choque térmico, estas proteínas mostraram-se essenciais também em condições fisiológicas normais, pois interagem com polipeptídeos recém-sintetizados, promovendo o seu correto enovelamento, evitando agregação, e se associam a proteínas a serem secretadas ou transportadas através de membranas, garantindo o seu endereçamento correto (Craig *et al.*, 1993). Além disso, estas proteínas auxiliam na formação de complexos oligoméricos e são capazes de endereçar proteínas desnaturadas para proteólise (Ellis e Hemmingsen, 1989).

Em *C. crescentus*, cerca de 20 proteínas diferentes têm sua síntese induzida durante a resposta ao choque térmico. Todas estas proteínas são induzidas em todas as fases do ciclo celular e a expressão das mesmas é regulada em nível transcricional (Gomes *et al.*, 1986). A Hsp62 de *Caulobacter* é a mais abundante proteína após o choque térmico e apresenta reação cruzada com o anticorpo produzido contra GroEL de *E. coli*, sendo assim

homóloga a esta. A Hsp 70 de *C. crescentus* também apresenta reação cruzada com o anticorpo contra DnaK de *E. coli* (Gomes *et. al*, 1986).

GroEL exerce sua função de chaperone na forma de um homo-oligômero de 14 subunidades, cada uma possuindo 57 KDa. Estas subunidades são arrançadas em dois anéis heptaméricos formando uma estrutura cilíndrica com duas cavidades. Sua co-chaperone GroES, forma um heptâmero de subunidades de 10 KDa, que se encaixa como uma tampa sobre a cavidade do cilindro de GroEL (Houry, 2001).

O mecanismo de funcionamento de GroEL está bem estabelecido *in vitro* (Fenton e Horwich, 1997; Rye *et al.*, 1999). Os anéis de GroEL têm sua conformação alterada pela ligação, hidrólise de ATP e pela interação com GroES (Horovitz, 1998). Cada anel de GroEL consiste em um domínio equatorial, um domínio intermediário e um domínio apical. Os domínios apicais do anel sem GroES apresentam regiões hidrofóbicas expostas que têm afinidade por peptídeos do mesmo caráter (Fink, 1999). Quando o substrato se liga à cavidade aberta (anel *cis*), GroES é liberada do anel *trans* (anel que não apresenta peptídeo ligado), ATP e GroES se ligam ao anel *cis* alterando a conformação da cavidade e favorecendo o dobramento correto do peptídeo. A hidrólise do ATP no anel *cis* enfraquece a ligação GroEL/GroES, liberando GroES, enquanto o dobramento do peptídeo continua. A ligação de ATP no anel *trans* impede que GroES se ligue novamente ao anel *cis*, permitindo a liberação do peptídeo já em conformação nativa ou mais próxima desta, que poderá ser alcançada em um novo ciclo no sistema GroEL/GroES ou com a assistência de outro chaperone molecular (Bukau e Horwich, 1998).

Aproximadamente 300 proteínas, representando 10-15% do total das proteínas citoplasmáticas de *E. coli*, utilizam GroEL para seu enovelamento correto sob condições normais de crescimento, aumentando para aproximadamente o dobro durante condições de estresse térmico. GroEL interage preferencialmente com proteínas de massa molecular entre 20 e 60 Kda (Houry, 2001).

O outro sistema que tem sido extensivamente estudado *in vitro* e *in vivo* é o sistema chaperone DnaK/DnaJ/GrpE. DnaK atua na forma de um dímero, cujos monômeros

possuem cerca de 70 kDa. Assim como GroEL, DnaK apresenta atividade de ATPase e sofre mudanças conformacionais dependentes de ATP durante seu ciclo funcional, que é regulado pelas co-chaperones DnaJ e GrpE (Fink, 1999). A ligação de DnaK aos peptídeos alvos ocorre através de um canal definido principalmente por uma região em alça no domínio C terminal de DnaK (Ben-Zvi e Goloubinoff, 2001). O referido motivo de ligação ao peptídeo de DnaK provavelmente consiste em uma região hidrofóbica de 4 a 5 resíduos de aminoácidos, particularmente rica em leucina, flanqueada por regiões enriquecidas em resíduos básicos (Fink, 1999). DnaK é responsável *in vivo* por auxiliar no enovelamento de 5-10% do total das proteínas solúveis de *E. coli* a 30 °C, incluindo peptídeos ainda ligados aos ribossomos (Ben-Zvi e Goloubinoff, 2001). Essas proteínas apresentam preferencialmente massa molecular de 30-75 Kda (Houry, 2001).

DnaK liga-se através de interações hidrofóbicas e protege regiões expostas de proteínas totalmente ou parcialmente desnaturadas (Ben-Zvi e Goloubinoff, 2001). Em seu estado ligado a ATP, DnaK apresenta baixa afinidade a proteínas, mas quando o nucleotídeo é hidrolisado gerando ADP, a afinidade é aumentada. DnaK é regulada por duas co-chaperones: DnaJ que é responsável pela hidrólise do ATP e GrpE que promove a dissociação de ADP permitindo a re-ligação do ATP. Desta forma DnaJ promove a associação ao substrato enquanto que GrpE promove a dissociação (Burston e Clarke, 1995).

Uma vez que DnaK reconhece segmentos de polipeptídeos em conformação estendida e tem habilidade de ligar-se a peptídeos ainda associados a ribossomos, enquanto GroEL reconhece intermediários compactos, acredita-se que DnaK age na célula em um estágio anterior a GroEL no enovelamento das proteínas. A possibilidade de que alguns substratos de DnaK necessitem também GroEL vem da observação de que tanto DnaK como GroEL ligam-se preferencialmente a proteínas de massas moleculares similares (Houry, 2001).

A maquinaria de DnaK também coopera com a chaperone ClpB durante o processo de desagregação proteica. Um dos modelos propostos para essa cooperação (Ben-Zvi e

Goloubinoff, 2001) sugere um mecanismo sequencial no qual ClpB, que atua na forma hexamérica, age primeiro expondo novos sítios de ligação de DnaK na superfície dos agregados. Por outro lado, um segundo modelo propõe que a solubilização dos agregados protéicos é alcançada pela ação simultânea de ClpB e DnaK (Krzewska *et al.*, 2001).

Pouco se conhece sobre a importância das proteínas de choque térmico na sobrevivência das bactérias submetidas a outros estresses ambientais. Entretanto, vários estudos mostraram que GroES/GroEL e/ou DnaK/DnaJ são induzidas em resposta a estresse salino e osmótico, estresse oxidativo, extremos de pH, radiação UV, presença de substâncias tóxicas (etanol, antibióticos, compostos aromáticos ou metais pesados) (Farr e Kogoma, 1991; Hanawa *et al.*, 1995; Teixeira-Gomes *et al.*, 2000; Prasad *et al.*, 2003). Acredita-se que a ativação dos genes de choque térmico por diferentes agentes estressantes deve ser devido à existência de um sinal indutor comum (Wech, 1993). Hightower (1980) sugeriu que proteínas desnaturadas pelo estresse poderiam ser o sinal indutor da resposta uma vez que, geralmente, os agentes que produzem estresse são proteotóxicos, ou seja, provocam alterações na conformação das proteínas, promovendo quebra de interações não covalentes, ou a perda de inúmeras interações fracas, o que resulta na ruptura da conformação nativa da proteína.

3. REGULAÇÃO DA RESPOSTA AO CHOQUE TÉRMICO.

3.1. Fator σ^{32}

Os sistemas de regulação da resposta ao choque térmico em bactérias podem ser controlados em nível de transcrição, regulados por fatores sigma alternativos ou por repressores de transcrição, ou ainda, mecanismos pós-transcricionais, como estabilização de mRNAs (Georgopoulos *et al.*, 1994).

A resposta ao choque térmico em *E. coli* é regulada por um fator sigma alternativo da RNA polimerase, o fator σ^{32} , codificado pelo gene *rpoH*. A transcrição do gene *rpoH* ocorre a partir de pelo menos quatro promotores. Os promotores P1, P2, P4 e P5 são reconhecidos

pela RNA polimerase contendo o fator sigma vegetativo, σ^{70} . A maior parte da transcrição em condições fisiológicas ocorre a partir de P1 e P4. O promotor P3 é reconhecido pela holoenzima contendo o fator σ^E , também denominado σ^{24} . A transcrição a partir deste promotor aumenta gradualmente com o aumento de temperatura dentro da faixa de crescimento de *E. coli*, sendo o único promotor ativo em temperaturas de choque térmico extremo (51°C), assegurando a manutenção dos níveis do mRNA *rpoH*, cuja meia-vida é curta (Georgopoulos *et al.*, 1994). Além dos dois fatores sigma (σ^{70} e σ^E), a modulação da transcrição de *rpoH* é influenciada pelo regulador global CRP (cyclic AMP receptor protein) necessário para a transcrição a partir de P5; pela proteína DnaA (que reprime a transcrição via P3 e P4) e pelo repressor CytR (Kallipolitis e Valentin-Hansen, 1998).

A maior parte do controle da concentração de σ^{32} em *E. coli* ocorre a nível de tradução ou pós-tradução. Quando a temperatura é elevada de 30 para 42°C, há um grande aumento da quantidade da proteína (cerca de 20 vezes), enquanto o mRNA para σ^{32} aumenta ligeiramente, apenas duas vezes. Três regiões de controle, A, B e C, foram observadas dentro da região codificadora do gene *rpoH*. A região A assegura um alto nível de tradução, enquanto as regiões B e C a reprimem. A região B pode formar uma estrutura secundária, bloqueando a tradução em condições normais de temperatura. O complexo DnaK, DnaJ e GrpE parece estar envolvido na repressão a partir da região C, ligando-se na extremidade carboxi-terminal do polipeptídeo σ^{32} quando este emerge do ribossomo. A repressão da tradução seria direta, pelo bloqueio do ribossomo, ou indireta, permitindo a ação de proteases (Kallipolitis e Valentin-Hansen, 1998).

A proteína σ^{32} madura é altamente instável em condições normais de crescimento da bactéria. Esta instabilidade é mediada pelo complexo DnaK, DnaJ e GrpE, que inibe a atividade da holoenzima $E\sigma^{32}$ após sua ligação a um promotor de choque térmico; seqüestra σ^{32} , não permitindo sua ligação à RNA polimerase e media sua degradação por proteases. Durante o choque térmico, o complexo DnaK, DnaJ e GrpE, é requisitado para outras funções, liberando o σ^{32} , que pode então se ligar à RNA polimerase, ativando a transcrição

dos genes de choque térmico. O excesso das proteínas de choque térmico reprime novamente sua própria expressão, inativando o σ^{32} (Georgopoulos *et al.*, 1994; Yura *et al.*, 2000).

Os genes de *C. crescentus* que codificam proteínas de choque térmico, como *dnaKJ* (Gomes *et al.*, 1990; Avedissian *et al.*, 1995), *groESL* (Avedissian & Gomes, 1996; Baldini *et al.*, 1998), *hrcA-grpE* (Roberts *et al.*, 1996), *lon* (Wright *et al.*, 1996), *rpoH* (Reisenauer *et al.*, 1996; Wu & Newton, 1997), *ftsH* (Fischer *et al.*, 2002) e *clpB* (Simão *et al.*, 2005) apresentam promotores regulados por σ^{32} .

O gene *rpoH* de *C. crescentus*, que codifica o fator σ^{32} , foi isolado e apresenta 42% de identidade com o σ^{32} de *E. coli* (Reisenauer *et al.*, 1996; Wu e Newton, 1996). Foram encontrados dois inícios de transcrição para o gene *rpoH* de *C. crescentus*, que definiram dois promotores denominados P1 e P2. P1 apresenta seqüências similares ao consenso de promotores σ^{70} e P2 ao de σ^{32} , sugerindo uma auto-regulação positiva para a expressão deste fator sigma em *C. crescentus*. Os transcritos a partir de P2 são 8 a 10 vezes mais abundantes do que os de P1 a 30°C, e quase 100 vezes mais, após 5 minutos a 42°C (Reisenauer *et al.*, 1996; Wu e Newton, 1996). Os níveis da proteína aumentam de forma transitória cerca de 10 vezes durante o choque térmico (da Silva *et al.*, 2003). Tanto a transcrição quanto os níveis da proteína, não variam durante o ciclo de vida de *C. crescentus* na temperatura normal de crescimento. Tentativas de interromper o gene *rpoH* só tiveram sucesso quando uma cópia adicional *in trans* deste gene foi fornecida a *C. crescentus* (M. Avedissian, R.C.G. Simões e S.L. Gomes, dados não publicados), o que sugere que o σ^{32} seja essencial à célula, mesmo em temperaturas normais.

Resultados do nosso laboratório mostraram que em uma linhagem de *C. crescentus* que superexpressa DnaK, a resposta ao choque térmico é fortemente inibida, sugerindo um papel de regulador negativo para esta proteína na indução da resposta ao choque térmico. Entretanto, apesar da síntese das HSPs estar inibida quando DnaK está sendo superexpressa, os níveis de σ^{32} são até um pouco mais altos. Isto significa que deve ser a

atividade do fator σ^{32} que está sendo inibida (da Silva *et al.*, 2003). Além disso, verificou-se que na ausência de DnaK ou da protease FtsH, responsável pela degradação de σ^{32} , os níveis deste fator sigma permanecem altos durante os 60 minutos de choque térmico e apesar disso a resposta de choque térmico é transitória (da Silva *et al.*, 2003). Isto sugere que em *C. crescentus* o desligamento da transcrição dos genes de choque térmico deve acontecer por um mecanismo diferente daquele proposto para *E. coli*, onde na ausência de DnaK a resposta deixa de ser transitória. Nosso trabalho também sugeriu que a competição entre o σ^{32} e o sigma majoritário de *C. crescentus*, o σ^{73} , poderia ser o fator mais importante na fase de recuperação da resposta. Corroborando esta hipótese temos a observação de que a transcrição do gene *rpoD*, que codifica o σ^{73} , é induzida no choque térmico e que os níveis do σ^{73} aumentam cerca de duas vezes durante o estresse térmico (figura 2) (da Silva *et al.*, 2003).

O sistema chaperone DnaK de *E. coli* propicia o retorno da transcrição dos genes expressos constitutivamente através da reativação do fator σ^{70} , que é inativado durante o choque térmico, assim como pelo seqüestro do σ^{32} do cerne da RNA polimerase. Em um trabalho recente, verificamos que na ausência da chaperone ClpB o desligamento da resposta ao choque térmico é inibido, pois a síntese de vários polipeptídeos induzidos por choque térmico deixa de ser transitória (Simão *et al.*, 2005). Desta forma, considerando que ocorre competição entre o σ^{32} e σ^{73} na fase de recuperação do choque térmico (da Silva *et al.*, 2003), sugerimos que ClpB poderia estar envolvida na reativação do fator σ^{73} em *C. crescentus* (figura 2). Para corroborar esta hipótese, mostramos que a transcrição a partir de promotores dependentes de σ^{73} não é retornada no mutante nulo de ClpB durante a fase de recuperação. Além disso, verificamos que a solubilização dos agregados de σ^{73} formados devido ao choque térmico é dependente da presença de ClpB (Simão *et al.*, 2005).

Figura 2- **Regulação da resposta ao choque térmico em *C. crescentus*.** (A) A maquinaria de DnaK tem um papel negativo na indução da resposta ao choque térmico. Em condições normais de crescimento fator sigma alternativo (σ^{32}) é instável. Isto porque a maquinaria de DnaK sequestra σ^{32} impedindo sua ligação a RNA polimerase e mediando sua degradação por proteases. (B) No choque térmico o aumento de proteínas desnaturadas na célula desvia DnaK e desta forma σ^{32} fica disponível para se ligar a RNA polimerase. (C) A resposta ao choque térmico é controlada positivamente pelo fator σ^{32} que autoregula sua própria síntese. Ocorre, então, um aumento de σ^{32} que propicia a transcrição dos genes de choque térmico, inclusive o gene *rpoD*. (D) A reativação do fator sigma vegetativo (σ^{73}) que é inativado pelo choque térmico é dependente da chaperone ClpB. (E) σ^{32} e σ^{73} competem pela ligação ao cerne da RNA polymerase. Como a ligação de σ^{73} é preferencial ocorre a transcrição dos genes dependentes de σ^{73} e o desligamento da resposta ao choque térmico (da Silva *et al.*, 2003; Simão *et al.*, 2005).

3.2. O SISTEMA CIRCE/HrcA.

A sequência repetida invertida denominada CIRCE (controlling inverted repeat of chaperone expression) foi descrita primeiramente nos operons *dnaK* e *groEL* das bactérias Gram-positivas, *Bacillus subtilis* e micobactérias, associada com promotores reconhecidos por fatores sigma vegetativos. Desta forma, pensou-se inicialmente que a presença deste elemento substituiria o fator σ^{32} ausente nestes organismos, fator este que é responsável pela transcrição de genes de choque térmico em *E. coli* e outras bactérias Gram-negativas. Porém, logo se verificou a ocorrência de CIRCE em várias bactérias filogeneticamente distantes, inclusive naquelas onde há um fator σ^{32} (Segal e Ron, 1996). Em *Bacillus subtilis*, cujo genoma foi totalmente sequenciado não existe o fator σ^{32} . Nessa bactéria, mutações pontuais no elemento CIRCE elevaram a expressão de DnaK em células crescendo em temperatura normal (37°C) ao mesmo nível da expressão das células incubadas a 48°C (temperatura de choque térmico) (Zuber e Schumman, 1994). Estes autores sugeriram que o elemento CIRCE seria um sítio de ligação de uma proteína com atividade repressora. Mutantes de *B. subtilis* para o gene *hrcA* (anteriormente denominado *orf39*) apresentaram altos níveis de transcrição em condições normais de crescimento dos operons *dnaK* e *groE*, que apresentam o elemento CIRCE (Schulz e Schumann, 1996), sendo que apenas *groE* ainda apresenta uma leve indução por choque térmico (Hecker *et al.*, 1996).

Yuan e Wong (1995) demonstraram pela primeira vez que extratos protéicos de uma cepa de *E. coli* expressando HrcA de *B. subtilis* eram capazes de retardar a migração de fragmentos de DNA contendo o elemento CIRCE em géis de poliacrilamida não-desnaturantes. A partir destes dados, os autores sugeriram que a proteína HrcA, codificada por um gene do operon *dnaK* liga-se ao elemento CIRCE reprimindo a transcrição. Posteriormente, outros trabalhos demonstraram a interação específica entre HrcA purificada e o elemento CIRCE através de ensaios de retardamento de migração em gel de poliacrilamida (ERMGP), incluindo *Streptococcus pneumoniae* (Kim *et al.*, 2001),

Streptococcus thermophilus (Martirani *et al.*, 2001), *Bradyrhizobium japonicum* (Minder *et al.*, 2000), *Bacillus thermoglucosidasius* (Watanabe *et al.*, 2001), *Bacillus subtilis* (Mogk *et al.*, 1997; Reischl *et al.*, 2002) e *Chlamydia trachomatis* (Wilson e Tan, 2004).

A observação de que o elemento CIRCE é a sequência regulatória mais conservada em bactérias sugere que o domínio de ligação de HrcA ao DNA deveria apresentar-se também bastante conservado em sua estrutura e sequência de aminoácidos. Análise comparativa da sequência de aminoácidos de quase uma centena de proteínas HrcA presentes nas bases de dados mostrou a presença de um motivo altamente conservado na família das HrcAs, que está localizado na região N-terminal da proteína e compreende 37 aminoácidos, com a sequência consenso **SsATIRNeMadLEelGllekpHtSsGRvPdkGyRyy**, onde os resíduos em negrito e em letra maiúscula são conservados em pelo menos 70% das proteínas analisadas e os resíduos restantes são encontrados em não menos do que 20% das seqüências (Perez, 2002). Em *C. crescentus* esta região de HrcA estende-se do resíduo 53 ao 85, e foi denominada região conservada 1. A segunda região mais conservada está também localizada próximo ao N-terminal da proteína, compreende 29 aminoácidos e a sequência consenso é **teRqlXILralvedYiXtgePVGSktLse**. Este motivo entende-se do aminoácido 19 ao 47 na proteína HrcA de *C. crescentus* e foi denominada sequência conservada 2 (Susin *et al.*, 2004). Além disso, o domínio putativo de ligação ao DNA de HrcA de *C. crescentus* foi identificado, sendo que este domínio apresenta similaridade com o domínio "Winged Helix" de LexA de *E. coli* e apresenta um motivo HTH ("helix-turn-helix"), típico domínio de ligação ao DNA (figura 3) (Perez, 2002; Susin *et al.*, 2004). Um motivo HTH foi identificado também em HrcA de *B. thermoglucosidasius* (Hitomi *et al.*, 2003), *B. subtilis* (Wiegert e Schumann, 2003) e encontra-se localizado na mesma região nas diferentes proteínas. Em *C. crescentus*, o HTH estende-se provavelmente do aminoácido 42 ao 63, enquanto que a folha β -pregueada possivelmente localiza-se entre as posições 70 a 83 (Susin *et al.*, 2004).

O operon *groESL* é o único em *C. crescentus* que apresenta o elemento CIRCE (Avedissian e Gomes, 1996; Baldini, 1999). Este operon codifica um único mRNA de 2,3kb,

		Região Conservada 2	Região Conservada 1			
HrcA_Ccre	12	---TPGLAEI	DARARDIFRRVVESEYLETGEVPGERTISK	GG-VALIS	PASTIRNEMODLAQLGLLDAPHTSAGRMPTHAGLRME	89
HrcA_Xfas	18	SMCASFSPTID	SRSRQLRLTLISCIYIQNGEPVGSKTLAQ	QAG-LDIS	PATIRNHLADLEELGLNLSPHTSAGRVPTAHGYRME	99
HrcA_Bsub	1	-----MI	TNRQLLILQVLIINDFIKSAQPVGSRTLSK	KDE-ITE	SATIRNEMADLEELGFTIEKTHSSSGRVPSEKGYRY	74
HrcA_Bthe	1	-----MI	TDRQLLILQVLIIDDFIRSGQPVGSRAISK	KHE-ISIS	SATIRNEMADLEELGYIEKTHASSGRVPSEKGYRY	74
HrcA_Efae	1	-----MI	TERQONILRLIIQNYTNTGLPVGSKKIME	DG--IASS	SATIRNDMALEEYGLLAKTHSSSGRIPSMAGYRY	73
HrcA_Thal	1	-----MI	TQRQNILHQIITHNYTNLGPVGSKTLME	EG--IAAS	SATIRNEMKTLEEYGLLVKPHSSSGRIPSLKGYRY	73
HrcA_Llac	1	-----MI	TERQQLNLNLIVLYAKDHTPIGSKSL	--IDS-IOAS	SATIRNDMALERLGLIQEHTSSGRIPSVSGYKF	72
HrcA_Spyo	1	-----MI	TQRQNDILNLIVELFTQTHEPVGSKAL	--ORL-IDSS	SATIRNDMAKLEKLGLEKAHTSSGRMPSPAGFKYF	72
HrcA_Cjej	1	-----MMKS	RDKKDILESIIQTYLLDNAPIGSNEIN	---SNLCIP	SATIRVYLKRLSDEGLITQLHISSGRIPITILTMQNY	74
HrcA_Mpul	1	-----MN	FENKEIKLETKKTLFKNIVELYLRTGKPIGSKFLV	FDYGLGRS	SATIRNNMHEFEIEIGLEKSHISSGRIPSTLGLKY	83
LexA_Ecol	1	-----MK	ALTARQOEVDLIRDHISQTMGPPT	EAFTAORLG--FRSP	NAAEEHKLARKGVIEIVSGASRGIRLLQEEE--	73
Deor_Ecol	1	-----METR	REERIGQLLQELKRSK	-----LHUKDAVAL	LGVSFMTIRRDINNHSAPVLLGGYIVLE--PR	SASHYLL 68

Figura 3- Alinhamento da porção N-terminal da proteína HrcA de diversas espécies de bactérias com DeoR e LexA de E. coli obtido pelo ClustalW (modificada de Susin et al., 2004). As seqüências da hélice de estabilização e da hélice de reconhecimento contendo o motivo HTH (estruturalmente determinado para LexA e putativo para HrcA e DeoR), estão destacadas em cinza escuro. Os aminoácidos que fazem parte da hélice de reconhecimento estão em negrito. A região destacada em cinza claro refere-se à estrutura de folha β -pregueada do provável domínio “winged helix” de HrcA. Os aminoácidos que foram substituídos em HrcA de *C. crescentus* (Susin et al., 2004) estão em itálico e sublinhados. *Ccre*, *Caulobacter crescentus*; *Xfas*, *Xylella fastidiosa*; *Bsub*, *B. subtilis*; *Bthe*, *B. thermoglucosidasius*; *Efae*, *Enterococcus faecalis*; *Thal*, *Tetragenococcus halophilus*; *Llac*, *Lactococcus lactis*; *Spyo*, *Streptococcus pyogenes*; *Cjej*, *Campylobacter jejuni*; *Mpul*, *Mycoplasma pulmonis*; *Ecol*, *E. coli*; *Tmar*, *Thermotoga maritima*; *Ssp*, *Synechococcus* sp. (PCC 7942); *Ssol*, *Sulfolobus solfataricus*; *Cdip*, *Corynebacterium diphtheriae*; *Paer*, *Pseudomonas aeruginosa*; *Hsap*, *Homo sapiens*; *Saur*, *Staphylococcus aureus*.

sendo este tamanho suficiente para conter ambos os genes *groES* e *groEL* (Avedissian e Gomes, 1996). Trata-se do primeiro operon descrito em que dois elementos regulatórios envolvidos com o choque térmico, σ^{32} e CIRCE/HrcA, aparecem em conjunto (Avedissian e Gomes, 1996; Roberts *et al.*, 1996; Baldini *et al.*, 1998).

Em *Caulobacter*, expressão do operon *groESL* além de ser induzida em condições de choque térmico, apresenta regulação temporal, sendo sua transcrição praticamente inexistente na célula talo e máxima na célula pré-divisional (Avedissian e Gomes, 1996). A regulação temporal é perdida em linhagens mutantes para *hrcA* e em fusões de transcrição com *lacZ* da região regulatória de *groESL* contendo mutações no elemento CIRCE (Baldini *et al.*, 1998). Nos dois casos, ainda pode ser observada a indução por choque térmico, ao contrário do que ocorre em *Bacillus subtilis*, que não possui σ^{32} (Zuber e Schumman, 1994).

O gene *hrcA* de *C. crescentus* é o primeiro gene de um operon com *grpE*, que como vimos anteriormente atua juntamente com DnaK e DnaJ (Roberts *et al.*, 1996). Foi identificado um promotor a 5' de *hrcA*, cujo transcrito compreende os dois genes e um outro, mais fraco, a 5' de *grpE*. O promotor de *hrcA* apresenta consenso para σ^{32} , e sua transcrição pela RNA polimerase contendo este fator sigma pôde ser inferida pelo aumento nos níveis de HrcA a 30°C numa linhagem superexpressando σ^{32} e pelo aumento da síntese e, conseqüentemente, dos níveis da proteína HrcA no choque térmico (Baldini, 1999). A transcrição de *hrcA* parece ser constitutiva durante o ciclo celular de *C. crescentus*, conforme demonstrado utilizando-se fusões de transcrição da região regulatória de *hrcA* e o gene repórter *lacZ* (Roberts *et al.*, 1996).

Tanto a presença constante de HrcA no ciclo celular quanto seu aumento no choque térmico podem parecer contraditórios com seu papel de repressor de transcrição. Em *Bacillus subtilis*, a atividade de HrcA provavelmente é dependente dos níveis disponíveis de GroEL na célula. (Mogk *et al.*, 1997; Reischl *et al.*, 2002) O modelo proposto prevê que a proteína HrcA seja ativada por mudanças conformacionais, de acordo com a quantidade de

GroEL disponível na célula de maneira análoga ao sistema σ^{32} /DnaK de *E. coli*. Os autores sugerem que HrcA não se liga fortemente à repetição invertida, mas que se encontra num equilíbrio dinâmico agregando-se facilmente quando desligada de CIRCE e na ausência de GroEL. No choque térmico, o aumento de proteínas desnaturadas na célula desviaria GroEL que não estaria disponível para interagir com HrcA, que então formaria agregados não sendo capaz de reprimir a expressão dos operons *dnaK* e *groESL* (Mogk *et al.*, 1997). Da mesma forma, Martirani *et al.* (2001) verificaram que a proteína repressora HrcA de *Streptococcus thermophilus*, parcialmente desnaturada, necessita de GroEL para recuperar a sua propriedade de ligação ao elemento CIRCE. Entretanto, em *Bradyrhizobium japonicum* demonstrou-se que a atividade ligante de uma preparação de HrcA nativa não foi estimulada pela presença de GroEL e GroES, ao contrário, a adição de GroES/EL causou uma diminuição dos complexos HrcA-CIRCE (Minder *et al.*, 2000).

Por outro lado, em *Lactococcus lactis*, deleções na região C-terminal de DnaK elevaram a expressão dos operons contendo CIRCE (*hrcA-grpE-dnaK*, *groESL* e *dnaJ*), mas não os níveis do mRNA da protease HflB, envolvida na regulação do choque térmico, cujo gene, *hflB*, não apresenta o elemento CIRCE (Hoch *et al.*, 1998). Também em *Clostridium acetobutylicum* foi demonstrada a inibição da agregação de HrcA por DnaK, DnaJ, e pelo sistema DnaK-DnaJ-GrpE (Rungeling *et al.*, 1999). Além disso, foi sugerido para *B. thermoglucosidasius* que a ligação entre HrcA e CIRCE é por si só termo-lábil (Watanabe *et al.*, 2001). Todos estes resultados indicam a existência de diferentes sistemas de regulação da interação CIRCE/HrcA, o que ressalta a necessidade de elucidar o mecanismo de modulação da atividade de HrcA também em outras bactérias.

Este trabalho teve como objetivos o estudo a interação da proteína HrcA de *Caulobacter crescentus* com o elemento CIRCE presente na região regulatória do operon *groESL*, assim como o estudo do mecanismo de regulação da atividade de HrcA em *C. crescentus* tanto *in vitro* como *in vivo*.

Além disso, o papel de GroES/GroEL e DnaK/DnaJ na sobrevivência das células de *C. crescentus* expostas a vários estresses ambientais e na divisão celular foi analisado avaliando os fenótipos da linhagem mutante condicional de *groESL* (SG300) e da linhagem mutante condicional de *dnaKJ* (SG400).

1. Linhagens e plasmídeos

As linhagens de *C. crescentus* e *E.coli* utilizadas estão listadas na tabela 1 e os plasmídeos, na tabela 2. O fago utilizado para mutagênese sítio-dirigida foi o M13mp19 (Messing, 1983).

Tabela 1- Linhagens de bactérias utilizadas.

	Descrição	Fonte ou referência
<i>Caulobacter crescentus</i>		
NA1000	Sincronizável, derivada da CB15	Evinger e Agabian, 1977
LS2293	NA1000 com <i>hrcA</i> interrompido	Roberts <i>et al.</i> , 1996
SG300	<i>groESL</i> sob controle do promotor de xilose; mutante condicional	da Silva <i>et al.</i> , 2003
SG400	<i>dnaKJ</i> sob controle do promotor de xilose; mutante condicional	da Silva <i>et al.</i> , 2003
<i>Escherichia coli</i>		
TG-1	<i>supE hsdΔ5 thi Δ(lac-proAB) F' [traD36 proAB⁺ lacI^r lacZΔM15]</i>	Gibson, 1984
S17-1	294::RP4-2(Tc::Mu)(Km::Tn7)	Simon <i>et al.</i> , 1983
DH5α	<i>supE44 lacU169 (80 lacZ M15)hsdR17 recA1 endA11 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Hanahan, 1983
CJ236	<i>dut ung thi relA</i> pCJ195	Kunkel <i>et al.</i> , 1987

Tabela 2- Plasmídeos utilizados.

	Descrição	Fonte ou referência
pUCBM21	Replicon ColE1, Ap ^r	Boehringer Mannheim
placZ290	vetor de fusão de transcrição, Tc ^r , IncP1, <i>oriT</i>	Gober e Shapiro, 1992
pAR31	região promotora de <i>rpoH</i> clonada no placZ290	Reinsenauer <i>et al.</i> , 1996
pMA11	região promotora de <i>groESL</i> clonada no placZ290	Avedissian e Gomes, 1996
pRB19	região promotora de <i>groESL</i> , com mutação no elemento CIRCE, clonada no placZ290	Baldini <i>et al.</i> , 1998
pMA100	região promotora de <i>clpB</i> clonada no placZ290	da Silva <i>et al.</i> , 2003
pDel1	região promotora de <i>dnaKJ</i> clonada no placZ290	Avedissian <i>et al.</i> , 1995
pAS22	Vetor para expressão de genes em <i>C. crescentus</i> a partir do promotor P _{xyX} , <i>oriT</i> , Cm ^r	U. Jenal
pRB51	pAS22 carregando a região codificante de <i>groEL</i>	da Silva <i>et al.</i> , 2003
pMR20	IncP1, <i>oriT</i> , Tc ^r	Roberts <i>et al.</i> , 1996
pRR312-3	pMR20 carregando o gene <i>hrcA</i> selvagem	Roberts <i>et al.</i> , 1996
pSer56Ala	pMR20 carregando o gene <i>hrcA</i> gene contendo a substituição da serina na posição 56 por alanina	Susin <i>et al.</i> , 2004
pPro81Ala	pMR20 carregando o gene <i>hrcA</i> gene contendo a substituição da prolina na posição 81 por alanina	Susin <i>et al.</i> , 2004
pArg87Ala	pMR20 carregando o gene <i>hrcA</i> gene contendo a substituição da arginina na posição 87 por alanina	Susin <i>et al.</i> , 2004
pProEx-1	vetor de expressão contendo cauda de histidina	Gibco-BRL
pRB60	pProEx-1 carregando a região codificante de <i>hrcA</i>	Susin <i>et al.</i> , 2004
pMS3	pProEx-1 carregando a região codificante de <i>hrcA</i> contendo a substituição da alanina 81 por prolina	Susin <i>et al.</i> , 2004
pMS4	pProEx-1 carregando a região codificante de <i>hrcA</i> contendo a substituição da alanina 87 por arginina	Susin <i>et al.</i> , 2004

2. Meios e condições de cultura

As linhagens de *E. coli* foram crescidas a 37°C, em meio LB (triptona 10 g/l; extrato de levedura 5 g/l; NaCl 10 g/l; pH 7,5) ou 2 x TY (triptona 16 g/l; extrato de levedura 10 g/l; NaCl 5 g/l; pH 7,5). A linhagem TG-1 foi mantida em placas com meio mínimo M9 (Na₂HPO₄ 6g/l; KH₂PO₄ 3g/l; NaCl 0,5g/l; NH₄Cl 9mM; ágar 1,5%; MgSO₄ 2 mM; CaCl₂ 100 mM; glicose

0,2% e tiamina 10ml/l). Quando necessário, ampicilina (100 µg/ml), tetraciclina (12,5 µl/ml), cloranfenicol (30 µg/ml), espectinomicina (30 µg/ml) ou canamicina (50 µg/ml) foram adicionados.

As linhagens de *C. crescentus* foram cultivadas a 30°C em meio PYE (peptona 2g/l; extrato de levedura 1 g/l; MgSO₄.7H₂O 0,2 g/l; CaCl₂ 0,5 mM), acrescido ou não de tetraciclina (2 µg/l), ácido nalidíxico (20µg/ml), espectinomicina (5 µg/ml), cloranfenicol (1 µg/ml) e/ou canamicina (10 µg/ml). Quando necessário, xilose 0,2% foi adicionada ou foi utilizada em substituição à glicose. Para experimentos de marcação de proteínas *in vivo* com [³⁵S]-metionina, as culturas foram cultivadas em meio mínimo M2 (Na₂HPO₄ 18 mM; KH₂PO₄ 8 mM; NH₄Cl 9 mM; FeSO₄ 10 µM; MgSO₄ 2 mM; CaCl₂ 0,5 mM; glicose 0,2%) (Johnson and Ely, 1977). Os meios sólidos continham 1,5% ágar, o LB "soft" 0,7% e o PYE semi-sólido, 0,3%.

3. Isolamento de DNA, digestão com enzimas de restrição, desfosforilação, ligação e sequenciamento.

As formas replicativas dos fagos M13 foram extraídas pelo método de lise alcalina, como descrito em Sambroock *et al.*, 1989. A extração de DNA de fita simples para o sequenciamento foi realizado com o "QIAprep spin M13 kit"(Qiagen). O DNA total de *C. crescentus* foi extraído segundo o método descrito por Chen e Huo (1993).

As enzimas de restrição utilizadas foram obtidas da New England Biolabs, Amersham e Boehringer-Mannheim, sendo utilizadas com os tampões fornecidos pelos fabricantes.

A desfosforilação dos vetores foi realizada com fosfatase alcalina, obtida da United States Biochemical (USB), assim como o seu tampão.

Os fragmentos de DNA resultantes de digestões foram analisados por eletroforese em gel de agarose em tampão TBE (Tris 89 mM; ácido bórico 89mM; EDTA 2 mM pH 8),

após coloração com brometo de etídeo e visualização sob luz UV. Para o isolamento de fragmentos de DNA, foram realizadas eletroforeses em géis de poliacrilamida 6 ou 8% ou em agarose 0,8 a 1%. As bandas foram cortadas e o DNA eletroeluído, conforme descrito em Sambrook *et al.* (1989). As reações de ligação foram realizadas a temperatura ambiente, com T4 DNA ligase e tampão da Gibco-BRL.

O sequenciamento de DNA foi realizado utilizando-se o "BigDye terminator kit" e o sequenciador automático ABI377.

4. Oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos utilizados foram sintetizados pela Gibco-BRL e estão listados na Tabela 3.

Tabela 3- Oligonucleotídeos utilizados. As bases alteradas em mutações sítio-dirigidas encontram-se em negrito.

Nome	Seqüência (5' → 3')	Finalidade
Ser56Ala	GTCGCCGGCC G CGATCCGCAATACG	Mutação sítio-dirigida em <i>hrcA</i>
Pro81Ala	CCGGTCGTATGGCGACCCATGCGGG	Mutação sítio-dirigida em <i>hrcA</i>
Arg87Ala	CATGCGGGCCT G GCGATGTTCGTCTG	Mutação sítio-dirigida em <i>hrcA</i>

5. Transformação bacteriana

As transformações de *E.coli* com as formas replicativas dos fagos foram realizadas de acordo com o procedimento de Nishimura *et al.* (1990). As transformações com plasmídeos foram realizadas por eletroporação. As condições do pulso para eletroporação foram de 25µF de capacitância, 200 Ω (ohms) de resistência e 1,8 kVolts em uma cubeta de

0,1 cm de espessura em aparelho Gene Pulser™ da Bio-Rad. Após a eletroporação, as células foram recuperadas por uma hora em meio SOC (triptona 2%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 10mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 20 mM, MgSO₄ 20 mM e glicose 20 mM) e plaqueadas em meio LB contendo o antibiótico apropriado para a seleção.

6. Conjugação bacteriana

Os plasmídeos foram introduzidos na linhagem doadora *E. coli* S17-1 por eletroporação. As cepas receptoras (diferentes linhagens de *C. crescentus*) e a doadora (S17-1 portadora de plasmídeos com *oriT*) foram misturadas com o auxílio de uma alça de platina em placas de PYE e incubadas por 8-16 horas a 30°C para permitir a conjugação. Após esse período, a seleção foi feita em placas de PYE contendo ácido nalidíxico 50 µg/ml (seleção para *Caulobacter*, pois *E. coli* S17-1 é sensível a ácido nalidíxico) e o antibiótico cuja marca de resistência é codificada pelo plasmídeo a ser transferido (canamicina, tetraciclina ou cloranfenicol).

7. “Western blot”

Alíquotas das culturas de células de *C. crescentus* foram coletadas e centrifugadas por 3 minutos a 12.000 x g, o precipitado obtido foi ressuspenso em tampão de amostra para eletroforese (Laemmli, 1970) e o extrato celular fervido por 3 minutos antes de ser aplicado em gel de poliacrilamida na presença de SDS (dodecil sulfato de sódio) (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970).

Proteínas separadas eletroforéticamente em SDS-PAGE, foram transferidas para membrana de nitrocelulose, como descrito por Towbin *et al.* (1992). A transferência das proteínas para a membrana foi realizada utilizando o sistema Novablot (Amersham-Pharmacia Biotech). Após a transferência, as proteínas na membrana foram coradas com Ponceau S (0,1% em ácido acético 10%) e descoradas com água destilada. O filtro foi

bloqueado por 20 a 30 minutos em TBS (Tris-HCl 10 mM pH 8; NaCl 150 mM) contendo 5% de leite desnatado. A solução foi trocada e os anticorpos anti-GroEL (Baldini *et al.*, 1998) ou anti-DnaK (Baldini *et al.*, 1998) ou anti-HrcA (Susin *et al.*, 2004) ou anti- σ^{32} (Bukau, 1993) foram adicionados nas diluições de 1:5000, 1:8000, 1:100 e 1:100, respectivamente. Nos experimentos realizados com o anticorpo anti-HrcA, este foi adicionado a uma solução TBS-TT (Tris-HCl 10 mM pH 8; NaCl 150 mM; Tween 20 0,03%; Triton X-100 0,02%), sem adição de leite. Após incubação as membranas foram lavadas 2 vezes por 5 minutos, em TBS-T (Tris-HCl 10 mM pH 8; NaCl 150mM; Tween 20 0,05%) e uma vez em TBS por 10 minutos, procedendo-se então a incubação com o anticorpo secundário, conjugado com fosfatase alcalina ou peroxidase, seguindo-se nova lavagem como descrito acima.

Para a revelação com a fosfatase alcalina, foram utilizados BCIP (5-bromo-4-cloro-6-indolil fosfato; 0,3 mg/ml) e NBT (nitroblue tetrazolium; 0,15 mg/ml) em tampão Tris-HCl 10 mM pH 9,0 contendo NaCl 100 mM e $MgCl_2$ 5 mM. A revelação para o conjugado com peroxidase foi realizada por quimioluminescência, utilizando-se o "kit" ECL (Amershan Pharmacia Biotech), de acordo com as instruções do fabricante.

8. Mutagênese sítio-dirigida.

A construção dos mutantes do gene *hrcA* foi baseada na metodologia de Kunkel *et al.* (1987). Foi utilizado como fita-molde o DNA fita simples do fago M13mpl9, no qual previamente foi clonado o gene de *hrcA* contendo um sítio de restrição para a enzima Nde I.

Para a obtenção do DNA de fita simples contendo uracilas, a linhagem de *E. coli* CJ236 foi infectada com fagos isolados por meio do seguinte procedimento: 40 ml de uma cultura saturada de *E. coli* TG-1 infectada com o fago M13, contendo o gene a ser mutagenizado, foi centrifugada a 27.000 x g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi recolhido e o processo repetido. A 30 ml deste sobrenadante, foram adicionados 10 ml de solução PEG 8000 20% / acetato de amônio 3,5 M e a mistura foi mantida em gelo por, no mínimo, 30 minutos. Os fagos precipitados foram recolhidos por centrifugação a 37.000 x g

por 30 minutos, sendo o precipitado diluído em 300 μ L de tampão de diluição (Tris-HCl 100 mM pH 8,0; NaCl 300 mM; EDTA 1 mM). Foi realizada uma diluição 1:1000 e 1 μ L foi utilizado para infectar 50 ml de uma cultura da linhagem CJ236 (DO_{600} entre 0,2 e 0,3). Após 8 horas de crescimento em meio LB contendo cloranfenicol e uridina (250 ng/ml) a 37°C sob agitação, os fagos foram isolados conforme descrito acima. Para se remover o excesso de PEG, a suspensão foi mantida em gelo por 30 minutos e centrifugada novamente, numa microcentrífuga.

O DNA fita simples foi isolado pela extração sucessiva da suspensão de fagos com fenol, fenol:clorofórmio e clorofórmio, sendo o DNA precipitado com 2,5 volumes de etanol absoluto em banho de gelo seco/etanol por 20 minutos e centrifugação por 15 minutos a 4°C. O precipitado foi lavado em etanol 70%, seco sob vácuo e dissolvido em 100 μ L de TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM). Foram utilizados 5 μ L de DNA para cada reação de mutagênese.

Os oligonucleotídeos utilizados, sintetizados pela Gibco-BRL estão apresentados na tabela 3. Anteriormente à sua utilização como "primer" nas reações de mutagênese, cerca de 150 pmoles foram fosforilados com 20 unidades de T4 polinucleotídeo quinase (NEB), a 37°C por 1 hora na presença do tampão fornecido pelo fabricante e ATP 10 mM.

O DNA de fita simples com resíduos de uracila incorporados foi incubado com 15 pmoles de "primer" em tampão de hibridização (Tris-HCl 20 mM pH 8,0; $MgCl_2$ 2 mM; NaCl 50 mM) a 95°C por 5 minutos, sendo esfriados lentamente até aproximadamente 30°C. Foram adicionados tampão de mutagênese (Tris-HCl 17,5 mM pH 7,5; $MgCl_2$ 3,75 mM; 21,5 mM DTT; 0,75 mM ATP; dATP 0,4 mM; dTTP 0,4 mM; dGTP 0,4 mM; dCTP 0,4 mM), T4 DNA polimerase (1 unidade) e T4 DNA ligase. A mistura foi incubada a 37°C por pelo menos 90 minutos. Após este tempo, adicionou-se 90 μ L de TE e alíquotas de 2 a 10 μ L foram utilizadas para transformar bactérias TG-1 competentes. As placas de lise obtidas após incubação em meio LB "soft" (0,7 % de ágar) foram utilizadas para a obtenção de DNA de fita simples para o sequenciamento.

9. Clonagem dos genes *hrcA* mutados no vetor de expressão pPROEX-1.

Após transformação de células competentes de *E. coli* TG-1 (Gibson, 1984), os clones obtidos tiveram seu RFDNA extraído e analisado. Os clones que se mostraram de acordo com o esperado foram digeridos com as enzimas Nde I e Kpn I, o fragmento contendo o gene *hrcA* foi purificado e ligado ao vetor de expressão pPROEX-1 (Gibco-BRL) digerido com as mesmas enzimas, dando origem aos plasmídeos pMS3 e pMS4 (tabela 2). Este vetor é utilizado para expressão de proteínas heterólogas em *E.coli*. A proteína é expressa com a adição de uma cauda contendo 6 histidinas (6xHis), que foi utilizada na purificação da proteína de fusão por afinidade. A expressão da proteína de fusão é regulada pelo promotor *Tcr*, que pode ser induzido por IPTG (Isopropil-tio β -galactopiranosídeo).

10. Expressão e purificação de HrcA recombinante.

Várias condições foram testadas com o objetivo de obter as HrcA recombinantes na forma solúvel e a melhor condição está descrita abaixo. Um litro de meio LB (triptona 10 g/l; extrato de levedura 5 g/l; NaCl 10 g/l; pH 7,5) contendo 200 μ g/ml de ampicilina foi inoculado com 10ml de uma cultura crescida “overnight” de *E. coli* DH5 α carregando pRB60 (Susin *et al.*, 2004), pMS3 ou pMS4. A cultura foi incubada a 30°C até OD₆₀₀ =0,5 e então IPTG foi adicionado em uma concentração final de 0,6mM. Depois de 3 horas a 30°C, as células foram centrifugadas e o precipitado lavado e ressuspenso em 2ml de tampão A (Tris-HCl 50mM pH8; EDTA 0,5 mM; NaCl 50mM; glicerol 5%) contendo 150 μ l do inibidor de protease PMSF (glicerol e fenil metil sulfonil fluorídeo). As células foram lisadas por sonicação e os debris celulares foram removidos por centrifugação a 20.000 x g por 30 minutos. Nestas condições a maioria das proteínas HrcA tanto selvagem quanto mutantes são encontradas na fração solúvel. Esta fração foi, então, incubada com desoxicolato (DOC) 2% durante 10 minutos a 4°C e posteriormente dialisada contra tampão I (Tris-HCl pH7, NaCl 100 mM e

imidazol 10 mM) por 6 horas e concentrada utilizando o filtro Centricon 30 (Amicon). A fração de proteínas resultante foi incubada por 2 horas a 4°C com resina de agarose Ni-NTA (Qiagen) equilibrada no tampão I. A proteína H₆-HrcA foi eluída com 5ml de tampão I contendo 100 e a seguir 150mM de imidazol. O eluato obtido foi dialisado por 2 horas contra tampão A. A concentração da proteína H₆-HrcA purificada foi determinada usando o "kit" do ácido bicinconínico (BioRad).

11. Ensaio de retardamento de migração em gel de poliacrilamida (ERMGP).

Os ensaios de retardamento de migração em gel de poliacrilamida (ERMGP) foram usados para estudar a ligação da proteína HrcA ao elemento CIRCE, como descrito em Bucca *et al.* (1995). A sonda MA8 usada nestes ensaios foi um fragmento de 150bp EcoRI-HindIII obtido a partir do plasmídeo pMA18 (Avedissian e Gomes, 1996) contendo a região regulatória de *groESL* de *C. crescentus*. Esse fragmento de DNA foi isolado de gel de poliacrilamida e marcado com [γ -³²P]ATP e polinucleotídeo quinase, de acordo com Sambrook *et al.* (1989). O fragmento marcado (10⁵ cpm) foi incubado com 5µg da proteína H₆-HrcA purificada em tampão de ligação (Tris-HCl pH 7,8 10 mM contendo MgCl₂ 10mM, NaCl 100mM, ditiotretitol 2 mM, glicerol 1% e 1 µg DNA de esperma de salmão) em um volume final de 30µl. Quando necessário, as proteínas de *E. coli* GroEL (3µM) e/ou GroES (1µM), gentilmente cedidas pela Dra. Ana Cláudia Rasera da Silva, foram misturadas com H₆-HrcA e esta mistura pré-incubada por 10 minutos a 30°C em tampão de ligação antes da reação de ligação ser iniciada pela adição da sonda de DNA. Em alguns ensaios, ATP ou AMP-PCP foram adicionados à reação de ligação em uma concentração final de 30µM. Após a adição da sonda, as reações de ligação foram incubadas por 20 minutos a 30°C e aplicadas em um gel de poliacrilamida 8% não-desnaturante. A corrida foi realizada em tampão TBE (0,5x) com 20mA de amperagem por 4 horas a 4°C. Após a corrida, os géis

foram secos sob vácuo sobre papel Whatman 3MM a 70°C por 40 minutos e submetidos a auto-radiografia.

12. Ensaios de co-eluição HrcA-GroEL usando HrcA imobilizada em coluna de Ni-agarose.

Com o objetivo de investigar interações entre HrcA e GroEL, foi analisada a ligação de GroEL a H6-HrcA imobilizada em uma coluna Ni-agarose, de acordo com o método descrito em Enz *et al.* (2000). Extrato total de proteínas obtidas da *E. coli* superexpressando H6-HrcA recombinante foi aplicada em uma coluna de agarose Ni-NTA. Após várias lavagens com o tampão de lise (contendo imidazol), o extrato total preparado a partir da linhagem LS2293 de *C. crescentus* (mutante nula de *hrcA* que apresenta altos níveis de GroEL) ou GroEL purificada foi aplicado a esta coluna. A coluna foi lavada com tampão de lise e então as proteínas ligadas foram eluídas com o mesmo tampão contendo 100mM de imidazol. O eluato foi analisado por SDS-PAGE (Laemmli, 1970) e por western blot usando o anticorpo anti-GroEL. Como controle, os mesmos experimentos foram realizados utilizando uma coluna que não continha H₆-HrcA ligada. As reações de ligação foram realizadas a 4°C. O extrato total de LS2293 foi preparados a partir de células obtidas de uma cultura em fase exponencial de crescimento. As células foram coletadas por centrifugação, ressuspensas em 5ml de tampão de lise, rompidas por sonicação (potência 3, com pulsos de 10-15 segundos) e os debrís celulares foram removidos por centrifugação a 13.000 x g por 15 minutos a 4°C.

13. Ensaio de atividade de β -galactosidase

As fusões de transcrição pDel1, pMA11, pRB19 ou pMA100 (Tabela 2) foram introduzidas por conjugação nas linhagens NA1000 pRB51 e NA1000 pAS22, enquanto as fusões de transcrição pMA11 e pRB19 foram introduzidas nas linhagens SG300 e SG400. As culturas das linhagens resultantes obtidas foram crescidas durante a noite e diluídas para

uma DO₆₀₀ inicial de 0,2 e posteriormente crescidas em meio PYE sob agitação a 30°C até DO₆₀₀ de 0,5. Quando necessário, xilose foi adicionada para uma concentração final de 0,1%. O ensaio foi realizado com 50-100 µl de dessas culturas diluídas para uma DO₆₀₀ = 0,25 de acordo com Miller (1972). Os resultados foram expressos em unidades de atividade de β-galactosidase (unidades Miller), sendo corrigidos pela DO₆₀₀ das culturas pela fórmula:

Atividade= $1000 \times [DO_{420} / (V \times t \times DO_{600})]$, onde t = tempo de reação em minutos e V = volume da cultura no ensaio em ml. Foram realizados pelo menos três experimentos independentes para cada caso.

14. Teste de sobrevivência a diferentes condições de estresse.

A linhagem NA1000 foi inoculada em meio PYE e as mutantes SG300, SG400, em PYE xilose e cultivadas durante 16 horas a 30°C sob agitação. As culturas saturadas de NA1000 foram diluídas para DO₆₀₀ igual a 0,1 e incubadas a 30°C sob agitação até 6 horas de crescimento. Já as culturas referentes as mutantes SG300 e SG400 foram lavadas várias vezes para a retirada da xilose, e só depois diluídas até DO₆₀₀ = 0,1 e crescidas em meio PYE xilose (0,2%) ou PYE glicose (0,2%) sob agitação a 30°C durante 6 horas (tempo necessário para ocorrer depleção de GroEL e DnaK na ausência de xilose em SG300 e SG400, respectivamente). Uma alíquota foi então retirada (t=0h) e o restante das culturas foi submetido a choque térmico (42°C), estresse oxidativo (2,5 mM de H₂O₂), alta concentração de etanol (15%) e congelamento (-80°C). A sobrevivência dessas linhagens ao estresse salino e osmótico foi verificada durante o crescimento na presença de NaCl (80mM) ou sacarose (150mM). Para isso as culturas foram diluídas em meio PYE glicose ou PYE contendo glicose e xilose para uma DO₆₀₀ igual a 0,1 e crescidas por 1 hora (este ponto foi tomado como zero) e posteriormente foi adicionado NaCl ou sacarose. Para testar a sobrevivência das linhagens SG300 e SG400 à temperatura letal de 48°C e à aquisição de termotolerância, as culturas crescidas durante 6 horas a 30°C em condições permissivas (presença de xilose) ou restritivas (ausência de xilose) foram divididas em duas alíquotas,

uma delas foi incubada a 40°C por 30 minutos e a outra permaneceu a 30°C. Após a retirada de uma alíquota controle (t=0), ambas culturas foram transferidas para banho de água com agitação a 48°C.

Nos tempos desejados, alíquotas foram retiradas (100 µl) para uma diluição seriada em PYE (10^0 a 10^{-6}). Estas diluições foram plaqueadas em meio PYE (NA1000) e PYE contendo xilose (0,2%) (SG300 e SG400). As colônias obtidas foram contadas após aproximadamente 48 horas de crescimento a 30°C.

15. Marcação de células com pulsos [35 S]-metionina

A linhagem NA1000 de *C. crescentus* foi cultivada em meio PYE líquido e posteriormente transferida para meio mínimo M2 e incubadas durante a noite sob agitação a 30°C. No dia seguinte foi diluída em meio M2 contendo glicose 0,2% ou xilose 0,2%, para uma DO_{600} igual a 0,1 e incubada até uma DO_{600} igual a 0,5. Amostras de 1 ml foram retiradas de cada cultura a 30°C ou a 42°C e transferidas para tubo de vidro onde foi adicionado 10 µCi de [35 S]-metionina. Após 5 minutos de incubação as amostras foram transferidas para tubos eppendorff contendo 10 µl de metionina (10 mM) não marcada. As amostras foram então, centrifugadas por 5 minutos a temperatura ambiente e os precipitados foram suspensos em solução O, fervidos por 3 minutos, centrifugados a temperatura ambiente por 5 minutos e o sobrenadante aplicado em SDS-PAGE. Após a corrida, os géis foram secos sob vácuo sobre papel Whatman 3MM por 40 minutos e submetidos a auto-radiografia.

16. Preparação de células para microscopia óptica.

As culturas saturadas dos mutantes condicionais SG300 e SG400 foram lavadas várias vezes para a retirada da xilose, e só depois diluídas até $DO_{600} = 0,1$ em meio PYE xilose (0,2%) ou PYE glicose (0,2%). Alíquotas foram retiradas após 1, 4, 6, 10, 18 e 24

horas de crescimento e a morfologia celular visualizada em microscópio óptico (Nikon Eclipse E800), utilizando objetiva plana 100 (DIC). As células crescidas durante 10 horas em condições permissivas ou restritivas foram coradas utilizando os corantes "LIFE/DEAD BacLight Kit" (Molecular Probes) e FM1-43 (Molecular Probes) de acordo com as informações do fabricante. O SYTO 9 ("live"-verde) e o FM1-43 foram visualizados em microscópio óptico (Nikon TE300) utilizando o filtro EF-4 B-2E/C (excitação 480/30 nm, dicróico 505, emissão 535/40 nm) e o iodeto de propídeo ("dead"-vermelho) com o filtro EF-4 G-1B (excitação 546/10 nm, dicróico 565, emissão 590 /"longpass").

Para a microscopia de imunofluorescência, alíquotas foram retiradas após 10 horas de crescimento e as células foram fixadas em metanol como descrito em Hiraga *et al.* (1998). As células fixadas foram centrifugadas para retirar o metanol e posteriormente tratadas com lisozima (20ug/ul). As células foram a seguir aderidas a lâminas previamente tratadas com poli- L-lisina (0,1%) conforme descrito em Hiraga *et al.* (1998). Após várias lavagens para retirar as células não aderidas, as lâminas foram bloqueadas por uma hora em uma solução de PBS contendo 2% de BSA. Posteriormente a solução foi removida e o anticorpo anti-FtsZ de *C. crescentus* (gentilmente cedido por Y.V. Brun) foi adicionado nas concentrações adequadas, por aproximadamente 12 horas a 4°C. Foram testadas várias concentrações do anticorpo anti-FtsZ, sendo que as concentrações 1:500 e 1:1000 foram as mais adequadas para a visualização das células ao microscópio. Após incubação das lâminas com o anticorpo primário, estas foram lavadas 10 vezes com PBS, procedendo-se então a incubação com o anticorpo secundário, anti-IgG de coelho conjugado com Alexa488, seguida de nova lavagem como descrito acima. Após as lavagens, adicionou-se glicerol 90% e só então as lamínulas foram colocadas. As células assim tratadas, foram visualizadas em microscópio óptico (Nikon TE300) utilizando objetiva 100 (DIC) e filtro FITC padrão.

1. ANÁLISE FUNCIONAL DA PROTEÍNA REPRESSORA HrcA.

1.1. Ligação específica da proteína HrcA recombinante ao elemento CIRCE.

Para obter evidências da interação física entre CIRCE e HrcA de *C. crescentus*, foram realizados ensaios de retardamento de migração em gel de poliacrilamida (ERMGP) utilizando HrcA recombinante produzida em *E. coli* contendo uma cauda amino-terminal de histidina (H₆-HrcA) (figura 4) e como sonda um fragmento de DNA de 150pb (MA8) marcado com [³²P], que compreende a região promotora e o elemento CIRCE do operon *groESL* de *C. crescentus*. Como mostra a figura 5A, os experimentos de ERMGP utilizando quantidades crescentes de H₆-HrcA mostraram a formação dependente da concentração de HrcA de três bandas retardadas (complexos 1, 2 e 3). Todos os três complexos DNA-proteína são específicos, uma vez que a adição de quantidades crescentes do fragmento de DNA não radioativo, usado como competidor específico, preveniu a formação dos três complexos (figura 5B).

Para investigar se a atividade de ligação de HrcA ao DNA poderia ser modulada por GroES/GroEL, foram realizados experimentos pré-incubando-se H₆-HrcA em tampão de ligação contendo as proteínas GroES e GroEL purificadas de *E. coli*, e posteriormente adicionando-se a sonda de DNA marcado radioativamente. Como mostra a figura 6 (canaleta 3), quando HrcA foi pré-incubada com GroES/GroEL ocorreu um aumento significativo da quantidade de complexo 2, com a concomitante diminuição da quantidade dos complexos 1 e 3. Verificou-se também a formação de um novo complexo, denominado complexo 4, que é formado quando o ensaio de ligação é realizado na presença de GroES/GroEL. Os quatro complexos são específicos, visto que a quantidade de todos eles diminui drasticamente na presença do competidor específico (figura 6, canaleta 5).

Figura 4- Expressão e purificação da proteína HrcA recombinante. A indução da síntese de HrcA foi realizada com 0,6mM de IPTG por 3 horas a 30°C. As amostras referentes ao tempo zero de indução (canaleta 2) e após 3 horas de indução (canaleta 3) assim como as amostras referentes à purificação de HrcA (canaleta 4 a 7 - frações eluídas da coluna de níquel com concentrações crescentes de imidazol (75,100,150, 300mM) foram submetidas a eletroforese em gel SDS/PAGE. M, marcador de massa molecular. As bandas são, de baixo para cima, referentes a 10 kDa, 20 kDa, 30 kDa, 40 kDa, 50 kDa, 60 kDa, 70 kDa, 80 kDa, 90 kDa, 100 kDa, 110 kDa,120 kDa e 200 kDa.

Figura 5- **HrcA liga-se à região regulatória de *groESL* de forma específica.** (A) Ensaio de retardamento de migração em gel de poliacrilamida (ERMGP) utilizando a sonda de DNA MA8 marcada com [32 P] e quantidades crescentes de HrcA de *C. crescentus*. Canaleta 1: apenas sonda e Canaletas 2-5: 2,5; 5; 10 e 20 μ g de HrcA recombinante purificada, respectivamente. (B) Competição específica utilizando a sonda MA8 não-marcada no ERMGP. Canaleta 1: apenas sonda; Canaleta 2: 5 μ g de HrcA; Canaleta 3-5: 5 μ g de HrcA mais 0,1 μ M, 0,5 μ M ou 1 μ M de sonda não-marcada, respectivamente. HrcA e o DNA competidor, quando necessário, foram adicionados ao tampão de ligação, incubados por 10 minutos a 30°C, e então a sonda MA8 marcada radioativamente foi adicionada. A reação de ligação foi realizada a 30°C por 20 minutos. Os complexos foram resolvidos em gel de poliacrilamida não-desnaturantes, como descrito em Material e Métodos.

Figura 6- **Efeito de GroES, GroEL e ATP na ligação de HrcA a CIRCE.** Ensaio de retardamento de migração em gel de poliacrilamida (ERMGP) utilizando a sonda MA8 sem HrcA (canaleta 1); com HrcA (canaleta 2); com HrcA, GroES e GroEL (canaleta 3), com HrcA, GroES, GroEL e ATP (canaleta 4); com HrcA, GroES, GroEL e competidor específico (canaleta 5); com GroEL (canaleta 6); com GroEL e ATP (canaleta 7); com GroEL e competidor específico (canaleta 8). Reação de ligação realizada essencialmente como descrito na legenda da Figura 1. As diferentes misturas de reação contêm 5 μ g de HrcA, 1 μ g de GroES, 1 μ g de GroEL, 1 mM de ATP e 0,5 μ M de DNA competidor específico.

Surpreendentemente, quando ATP é adicionado à reação de ligação contendo HrcA, GroES e GroEL, a formação dos complexos 1, 2 e 3 é drasticamente diminuída enquanto que o complexo 4 é mantido (figura 6, canaleta 4). A presença de um análogo não-hidrolizável de ATP (AMP-PCP) não tem efeito na formação de nenhum dos quatro complexos (não mostrado). A formação do complexo 4 é intrigante, uma vez que um complexo aparentemente idêntico é formado quando a sonda MA8 é incubada com GroEL sozinha ou GroEL e ATP (figura 6, canaletas 6 e 7), indicando que GroEL liga-se a CIRCE independentemente de HrcA. Este complexo é também específico porque a adição da sonda não-marcada previne sua formação (figura 6, canaleta 8).

1.2. Níveis alterados de GroES/GroEL afetam a atividade promotora de *groESL* *in vivo*.

Com o objetivo de investigar se mudanças nos níveis de GroES/GroEL poderiam afetar a atividade repressora de HrcA *in vivo*, foram introduzidas fusões de transcrição com o gene *lacZ* e a região promotora de *groESL* apresentando CIRCE selvagem (pMA11) ou mutado no braço esquerdo (substituição das bases GCA por TTT) (pRB19), em linhagens de *C. crescentus* que superexpressam ou não GroES/GroEL. A linhagem NA1000 pRB51 super-expressa GroES/GroEL, já que carrega um plasmídeo multicópia no qual os genes *groESL* estão sob controle do promotor P_{xyIX} . Desta forma, na presença de xilose, os níveis de GroES/GroEL são cerca de 3 vezes maiores do que na linhagem controle, a NA1000 pAS22, que carrega somente a cópia cromossômica dos genes *groESL* (da Silva *et al.*, 2003). Como mostra a tabela 4, a atividade de β -galactosidase na linhagem contendo a fusão de transcrição pMA11, que apresenta o elemento CIRCE selvagem, é 30% menor quando as células estão expressando altos níveis de GroES/GroEL (NA1000 pRB51) do que nas células com níveis normais destas chaperoninas (NA1000 pAS22). Entretanto, a expressão aumentada de GroES/GroEL não tem efeito nas células carregando a fusão de

transcrição pRB19, que apresenta o elemento CIRCE mutado (tabela 4), ou seja, onde a interação de HrcA com elemento CIRCE é impedida ou prejudicada (Baldini *et al.*, 1998). Este resultado indica que a diferença entre as cepas é devida ao efeito de GroES/EL na atividade repressora de HrcA.

Como controle, fusões de transcrição do gene *lacZ* com outros dois promotores de genes de choque térmico que não apresentam o elemento CIRCE: pDel1 (região promotora de *dnaK/J*) ou pMA100 (região promotora de *clpB*), foram introduzidas nas linhagens NA1000 pRB51 e NA1000 pAS22. Como mostra a tabela 4, não foi observada nenhuma diferença na atividade de β -galactosidase nas linhagens contendo estas fusões de transcrição, independentemente dos níveis de GroES/EL. Estes resultados confirmam que as variações na quantidade destas chaperoninas só devem estar afetando a atividade repressora de HrcA.

As fusões de transcrição pMA11 e pRB19 foram também introduzidas em outras duas linhagens mutantes de *Caulobacter*, SG300 e SG400, nas quais a expressão dos operons *groESL* e *dnaKJ*, respectivamente, são dependentes da presença de xilose (da Silva *et al.*, 2003). Quando a xilose é removida do meio de cultura, a diminuição dos níveis de GroES/EL em SG300 é acompanhada pelo aumento concomitante nos níveis de DnaK/J. Inversamente, na linhagem SG400, crescendo na ausência de xilose, ocorre uma diminuição dos níveis de DnaK/J que é acompanhada por um aumento nos níveis de GroES/EL (da Silva *et al.*, 2003). Ocorre também um aumento nos níveis do σ^{32} em ambas as cepas na ausência de xilose, sendo que na SG400 o aumento é bem maior (2,5 vezes) do que na SG300 (da Silva *et al.*, 2003). Como mostra a tabela 5, quando as células de SG300 crescem na ausência de xilose e os níveis de GroES/EL diminuem drasticamente, a atividade de β -galactosidase aumenta igualmente nas células portadoras quer da fusão de transcrição pMA11 quer da fusão pRB19, ou seja, independentemente da presença ou não do elemento CIRCE selvagem. Por outro lado, quando as células de SG400 crescem na ausência de xilose e os níveis de GroES/EL aumentam (da Silva *et al.*, 2003), a atividade de

β -galactosidase aumenta somente nas células portadoras da fusão de transcrição de pRB19, que contém o elemento CIRCE mutado. Nas células portadoras da fusão de transcrição pMA11, que contém CIRCE selvagem, não se observou aumento na atividade de β -galactosidase. Além disso, como as células da linhagem SG400 na ausência de xilose apresentam níveis mais elevados de σ^{32} do que as células da linhagem SG300 crescidas nas mesmas condições, a atividade de β -galactosidase na linhagem SG400 pRB19 é conseqüentemente maior do que nas células da linhagem SG300 pRB19 (tabela 5).

O fato de termos verificado diferenças na atividade de β -galactosidase quando comparamos as células contendo pMA11 (CIRCE selvagem) ou pRB19 (CIRCE mutado) somente nas células não depletadas de GroES/GroEL (SG400), concorda com a hipótese de que estas chaperoninas são necessárias para a atividade de HrcA.

Tabela 4- Efeito da superexpressão de GroES/GroEL na transcrição a partir de diferentes promotores de genes de choque térmico.

Fusões de transcrição	Promotor ^a :	Atividade de β -galactosidase ^b		
		NA1000 pRB51	NA1000 pAS22	Razão ^c
pMA11	<i>groE</i>	1540 $\pm$ 110	2200 $\pm$ 120	0.70
pRB19	<i>groEmutCIRCE</i>	2950 $\pm$ 200	3100 $\pm$ 240	0.95
pDel1	<i>dnaK</i>	1410 $\pm$ 190	1430 $\pm$ 160	0.99
pMA100	<i>clpB</i>	2790 $\pm$ 220	2770 $\pm$ 230	1.00

^a. Os promotores indicados encontram-se em fusão de transcrição com o gene *lacZ* no plasmídeo placZ290 e cada construção foi introduzida por conjugação nas linhagens NA1000 pRB51 (superexpressão de GroES/GroEL) ou NA1000 pAS22 (níveis normais de GroES/GroEL)

^b A atividade dos promotores foi estimada através da medida da atividade de β -galactosidase, como descrito em Materiais e Métodos. Os valores mostrados representam a média de quatro experimentos independentes.

^c A razão da atividade de β -galactosidase foi determinada dividindo-se a atividade de β -galactosidase determinada nas células da linhagem NA1000 pRB51 pela atividade de β -galactosidase nas células da linhagem NA1000 pAS22.

Tabela 5- Efeito da ausência de GroES/GroEL ou DnaK/DnaJ na transcrição a partir do promotor selvagem do operon *groESL* (*groE*) e do promotor contendo mutação em CIRCE (*groEmutCIRCE*)

Fusões de transcrição	Promotor ^a :	Razão da atividade de β -galactosidase ^b							
		SG300				SG400			
		0h	4h	6h	8h	0h	4h	6h	8h
pMA11	<i>groE</i>	1.0	1.1	1.4	1.7	1.0	1.0	0.9	1.0
pRB19	<i>groEmutCIRCE</i>	1.0	1.0	1.3	1.8	0.9	1.7	2.8	2.9

^a Os promotores indicados encontram-se em fusão com o gene *lacZ* no plasmídeo placZ290 e cada construção foi introduzida por conjugação nas linhagens SG300 e SG400 de *C. crescentus*.

^b As culturas saturadas de SG300 e SG400 foram lavadas várias vezes para a retirada da xilose, e só depois diluídas até DO₆₀₀ = 0,05 e cultivadas em meio M2GX (xilose 0,1% e glicose 0,1%) ou M2G (glicose 0,2%) sob agitação a 30°C durante 6 horas. Nos tempos indicados amostras das culturas foram coletadas e a atividade dos promotores foi estimada através da medida da atividade de β -galactosidase, como descrito em Materiais e Métodos. A razão da atividade de β -galactosidase foi determinada dividindo-se a atividade de β -galactosidase determinada nas células cultivadas em M2G pela atividade nas células cultivadas em M2GX.

1.3. Interação de GroEL e HrcA *in vitro*.

Para demonstrar a interação física entre GroEL e HrcA, a proteína recombinante H₆-HrcA foi imobilizada em uma coluna de Ni-agarose e o extrato total de proteínas de *C. crescentus* foi aplicado a esta coluna. Após várias lavagens, as proteínas ligadas foram eluídas com 100mM de imidazol. Tanto H₆-HrcA como GroEL foram encontradas no eluato, como observado em SDS-PAGE e “western blot” (figura 7). Como controle utilizamos uma coluna que não apresentava HrcA ligada e neste caso, GroEL não foi encontrada no eluato, indicando que não se ligou à coluna controle. Resultados semelhantes foram obtidos quando GroEL purificada de *E. coli* foi aplicada à coluna ao invés do extrato total de proteínas, confirmando a interação direta entre HrcA e GroEL *in vitro*.

1.4. Análise de mutantes pontuais de HrcA.

Uma análise comparativa extensa utilizando 97 sequências de HrcA presentes nos bancos de dados públicos permitiu a identificação de um domínio putativo de ligação ao DNA na HrcA de *C. crescentus*, além da identificação de resíduos altamente conservados em outras regiões da proteína (figura 4) (Perez, 2002; Susin *et al.*, 2004). Com base nesses resultados foram construídas por R. L. Baldini, em nosso laboratório, mutações sítio-dirigidas no gene *hrcA* de *C. crescentus*. Os genes contendo as mutações foram então clonados no vetor pMR20 e usados para complementar o mutante nulo de HrcA (LS2293). O mutante LS2293 apresenta como esperado níveis mais altos de GroEL (2,5 vezes) do que a cepa parental NA1000. O teste de complementação baseou-se na análise dos níveis de GroEL e HrcA por Western blot, conforme descrito em Susin *et al.* (2004). Dentre os mutantes testados, a maioria complementou apenas parcialmente o mutante nulo, indicando defeito na atividade repressora da proteína HrcA mutada. Para estudos neste trabalho,

Figura 7- **Interação entre HrcA e GroEL *in vitro***. Frações obtidas a partir da coluna Ni-agarose controle sem HrcA (canaletas 1, 2, 5 e 6) ou a partir da coluna Ni-agarose carregada com H6-HrcA (canaletas 3, 4, 7, e 8) as quais foi aplicado extrato total de *C. crescentus* (canaletas 1-4) ou GroEL purificada de *E. coli* (canaletas 5-8) foram resolvidas por SDS-PAGE. A presença de HrcA e GroEL nas frações que não ligaram na coluna (canaletas 1, 3, 5 e 7) ou frações eluidas obtidas após lavagem com tampão contendo 100 mM de imidazol (canaletas 2, 4, 6 e 8) foram visualizadas por coloração do gel com azul de Coomassie **(A)** ou por western blot usando anticorpo anti-GroEL **(B)**. M, marcador de massa molecular. As bandas são, de baixo para cima, referentes a 10 kDa, 20 kDa, 30 kDa, 40 kDa, 50 kDa, 60 kDa, 70 kDa, 80 kDa, 90 kDa, 100 kDa, 110 kDa, 120 kDa e 200 kDa.

selecionamos três proteínas: HrcA Ser56Ala, HrcA Pro81Ala e HrcA Arg87Ala. Estas três proteínas complementam apenas parcialmente o mutante nulo, sendo que a HrcA Pro81Ala é a que menos complementa, ou seja, na presença da qual os níveis de GroEL são os mais elevados (Susin *et al.*, 2004).

1.4.1. As mutantes HrcA Pro81Ala e HrcA Arg87Ala apresentam capacidade reduzida de ligação ao elemento CIRCE.

Para investigar se a falha na complementação do mutante nulo de HrcA poderia estar associada à incapacidade de ligação ao elemento CIRCE, duas das proteínas mutantes foram expressas em *E. coli* e utilizadas em ensaios de retardamento de migração em gel de poliacrilamida (ERMGP). A figura 8 mostra que os complexos 1 e 2 não são detectados quando HrcA Pro81Ala e HrcA Arg87Ala foram utilizadas nos experimentos de ligação a CIRCE. Além disso, o complexo 3 pode ser observado com ambas as proteínas mutantes, porém em quantidades muito menores do que se observa com a HrcA selvagem. Estes resultados concordam com a capacidade reduzida de complementação do fenótipo do mutante nulo de HrcA (LS2293) por essas proteínas observado *in vivo* (Susin *et al.*, 2004).

1.4.2. A mutante HrcA Ser56Ala produz um fenótipo dominante-negativo.

A estrutura simétrica do elemento CIRCE sugere que HrcA se liga ao DNA como um dímero ou tetrâmero. Além disso foi descrito que HrcA de *Streptococcus thermophilus* apresenta-se como um dímero no seu estado nativo (Martirani *et al.*, 2001). A presença de uma proteína mutante em uma célula que também produz a proteína HrcA selvagem poderia induzir a formação de hetero-dímeros (ou hetero-oligômeros de ordem maior). Uma vez que algumas substituições de aminoácidos em HrcA podem causar diminuição da ligação da

Figura 8- Os resíduos Pro81 e Arg87 são importantes para atividade de ligação ao DNA presente em HrcA. HrcA Arg87Ala purificada (canaletas 1-3), HrcA selvagem (canaletas 4-6) e HrcA Pro81Ala (canaletas 7-9) , nas concentrações 5 mg (canaletas 1, 4 e 7), 10 mg (canaletas 2, 5 e 8) e 20 mg (canaletas 3, 6 e 9) foram incubadas com a região regulatória de *groESL* marcada com [32 P] e as amostras foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida não-desnaturante.

proteína a CIRCE (figura 8; Susin *et al.*, 2004), a formação de hetero-oligômeros entre estas proteínas mutantes e HrcA selvagem poderia produzir um fenótipo dominante-negativo.

Para investigar esta possibilidade plasmídeos expressando HrcA selvagem ou proteínas HrcA mutantes: HrcA Ser56Ala, HrcA Pro81Ala e HrcA Arg87Ala foram introduzidas na linhagem parental NA1000. Extratos celulares das bactérias foram obtidos e os níveis de GroEL foram analisados por Western blot, utilizando a linhagem nula de *hrcA* (LS2293) e a linhagem parental (NA1000) como controles. Como mostra a figura 9, quando o gene selvagem de *hrcA* está presente *in trans* (NA1000 pRR312-3), os níveis de GroEL são equivalentes aos detectados na linhagem NA1000. Similarmente, os níveis de GroEL nas linhagens carregando as construções que codificam para HrcA Pro81Ala e HrcA Arg87Ala, apresentam também níveis praticamente idênticos aos selvagens. Somente quando HrcA Ser56Ala é expressa na linhagem NA1000 os níveis de GroEL mudam, aumentando cerca de duas vezes quando comparado com os níveis da linhagem sem a proteína mutante. Uma vez que todas as três proteínas mutantes analisadas complementam o fenótipo da mutante nula de HrcA apenas parcialmente, o resultado apresentado na figura 6 sugere que somente HrcA Ser56Ala poderia formar um hetero-oligômero com HrcA selvagem, produzindo um fenótipo dominante-negativo. O resultado também sugere que as outras duas proteínas mutantes (Pro81Ala e Arg87Ala) podem ter sido afetadas na sua capacidade de oligomerização.

Figura 9- **HrcA Ser56Ala produz um fenótipo dominante-negativo.** Os níveis relativos de GroEL foram determinados por western blot utilizando extratos celulares obtidos a partir das culturas das linhagens: LS2293 (canaleta 1), NA1000 (2), NA1000 pRR312-3 (3), NA1000 pSer56Ala (4), NA1000 pArg87Ala (5) e NA1000 pPro81Ala (6). As proteínas totais foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) 9% e transferidas para membrana de nitrocelulose. A mesma quantidade de proteína total foi aplicada em cada canaleta. Esta membrana foi incubada com um antisoro policlonal anti-GroEL de *C. crescentus* seguindo-se incubação com anti IgG de coelho conjugado com peroxidase. Luminol (ECL-Amersham) foi usado como substrato para visualizar a reação da peroxidase e a seguir a membrana de nitrocelulose foi exposta a filme de raio X. O nível relativo de GroEL e DnaK foi estimado por densitometria do autorradiograma.

1.5. Discussão

Um dos objetivos deste trabalho foi investigar a interação entre a HrcA de *C. crescentus* e o elemento CIRCE presente na região regulatória do operon *groESL*.

Resultados anteriores do laboratório mostraram que o sistema CIRCE/HrcA é responsável pela regulação temporal da expressão de *groESL* durante o ciclo celular da bactéria a temperaturas normais. Tanto a transcrição como a tradução de *groESL* apresentam níveis mínimos na célula talo e níveis máximos na célula pré-divisional. Esta expressão diferencial é perdida quando se tem mutações em CIRCE ou em *hrcA* (Avedissian e Gomes, 1996; Baldini *et al.*, 1998). Já a indução de *groESL* por choque térmico é controlada positivamente pelo fator sigma de choque térmico, σ^{32} , mas não por CIRCE/HrcA (Roberts *et al.*, 1996; Baldini *et al.*, 1998). Assim, o sistema CIRCE/HrcA em *Caulobacter* tem um papel diferente daquele descrito em outras bactérias, principalmente as Gram-positivas como *B. subtilis*, onde não existe um ortólogo de σ^{32} .

Para verificar a interação entre CIRCE e HrcA, foram realizados ensaios de retardamento de migração em gel de poliacrilamida (ERMGP) que mostraram que a HrcA de *C. crescentus* liga-se especificamente ao elemento CIRCE do operon *groESL*, levando à formação de três complexos DNA-proteína. Entretanto, um excesso molar da proteína HrcA recombinante com relação ao DNA foi necessário para que ocorresse esta ligação, assim como descrito nos demais sistemas bacterianos estudados (Mogk *et al.*, 1996; Minder *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2001; Martirani *et al.*, 2001; Watanabe *et al.*, 2001; Reischl *et al.*, 2002). Este fato deve-se provavelmente à tendência intrínseca deste repressor em formar agregados ou a permanecer em uma conformação não funcional (Reischl *et al.*, 2002; Wilson e Tan, 2002; Minder *et al.*, 2000), ou seja, é possível que apenas uma fração da proteína recombinante estivesse ativa e portanto, capaz de se ligar ao DNA. Resultados preliminares, obtidos em nosso laboratório por H. R. Perez em experimentos de espalhamento de luz e FPLC, com a mesma HrcA recombinante, mostraram que a proteína realmente forma agregados, alguns bastante grandes.

Outra razão, fisiologicamente mais relevante para a reduzida atividade de HrcA verificada por ERMGP é a possibilidade de uma interação inerentemente fraca ou transitória entre HrcA e CIRCE.

Diferentes formas oligoméricas da proteína podem ser a razão para a presença dos três complexos referentes à ligação de HrcA ao elemento CIRCE. Experimentos realizados com HrcA de *B. subtilis* também mostraram a formação de mais de uma banda retardada pela ligação de HrcA ao elemento CIRCE (Reischl *et al.*, 2002). Desta forma, futuras caracterizações bioquímicas da proteína repressora HrcA de *C. crescentus* devem ser realizadas, porém a alta tendência de HrcA em formar agregados tem dificultado estes estudos (Reischl *et al.*, 2002; H.R. Perez, comunicação pessoal)

Foi mostrado anteriormente que o controle durante o ciclo celular do operon *groESL* não se dá devido a variações na transcrição do gene *hrcA*, que é constitutiva (Roberts *et al.*, 1996), nem por variação da concentração celular da proteína HrcA ao longo do ciclo de vida da bactéria (Baldini, 1999). Isto indica que a variação na expressão do operon *groESL* em *C. crescentus* durante o ciclo celular ocorre, provavelmente, por uma modulação da afinidade da interação entre a proteína HrcA e a sequência operadora CIRCE.

Os ensaios de ERMGP mostraram que GroEL/GroES levam a um aumento significativo da quantidade de um dos complexos (complexo 2) formados pela interação de HrcA de *C. crescentus* com o elemento CIRCE, enquanto que os demais complexos (complexos 1 e 3) diminuem. Este resultado corrobora a hipótese proposta por Mogk *et al.* (1997) de que GroEL ativa HrcA e sugere que o complexo 2 é o complexo principal, onde HrcA deve estar mais próxima de sua conformação nativa. Além disso, demonstramos por cromatografia de afinidade que HrcA de *C. crescentus* interage diretamente com GroEL *in vitro*, assim como HrcA de *B. subtilis* (Reischl *et al.*, 2002).

Em *B. subtilis*, GroEL e GroES também aumentam a ligação de HrcA ao elemento CIRCE nos ensaios de ERMGP, porém um aumento ainda maior foi observado na presença do ATP (Reischl *et al.*, 2002). Em *C. crescentus*, ao contrário, a adição do ATP à reação de ligação contendo GroEL e GroES causa uma drástica diminuição na formação de todos os

complexos HrcA/CIRCE. A hidrólise do ATP parece ser importante neste processo, pois a presença de um análogo não-hidrolizável de ATP (AMP-PCP) não tem efeito na formação de nenhum dos complexos. Resultados preliminares de espectrometria de fluorescência com HrcA indicaram que ela liga ATP (H.R. Perez, comunicação pessoal). Entretanto, mais dados devem ser obtidos para esclarecer se a ligação e provável hidrólise de ATP está realmente envolvida na regulação da atividade repressora de HrcA.

Observamos também que diferentemente de *B. subtilis*, GroEL provavelmente liga-se à região regulatória de *groESL* de forma independente de HrcA. Dados da literatura mostram que GroEL liga-se a RNA (Georgellis *et al.*, 1995) e a DNA (Matsuno *et al.*, 1995). A ligação de GroEL a ácidos nucleicos pode refletir uma função ainda inexplorada desta proteína.

Em *B. subtilis* observou-se que a atividade de HrcA *in vivo* parece ser dependente dos níveis disponíveis de GroEL (Mogk *et al.*, 1997), enquanto os resultados com *Lactococcus lactis*, sugerem que DnaK tem efeito sobre atividade desta proteína (Hoch *et al.*, 1998). Em *C. crescentus*, verificamos que células com a fusão de transcrição da região regulatória de *groESL* e o gene *lacZ* (pMA11) apresentam atividade de β -galactosidase significativamente diminuída quando há superexpressão de GroES/EL. Entretanto, não foi observada nenhuma diferença na atividade de β -galactosidase nas linhagens com as fusões de transcrição do gene *lacZ* e as regiões promotoras de *dnaKJ* ou *clpB* (promotores de choque térmico que não apresentam o elemento CIRCE), ou ainda com a região regulatória de *groESL* contendo CIRCE mutado (pRB21). Uma vez que os promotores de *clpB* e *dnaKJ* são controlados apenas por σ^{32} , estes resultados indicam que o efeito no promotor de *groESL* é devido à presença de CIRCE e não ao promotor dependente de σ^{32} . Estes resultados estão de acordo com um papel positivo de GroES/GroEL na atividade repressora de HrcA, como se observou *in vitro*.

Além disso, a atividade de β -galactosidase aumenta igualmente nas células exauridas de GroES/EL (SG300 cultivada na ausência de xilose), portadoras de fusão de

transcrição entre a região regulatória de *groESL* contendo CIRCE selvagem ou mutado e o gene *lacZ* (pMA11 ou pRB19). Pela peculiaridade da região regulatória de *groESL* de *C. crescentus* conter também um promotor regulado por σ^{32} , esse aumento na atividade de β -galactosidase se deve ao aumento dos níveis deste fator sigma, verificados tanto na linhagem SG300 quanto na SG400 cultivadas na ausência de xilose (da Silva *et al.*, 2003). Por outro lado, quando as células de SG400 crescem na ausência de xilose e os níveis de GroES/EL aumentam (da Silva *et al.*, 2003), a atividade de β -galactosidase aumenta somente nas células portadoras da fusão de transcrição de pRB19. Nas células portadoras da fusão de transcrição pMA11, que contém CIRCE selvagem, não se observou aumento na atividade de β -galactosidase. O fato de termos verificado diferenças na atividade de β -galactosidase quando comparamos as células contendo pMA11 (CIRCE selvagem) ou pRB19 (CIRCE mutado) somente nas células não exauridas de GroES/GroEL (SG400), concorda com a hipótese de que estas chaperoninas são necessárias para a atividade de HrcA.

Estes resultados obtidos tanto *in vitro* como *in vivo* constituem a primeira demonstração do papel positivo de GroES/GroEL na atividade de HrcA em bactérias Gram-negativas, assim como foi proposto em *B. subtilis* e *S. thermophilus* (Mogk *et al.*, 1997; Reischl *et al.*, 2002). Como já mencionamos nessas bactérias Gram-positivas, HrcA/CIRCE está envolvido na indução ao choque térmico, e o modelo propõe que durante o estresse térmico ocorre acúmulo de proteínas desnaturadas dentro da célula, o que leva ao sequestro de GroES/GroEL que então deixam de interagir com HrcA, causando sua inativação. Em *C. crescentus* onde o sistema HrcA/CIRCE não está envolvido na indução ao choque térmico, a regulação da produção de GroES/GroEL ocorre em temperaturas normais e seria um controle dos níveis destas proteínas por auto-regulação negativa.

Estudos com mutantes pontuais em *hrcA* mostraram que substituições em resíduos de aminoácidos conservados Pro39, Ser42, Ser56, Arg58, Pro81 e Arg87, que estão localizados no domínio de ligação ao DNA putativo em HrcA de *C. crescentus*, são

incapazes de complementar a linhagem nula para *hrcA* (Susin *et al.* 2004). Estes resultados indicaram que todos esses aminoácidos devem ter um papel na manutenção da proteína repressora HrcA ativa. As proteínas mutantes HrcA Pro81Ala e HrcA Arg87Ala expressas em *E. coli* e utilizadas em experimentos de ERMGP, apresentaram capacidade de ligação ao elemento CIRCE prejudicada. Desta forma, provavelmente a falha na complementação total do mutante nulo de HrcA pelas proteínas HrcA apresentando essas substituições poderia estar associada à incapacidade de ligação ao elemento CIRCE. Além disso, quando as proteínas HrcA Pro81Ala, HrcA Arg87Ala e HrcA Ser56Ala são produzidas juntamente com a proteína selvagem dentro da mesma célula, apenas a proteína mutante HrcA Ser56Ala apresentou um fenótipo dominante-negativo. Desta forma, pode-se concluir que HrcA de *C. crescentus* se liga a CIRCE na forma de um oligômero (provavelmente um dímero) e que as substituições Pro81Ala e Arg87Ala devem impedir a formação destes oligômeros, o que sugere que estes aminoácidos sejam importantes para a oligomerização.

2. CARACTERIZAÇÃO DAS LINHAGENS MUTANTES CONDICIONAIS EM *groESL* (SG300) E EM *dnaKJ* (SG400) DE *Caulobacter crescentus*.

As tentativas de obtenção de mutantes nulos para os genes *groESL* ou *dnaKJ* falharam, mostrando que as proteínas GroEs/GroEL e DnaK/DnaJ são essenciais em *C. crescentus* mesmo a temperaturas normais. Foram então, construídas linhagens mutantes condicionais: SG300, mutante condicional do operon *groESL* e SG400, mutante condicional do operon *dnaKJ* (da Silva *et al.*, 2003). Para tanto, as regiões regulatórias de *groESL* em SG300 e de *dnaKJ* em SG400 foram substituídas pelo promotor P_{xytX} (Meisenzahl *et al.*, 1997). Este promotor regula a expressão de um operon cujos produtos gênicos estão envolvidos na utilização de xilose como fonte de carbono, sendo ativo apenas na presença deste açúcar. Desta forma, a linhagem SG300 tem a expressão de *groESL* e a linhagem SG4000, de *dnaKJ* condicionada à presença de xilose no meio de cultura.

2.1. Análise dos níveis de GroEL e DnaK nas linhagens SG300 e SG400 de *C. crescentus*.

A figura 10 mostra experimentos de “western blot” utilizando extratos protéicos totais de células de *C. crescentus* no tempo zero e após seis horas de crescimento a 30°C em condições permissivas (presença de xilose) e restritivas (ausência de xilose). As membranas foram incubadas com anti-GroEL ou anti-DnaK e anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase, conforme descrito em Materiais e Métodos. Desta forma, as quantidades relativas de DnaK e GroEL foram obtidas após a análise da densitometria das bandas reveladas no “western blot”.

Verificamos que os níveis de GroEL na linhagem SG300, mesmo na presença de xilose, são menores (0,5x) do que na linhagem parental NA1000 (figura 10A), isto porque

Figura 10- **Análise comparativa dos níveis de GroEL e DnaK. nas linhagens condicionais SG300 e SG400 e na linhagem parental NA1000.** (A) Ensaio de “Western blot” para verificar os níveis de GroEL em extratos protéicos das linhagens NA1000, SG300 e SG400. (B) Ensaio de “Western blot” para verificar os níveis de DnaK em extratos protéicos das linhagens NA1000, SG300 e SG400. Proteínas totais referentes às células coletadas no tempo zero e após seis horas de crescimento na presença (+xil) ou ausência de xilose (-xil) foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) 9% e transferidas para membrana de nitrocelulose. Esta membrana foi incubada com um antisoro policlonal anti-GroEL ou anti-DnaK de *C. crescentus* seguindo-se incubação com anti IgG de coelho conjugado com peroxidase. Luminol (ECL-Amersham) foi usado como substrato para visualizar a reação da peroxidase e a seguir a membrana de nitrocelulose foi exposta a filme de raio X. O nível relativo de GroEL e DnaK foi estimado por densitometria do autorradiograma.

provavelmente o promotor de xilose é mais fraco que o promotor selvagem de *groESL*. Além disso, observamos que os níveis de DnaK são mais altos (1,5x) na linhagem SG300 na presença de xilose e ainda mais altos (3x) após seis horas de crescimento na ausência de xilose (Figura 10B).

Por outro lado, na linhagem SG400 os níveis de DnaK são maiores (1,5x) na presença de xilose em comparação com a cepa selvagem NA1000 (Figura 10B), novamente refletindo a força do promotor de xilose, que neste caso é provavelmente mais forte que o promotor selvagem do operon *dnaKJ*. Os níveis de GroEL nesta linhagem após o crescimento de seis horas na ausência de xilose apresentam um aumento de cerca de 2 vezes em relação à SG400 na presença de xilose e também em relação à NA1000 (Figura 10A).

Como já descrito anteriormente (da Silva *et al.*, 2003), na linhagem SG400 após seis horas de crescimento na ausência de xilose, os níveis de DnaK caem para aproximadamente 1/10 da quantidade na NA1000, enquanto na linhagem SG300 crescendo nas mesmas condições GroEL não é mais detectada por western blot (figura 10).

Embora já soubéssemos que após seis horas de crescimento em condições restritivas a linhagem SG300 apresentava depleção de GroEL e que a linhagem SG400, níveis muito baixos de DnaK (da Silva *et al.*, 2003), a análise comparativa dos níveis de GroEL e DnaK nas linhagens SG300 e SG400 com relação à linhagem parental NA1000 auxiliaram no entendimento de vários resultados obtidos durante a caracterização destas linhagens mutantes.

2.2. Análise do crescimento das linhagens SG300 e SG400 de *C. crescentus*.

A figura 11 mostra que a linhagem SG400 é incapaz de crescer em placas contendo meio de cultura sem xilose incubadas tanto a 37°C, quanto a 30°C (temperatura fisiológica) e 16°C. A linhagem SG300 também não forma colônias em placas sem xilose incubadas todas

Figura 11- **GroES/EL e DnaK/J são essenciais para *C. crescentus* em todas as temperaturas estudadas.** As linhagens condicionais SG300 e SG400 e a linhagem parental NA1000 foram semeadas em placas com meio de cultura PYE contendo ou não xilose e o crescimento foi analisado após a incubação das placas a 30°C (**A**); 37°C (**B**) e 16°C (**C**).

as temperaturas testadas (37°C, 30°C e 16°C). Além disso, a linhagem SG300 também não cresce em placas contendo meio de cultura com xilose incubadas a 37°C. Isso pode ser explicado pelo fato dos níveis de GroEL já serem bem menores nesta linhagem do que na NA1000, como mostrado na figura 10 e descrito no item 2.1. Estes resultados indicam que as proteínas GroES/GroEL e DnaK/DnaJ são essenciais para o crescimento de *C. crescentus* em todas as temperaturas testadas.

2.3. Análise da sobrevivência ao choque térmico das linhagens SG300 e SG400 de *C. crescentus*.

Para analisar os efeitos fisiológicos da ausência de GroES/GroEL ou DnaK/DnaJ submetidas a um aumento brusco de temperatura, as linhagens SG300 e SG400 após o crescimento durante 6 horas em condições permissivas (presença de xilose) ou restritivas (ausência de xilose) foram transferidas da temperatura fisiológica de 30°C para 42°C. Aliquotas foram retiradas após tempos definidos e as células plaqueadas em meio PYE contendo xilose.

Como mostra a Figura 12B, o mutante SG400 cultivado na ausência de xilose durante 6 horas, ou seja quando os níveis de DnaK são quase nulos (figura 10B), apresenta uma sensibilidade muito maior ao choque térmico quando se compara com a linhagem parental NA1000. Por exemplo, após 60 minutos de incubação a 42°C, a sobrevivência da linhagem NA1000 foi de 36% enquanto que na linhagem SG400 cultivada na ausência de xilose foi de 0,3%, ou seja, observa-se um aumento de 120 vezes na sensibilidade ao choque térmico na linhagem depletada de DnaK/DnaJ. Após 120 minutos de choque térmico, a SG400 depletada de DnaK/DnaJ chega a apresentar uma porcentagem de sobrevivência 2600 vezes menor que a linhagem parental, o que indica claramente que estas chaperones são essenciais para as células de *C. crescentus* submetidas a este

Figura 12- **Curva de sobrevivência da linhagem parental NA1000 e das linhagens mutantes condicionais SG300 e SG400 submetidas a choque térmico.** Culturas das linhagens SG300 **(A)** e SG400 **(B)** incubadas durante a noite a 30°C em PYE contendo xilose foram lavadas e diluídas em meio PYE contendo glicose ou xilose para uma DO_{600nm} igual a 0,1 e incubadas durante 6 horas a 30°C. A seguir as culturas foram transferidas para 42°C e nos tempos indicados, alíquotas foram retiradas para o plaqueamento em meio PYE, no caso da NA1000 e PYE contendo o xilose, no caso das linhagens condicionais e posterior incubação a 30°C por 2 dias e contagem das colônias formadas. Os valores apresentados correspondem à média de três experimentos independentes. As barras verticais correspondem ao desvio padrão.

estresse térmico. Por outro lado, células de SG400 cultivadas na presença de xilose apresentam um comportamento muito semelhante à linhagem parental (figura 12B), ou seja, após 60 minutos de choque térmico a 42°C a SG400 na presença de xilose apresentou 30% de sobrevivência e a NA1000, 36%. Na presença de xilose os níveis de DnaK na SG400 são aproximadamente 2 vezes maiores do que na linhagem parental (figura 12B), favorecendo a sua sobrevivência em todos os intervalos de tempo analisados quando se compara com a SG400 crescida na ausência de xilose.

Em contraste, quando a linhagem SG300 crescendo quer na presença quer na ausência de xilose é submetida ao choque térmico, as células respondem de forma bastante semelhante à linhagem parental (figura 12A). Este resultado sugere que GroES/EL não apresentam um papel essencial na sobrevivência ao choque térmico em *C. crescentus*. A maior resistência da cepa mutante SG300 com relação a SG400 pode ser explicada também pelos níveis alterados de DnaK observados nesta cepa tanto na presença como na ausência de xilose. Na presença de xilose, os níveis de DnaK na SG300 são aproximadamente 1,5 vezes maiores do que na cepa parental NA1000; enquanto a quantidade de GroEL é cerca de metade daquela observada na NA1000 (figura 10). Quando a linhagem SG300 é crescida durante 6 horas na ausência de xilose, os níveis de DnaK aumentam cerca de 3 vezes com relação à NA1000 e 2,5 vezes com relação à SG300 na presença de xilose (figura 10). Mais uma vez, nossos resultados apontam para uma participação maior de DnaK na resposta ao estresse térmico.

2.4. Análise da sobrevivência na temperatura letal de 48°C e aquisição de termotolerância nas linhagens SG300 e SG400 de *C. crescentus*.

Para analisar os efeitos fisiológicos da ausência de GroES/GroEL ou DnaK/DnaJ em *C. crescentus* submetidas ao choque térmico extremo e também para verificar o papel destas proteínas na aquisição de termotolerância induzida por choque térmico moderado, as linhagens SG300 e SG400 após 6 horas de crescimento em condições permissivas

(presença de xilose) ou restritivas (ausência de xilose) foram transferidas da temperatura fisiológica de 30°C para 40°C durante 30 minutos. Parte das culturas de SG300 e SG400 não sofreu este pré-tratamento e portanto as células continuaram crescendo à temperatura de 30°C durante estes 30 minutos. Após a retirada do tempo zero, ambas as alíquotas foram submetidas a choque térmico extremo de 48°C. Alíquotas das duas diferentes condições de pré-tratamento foram retiradas após diferentes tempos e as células semeadas em meio PYE contendo xilose a 30°C.

Como mostra a Figura 13A, a linhagem mutante SG300 após crescimento durante 6 horas na ausência de xilose, ou seja quando os níveis de GroEL são praticamente nulos, apresenta uma maior sensibilidade ao choque térmico extremo quando comparada com a mesma linhagem na presença de xilose. Entretanto, a diferença entre elas é pequena, pois após 60 minutos de incubação a 48°C, a sobrevivência da linhagem SG300 cultivada na ausência de xilose foi de 5,3% enquanto que na presença de xilose foi de 2,6%. Por outro lado, o pré-tratamento a 40°C durante 30 minutos e a posterior transferência para 48°C, teve um efeito maior na sobrevivência da linhagem SG300 na presença de xilose, que foi de 50%, enquanto que na ausência de xilose esta linhagem apresentou apenas 9% de sobrevivência com o pré-tratamento, indicando que a ausência de GroES/GroEL prejudica significativamente a aquisição de termotolerância em *C. crescentus*.

A figura 13B, por sua vez, mostra que a capacidade de sobreviver ao choque térmico extremo na linhagem SG400 está bastante diminuída, quer nas células cultivadas na ausência de xilose (0,02% após 60 min a 48°C), quer na presença de xilose (0,1% após 60 min a 48°C), quando se compara com a linhagem SG300. Desta forma, nossos resultados indicam que DnaK/DnaJ são essenciais na resposta ao estresse a 48°C e que os níveis destas chaperones na presença de xilose não são suficientes no choque térmico extremo, diferentemente do foi verificado frente à exposição a 42°C, onde o comportamento foi semelhante à NA1000 (figura 12B).

Figura 13- Curva de sobrevivência das linhagens condicionais SG300 e SG400 submetidas a choque térmico extremo e aquisição de termotolerância. Culturas das linhagens SG300 (A) e SG400 (B) incubadas por 12 horas a 30°C em PYE acrescido de xilose foram lavadas e diluídas em meio PYE contendo glicose ou xilose para uma DO_{600nm} igual a 0,1 e incubadas durante 6 horas a 30°C. Cultura da linhagem NA1000 (A) incubada por 12 horas a 30°C em PYE foi diluída em meio PYE para uma DO_{600nm} igual a 0,1 e incubada durante 6 horas a 30°C. As culturas de SG300, SG400 e NA1000 foram divididas em duas alíquotas. Uma alíquota foi incubada a 40°C durante 30 minutos e a outra permaneceu a 30°C. As culturas foram transferidas para 48°C, e amostras foram retiradas nos tempos indicados na figura. CT e TT indicam choque térmico e termotolerância, respectivamente. Os valores apresentados correspondem à média de três experimentos independentes. As barras verticais correspondem ao desvio padrão.

Quando a linhagem SG400 foi submetida a um pré-tratamento a 40°C por 30 minutos, anteriormente ao choque térmico de 48°C durante 60 minutos, verificamos que a sobrevivência da linhagem na presença de xilose aumentou para 20%. Por outro lado, a sobrevivência desta linhagem na ausência de xilose apresentou praticamente os mesmos valores obtidos quando a linhagem não recebeu o pré-tratamento, em torno de 0,03% (figura 13B). Ou seja, a termotolerância só foi induzida nas células da linhagem SG400 cultivadas na presença de xilose, indicando que DnaK/DnaJ são essenciais neste processo.

Vale ressaltar também, que tanto a linhagem SG300 quanto a SG400, cultivadas na presença de xilose, são capazes de adquirir o mesmo nível de termotolerância observado para a linhagem NA1000 (figura 13A).

2.5. Análise da sobrevivência a estresse oxidativo nas linhagens SG300 e SG400 de *C. crescentus*.

O estresse oxidativo foi induzido pela adição de 2,5 mM de H₂O₂ às culturas das linhagens SG300 e SG400 após o crescimento durante 6 horas em condições permissivas (presença de xilose) e restritivas (ausência de xilose). A concentração de H₂O₂ ideal para esses ensaios foi estabelecida a partir da análise da sobrevivência da linhagem parental NA1000 frente a diferentes concentrações de H₂O₂ (1; 2,5; 5 e 10 mM). A linhagem NA1000 exposta a 1 mM de H₂O₂ apresentou em torno de 100% de sobrevivência até 60 minutos de incubação, enquanto que na presença de 5 e 10 mM de H₂O₂ durante 15 minutos as células apresentaram uma porcentagem de sobrevivência muito baixa, de 1,5% e 0,05%, respectivamente (resultados não mostrados). Por outro lado, a linhagem NA1000 na presença de 2,5 mM de H₂O₂ apresentou sobrevivência superior a 10% após 60 min de exposição (figura 14).

Figura 14- Curva de sobrevivência da linhagem parental NA1000 e das linhagens condicionais SG300 e SG400 submetidas a estresse oxidativo. Culturas das linhagens SG300 (A) e SG400 (B) incubadas por 12 horas a 30°C em PYE contendo xilose foram lavadas e diluídas em meio PYE contendo glicose ou xilose para uma DO_{600nm} igual a 0,1 e incubadas durante 6 horas 30°C. A seguir adicionou-se 2,5 mM de H₂O₂ e nos tempos indicados, alíquotas foram retiradas para o plaqueamento em meio PYE, no caso da NA1000 e PYE contendo xilose, no caso das linhagens mutantes condicionais. Os valores apresentados correspondem à média de três experimentos independentes. As barras verticais correspondem ao desvio padrão.

Como mostra a Figura 14B, a sobrevivência frente ao estresse oxidativo da linhagem SG400, tanto cultivada na presença quanto na ausência de xilose, não apresenta diferença significativa quando comparada à linhagem parental NA1000 cultivada nas mesmas condições.

Por outro lado, o mutante SG300 crescido na ausência de xilose durante 6 horas, ou seja quando os níveis de GroEL são quase nulos, apresenta uma alta sensibilidade a H_2O_2 quando comparado à linhagem parental NA1000. A linhagem SG300 exaurida de GroES/GroEL apresenta 0,06% de sobrevivência após 60 minutos de incubação na presença do agente oxidativo, enquanto a linhagem parental NA1000 apresenta 6% de sobrevivência sob as mesmas condições (figura 14A). Este resultado sugere que a presença de GroES/GroEL pode auxiliar a célula a se recuperar do estresse oxidativo. Embora os níveis de DnaK sejam mais altos no mutante SG300 do que na NA1000, independentemente da presença de xilose (figura 10), este fato não favoreceu a sobrevivência do mutante frente a H_2O_2 , sugerindo que GroEL, e não DnaK, apresenta um papel importante na resposta a este estresse.

2.6. Análise da sobrevivência à exposição a alta concentração de etanol nas linhagens SG300 e SG400 de *C. crescentus*.

A concentração ideal de etanol para estes ensaios foi estabelecida a partir da análise da sobrevivência da linhagem parental NA1000 frente à incubação com diferentes concentrações de etanol (1; 2,5; 5; 10 e 15%). As concentrações de 1; 2,5; 5 ou 10% de etanol não causaram diminuição da taxa de sobrevivência da linhagem parental NA1000 (resultados não mostrados). Sendo assim, células das linhagens SG300 e SG400 após o crescimento durante 6 horas em condições permissivas (presença de xilose) ou restritivas (ausência de xilose) foram submetidas a alta concentração de etanol (15% v/v). Alíquotas das culturas foram retiradas nos tempos indicados e semeadas em PYE a 30°C para determinação da sobrevivência das células a este estresse.

Figura 15- Curva de sobrevivência da linhagem parental NA1000 e das linhagens mutantes condicionais SG300 e SG400 submetidas a alta concentração de etanol. Culturas das linhagens SG300 (A) e SG400 (B) incubadas por 12 horas a 30°C em PYE contendo xilose foram lavadas e diluídas em meio PYE contendo glicose ou xilose para uma DO_{600nm} igual a 0,1 e incubadas durante 6 horas 30°C. A seguir adicionou-se etanol 15% (v/v) e nos tempos indicados, alíquotas foram retiradas para o plaqueamento em meio PYE, no caso da NA1000 e PYE contendo xilose no caso das linhagens mutantes condicionais. Os valores apresentados correspondem à média de três experimentos independentes. As barras verticais correspondem ao desvio padrão.

A figura 15A mostra a porcentagem de sobrevivência da linhagem SG300 cultivada na presença ou ausência de xilose. Neste caso não foi observada nenhuma diferença entre as culturas, sendo a sobrevivência desta linhagem semelhante à NA1000, independentemente da presença ou não de xilose.

Por outro lado, a linhagem SG400 cultivada na ausência de xilose apresenta uma maior sensibilidade a etanol quando comparada à NA1000. Como mostra a figura 15B, após 30 minutos de exposição a 15% de etanol, a linhagem SG400 exaurida de DnaK/DnaJ apresenta uma sobrevivência de cerca de 2,5%, enquanto a linhagem parental NA1000 apresenta 18%. Este resultado sugere que a presença de DnaK/DnaJ pode auxiliar a célula a se recuperar deste estresse.

Além disso, os resultados mostrados na figura 15B, indicam que GroEL não apresenta um papel importante na resposta a etanol, pois a SG400 na ausência de xilose apresenta níveis mais elevados de GroEL (figura 10), mas não apresenta maior resistência a etanol quando comparada à NA1000.

2.7. Análise da sobrevivência a estresse salino e osmótico nas linhagens SG300 e SG400 de *C. crescentus*.

A fim de verificar possíveis diferenças na sobrevivência das linhagens SG300 e SG400 em condições permissivas (presença de xilose) ou restritivas (ausência de xilose) quando submetidas a estresse salino ou osmótico foram realizadas curvas de até 8 horas de exposição ou não a 85mM de NaCl ou 150mM de sacarose, concentrações escolhidas de acordo com os dados de Zuleta *et al.* (2003).

Como mostra a Figura 16A, o mutante SG300 crescendo na ausência de xilose apresenta uma maior sensibilidade ao estresse osmótico e principalmente ao estresse salino

Figura 16- Curva de sobrevivência das linhagens mutantes condicionais SG300 e SG400 submetidas ao estresse salino e osmótico. Culturas das linhagens SG300 (A) e SG400 (B) incubadas por 12 horas a 30°C em PYE contendo xilose foram lavadas e diluídas em meio PYE contendo glicose ou xilose para uma DO_{600nm} igual a 0,1 e incubadas durante 1 hora a 30°C. As culturas foram divididas em duas alíquotas. Uma alíquota recebeu 85mM de NaCl ou 150mM de sacarose e a outra não. Nos tempos indicados foram retiradas amostras para o plaqueamento em PYE contendo xilose. Os valores apresentados correspondem à média de três experimentos independentes. As barras verticais correspondem ao desvio padrão.

quando se compara com a mesma linhagem crescendo na presença de xilose. Após 8 horas de crescimento da linhagem SG300 na ausência de xilose e na presença de sacarose a sobrevivência das células foi de 23%, enquanto na presença de NaCl foi de 2%. Além disso, o efeito tanto do sal quanto da sacarose é observado a partir de 4 horas, ou seja, quando os níveis de GroES/GroEL já encontram-se bastante diminuídos (figura 16A), indicando a participação destas proteínas na resposta a estes estresses em *C. crescentus*.

Já a linhagem SG400 crescendo tanto na presença quanto na ausência de xilose responde de forma bastante semelhante à adição de sacarose ou NaCl (figura 16B). Este resultado sugere que as proteínas DnaK/DnaJ não têm um papel importante na resposta aos estresses salino e osmótico em *C. crescentus*.

A linhagem NA1000, assim como as linhagens SG300 e SG400 na presença de xilose, quando cultivada na presença de NaCl (85mM) ou sacarose (150mM) por até 8 horas apresentam de 100 a 90% de sobrevivência (dados não mostrados).

2.8. Análise da sobrevivência nas linhagens SG300 e SG400 de *C. crescentus* ao congelamento.

Com a finalidade de averiguar a possibilidade de GroES/GroEL e/ou DnaK/DnaJ apresentarem um papel na resposta ao congelamento em *C. crescentus*, as linhagens SG300 e SG400 após o crescimento durante 6 horas em condições permissivas (presença de xilose) ou restritivas (ausência de xilose) foram transferidas da temperatura fisiológica de 30°C para -80°C. Alíquotas foram retiradas após tempos definidos, descongeladas a temperatura ambiente e semeadas em meio PYE contendo xilose.

A figura 14 mostra o efeito do congelamento na sobrevivência das linhagens SG300 e SG400. Surpreendentemente, verificou-se que a cepa parental NA1000 é extremamente resistente ao congelamento a -80°C, ou seja manteve 100% de sobrevivência até o tempo estudado (144 horas). Essa forte adaptação não havia sido verificada anteriormente em

Figura 17- Curva de sobrevivência da linhagem parental NA1000 e das linhagens mutantes condicionais SG300 e SG400 submetidas ao congelamento. Culturas das linhagens SG300 e SG400 incubadas por 12 horas a 30°C em PYE contendo xilose foram lavadas e diluídas em meio PYE contendo glicose ou xilose para uma DO_{600nm} igual a 0,1 e incubadas durante 6 horas a 30°C. A seguir as culturas foram transferidas para -80°C e nos tempos indicados, alíquotas foram descongeladas a temperatura ambiente e plaqueadas em meio PYE, no caso da NA1000 e PYE contendo xilose no caso das linhagens mutantes condicionais. Os valores apresentados correspondem à média de três resultados independentes. As barras verticais correspondem ao desvio padrão.

nenhuma bactéria estudada. Além disso, não se verificou queda na sobrevivência de SG300 quando submetida ao congelamento, tanto na presença quanto na ausência de xilose; as culturas mantiveram em torno 100% de sobrevivência em todos os intervalos estudados (figura 17A). Já a sobrevivência da linhagem SG400 na ausência de xilose, após 18 horas de incubação a -80°C, caiu para 32% e se manteve em aproximadamente 30% até o máximo tempo testado (144 horas), ou seja, a ausência de DnaK/DnaJ torna as células de *C. crescentus* de 2 a 3 vezes mais sensíveis ao congelamento.

2.9. Análise dos níveis das proteínas GroEL, DnaK e do fator sigma 32 em resposta aos diversos estresses ambientais estudados.

Como mostra a figura 18A, a exposição das células da linhagem parental NA1000 a 5% de etanol induz um aumento na síntese das proteínas de choque térmico ClpB, DnaK e GroEL. A síntese aumentada de DnaK e GroEL acarreta em um aumento nos níveis de GroEL DnaK e como mostra a figura 18B. Além disso, observou-se também um aumento transitório nos níveis de σ^{32} durante o tratamento com etanol (figura 18B). Os níveis de GroEL e DnaK também aumentam nas células submetidas a estresse oxidativo (120 μ M de H₂O₂) (figura 18C). Entretanto, os níveis de GroEL e DnaK praticamente não variam em resposta ao estresse salino (85mM de NaCl) e osmótico (150mM de sacarose) (resultados não mostrados).

Figura 18- (A) Padrão de síntese de proteínas totais frente a estresse por etanol *C.crescentus*. Células da linhagem parental NA1000 foram marcadas com pulsos de [³⁵S]-metionina por 5 min durante vários tempos de incubação com etanol 5%. (B) Análise dos níveis de GroEL, DnaK e σ^{32} em extratos protéicos da linhagem NA1000 de *Caulobacter crescentus* sob estresse. Proteínas totais de diferentes tempos de incubação com etanol 5% ou com 120 μ M de H₂O₂ (C) foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) 9% e transferidas para membrana de nitrocelulose. Esta membrana foi incubada com um antisoro policlonal anti-GroEL, anti-DnaK ou anti- σ^{32} de *C. crescentus* seguido de incubação com anti IgG de coelho conjugado com peroxidase. Luminol foi usado como substrato para visualizar a reação da peroxidase após exposição da membrana de nitrocelulose a filme de raio X.

2.10. Análise da morfologia e viabilidade das células das linhagens SG300 e SG400 em condições permissivas ou restritivas.

Visto que baixos níveis de GroES/EL ou de DnaK/J afetam a sobrevivência das células de *C. crescentus*, resolvemos investigar o efeito da ausência destas proteínas na morfologia das células. As células das linhagens SG300 e SG400 foram cultivadas em PYE contendo ou não xilose e após diferentes tempos alíquotas de células foram fixadas em lâminas de vidro e analisadas por microscopia óptica. As figuras 19 e 20 mostram que as células de SG300 e SG400, a partir de 10 horas de crescimento na ausência de xilose, ou seja, células exauridas de GroES/GroEL ou DnaK/DnaJ, respectivamente, apresentam morfologia bastante diferente daquela observada nas células crescendo na presença de xilose. As células da linhagem SG400 com baixos níveis de DnaK/J apresentam-se mais alongadas e com um volume total maior do que as células na presença de xilose. Já as células de SG300 apresentam-se extremamente alongadas após 10 e 18 horas na ausência de xilose, enquanto as células na presença de xilose têm uma morfologia normal. Estes resultados indicam que baixos níveis tanto de DnaK/J como de GroES/EL causam falha na divisão celular.

A figura 21 mostra células das linhagens SG300 e SG400 cultivadas por 10 horas na ausência ou presença de xilose que foram coradas com SYTO9 e iodeto de propídeo ("LIVE/DEAD BacLight" da Molecular Probes Inc.). O "LIVE/DEAD BacLight" foi desenvolvido para diferenciar as bactérias vivas das mortas. Os dois corantes de ácidos nucleicos fluorescentes utilizados diferem em suas características espectrais e na sua capacidade de penetrar nas células bacterianas viáveis. O fluorocromo verde (SYTO9) é uma molécula pequena, portanto penetra em todas as bactérias de uma população, tanto aquelas que apresentam membranas intactas, quanto aquelas com membranas comprometidas. Em contraste, o fluorocromo vermelho (iodeto de propídeo) penetra apenas em membranas

Figura 19- **Morfologia das células da linhagem SG300 na presença e ausência de xilose.** A linhagem SG400 foi inoculada em meio PYE contendo xilose ou glicose e alíquotas foram retiradas após os tempos indicados. As células foram fixadas em lâminas de vidro e visualizadas por microscopia óptica utilizando objetiva 100 (DIC).

Figura 20- **Morfologia das células da linhagem SG400 na presença e ausência de xilose.** A linhagem SG400 foi inoculada em meio PYE contendo xilose ou glicose e alíquotas foram retiradas após os tempos indicados. As células foram fixadas em lâminas de vidro e visualizadas por microscopia óptica utilizando objetiva 100 (DIC).

Figura 21- **Caracterização microscópica do fenótipo causado pela ausência de GroES/EL e DnaK/J.** A-D Células das linhagens SG300 e SG400 tratadas com os corantes LIVE/DEAD. Em **A**, linhagem SG300 crescida na presença de xilose e em **B**, na ausência de xilose. Em **C**, linhagem SG400 crescida na presença de xilose e em **D**, na ausência de xilose. Verde corresponde a células saudáveis enquanto que vermelho indica células que perderam a viabilidade.

comprometidas, causando uma redução na fluorescência do SYTO9, o que resulta em células que fluorescem no vermelho. Desta forma, além das mudanças morfológicas, o sistema LIVE/DEAD permitiu uma análise quantitativa da viabilidade de células exauridas de GroEL e DnaKJ, através da contagem de células vivas e mortas em vários campos escolhidos aleatoriamente, como descrito em Boulos et al. (1999). Verificamos que a linhagem SG300, crescendo na ausência de xilose por dez horas, apresenta 52% de células não-viáveis (coloração vermelha) e 48% de células viáveis (coloração verde), enquanto na presença de xilose verificamos 95% de células viáveis. A linhagem SG400, entretanto, não apresentou diferença significativa quanto à viabilidade das células cultivadas na presença ou ausência de xilose por 10 horas, pois verificamos em torno de 93% de células viáveis em ambas as condições de crescimento (figura 21).

Para melhor caracterizar o defeito de divisão celular observado nas linhagens SG300 e SG400, utilizamos um corante vital de membrana, o FM1-43 (Molecular Probes), que é capaz de se integrar à membrana externa de bactérias, permitindo o estudo da formação de septo durante a divisão celular (Pogliano *et al.*, 1999). Assim, analisamos a formação ou não de septo nestas linhagens de *C. crescentus*. Verificamos, então, que a maioria das células filamentosas de SG300 (depletadas de GroES/EL) possuem constrições fundas e irregulares ao longo dos filamentos, enquanto que apenas 4% não possuem constrições (figura 22B). Por outro lado, apenas 11% das células da linhagem SG400 apresentam septo ou possuem uma discreta constrição no meio de célula (figura 23B). Como controle, as células das linhagens SG300 e SG400 cultivadas na presença de xilose (figuras 22A e 23A), assim como as células da linhagem parental NA1000 (resultado não mostrado), também foram analisadas quanto à capacidade de formação de septo. Esta análise mostrou que 35-41% das células tanto das linhagens condicionais em condições permissivas (presença de xilose) como da linhagem parental NA1000 apresentam septo após 10 horas de crescimento. Estas células que possuem septo correspondem às células pré-divisionais.

Figura 22- **Análise do bloqueio da divisão celular em células da linhagem SG300 cultivadas em condições restritivas (ausência de xilose), tratadas com o corante de membrana FM1-43.** Em **A**, linhagem SG300 crescida na presença de xilose e em **B**, na ausência de xilose. Em **C**, gráfico mostrando a distribuição dos tamanhos das células de SG300 cultivadas na presença (cinza claro) ou ausência de xilose (cinza escuro). As setas apontam os septos ou sinais de constrição.

Figura 23- **Análise do bloqueio da divisão celular em células da linhagem SG400 cultivadas em condições restritivas (ausência de xilose), tratadas com o corante de membrana FM1-43.** Em **A**, linhagem SG400 crescida na presença de xilose e em **B**, na ausência de xilose. Em **C**, gráfico mostrando a distribuição dos tamanhos das células de SG400 cultivadas na presença (cinza claro) ou ausência de xilose (cinza escuro). As setas apontam os septos ou sinais de constrição.

Através da medida das células, utilizando um programa de imagem (Image Pro), nós determinamos a distribuição dos tamanhos das células das linhagens condicionais SG300 e SG400 cultivadas por 10 horas tanto na presença quanto na ausência de xilose (figura 22C e 23C). A figura 22C mostra claramente que as células exauridas de GroEL/GroES apresentam uma faixa de tamanho bem maior do que as células que apresentam níveis próximos aos da célula parental. A maioria das células de SG300 cultivadas na ausência de xilose (56%) apresenta tamanho de 8,0 a 13,0 μ m, enquanto a maior parte das células cultivadas na presença de xilose (54%) apresenta tamanho de 2,0 a 3,4 μ m. Portanto, as células com baixos níveis de GroES/GroEL são em torno de 4 vezes maiores do que as células que apresentam níveis próximos aos normais. Em contraposição, as células com baixos níveis de DnaK/DnaJ são apenas em torno de 1,4 vezes maiores que as células na presença de xilose, pois a maioria das células de SG400 cultivadas na ausência de xilose (55%) apresenta tamanho de 3,4 a 4,7 μ m enquanto a maior parte das células cultivadas na presença do indutor (61%) apresentam tamanhos de 2,0 a 3,4 μ m (figura 23C). Esta análise aponta novamente para um provável bloqueio no crescimento das células exauridas de DnaK/DnaJ. As células da linhagem parental NA1000 obedecem praticamente a mesma distribuição de tamanho verificada para as células das linhagens SG300 e SG400 na presença de xilose (resultado não mostrado).

2.11. Análise da formação do anel Z nas linhagens SG300 e SG400.

Com o objetivo de investigar se ocorre formação do anel Z nas células exauridas de GroES/GroEL ou DnaK/DnaJ, preparamos células das linhagens SG300 e SG400 para microscopia de imunofluorescência utilizando anticorpo anti-FtsZ de *C. crescentus* (gentilmente cedido pelo Dr. Yves V. Brun) e analisamos em microscópio óptico (figura 24).

Esta análise mostrou que em torno de 70% das células das linhagens SG300 e SG400 crescidas na presença de xilose, assim como da linhagem parental NA1000

apresentam anéis Z na posição correta. Estas células devem corresponder às que estão em transição da célula talo para célula pré-divisional assim como às células pré-divisionais propriamente ditas, enquanto as células que não apresentam o anel Z provavelmente correspondem às células móveis e às células talo em estágio inicial de replicação do cromossomo.

Os experimentos com as células da linhagem SG300 exauridas de GroES/EL mostraram que a maioria das células nessas condições (92%) forma vários anéis Z (figura 21B). Em contraste, a observação das células da linhagem SG400 exauridas de DnaK/J revelou que apenas 8% das células apresenta anéis Z (figura 24D).

Figura 24- Localização de FtsZ nas células da linhagens SG300 e SG400 através de microscopia de imunofluorescência. Em A, linhagem SG300 crescida na presença de xilose e em B, na ausência de xilose. Em C, linhagem SG400 crescida na presença de xilose e em D, na ausência de xilose. As setas apontam a localização dos anéis Z.

2.12. Discussão

As respostas das bactérias a diversos estresses ambientais, como choque térmico, pH ácido ou alcalino, estresse osmótico, estresse oxidativo, têm sido bastante investigadas, sendo a resposta ao choque térmico a melhor caracterizada (van de Guchte *et al.*, 2002; Aertsen e Michiels, 2004; De Angelis e Gobbetti, 2004). De forma geral, as bactérias respondem a estresses induzindo de forma transitória a expressão de genes específicos e de genes de resposta geral a estresses, assim como sofrendo mudanças fisiológicas que geralmente aumentam a capacidade de sobrevivência dos organismos durante as condições adversas (Ang *et al.*, 1991).

Os genes que codificam as proteínas GroES/GroEL e DnaK/DnaJ foram considerados genes de resposta geral a estresse em algumas bactérias estudadas, porque a indução da síntese destas proteínas ocorre em resposta a vários estresses ambientais (Mojica *et al.*, 1997, Teixeira-Gomes *et al.*, 2000; Duché *et al.*, 2002). Entretanto, poucos trabalhos demonstraram a importância destas chaperones para a sobrevivência das bactérias submetidas a diferentes estresses ambientais.

Neste trabalho, analisamos as linhagens mutantes condicionais SG300 e SG400 de *C. crescentus*, onde a expressão de *groESL* e de *dnaKJ*, respectivamente, depende da presença de xilose no meio de cultura, quanto à capacidade de sobrevivência frente a vários estresses, tais como: choque térmico a 42°C e 48°C, estresse oxidativo (2,5mM H₂O₂), alta concentração de etanol (15%), congelamento (-80°C), estresse salino (85mM NaCl), estresse osmótico (150 mM sacarose) e aquisição de termotolerância.

Várias evidências experimentais demonstraram que as proteínas de choque térmico apresentam importantes funções celulares, não apenas durante o choque térmico ou outros estresses ambientais, mas também em condições fisiológicas normais de temperaturas. Concordando com esta hipótese, observamos que GroES/GroEL são essenciais para o crescimento de *C. crescentus* em todas as temperaturas testadas (37°C, 30°C e 16°C),

assim como já havia sido descrito para *E. coli* (Fayet *et al.*, 1989). Entretanto, diferente de *E. coli* e *B. subtilis*, observamos que DnaK/DnaJ são essenciais em *C. crescentus* tanto a 37°C, quanto a 30°C (temperatura fisiológica) e 16°C. Bukau e Walker (1989) mostraram que DnaK é essencial ao crescimento de *E. coli* apenas em altas temperaturas, enquanto o mutante nulo de *dnaK* de *B. subtilis* forma colônias em todas as temperaturas testadas (16 a 52°C) (Schulz *et al.*, 1995).

O choque térmico se caracteriza por causar principalmente desnaturação e agregação protéica. Nossos resultados apontam para uma maior participação na resposta ao estresse térmico de DnaK/DnaJ do que de GroES/EL, visto que na ausência destas chaperoninas não verificamos variações significativas na sobrevivência das células da linhagem SG300 ao choque térmico a 42°C (Fig.12A). Mesmo a 48°C, a ausência destas chaperoninas teve pouco efeito na sobrevivência das células (Fig.13A). Em contraste, a ausência de DnaK/J na linhagem SG400, principalmente na temperatura de 42°C, mostrou um forte efeito na sobrevivência das células (Fig.12B). Estes dados concordam com a proposta de que DnaK e DnaJ têm um papel mais importante como chaperones moleculares (Chow e Tung, 1998). DnaK também mostrou ser importante durante o choque térmico em *E. coli* e *L. lactis*, pois linhagens mutantes nulas para esta proteína apresentaram uma menor sobrevivência quando submetidas a estresse térmico (Paciorek *et al.*, 1997; Koch *et al.*, 1998). Entretanto, o efeito da ausência de GroES/EL na sobrevivência ao choque térmico nunca foi testado em *E. coli*, talvez pelo fato destas chaperoninas serem essenciais mesmo em temperaturas fisiológicas.

A observação de que a ausência de GroES/EL não afeta a sobrevivência das células da linhagem SG300 ao choque térmico a 42°C, pode ser explicada pelos níveis aumentados de DnaK/J nesta linhagem em relação à cepa parental, tanto na presença (1,5X) com na ausência de xilose (3X), na temperatura fisiológica de 30°C (Fig.10). Este resultado é concordante com uma maior importância de DnaK/J no estresse térmico.

Mostramos também, que embora tanto DnaK/DnaJ quanto GroES/GroEL apresentem um papel na sobrevivência de *C. crescentus* à temperatura letal de 48°C,

DnaK/DnaJ são essenciais para aquisição de termotolerância, enquanto que GroES/GroEL mostraram ser menos importantes (Fig 13 A e B). Recentemente, verificamos que a ausência da chaperone ClpB torna as células de *C. crescentus* mais sensíveis a choque térmico e a etanol, além de ser necessária para a aquisição de termotolerância (Simão *et al.*, 2005). Desta forma, acreditamos que DnaK e ClpB poderiam atuar cooperativamente, assim como descrito na literatura (Goloubinoff *et al.*, 1999), suprimindo e revertendo a formação de agregados protéicos durante o choque térmico em *C. crescentus*.

Assim como no choque térmico, apenas DnaK/DnaJ apresentaram um papel importante em *C. crescentus* durante exposição a altas concentrações de etanol. Isso provavelmente se deve ao fato do etanol ser um agente que mimetiza o estresse térmico, uma vez que é capaz de induzir a resposta ao choque térmico (Flahaut *et al.*, 1997). O etanol, assim como outros solventes orgânicos, causa desnaturação protéica, pois compete com a água pelos sítios polares das proteínas. Observamos também que o tratamento com etanol, a exemplo do que ocorre no choque térmico, causa um aumento transitório nos níveis do fator σ^{32} e um aumento gradativo nos níveis de DnaK e GroEL em *C. crescentus*, como também demonstrado em *E. coli* (Lindquist, 1986).

Durante o estresse oxidativo, importantes enzimas e estruturas celulares são danificadas levando à perda de viabilidade de populações bacterianas (Martinez e Kolter, 1997; Tamarit *et al.*, 1998; Imlay, 2003). A regulação da resposta ao estresse oxidativo tem sido extensivamente estudada em *E. coli*, onde foram caracterizados dois regulons: *oxyR* e *soxRS*. O regulon *soxRS* controla a resposta a agentes geradores do radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) enquanto o regulon *oxyR* controla a resposta ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Verificou-se, entretanto, que em algumas bactérias a resposta a condições de estresse oxidativo se sobrepõem a outras respostas a estresse como: choque térmico, carência de nutrientes e resposta SOS (Tamarit *et al.*, 1998). Alguns trabalhos mostraram que as proteínas de choque térmico GroEL e DnaK são induzidas durante o tratamento com H_2O_2 (Farr e Kogoma, 1991). Além disso, Parsons *et al.* (1997) mostraram que células de *Haemophilus ducreyi* com baixos níveis de GroEL apresentaram uma diminuição em sua

capacidade de sobrevivência ao estresse oxidativo. Por outro lado, verificou-se que a linhagem nula de *dnaK* de *E. coli* mantém a capacidade de desenvolver resistência a H₂O₂ (Rockabrand *et al.*, 1995).

Nossos resultados mostraram que células da linhagem SG300 com baixos níveis de GroES/GroEL apresentam maior sensibilidade ao estresse oxidativo, o mesmo não ocorrendo com as células da cepa SG400 com baixos níveis de DnaK/DnaJ. Este fato pode ser explicado com base nas evidências obtidas por Melkani *et al.* (2004). Estes autores, em um estudo que visava verificar alterações na estrutura e atividade de GroEL durante o estresse oxidativo, concluíram que GroEL é mais resistente a este estresse quando comparada com outras proteínas. Verificaram também, que os monômeros oxidados de GroEL gerados nestas condições, facilitam a reativação da enzima rodanese inativada por H₂O₂ e então, sugeriram que GroEL seria capaz de proteger também outras proteínas durante este estresse. Em contraposição, em células de *E. coli* expostas a H₂O₂ foi identificada a proteína DnaK como um dos maiores alvos protéicos deste estresse (Tamarit *et al.*, 1998). Entretanto, tanto GroEL quanto DnaK apresentam níveis aumentados na presença de H₂O₂ em *C. crescentus*, como mostra a figura 18. Também já havia sido demonstrado que os níveis de GroEL e DnaK aumentam durante a exposição ao estresse oxidativo em *Francisella tularensis* (Ericsson *et al.*, 1994), *Listeria monocytogenes* (Hanawa *et al.*, 1995), *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium* (Farr e Kogoma, 1991).

Assim como observado durante o estresse oxidativo, GroES/GroEL são essenciais também para a sobrevivência de *C. crescentus* durante o estresse salino e osmótico. Quando submetidas a uma situação de hiperosmolaridade, as bactérias respondem, segundo Wood (1999), em três fases que se sobrepõem: desidratação (fase I); ajuste da composição do solvente citoplasmático e rehidratação (fase II) e remodelamento celular (fase III). Efeitos similares ocorrem também quando a célula é submetida a altas concentrações de sal (Kanesaki *et al.*, 2002).

Em *E. coli*, a resposta mais rápida para um estresse osmótico é a entrada de ions K⁺. Depois de aproximadamente um minuto, a síntese de glutamato tem início, mantendo a

eletroneutralidade (Dinnbier *et al.*, 1988). Nos 30-120 minutos seguintes, K^+ é substituído progressivamente por osmoprotetores (como trealose e glicina betaína), cuja síntese ou importação é estimulada pela indução de genes regulados osmoticamente (Csonka e Eipstein, 1996). O aumento nos níveis de σ^S que se segue a um choque hiperosmótico é de grande importância na sobrevivência de *E. coli* por aumentar a transcrição de genes envolvidos na síntese e transporte de osmoprotetores (Bianchi e Baneyx, 1999).

Embora a sacarose também exerça um efeito iônico na célula, este efeito é ainda maior no estresse salino devido à entrada dos íons Na^+ no citoplasma da bactéria causado pela alta concentração destes íons no meio de cultura. As células bacterianas protegem-se dos efeitos adversos do Na^+ através dos sistemas de exclusão de Na^+ , como por exemplo, os transportadores Na^+/H^+ (Kanesaki *et al.*, 2002).

Uma sobreposição entre as respostas de choque térmico e do estresse por sal foi observada em *L. lactis* MG1363, onde várias proteínas induzidas por estresse salino também foram induzidas por estresse de temperatura (Kilstrup *et al.*, 1997). Entretanto, quando iniciamos nossos estudos, apenas se conhecia a importância de uma proteína de choque térmico, a protease FtsH, na sobrevivência das células bacterianas submetidas ao estresse salino. Dados da literatura mostravam que células de *B. subtilis* e de *C. crescentus* privadas de FtsH apresentavam extrema sensibilidade ao estresse salino (Deuerling *et al.*, 1997; Fischer *et al.* 2002).

A razão pela qual GroES/GroEL seriam necessárias para a sobrevivência de *C. crescentus* em altas osmolaridades e altas concentrações de sal é que provavelmente estas chaperoninas devem ser responsáveis pelo dobramento correto de proteínas recém sintetizadas, que são rapidamente superexpressas no choque salino e osmótico (Kanesaki *et al.*, 2002), como por exemplo a proteína envolvida com o transporte de K^+ e/ou transportadores responsáveis pelo acúmulo dos solutos osmoprotetores, assim como componentes dos sistemas de exclusão de íons Na^+ . GroES/GroEL também podem atuar renaturando esses polipeptídeos danificados como resultado do efluxo de água (Kanesaki *et al.*, 2002). Além disso, GroES/GroEL poderiam participar da translocação e integração

destes transportadores na membrana plasmática. Lecker *et al.* (1989) mostraram que GroES/GroEL interagem com proteínas secretórias mantendo-as em uma conformação aberta que é essencial para sua translocação. Deaton *et al.* (2004) e Sun *et al.* (2005) sugeriram que GroES/GroEL podem também apresentar um papel na integração de proteínas na membrana plasmática.

No entanto, não verificamos indução das proteínas GroEL e DnaK durante o estresse salino e osmótico em *C. crescentus*, ou seja, provavelmente apenas os níveis basais de GroEL teriam sido responsáveis pela maior resistência ao NaCl e a sacarose apresentadas pela SG300 na presença de xilose. Em um trabalho realizado em *B. subtilis*, também não foi observado aumento da síntese de DnaK (GroEL não foi investigada) em resposta ao estresse osmótico (Volker *et al.*, 1994). Já, a indução de DnaK em resposta ao estresse por sal foi observada em *E. coli* (Meury e Kohiyama, 1991) e *Listeria monocytogenes* (Duché *et al.*, 2002), e de GroEL e DnaK em *Lactococcus lactis* (Kilstrup *et al.*, 1997). A indução de DnaK e GroEL em resposta ao estresse por sal e osmótico foi descrita em *Haloferax volcanii* (Mojica *et al.*, 1997) e em *Synechocystis* sp. (Kanesaki *et al.*, 2002).

No choque frio e no congelamento, a desnaturação protéica não tem sido considerada como o maior problema para as bactérias. Entretanto, alguns trabalhos sugerem que a propriedade de renaturação de proteínas é necessária após o choque frio e congelamento, ou seja, as chaperones devem ser mais importantes na recuperação do que durante estes estresses (Chow e Tung, 1998). A falta de DnaK/DnaJ diminui a capacidade de sobrevivência das células de *C. crescentus* submetidas ao congelamento, provavelmente devido a uma solubilização ineficiente de agregados e renaturação protéica, o que deve ter prejudicado a recuperação das células após o descongelamento. Já a ausência de GroES/EL não afetou a sobrevivência das células nestas mesmas condições.

Em *E. coli*, diferente de *C. crescentus*, tanto DnaK quanto GroEL parecem importantes para a sobrevivência das células submetidas ao congelamento. Linhagens de *E. coli* que produzem DnaK e GroEL não funcionais apresentam uma recuperação mais fraca depois de submetidas ao congelamento quando comparadas com o tipo selvagem. Porém, a

mutante de *dnaK* apresentou uma tolerância ao congelamento ainda pior que a mutante de *groEL*. Chow e Tung (1998) também mostraram que a superexpressão de DnaK/J e GroEL confere uma maior tolerância ao congelamento. Os mesmos autores também mostraram que GroEL e DnaK são mais abundantes em extratos de *E. coli* que sofreram congelamento e sugeriram que o congelamento causa desnaturação protéica e essas proteínas desnaturadas podem, então, induzir a síntese de proteínas de choque térmico.

Durante este trabalho verificamos que GroEL/GroES e DnaK/DnaJ também parecem estar envolvidas com aspectos do ciclo celular de *C. crescentus*.

A divisão celular em bactérias é um processo complexo que requer pelo menos nove genes em *E. coli*, *ftsZ*, *A*, *I*, *K*, *L*, *N*, *Q*, *W* e *zipA* (Rothfield *et al.*, 1999). Destes genes, *ftsZ* age no estágio mais precoce da divisão celular e recruta os outros produtos gênicos citados acima para o sítio de divisão. Mutantes nulos de *FtsZ* de *E. coli* são incapazes de iniciar a divisão celular e formam longos filamentos. *FtsZ* localiza-se no sítio de divisão antes que qualquer contração seja visível e forma uma estrutura de anel chamada anel de Z.

Wang *et al.* (2001) mostraram que o mutante condicional de *FtsZ* de *C. crescentus*, crescendo em condições restritivas, a cada ciclo continua a se alongar sem ocorrer divisão celular, indicando que *FtsZ* é requerido para a iniciação da divisão celular em *Caulobacter*. Posteriormente, Martin *et al.* (2004) mostraram que células de *C. crescentus* exauridas de *FtsA* também filamentam-se dramaticamente. Porém neste caso, os filamentos apresentam várias constrições onde a célula deve ter iniciado a divisão celular, que é incapaz de progredir na ausência de *FtsA* (Martin *et al.*, 2004).

O fenótipo observado para a mutante SG300, crescendo na ausência de xilose, é semelhante ao fenótipo descrito para a linhagem condicional de *FtsA* de *C. crescentus*, pois em SG300 exaurida de GroES/EL, as células também se tornam bastante filamentosas e a grande maioria das células possui constrições fundas e irregulares ao longo dos filamentos. Além disso, a maioria das células de SG300 exauridas de GroES/EL forma vários anéis de Z, indicando que o processo de citocinese parece ter sido bloqueado em um estágio mais

adiantado. Esse resultado é coerente com a fase do ciclo celular onde a transcrição de *groESL* é máxima, o que ocorre na célula pré-divisional (Avedissian e Gomes, 1996).

A mutante SG400 exaurida de DnaK/J, apresenta apenas um fenótipo um pouco mais alongado do que as células pré-divisionais normais, indicando uma provável parada no ciclo celular em um estágio específico, mais provavelmente no estágio de célula pré-divisional. Além disso, deve também ocorrer bloqueio na formação do septo ou pelo menos de um septo completo, uma vez que apenas 8% das células possuem septo ou uma discreta constrição no meio de célula. De fato, apenas a minoria das células apresenta anéis de Z. Desta forma o bloqueio deve estar ocorrendo nos estágios iniciais da divisão celular, a célula sendo provavelmente incapaz de promover a polimerização estável do anel de Z.

Diferente de *C. crescentus*, McCarty e Walker (1994) e Rockabrand *et al.* (1995) mostraram que mutações no gene *dnaK* de *E. coli* resultam em uma severa filamentação e sugeriram que DnaK está envolvida direta ou indiretamente na formação de septo durante a divisão celular.

É conhecido que a iniciação da replicação e a segregação dos cromossomos em *C. crescentus* está interconectada com a divisão celular e a diferenciação (Quardokus e Brun, 2003). Isto porque a inibição da replicação bloqueia a formação completa do septo (Quardokus e Brun, 2003), uma vez que a progressão da divisão celular, após a iniciação da constrição, requer *ftsA* e *ftsQ*, cuja transcrição é dependente da replicação do DNA. Sem FtsA e FtsQ, o anel de Z é desmontado (Martin *et al.*, 2004).

Sendo assim, o fenótipo das células de *C. crescentus* exauridas de DnaK/DnaJ também pode estar refletindo um bloqueio da replicação ou da segregação dos cromossomos nestas células. Concordando com essa hipótese, a transcrição do gene *dnaK* de *C. crescentus* precede a fase S, justamente durante a transição de célula móvel para célula talo e novamente nas células pré-divisionais, coincidindo com a iniciação da replicação do DNA na progênie das células talo (Gomes *et al.*, 1990). Além disso, DnaK parece participar diretamente da iniciação da replicação em *E. coli* (Hupp e Kaguni, 1993; Konieczny e Liberek, 2002; Zzaman *et al.*, 2004) e parece estar envolvida na segregação do

cromossomo (Bukay e Walker, 1989). Com base nestas informações, nós tentamos buscar evidências de um bloqueio de replicação em células de *C. crescentus* depletadas de DnaK/DnaJ, através da análise por microscopia de fluorescência destas células tratadas com um corante de DNA (DAPI). Entretanto, como o nucleóide de *C. crescentus* é muito difuso, quando analisamos SG400 cultivada na ausência de xilose a coloração foi observada por toda a célula, dificultando a observação do número de nucleóides por célula e portanto a investigação do bloqueio da replicação nestas células.

Um fenótipo bastante parecido foi verificado em linhagens mutantes para genes envolvidos com divisão celular em *C. crescentus* cuja função é ainda desconhecida, que apresentam defeito tanto no crescimento como na divisão celular (Ohta *et al.*, 1997). Outro fenótipo semelhante foi verificado em uma linhagem nula para o gene *smc*, que está envolvido na condensação, segregação e outros aspectos da dinâmica dos cromossomos (Jensen e Shapiro, 1999). Os autores sugeriram que um “checkpoint” do ciclo celular de *C. crescentus* percebe perturbações na organização ou segregação dos cromossomos, levando ao bloqueio do ciclo celular.

Entretanto, devemos levar em consideração que os defeitos de divisão celular por nós observados podem ser consequência de múltiplos fatores, muitos deles indiretamente relacionados à formação do septo. GroES/GroEL e DnaK/DnaJ possuem diversos substratos celulares e a ausência destas proteínas deve promover alterações pleiotrópicas na fisiologia das bactérias.

1- Este trabalho permitiu um maior entendimento da regulação da atividade da proteína repressora HrcA de *C. crescentus*, assim como, da interação deste repressor com o elemento CIRCE. As conclusões obtidas foram as seguintes:

- HrcA de *C. crescentus* liga-se especificamente ao elemento CIRCE e GroES/GroEL facilitam esta ligação *in vitro*.
- GroES/EL também apresentam papel positivo na atividade de HrcA de *C. crescentus in vivo*.
- HrcA de *C. crescentus* interage diretamente com GroEL *in vitro*.
- Verificamos que hidrólise de ATP pode estar relacionada com a regulação da atividade de HrcA, impedindo a interação de HrcA com o elemento CIRCE *in vitro*.
- Os aminoácidos Pro81 e Arg87, presentes no domínio putativo de ligação ao DNA, mostraram ser importantes para a atividade repressora de HrcA.
- HrcA Ser56Ala expressa junto com a proteína HrcA selvagem produziu um fenótipo dominante-negativo, indicando que HrcA liga-se à CIRCE de forma oligomérica.
- As substituições Pro81Ala e Arg87Ala parecem impedir a formação de oligômeros, o que sugere que estes aminoácidos sejam importantes para a oligomerização de HrcA.

2- A caracterização das linhagens SG300 (mutante condicional de GroES/GroEL) e SG400 (mutante condicional de DnaK/DnaJ) trouxe informações importantes a respeito do papel destas proteínas frente ao choque térmico e vários outros estresses em *C. crescentus*, assim como durante a divisão celular da bactéria. As conclusões obtidas estão listadas abaixo:

- GroES/EL e DnaK/J são essenciais para *C. crescentus* tanto a 37°C, quanto a 30°C (temperatura fisiológica) e 16°C.
- GroES/EL e DnaK/J são importantes para a sobrevivência de *C. crescentus* sob diferentes estresses ambientais:
 - As células exauridas de GroES/EL são sensíveis ao estresse oxidativo, salino e osmótico.
 - As células exauridas de DnaK/J são sensíveis ao choque térmico a 42°C, ao choque térmico extremo, à exposição a alta concentração de etanol e ao congelamento.
- DnaK/DnaJ são essenciais para aquisição de termotolerância, enquanto GroES/GroEL são menos importantes.
- Os níveis de GroEL e DnaK aumentam em resposta ao estresse por etanol e ao estresse oxidativo na linhagem NA1000. Ocorre também um aumento transitório nos níveis de σ^{32} durante o tratamento com etanol.
- 93% das células depletadas de DnaK/DnaJ são viáveis, enquanto que apenas 48% das células depletadas de GroES/GroEL são viáveis.
- A ausência de GroES/GroEL ou DnaK/DnaJ provoca o bloqueio da progressão do ciclo celular de *C. crescentus* em estágios diferentes.
 - Nas células exauridas de GroES/GroEL, o bloqueio deve ocorrer nos estágios finais da divisão celular, enquanto nas células exauridas de

DnaK/J o bloqueio ocorre provavelmente nos primeiros estágios da divisão celular, refletindo um provável bloqueio na replicação do DNA.

- AERTSEN, A. e MICHIELS, C.W. 2004. Stress and how bacteria cope with death and survival. *Crit. Rev. Microbiol.*, 30(4):263-273.
- ANG, D.; LIBEREK, K.; SKOWYRA, D. ZYLICZ, M. e GEORGOPOULOS, C. 1991. Biological role and regulation of the universally conserved heat shock proteins. *J. Biol. Chem.* 266(36):24233-6.
- AVEDISSIAN, M. e GOMES, S.L. 1996. Expression of the *groESL* operon is cell cycle controlled in *Caulobacter crescentus*. *Mol. Microbiol.*, 19: 79-89.
- AVEDISSIAN, M.; LESSING, D.; GOBER, J.W.; SHAPIRO, L. e GOMES, S.L. 1995. Regulation of the *Caulobacter crescentus dnaKJ* operon. *J. Bacteriol.*, 177: 3479-3484.
- BALDINI, R.L. 1999. Expressão do operon de choque térmico *groESL* durante o ciclo celular de *Caulobacter crescentus*. Tese de Doutorado, Instituto de Química, Universidade de São Paulo.
- BALDINI, R.L.; AVEDISSIAN, M. e GOMES, S.L. 1998. The CIRCE element and putative repressor control cell cycle expression of the *Caulobacter crescentus groESL* operon. *J. Bacteriol.* 180:1632-1641.
- BEN-ZVI, A.P. e GOLOUBINOFF, P. 2001. Review: mechanisms of disaggregation and refolding of stable protein aggregates by molecular chaperones. *J. Struct. Biol.*, 135(2):84-93.
- BI, E.F. e LUTKENHAUS, J. 1991. FtsZ ring structure associated with division in *Escherichia coli*. *Nature*, 354(6349):161-164.
- BIANCHI, A.A. e BANEYX, F. 1999. Hyperosmotic shock induces the stress regulons of *E. coli*. *Mol. Microbiol.*, 34:1029-1038.
- BOULOS, L.; PREVOST, M.; BARBEAU, B.; COALLIER, J. e DESJARDINS, R. 1999. LIVE/DEAD BacLight : application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *J. Microbiol. Methods.*, 37(1):77-86.
- BUCCA, G.; FERINA, G.; PUGLIA, A.M. e SMITH, C. 1995. The *dnaK* operon of *Streptomyces coelicolor* encodes a novel heat-shock protein which binds to the promoter region of the operon. *Mol. Microbiol.*, 17:663-674.

- BUKAU, B. Regulation of the *Escherichia coli* heat-shock response. *Mol. Microbiol.*, 9(4):671-680.
- BUKAU, B. e HORWICH, A.L. 1998. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell*, 92(3):351-366.
- BUKAU, B. e WALKER, G.C. 1989. Delta dnaK52 mutants of *Escherichia coli* have defects in chromosome segregation and plasmid maintenance at normal growth temperatures. *J. Bacteriol.*, 171 (11): 6030–6038.
- BURSTON, S.G. e CLARKE, A.R. 1995. Molecular chaperones: physical and mechanistic properties. *Essays Biochem.*, 29:125-136.
- CHEN, W.P. e KUO, T.T. 1993. A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA. *Nucleic Acids Res.* 21(9):2260.
- CHEN, J.C.; WEISS, D.S.; GHIGO, J.M. e BECKWITH, J. 1999. Septal localization of FtsQ, an essential cell division protein in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 181(2):521-30.
- CHOW, K.C. e TUNG, L.T. 1998. Overexpression of *dnaK/ dnaJ* and *groEL* confers freeze tolerance to *E. coli*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 253:502-505.
- CRAIG, E.A.; GAMBILL, B.D. e NELSON, R.J. 1993. Heat shock proteins: molecular chaperones of protein biogenesis. *Microbiol. Rev.*, 57:402- 414.
- CSONKA, L.N. e EIPSTEIN, W. 1996. Osmoregulation. In *Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and Molecular Biology. Eds. F. C. Neidhardt, R. Curtiss III, J.L. Ingraham, E.C.C. Lin, K.B. Low, B Magasanik, *et al.* Washington D. C. American Society for Microbiology Press, p. 1210-1223.
- Da SILVA, A.C.A., SIMÃO, R.C.G., SUSIN, M.F.; BALDINI, R.B., AVEDISSIAN, M. e GOMES, S. L. 2003. Down-regulation of the heat shock response is independent of DnaK e RpoH levels in *Caulobacter crescentus*. *Mol. Microbiol.* 49(2):541-553.
- DE ANGELIS, M. e GOBBETTI, M. 2004. Environmental stress responses in *Lactobacillus*: a review. *Proteomics*, 4(1):106-122.
- DEATON, J.; SAVVA, C.G.; SUN, J.; HOLZENBURG, A.; BERRY, J. e YOUNG, R. 2004. Solubilization and delivery by GroEL of megadalton complexes of the lambda holin. *Protein Sci.*, 13(7):1778-1786.
- DEUERLING, E.; MOGK, A.; RICHTER, C.; PURUCKER, M. e SCHUMANN, W. 1997. The *ftsH* gene of *Bacillus subtilis* is involved in major cellular processes such as sporulation, stress adaptation and secretion. *Mol. Microbiol.* 23(5):921-33.

- DINNBIER, U. ;LIMPINSEL, E.; SCHMID, R. e BAKKER, E.P. 1988. Transient accumulation of potassium glutamate and its replacement by trehalose during adaptation of growing cells of *E. coli* K-12 to elevated sodium chloride concentrations. *Arch. Microbiol.* 150:3348-357.
- DUCHÉ, O.; TRÉMOULET, F.; GLASER, P. e LABADIE, J. 2002. Salt stress proteins induced in *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(4): 1491-1498.
- ELLIS, R. J. e HEMMINGSEN, S. M. 1989. Molecular chaperones: proteins essential for the biogenesis of some macromolecular structures. *Trends Biochem. Sci.*, 14:339-342.
- ENZ, S.; MAHREN, S.; STROEHER, U.H. e BRAUN, V. 2000. Surface signaling in ferric citrate transport gene induction: interaction of the FecA, FecR, and FecI regulatory proteins. *J. Bacteriol.*, 182:637-646.
- ERICSSON, M.; TARNVIK, A.; KUOPPA, K.; SANDSTROM, G. e SJOSTEDT, A. 1994. Increased synthesis of DnaK, GroEL, and GroES homologs by *Francisella tularensis* LVS in response to heat and hydrogen peroxide. *Infect. Immun.*, 62(1):178-183.
- EVINGER, M. e AGABIAN, N. 1977. Envelope-associated nucleoid from *Caulobacter crescentus* stalked and swarmer cells. *J. Bacteriol.* 132:1 294-301.
- FARR, S.B. e KOGOMA, T. 1991. Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiol. Rev.* 55:561-585.
- FAYET, O.; ZIEGELHOFFER, T. e GEORGOPOULOS, C. 1989. The *groES* and *groEL* heat shock gene products of *Escherichia coli* are essential for bacterial growth at all temperatures. *J. Bacteriol.*, 171(3):1379-1385.
- FENTON, W.A. e HORWICH, A.L. 1997. GroEL-mediated protein folding. *Protein Sci.*, 6(4):743-760.
- FINK, A.L. 1999. Chaperone-mediated protein folding. *Physiol. Rev.* 79(2):425-49.
- FISCHER, B.; RUMMEL, G.; ALDRIDGE, P. e JENAL, U. 2002. The FtsH protease is involved in development, stress response and heat shock control in *Caulobacter crescentus*. *Mol. Microbiol.*, 44:461-478.
- FLAHAUT, S.; FRERE, J.; BOUTIBONNES, P. e AUFFRAY, Y. 1997. Relationship between the thermotolerance and the increase of DnaK and GroEL synthesis in *Enterococcus faecalis* ATCC19433. *J. Basic. Microbiol.*, 37(4):251-258.

- GEORGELLIS, D.; SOHLBERG, B.; HARTL, F.U. e VON GABAIN, A. 1995. Identification of GroEL as a constituent of an mRNA-protection complex in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, 16(6):1259-1268.
- GEORGOPOLOS, C.; LIBEREK, K.; ZYLICK, M. e ANG, D. 1994. Properties of the heat shock proteins of *Escherichia coli* and the auto-regulation of the heat shock response. In Morimoto, R.I.; Tissières, A. e Georgopoulos, C. 1994. *The Biology of Heat Shock Proteins e Molecular Chaperones*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- GIBSON, T.J. 1984. Studies on the Epstein-Barr virus genome. PhD. Cambridge University, Cambridge, UK.
- GOBER, J.W. e SHAPIRO, L. 1992. A developmentally regulated *Caulobacter* flagellar promoter is activated by 3' enhancer and IHF binding elements. *Mol. Biol. Cell*, 3: 913-916.
- GOMES S.L.; JULIANI, M.H.; MAIA, J.C. e SILVA, A.M. 1986. Heat shock protein synthesis during development in *Caulobacter crescentus*. *J. Bacteriol.*, 168: 923-930.
- GOMES, S.L.; GOBER, J.W. e SHAPIRO, L. 1990. Expression of the *Caulobacter* heat shock gene *dnaK* is developmentally controlled during growth at normal temperatures. *J. Bacteriol.*, 172:3051-3059.
- HANAHAN, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.*, 166:557.
- HANAWA, T.; YAMAMOTO, T. e KAMIYA, S. 1995. *Listeria monocytogenes* can grow in macrophages without the aid of proteins induced by environmental stresses. *Infect. Immun.*, 63(12):4595-4599.
- HECKER, M.; SCHUMANN, W. e VOLKER, U. 1996. Heat-shock and general stress-response in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.*, 19: 417-428.
- HIGHTOWER, L.E.. 1980. Cultured animal cells exposed to amino acid analogues or puromycin rapidly synthesize several polypeptides. *J. Cell Physiol.*; 102(3):407-27.
- HIRAGA, S.; ICHINOSE, C.; NIKI, H. e YAMAZOE, M. 1998. Cell cycle-dependent duplication and bidirectional migration of SeqA-associated DNA-protein complexes in *E.coli*. *Mol. Cell.*, 1(3):381-387.
- HITOMI, M.; NISHIMURA, H.; TSUJIMOTO, Y.; MATSUI H. e WATANABE, K. 2003. Identification of a helix-turn-helix motif of *Bacillus thermoglucosidasius* HrcA essential for

- binding to the CIRCE element and thermostability of the HrcA-CIRCE complex, indicating a role as a thermosensor. *J. Bacteriol.*, 185:381-385.
- HOCH, B.; KILSTRUP, M.; VOGENSEN, F.K. e HAMMER, K. 1998. Induced levels of heat shock proteins in a *dnaK* mutant of *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.*, 180: 3873-3881.
- HOROVITZ, A. 1998. Structural aspects of GroEL function. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 8(1):93-100.
- HOURY, W.A. 2001. Chaperone-assisted protein folding in the cell cytoplasm. *Curr. Protein Pept. Sci.*, 2(3):227-244.
- HUPP, T.R. e KAGUNI, J.M. 1993. Activation of mutant forms of DnaA protein of *Escherichia coli* by DnaK and GrpE proteins occurs prior to DNA replication. *J. Biol. Chem.*, 268(18):13143-13150.
- IMLAY, J.A. 2003. Pathways of oxidative damage. *Annual Rev. Microbiol.*, 57:395-418.
- JENSEN, R.B. e SHAPIRO, L. 1999. The *Caulobacter crescentus smc* gene is required for cell cycle progression and chromosome segregation. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 96(19):10661-10666.
- JOHNSON, R.C. e ELY, B. 1977. Isolation of spontaneously derived mutants of *Caulobacter crescentus*. *Genetics*, 86(1):25-32.
- KALLIPOLITIS, B.H. e VALENTIN-HANSEN, P. 1998. Transcription of *rpoH* the *Escherichia coli* heat-shock regulator sigma 32, is negatively controlled by the cAMP-CRP/ CytR nucleoprotein complex. *Mol. Microbiol.*, 29(4): 1091-1099.
- KANESAKI, Y.; SUZUKI, I.; ALLAKHVERDIEV, S.I.; MIKAMI, K. e MURATA, N. 2002. Salt stress and hyperosmotic stress regulate the expression of different sets of genes in *Synechocystis sp.* PCC 6803. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 290:3339-348.
- KELLY, A.J.; SACKETT, M.J.; DIN, N.; QUARDOKUS, E. e BRUN, Y.V. 1998. Cell cycle-dependent transcriptional and proteolytic regulation of FtsZ in *Caulobacter*. *Genes Dev.*, 12(6):880-893.
- KILSTRUP, M. JACOBSEN, S.; HAMMER, K.; VOGENSEN, F.K. Induction of heat-shock protein DnaK, GroEL and GroES by salt stress in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63:1826-1837.
- KIM, S.N.; KIM, S.W.; PYO, S.N. e RHEE, D.K. 2001. Molecular cloning and characterization of *groESL* operon in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Cells.*, 11(3):360-368.
- KOCH, B.; KILSTRUP, M.; VOGENSEN, F.K. e HAMMER, K. 1998. Induced levels of heat shock proteins in a *dnaK* mutant of *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.*, 180(15):3873-3881.

- KONIECZNY, I. e LIBEREK, K. 2002. Cooperative action of *Escherichia coli* ClpB protein and DnaK chaperone in the activation of a replication initiation protein. *J. Biol. Chem.*, 277(21):18483-18488.
- KRZEWSKA, J.; LANGER, T. e LIBEREK, K. 2001. Mitochondrial Hsp78, a member of the Clp/Hsp100 family in *Saccharomyces cerevisiae*, cooperates with Hsp70 in protein refolding. *FEBS Lett.*, 489(1):92-96.
- KUNKEL, T.A.; ROBERTS, J.D. e ZAKOUR, R.A. 1987. Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Methods Enzymol.*, 154: 367-382.
- LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259):680-5.
- LECKER, S.; LILL, R.; ZIEGELHOFFER, T.; GEORGOPOULOS, C.; BASSFORD, P.J. JR, KUMAMOTO, C.A. e WICKNER, W. Three pure chaperone proteins of *Escherichia coli*-- SecB, trigger factor and GroEL-form soluble complexes with precursor proteins in vitro. *EMBO J.*, 8(9):2703-2709.
- LINDQUIST, S. 1986. The heat-shock response. *Annu. Rev. Biochem.* 55:1151-1191
- LINDQUIST, S. e CRAIG, E.A. 1998. The heat shock proteins. *Annual Rev. Genet.*, 22: 631-677.
- LOWE, J. e AMOS, L.A. 1998. Crystal structure of the bacterial cell-division protein FtsZ. *Nature*, 391(6663):203-206.
- MARTIN, M.E.; TRIMBLE, M.J. e BRUN, Y.V. 2004. Cell cycle-dependent abundance, stability and localization of FtsA and FtsQ in *Caulobacter crescentus*. *Mol. Microbiol.*, 54(1):60-74.
- MARTINEZ, A. e KOLTER, R. 1997. Protection of DNA during oxidative stress by the nonspecific DNA-binding protein Dps. *J. Bacteriol.*, 179(16):5188-5194.
- MARTIRANI, L.; RANIELLO, R.; NACLERIO, G.; RICCA, E. e De FELICE, M. 2001. Identification of the DNA-binding protein, HrcA, of *Streptococcus thermophilus*. *FEMS Microbiol. Letters*, 198: 177-182.
- MATSUNO, K.; MIYAMOTO, T.; YAMAGUCHI, K.; ABU SAYED, M.; KAJIWARA, T. e HATANO, S. 1995. Identification of DNA-binding proteins changed after induction of sporulation in *Bacillus cereus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 59(2):231-235.

- McCARTY, J.S. e WALKER, G.C. 1994. DnaK mutants defective in ATPase activity are defective in negative regulation of the heat shock response: expression of mutant DnaK proteins results in filamentation. *J. Bacteriol.* 176(3):764-780.
- MEISENZAHN, A.; SHAPIRO, L. e JENAL, U. 1997. Isolation and characterization of a xylose-dependent promoter from *Caulobacter crescentus*. *J. Bacteriol.* 179: 592-600.
- MELKANI, G.C.; ZARDENETA, G. e MENDOZA, J.A. 2004. Oxidized GroEL can function as a chaperonin. *Front Biosci.*, 1;9:724-731.
- MESSING, J. 1983. New M13 vectors for cloning. *Methods Enzymol.*, 101:20-78.
- MEURY, J. e KOHIYAMA, M. 1991. Role of heat shock protein DnaK in osmotic adaptation of *E. coli*. *J. Bacteriol.*, 173(14): 4404-4410.
- MILLER, J.M. 1972. *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratories.
- MINDER, A.C., FISCHER, H.M., HENNECKE, H. e NARBERHAUS, F. 2000. Role of HrcA and CIRCE in the heat shock regulatory network of *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.*, 182:1 14-22.
- MOGK, A.; HOMUTH, G.; SCHOLZ, C.; KIM, L.; SCHID, F.X. e SCHUMANN, W. 1997. The GroE chaperonin machine is a major modulator of the CIRCE heat shock regulon of *Bacillus subtilis*. *EMBO J.*, 16: 4579-4590.
- MOHL, D.A. e ASTER, J. JR, e GOBER, J.W. 2001. The chromosome partitioning protein, ParB, is required for cytokinesis in *Caulobacter crescentus*. *Mol. Microbiol.*, 42(3):741-755.
- MOJICA, F.J.M.; CISNEROS, E.; FERRER, C.; RODRÍGUEZ-VALERA, F. e JUEZ, G. 1997. Osmotically induced response in representatives of Halophilic prokaryotes: the bacterium *Halomonas elongata* and the Archaeon *Haloferax volcanii*. *J. Bacteriol.* 179(17): 5471-5481.
- NISHIMURA, A.; MORITA, M.; NISHIMURA, Y. e SUGINO, Y. 1990. A rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells. *Nucleic Acids Res.*, 18(20):6169.
- OHTA, N.; NINFA, A.J.; ALLAIRE, A.; KULICK, L. e NEWTON A. 1997. Identification, characterization, and chromosomal organization of cell division cycle genes in *Caulobacter crescentus*. *J. Bacteriol.*;179(7):2169-2180.
- PACIOREK, J.; KARDYS, K.; LOBACZ, B. e WOLSKA, K.I. 1997. *Escherichia coli* defects caused by null mutations in *dnaK* and *dnaJ* genes. *Acta Microbiol. Pol.*, 46(1):7-17.

- PARSONS, L.M.; LIMBERGER, R.J. e SHAYEGANI, M. 1997. Alterations in levels of DnaK and GroEL results in diminished survival e adherence of stressed *Haemophilus ducreyi*. *Infec. and Immun.*, 65(6): 2413-2419.
- PEREZ, H. R. 2002. HrcA de *Caulobacter crescentus* e *Xyllela fastidiosa*: estudos comparativos de seqüências e desenvolvimento de modelo estrutural. Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, Universidade de São Paulo.
- POGLIANO, J.; OSBORNE, N.; SHARP, M.D.; ABANES-DE MELLO, A.; PEREZ, A.; SUN, Y.L.e POGLIANO, K. 1999. A vital stain for studying membrane dynamics in bacteria: a novel mechanism controlling septation during *Bacillus subtilis* sporulation. *Mol. Microbiol.*, 31(4):1149-1159.
- POINDEXTER, J.S. 1981. The *Caulobacters*: ubiquitous unusual bacteria. *Microbiol. Rev.*, 45:1223-179.
- PRASAD, J.; MCJARROW, P. e GOPAL, P. 2003. Heat and osmotic stress responses of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (DR20) in relation to viability after drying. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(2):917-925.
- QUARDOKUS, E.M. e BRUN, Y.V. 2003. Cell cycle timing and developmental checkpoints in *Caulobacter crescentus*. *Curr Opin Microbiol.*, 6(6):541-549.
- REINSENAUER, A.; MOHR, C.D. e SHAPIRO, L. 1996. Regulation of a heat shock σ^{32} gene homolog in *Caulobacter crescentus*. *J. Bacteriol.*, 178: 1919-1927.
- REISCHL, S.; WIEGERT, T.e SCHUMANN, W. 2002. Isolation and analysis of mutant alleles of *Bacillus subtilis* HrcA repressor with reduced dependency on GroE function. *J. Biol. Chem.*, 277:32659-32667.
- ROBERTS, R.; TOOCHINDA, C.; AVEDISSIAN, M.; BALDINI, R.L.; GOMES, S.L. e SHAPIRO, L. 1996. Identification of a *Caulobacter crescentus* operon encoding *hrcA*, involved in negatively regulating heat-inducible transcription the chaperone gene *grpE*. *J. Bacteriol.*, 178: 1829-1841.
- ROCKABRAND, D.; ARTHUR, T.; KORINEK, G.; LIVERS, K. e BLUM, P. 1995. An essential role for the *Escherichia coli* DnaK protein in starvation-induced thermotolerance, H₂O₂ resistance, and reductive division. *J. Bacteriol.*, 177(13):3695-3703.
- ROTHFIELD, L.; JUSTICE, S. e GARCIA-LARA, J. 1999. Bacterial cell division. *Annu. Rev. Genet.*, 33:423-448.

- RUNGELING, E.; LAUFEN, T. e BAHL, H. 1999. Functional characterization of the chaperones DnaK, DnaJ e GrpE from *Clostridium acetobutylicum*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 170:119-123.
- RYAN, K. R. e SHAPIRO, L. 2003. Temporal and spatial regulation in prokaryotic cell cycle progression and development. *Annu Rev Biochem.*, 72:367-394.
- RYE, H.S.; ROSEMAN, A.M.; CHEN, S.; FURTAK, K.; FENTON, W.A.; SAIBIL, H.R. e HORWICH, A.L. 1999. GroEL-GroES cycling: ATP and nonnative polypeptide direct alternation of folding-active rings. *Cell*, 97(3):325-328.
- SAMBROOK, J.; FRITCH, E.F. e MANIATIS, T. 1989. *Molecular cloning. A laboratory Manual*. Segunda edição, Cold Spring Harbor Laboratory prees.
- SCHULZ, A. e SCHUMANN, W. 1996. *hrcA*, the first gene of *Bacillus subtilis dnaK* operon encodes a negative regulator of class I heat shock genes. *J. Bacteriol.*, 178: 1088-1093.
- SCHULZ, A.; TZSCHASCHEL, B.; SCHUMANN, W. 1995. Isolation and analysis of mutants of the *dnaK* operon of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol.*, 15(3):421-429.
- SEGAL, G. e RON, E.Z. 1996. Regulation e organization of the *groE* and *dnaK* operons in Eubacteria. *FEMS Microbiol. Lett.*, 138: 1-10.
- SIMÃO, R.C.; SUSIN, M.F.; ALVAREZ-MARTINEZ, C.E. e GOMES, S.L. 2005. Cells lacking ClpB display a prolonged shutoff phase of the heat shock response in *Caulobacter crescentus*. *Mol. Microbiol.*, 57(2):592-603.
- SIMON, R.; PRIEFER, U. e PUHLER, A. 1983. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Biotechnol.* 1:784-790.
- SUN, J.; SAVVA, C.G.; DEATON, J.; KABACK, H.R.; SVRAKIC, M.; YOUNG. R. e HOLZENBURG, A. 2005. Asymmetric binding of membrane proteins to GroEL. *Arch. Biochem. Biophys.*, 434(2):352-357.
- SUSIN, M.F.; PEREZ, H.R.; BALDINI, R.L. e GOMES, S.L. 2004 Functional and structural analysis of HrcA repressor protein from *Caulobacter crescentus*. *J. Bacteriol.*, 186(20):6759-6767.
- TAMARIT, J.; CABISCOL, E. e ROS, J. 1998. Identification of the major oxidatively damaged proteins in *E. coli* cells exposed to oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 273(5):3027-3032.

- TEIXEIRA-GOMES, A.P.; CLOECKAERT, A. e ZYGMUNT, M.S. 2000. Characterization of heat, oxidative, and acid stress responses in *Brucella melitensis*. *Infect. Immun.*, 68(5):2954-2961.
- TOWBIN, H.; STAHELIN, T. e GORDON, J. 1992. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Biotechnology*, 24:145-149.
- van de GUCHTE, M.; SERROR, P.; CHERVAUX, C.; SMOKVINA, T. EHRLICH, S.D. e MAGUIN, E. 2002. Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 82(1-4):187-216.
- van den ENT, F. e LOWE, J. 2000. Crystal structure of the cell division protein FtsA from *Thermotoga maritima*. *EMBO J.*, 19(20):5300-5307.
- VOLKER, U. ENGELMANN, S.; MAUL, B.; RIETHDORF, S.; VOLKER, A.; SCHMID, R.; MACH, H. e HECKER, M. 1994. Analysis of the induction of general stress proteins of *Bacillus subtilis*. *Microbiol.*, 140: 741-752.
- WANG, Y.; JONES, B.D. e BRUN, Y.V. 2001. A set of *ftsZ* mutants blocked at different stages of cell division in *Caulobacter*. *Mol Microbiol.*, 40(2):347-360.
- WATANABE, K.; YAMAMOTO, T. e SUZUKI, Y. 2001. Renaturation of *Bacillus thermoglucosidasius* HrcA repressor by DNA and thermostability of the HrcA-DNA complex *in vitro*. *J. Bacteriol.*, 183:155-161.
- WECH, W. J. 1993. How Cells Respond To Stress. *Sci. Americ.* 268:56-64.
- WIEGERT, T., e SCHUMANN, W. 2003. Analysis of a DNA-binding motif of the *Bacillus subtilis* HrcA repressor protein. *FEMS Microbiol. Lett.* 223:101-106.
- WILSON, A.C. e TAN, M. 2002. Functional analysis of the heat shock regulator HrcA of *Chlamydia trachomatis*. *J. Bacteriol.*, 184(23):6566-6571.
- WILSON, A.C. e TAN, M. 2004. Stress response gene regulation in *Chlamydia* is dependent on HrcA-CIRCE interactions. *J. Bacteriol.*, 186(11):3384-3391.
- WORTINGER, M.; SACKETT, M.J. e BRUN, Y.V. 2000. CtrA mediates a DNA replication checkpoint that prevents cell division in *Caulobacter crescentus*. *EMBO J.*, 19(17):4503-4512.
- WRIGHT, R.; STEPHENS, C.; ZWEIGER, G.; SHAPIRO, L. e ALLEY, M.R. 1996. *Caulobacter* Lon protease has a critical role in cell-cycle control of DNA methylation. *Genes Dev.*, 10(12):1532-1542.

- WU, J. e NEWTON, A. 1996. Isolation, identification and transcriptional specificity of heat shock sigma factor σ^{32} from *Caulobacter crescentus*. *J. Bacteriol.*, 178: 2094-2101.
- YUAN, G. e WONG, S. 1995. Isolation and characterization of *Bacillus subtilis* *groE* regulatory mutants: evidence for *orf39* in the *dnaK* operon as a repressor gene in regulating the expression of *groE* e *dnaK*. *J. Bacteriol.*, 177: 6462-6468.
- YURA, T.; KANEMORI, M. e MORITA, M.T. 2000. The heat shock response: regulation e function In: Storz, G. e Hengge Eds. *Bacterial Stress Response*, Chapter 1, ASM Press, Washington, D.C. 3-18pp.
- ZUBER, U. e SCHUMANN, W. 1994. CIRCE, a novel heat shock element involved in regulation of heat shock operon *dnaK* of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, 176: 1359-1363.
- ZULETA, L.F.; ITALIANI, V.C. e MARQUES, M.V. 2003. Isolation and characterization of NaCl-sensitive mutants of *Caulobacter crescentus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(6):3029-3035.
- ZZAMAN, S.; REDDY, J.M. e BASTIA, D. 2004. The DnaK-DnaJ-GrpE chaperone system activates inert wild type pi initiator protein of R6K into a form active in replication initiation. *J. Biol. Chem.*, 279(49):50886-50894.