UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

Expressão do operon de choque térmico *groESL*
durante o ciclo celular de *Caulobacter crescentus*.

Regina Lúcia Baldini

Tese de Doutorado

Orientadora: Profa. Dra. Suely Lopes Gomes

São Paulo
1999

**“Expressão do Operon de Choque Térmico
groESL Durante o Ciclo Celular de *Caulobacter
crescentus*”.**

REGINA LÚCIA BALDINI

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

Aprovada por:

Profª Dra. SUELY LOPES GOMES

IQ - USP

(Orientadora e Presidente)

Prof. Dr. ROBERTO VICENTE SANTELLI

IQ - USP

Profª. Dra. CARLA COLUMBANO DE OLIVEIRA

IQ - USP

Prof. Dr. CARLOS FREDERICO MARTINS MENCK

ICB - USP

Prof. Dr. GABRIEL PADILLA MALDONADO

ICB - USP

SÃO PAULO

23 DE ABRIL DE 1999.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Suely Lopes Gomes, pela orientação sempre competente, pela disponibilidade, pela confiança e, sobretudo, pelo exemplo de dedicação.

À Marilis do Valle Marques, pela ajuda no início e no decorrer do doutorado, pelas discussões e pela grande amizade.

Ao Marcelo Avedissian, pelo companheirismo, por ter iniciado este trabalho, pela amizade e papos nem sempre científicos.

Aos colegas de laboratório que já tomaram outros rumos, Ana Cláudia, Cíntia, Rosane, Júlio, Flávio, Débora e Lucivanda, pelo bom ambiente de trabalho e pela colaboração.

Aos colegas atuais, Luciano, Luciana, Rita, Yoji, Ayumi, Mara, Ana Cláudia e Antonio Carlos, pela convivência, colaboração e amizade.

Ao Beto Hülle, pelo interesse e pela grande ajuda em muitos experimentos.

À Sandra, pela eficiência, boa vontade e amizade.

A Denis e Neuza, pelo apoio técnico.

À Elizety, pela ajuda sempre que foi preciso.

Aos professores do Departamento de Bioquímica, pela utilização de equipamentos de seus laboratórios, e a todos os colegas.

Às amigas Valéria e Lyriam, pela força mesmo à distância.

À minha mãe, Maria Lydia, e meus irmãos, Rosa, Renato, Inês e Fernando, por todo o apoio e carinho.

Aos sogros, Arnaldo e Isaura, pelo grande valor que dão ao meu trabalho.

A FAPESP e CNPq, pelo auxílio financeiro.

Ao meu querido Gui.

ÍNDICE

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
INTRODUÇÃO	1
1. <i>Caulobacter crescentus</i>	1
2. Proteínas de resposta ao choque térmico	4
3. Regulação da resposta ao choque térmico em bactérias	8
3.1. <i>Escherichia coli</i>	8
3.2. <i>Bacillus subtilis</i>	10
3.3. <i>Caulobacter crescentus</i>	12
3.4. Outras bactérias	15
OBJETIVOS	18
MATERIAL E MÉTODOS	19
1. Linhagens, fagos e plasmídeos	19
2. Meios e condições de cultura	21
3. Oligonucleotídeos	22
4. Isolamento de DNA, digestão com enzimas de restrição, desfosforilação, ligação e sequenciamento	22
5. Transformação	24
6. Conjugação	24
7. Sincronização de culturas de <i>Caulobacter crescentus</i>	24
8. Obtenção de anticorpos	25
8.1. GroEL	25
8.2. DnaK	27
8.3. HrcA	28
9. Extração de proteínas, eletroforese e “Western blots”	29
10. Imunoprecipitação de proteínas de <i>Caulobacter crescentus</i>	30
11. Eletroforese bidimensional de proteínas	31
12. Mutagênese sítio-dirigida	32
13. Construção das fusões de transcrição e tradução	34
14. Marcação de sondas e hibridação	35

15. Ensaio de extensão de oligonucleotídeo	36
15.1. Obtenção do mRNA de <i>Caulobacter crescentus</i>	36
15.2. Reação de extensão e análise dos produtos	37
16. Construção de linhagens de <i>C. crescentus</i> com o gene <i>groEL</i> interrompido	38
16.1. Clonagem de um gene de resistência à espectinomicina interrompendo a região codificadora de <i>groEL</i> num plasmídeo.....	38
16.2. Obtenção das linhagens <i>groEL::Sp^r</i>	39
17. Construção da linhagem com <i>groEL</i> sob o controle do promotor P_{xylX}	39
17.1. Construção do plasmídeo pRB55	39
17.2. Obtenção da linhagem SG300 por recombinação homóloga	40
17.3. Análise do fenótipo das linhagens SG300-8 e SG300-10	41
17.4. Análise da atividade do promotor de <i>groESL</i> na linhagem SG300.....	41
18. Introdução de mutações na região codificadora de <i>groEL</i>	42
RESULTADOS	44
1. Ensaio da atividade de β -galactosidase das fusões de transcrição e tradução da região regulatória de <i>groESL</i> com o gene repórter <i>lacZ</i>	44
2. Efeito de mutações no elemento CIRCE sobre a indução da resposta ao choque térmico do operon <i>groESL</i>	48
3. Efeito da superexpressão de σ^{32} na expressão de <i>groESL</i>	50
4. Determinação dos inícios de transcrição das construções $P_{groESL}/lacZ$	53
5. Papel de HrcA na regulação temporal de <i>groESL</i>	55
6. Efeito de HrcA na indução de GroEL e DnaK no choque térmico.....	58
7. Variação nos níveis e na síntese de HrcA no choque térmico	61
8. Perfil protéico da linhagem LS2293 (<i>hrcA⁻</i>).....	63
9. Construção da linhagem <i>groEL::Sp^r</i>	66
10. Construção e análise de um mutante <i>groESL</i> condicional.....	69
11. Atividade da região regulatória de <i>groESL</i> na linhagem mutante SG300	76
12. Efeito de mutações pontuais em GroEL	77
DISCUSSÃO	80
CONCLUSÕES	90
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
CURRICULUM VITAE	97

RESUMO

Expressão do operon de choque térmico *groESL* durante o ciclo celular de *Caulobacter crescentus*.

Caulobacter crescentus é uma bactéria Gram-negativa de vida livre cujo ciclo celular depende de eventos de diferenciação celular. A célula pré-divisional assimétrica dá origem a duas células filhas morfológica e funcionalmente distintas: a célula-talo e a célula móvel.

A expressão do operon *groESL* é regulada por choque térmico e durante o ciclo celular a temperaturas normais, sendo a transcrição máxima na célula pré-divisional, com níveis baixos na célula-talo. Numa linhagem superexpressando σ^{32} , os níveis do mRNA e da proteína GroEL estão aumentados, indicando que a transcrição ocorre a partir de um promotor ativado por σ^{32} . A região regulatória também apresenta uma sequência repetida invertida, CIRCE, em que mutações de ponto aumentam a transcrição apenas a temperaturas normais de crescimento, indicando o papel inibitório desse elemento. Fusões de transcrição *groESL-lacZ* com mutações em CIRCE deixam de apresentar regulação temporal, bem como a síntese de GroEL numa linhagem *hrcA*⁻, em que o gene codificando o provável repressor que se liga em CIRCE está interrompido. Estes resultados indicam que o sistema CIRCE/HrcA está envolvido com a regulação da expressão de *groESL* durante o ciclo celular.

Tentativas de se construir uma linhagem com *groEL* interrompido não tiveram sucesso, indicando ser este um gene essencial em todas as temperaturas. Um mutante condicional de *groESL* foi construído por recombinação homóloga e, em condições restritivas, o crescimento é inibido, os níveis de DnaK aumentam e as células se tornam filamentosas, porém não foi observada lise celular. As proteínas essenciais que são dependentes de GroEL/GroES para atingirem sua conformação funcional ainda não foram determinadas.

ABSTRACT

Cell cycle expression of the heat shock *groESL* operon in *Caulobacter crescentus*.

Caulobacter crescentus is an aquatic free-living Gram-negative bacterium whose cell cycle depends on cell differentiation. The asymmetrical predivisional cell gives rise to two morphologically and functionally different daughter cells: the swarmer cell and the stalked cell.

The expression of the *groESL* operon is induced by heat shock and is cell cycle controlled at normal temperatures, with maximal transcription in the predivisional cell and very low levels in the stalked cell. In this work, it was demonstrated that, in a strain overexpressing σ^{32} , the levels of *groESL* transcripts and the synthesis of GroEL are increased, confirming that this factor is responsible for the transcriptional activation of the σ^{32} -like promoter of this operon, that also presents an inverted repeat called CIRCE in its regulatory region. *groESL-lacZ* transcription fusions with point mutations in CIRCE indicated a negative role of this *cis*-acting element only at normal growth temperatures, with a minor effect on heat shock induction. In addition, the expression of these fusions are no longer cell-cycle regulated, as well as GroEL synthesis in a strain which does not have the HrcA protein, the putative repressor that binds CIRCE, indicating that the CIRCE-HrcA system are involved in cell cycle regulation of *groESL* in *C. crescentus*.

It was also shown that *groEL* is an essential gene at normal growth temperatures, since a strain with *groEL* disrupted is not viable. A conditional mutant was obtained by homologous recombination and in restrictive conditions growth is inhibited, DnaK levels are increased and the cells become filamentous, but no cell lysis was observed. The proteins that require GroEL/GroES for proper folding have not been identified yet.

INTRODUÇÃO

1. *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, aeróbias obrigatórias, que apresentam um apêndice derivado da parede celular, a prosteca, denominada também de talo quando há a presença de material adesivo em sua extremidade. O talo das caulobacters, representadas pelos gêneros *Caulobacter* e *Asticcacaulis*, apresenta bandas a intervalos irregulares e é constituído pelo envelope celular, sendo o citossol desprovido de ribossomos ou DNA. Os ambientes onde se encontram caulobacters são pobres em nutrientes e com pH próximo da neutralidade. Em água não perturbada, elas são um dos principais componentes do biofilme que se forma na interface água-ar. Pela sua baixa exigência nutricional, elas já foram isoladas até de reservatórios de água destilada (Poindexter, 1981).

No ambiente oligotrófico onde vivem, as caulobacters são importantes na reciclagem do carbono, utilizando fontes deste elemento encontradas em baixas concentrações e liberando-o ao sistema como CO_2 . Apesar de sua larga distribuição e importância ecológica, a maioria dos estudos sobre estas bactérias tem explorado seu peculiar ciclo de vida, que envolve divisão celular assimétrica, dando origem a células filhas diferentes (Poindexter, 1981).

Caulobacter crescentus é o principal modelo de estudo para a diferenciação celular deste grupo de bactérias, cujos mecanismos moleculares vêm sendo detalhados extensivamente nos últimos anos. Para completar seu ciclo celular, a célula de *C. crescentus* passa obrigatoriamente por eventos de diferenciação celular (Figura 1). Uma das fases do ciclo, a célula móvel (Figura 1a), possui um único flagelo polar, fímbrias e tem capacidade quimiotática. Seu cromossomo encontra-se condensado, não sendo capaz de se replicar. Após cerca de um terço do ciclo, obedecendo a sinais internos, a célula móvel perde o flagelo e as fímbrias, o cromossomo se descondensa e inicia-se a formação

de um talo, que consiste de um prolongamento da membrana e da parede celular, no mesmo pólo da célula onde se encontrava o flagelo. A nova célula talo (Figura 1b) inicia a duplicação do DNA e começa a aumentar de tamanho. A seguir, um novo flagelo é montado no pólo oposto ao do talo. Essa célula assimétrica, denominada pré-divisional (Figura 1c), divide-se dando origem a duas células filhas morfológica e fisiologicamente distintas. A duração do ciclo é de aproximadamente três horas a 30°C em meio definido (revisado em Shapiro, 1994).

A diferenciação celular envolve a transcrição temporal e espacialmente regulada de vários genes, a localização de proteínas e proteólise regulada, sendo a cascata de regulação dos genes da biogênese do flagelo o evento melhor estudado. Os genes de flagelo podem ser classificados em quatro classes, sendo que a expressão dos genes localizados no topo da hierarquia é necessária para a expressão dos genes mais abaixo (revisado em Brun *et al.*, 1994 e Gober & Marques, 1995). O único gene de classe I identificado até o momento é o que codifica a proteína regulatória CtrA (Quon *et al.*, 1996), que se liga ao DNA em sítios específicos, sendo sua atividade controlada por fosforilação e proteólise (Wu *et al.*, 1998; Jenal & Fuchs, 1998). Os genes de classe II possuem em sua região regulatória sequências reconhecidas por CtrA e codificam as proteínas localizadas na base da estrutura do flagelo, proteínas envolvidas na montagem do flagelo e os fatores de transcrição σ^{54} e FlbD. Os genes de classe III, transcritos pela $E\sigma^{54}$ (RNA polimerase contendo o fator σ^{54}), codificam as proteínas que compõem a parte intermediária do flagelo e os genes de classe IV codificam as proteínas do gancho e as flagelinas. A expressão dos genes de classe II é necessária para a transcrição dos genes de classe III, do mesmo modo que mutações nestes últimos impedem a transcrição dos genes de classe IV (revisado em Gober & Marques, 1995). Além da cascata de regulação de genes flagelares, CtrA também participa da regulação da transcrição de genes essenciais para o desenvolvimento do ciclo celular, como *ccrM*, que codifica uma DNA metiltransferase e *hemC*, cujo produto participa da via de biossíntese de heme. Outra função atribuída à CtrA é a inibição da replicação do cromossomo na célula móvel (Quon *et al.*, 1996).

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

2. Proteínas de resposta ao choque térmico.

A indução da síntese de determinadas proteínas em resposta a um aumento brusco de temperatura ou a outros tipos de estresse é um fenômeno que ocorre na maioria dos organismos. Muitas dessas proteínas possuem sequências de aminoácidos bastante conservadas evolutivamente, sendo denominadas proteínas de choque térmico ou Hsps (*heat shock proteins*) (Lindquist & Craig, 1988). A indução dessas proteínas em condições de estresse permite que a célula possa se recuperar da desnaturação protéica, seja por preveni-la, impedindo a formação de agregados, por possibilitar que formas desnaturadas possam voltar à conformação nativa ou mesmo por degradar aquelas irreversivelmente desnaturadas. Assim, várias Hsps são cicerones moleculares (*molecular chaperons*) e outras são proteases.

Apesar dos cicerones moleculares terem sido identificados a princípio devido à indução por choque térmico ou outros tipos de estresse, elas se mostraram essenciais em condições fisiológicas, pois são capazes de se ligar a outras proteínas em estados não-nativos, assistindo seu dobramento até a conformação funcional, geralmente às expensas de ATP (revisado em Bukau & Horwich, 1998). As famílias mais estudadas de cicerones moleculares são a da Hsp70 (DnaK em *E. coli*) e a das chaperoninas (GroEL em *E. coli*), mas o termo também compreende a Hsp100, a Hsp90 e as Hsps de baixo peso molecular, na faixa de 30kDa.

DnaK age em conjunto com as proteínas de choque térmico DnaJ e GrpE. O substrato a ser enovelado sofre vários ciclos de ligação/liberação, geralmente na estequiometria de uma molécula de substrato para uma molécula de DnaK. Os substratos liberados podem atingir a conformação nativa, sofrer outro ciclo de ligação à DnaK, serem ligados a outros cicerones ou proteases, ou formarem agregados (Bukau & Horwich, 1998). O sistema DnaK/DnaJ/GrpE pode interagir com peptídeos assim que estes emergem do ribossomo, impedindo sua agregação ou dobramento incorreto.

A classe das chaperoninas consiste de estruturas relativamente grandes, formadas por 14, 16 ou 18 subunidades, que pode ser dividida em dois grupos. O primeiro é representado por GroEL, presente no citossol de eubactérias, e Hsp60, encontrada em organelas de provável origem endossimbionte, como mitocôndrias e cloroplastos, tendo

os membros alto grau de similaridade. O segundo grupo de chaperoninas é representado por chaperoninas contendo TCP-1 (CCT) do citossol de eucariotos e TF55 de Archaeae, que apresentam menor similaridade de sequência (Braig, 1998).

O sistema de chaperonina mais estudado é GroEL/GroES de *E. coli*. GroEL apresenta-se como uma estrutura oligomérica, na forma de dois anéis empilhados, sendo que cada anel é composto por sete monômeros de cerca de 57 kDa. GroES se organiza na forma de um único anel heptamérico, com subunidades de ~10 kDa (Zeilstra-Ryalls *et al.*, 1991). A estrutura e o mecanismo de ação de GroEL/GroES foi recentemente revisado por Bukau & Horwich (1998). Os anéis de GroEL formam um cilindro com duas cavidades, que tem sua conformação bastante alterada pela ligação ou hidrólise de ATP e pela interação com GroES, que se encaixa como uma tampa em uma das extremidades do cilindro. O complexo assimétrico GroEL/GroES provavelmente é o acceptor dos peptídeos desnaturados *in vivo*. Os domínios apicais do anel sem GroES apresentam regiões hidrofóbicas expostas que têm afinidade por peptídeos de mesmo caráter. Quando o substrato se liga à cavidade aberta (anel *cis*), GroES é liberada do anel *trans* (anel que não apresenta peptídeo ligado) e ATP e GroES se ligam ao anel *cis*, alterando a conformação da cavidade e favorecendo o dobramento correto do peptídeo. A hidrólise de 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 num novo ciclo no sistema GroEL/GroES ou com a assistência de outro chaperone molecular. Um esquema do descrito acima está apresentado na Figura 2.

Apenas 10-15% de todas as proteínas sintetizadas em *E. coli* interagem com GroEL em condições normais. Em relação à dependência de GroEL para o dobramento correto, as proteínas de *E. coli* podem ser classificadas em três grupos. A menor fração consiste de peptídeos que se dobram rapidamente, e não requerem ou sequer interagem com GroEL. O segundo, onde se incluem a maioria das proteínas (cerca de 50% do total), podem ou não utilizar a chaperonina. Geralmente, apenas 5% da população dessas proteínas interagem com GroEL em condições normais. No choque térmico, essa fração

pode aumentar de duas a três vezes. Finalmente, o terceiro grupo é composto por um conjunto de proteínas de 25-55 kDa, que interagem quantitativamente com GroEL e provavelmente têm requerimento obrigatório da chaperonina para seu dobramento correto, que geralmente é lento (Ewalt *et al.*, 1997).

Os genes do operon *groE* de *E. coli* foram inicialmente identificados por meio de mutações que impediam o crescimento (*growth*, em inglês) dos bacteriófagos λ e T4, por não permitirem a montagem correta de estruturas tais como a cauda e a cabeça desses vírus (revisado por Zeilstra-Ryalls *et al.*, 1991). Posteriormente, foi determinado que os produtos destes genes têm síntese induzida por choque térmico, mas que são essenciais para a bactéria em todas as temperaturas (Fayet *et al.*, 1989). Outros fenótipos puderam ser associados a estas mutações, por exemplo: falha na exportação de proteínas (Kusukawa *et al.*, 1989), sensibilidade à luz ultravioleta (Burnett *et al.*, 1994), supressão de mutações em outros genes (Laine & Meyer, 1992) e perda da motilidade (Burnett *et al.*, 1994).

Em *E. coli* e na maioria das bactérias, existe apenas um operon *groESL*. Porém, em algumas bactérias Gram-positivas e cianobactérias estão presentes um operon *groESL* e um gene *groEL* isolado. Em *R. meliloti*, por outro lado, estão presentes 2 operons *groESL*, sendo um plasmidial, e mais uma cópia de *groEL*. *Bradyrhizobium japonicum* apresenta 5 cópias de *groESL* (Fischer *et al.*, 1993). *Caulobacter crescentus* apresenta apenas um operon *groESL* (Avedissian & Gomes, 1996).

Em *E. coli*, GroEL é essencial para a sobrevivência da célula em todas as temperaturas (Fayet *et al.*, 1989). Do grupo de proteínas essenciais que obrigatoriamente interagem com GroEL para a aquisição de sua forma ativa, apenas DapA foi identificada. Esta enzima está envolvida no primeiro passo da síntese do ácido diaminopimélico, que é um componente da parede celular e um intermediário na biossíntese de lisina. Num mutante condicional de *groEL*, a ausência de síntese de GroEL provoca a lise das células em cultura após cerca de 10 gerações, pela incapacidade de sintetizar a parede celular (McLennan & Masters, 1998).

FIGURA 2. Mecanismo de ação de GroES/GroEL. Em azul, os anéis de GroEL; em vermelho, GroES; em verde, o substrato; D, ADP; T, ATP; T→D, hidrólise de ATP. Para explicações, ver o texto. Adaptado a partir de Bukau & Horwich (1998).

3. Regulação da resposta ao choque térmico em bactérias.

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 por mecanismos pós-transcrição, como estabilização de mRNAs.

Os mecanismos de transcrição mais bem caracterizados são os que envolvem o fator σ^{32} de *E. coli* e a sequência repetida invertida CIRCE (*c*ontrolling *i*nverted *r*epet of *c*haperone *e*xpression, Zuber & Schumann, 1994), à qual se liga o repressor HrcA (*h*eat *r*egulator at *CIRCE*; Roberts *et al.*, 1996). O elemento CIRCE foi inicialmente descrito em *Bacillus subtilis* e micobactérias e posteriormente foi encontrado à frente de operons *groE* e *dnaK* de diversas bactérias filogeneticamente distintas. A sequência de CIRCE apresenta um alto grau de conservação, com consenso TTAGCACTC-N₉-GAGTGCTAA (Zuber & Schumman, 1994, Segal & Ron, 1996), e está sempre associada a promotores reconhecidos pela RNA polimerase com o fator sigma vegetativo. O único operon estudado em que CIRCE está associado a um promotor regulado por σ^{32} é *groESL* de *C. crescentus* (Avedissian & Gomes, 1996; Baldini *et al.*, 1998).

Há evidências de dois tipos de controle pós-transcrição. Em *Agrobacterium tumefaciens* e em *B. subtilis*, a sequência repetida invertida CIRCE é transcrita e contribui para uma menor meia-vida do mRNA em condições normais. O mRNA *groESL* de *A. tumefaciens* também pode ser clivado num ponto específico, resultando em sua rápida degradação (Segal & Ron, 1998).

3.1. *Escherichia coli*.

A resposta ao choque térmico em *E. coli* é ativada por uma 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, P3, P4 e P5 e 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 da 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 regulada negativamente pelo complexo cAMP-CRP/CytR e pela proteína DnaA (Kallipolitis & Valentin-Hansen, 1998).

A maior parte do controle da concentração de σ^{32} na célula ocorre em nível de tradução ou pós-tradução. Quando a temperatura é elevada de 30 a 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. A região A assegura um alto nível de tradução, enquanto as regiões B e C a reprimem. A região B do mRNA pode formar uma estrutura secundária que compreende a região A, bloqueando a tradução. O complexo DnaK/DnaJ/GrpE deve 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 (Georgopoulos *et al.*, 1994).

A proteína σ^{32} madura é altamente instável em condições normais de crescimento. Esta instabilidade é mediada pelo complexo DnaK/DnaJ/GrpE, que inibe a atividade da holoenzima $E\sigma^{32}$ após sua ligação a um promotor de choque térmico; sequestra σ^{32} , não permitindo sua ligação à RNA polimerase e media sua degradação por proteases. Durante o choque térmico, o complexo DnaK/DnaJ/GrpE é requisitado para outras funções, liberando 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, através dos promotores σ^{32} . Evidências sugerem que GroEL também possa estar envolvida no enovelamento correto de σ^{32} (Georgopoulos *et al.*, 1994).

O fator σ^E é considerado o segundo fator sigma de choque térmico de *E. coli*. A proteína σ^E , codificada pelo gene *rpoE*, é essencial para a sobrevivência das células a temperaturas acima de 40°C, mas mesmo a 37°C mutantes $\Delta rpoE$ têm viabilidade reduzida (Rouvière *et al.*, 1995; Raina *et al.*, 1995). Recentemente, foi demonstrado que

σ^E é essencial também a temperaturas abaixo de 37°C, pois as linhagens estudadas nos trabalhos anteriores possuíam mutações supressoras que permitiam a sobrevivência das células (De Las Peñas *et al.*, 1997). Cerca de 10 proteínas apresentam síntese elevada quando há superexpressão de *rpoE* (Rouvière *et al.*, 1995; Raina *et al.*, 1995), porém apenas três outros promotores reconhecidos pela holoenzima $E\sigma^E$, além de P3 de *rpoH*, foram identificados: P2 do operon *rpoE*, e os promotores dos genes *degP* e *fkpA*. *degP* codifica uma protease e *fkpA*, uma peptidil-prolil *cis/trans* isomerase, sendo as proteínas DegP e FkpA localizadas no periplasma (Danese & Silhavy, 1997; Missiakas & Raina, 1998). Essas duas proteínas também devem ser necessárias para impedir a presença de peptídeos desnaturados no periplasma em condições de choque térmico, contribuindo para a adaptação da célula em condições de estresse.

A atividade de σ^E é regulada pelos produtos dos genes encontrados no operon *rpoE-rseA-rseB-rseC*. RseA é um anti-fator sigma, funcionando como regulador negativo, em conjunto com RseB, enquanto RseC é um regulador positivo (Missiakas *et al.*, 1997).

3.2. *Bacillus subtilis*.

A bactéria Gram-positiva *Bacillus subtilis* apresenta três classes de genes de choque térmico. Os de classe I apresentam o elemento CIRCE na região 5' não-codificadora. São representados pelos operons *groESL* e *hrcA-grpE-dnaK-dnaJ-orf25-orf38-orf50*. Estes operons são transcritos pela RNA polimerase contendo o fator sigma vegetativo, σ^A (Hecker *et al.*, 1996; Homut *et al.*, 1997)). O elemento CIRCE está presente em operons *groEL* e *dnaK* de várias bactérias filogeneticamente distantes entre si e apresenta alto grau de conservação.

Mutações pontuais no elemento CIRCE causaram aumento da expressão de DnaK à temperatura normal de crescimento (37°C) ao mesmo nível da expressão a 48°C, temperatura de choque térmico para este organismo (Zuber & 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* (Schulz & Schumann, 1996), sendo que apenas *groE* ainda apresenta uma leve indução por choque térmico (Hecker *et al.*, 1996). Yuan & Wong (1995) demonstraram que extratos protéicos de uma cepa de *E. coli* expressando HrcA de *B. subtilis* são capazes de retardar a migração em géis de poliacrilamida não-desnaturantes de fragmentos de DNA contendo o elemento CIRCE. Esses dados sugerem que a proteína HrcA liga-se ao elemento CIRCE, reprimindo a transcrição, ou que está de alguma forma relacionada com outra proteína que se liga a este elemento. Um trabalho recente (Mogk *et al.*, 1997) sugere uma autorregulação da resposta ao choque térmico das proteínas de classe I de *B. subtilis* por GroEL, pela modulação da atividade de HrcA. A proteína HrcA seria 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 ao operador, mas que se encontra num equilíbrio dinâmico, agregando-se facilmente quando desligada e na ausência de GroEL. No choque térmico, o aumento de proteínas desnaturadas na célula requisitaria GroEL, que não estaria disponível para interagir com HrcA, que formaria agregados e não seria capaz de reprimir a expressão dos operons *dnaK* e *groESL*.

Os genes de choque térmico da classe II de *B. subtilis* são regulados por um fator sigma alternativo, σ^B , que não é análogo ao fator σ^{32} de *E. coli*. A maioria dos genes de choque térmico estão neste regulon, que inclui genes que também são induzidos na fase estacionária e em outras condições desfavoráveis à célula, como exposição a etanol, estresse salino e limitação de nutrientes e oxigênio. De cerca de 40 proteínas cuja expressão é regulada por σ^B , catalase, UDP-glicose pirofosforilase e GsiB (*glucose-starvation-induced protein*), além do próprio fator σ^B , foram identificadas e são dispensáveis no crescimento vegetativo (Hecker *et al.*, 1996).

A classe III inclui outros genes induzidos por choque térmico, que incluem os genes para proteases dependentes de ATP, como ClpP, ClpC, Lon e FtsH, que são todos regulados por σ^{32} em *E. coli* (Hecker *et al.*, 1996). Recentemente, foi demonstrado que a proteína codificada pelo primeiro gene do operon *clpC* é capaz de se ligar a uma sequência heptamérica repetida na região regulatória dos operons *clpC*, *clpP* e *clpE*. Esta

proteína foi denominada CtsR, de *class three stress gene repressor* e provavelmente funciona como um repressor de transcrição (Derré *et al.*, 1998).

Com os dados do sequenciamento do genoma de *Bacillus subtilis*, sete genes codificando fatores σ do tipo ECF (semelhantes a σ^E de *E. coli*) foram identificados. De dois destes genes estudados até o momento, apenas σ^X tem papel na sobrevivência das células a altas temperaturas, porém ainda não se tem evidência de genes de choque térmico transcritos por $E\sigma^X$ (Huang *et al.*, 1999).

3.3. *Caulobacter crescentus*.

Em *C. crescentus*, a síntese de 20 diferentes proteínas é induzida durante a resposta ao choque térmico. As mesmas proteínas têm a síntese induzidas em todas as fases do ciclo celular e sua expressão é regulada em nível de transcrição. Quatro dessas proteínas (Hsp70, Hsp62, Hsp24b e Hsp23a) também estão presentes, porém em níveis mais baixos, em extratos de células cultivadas a temperaturas normais de crescimento, apresentando regulação temporal durante o ciclo. A Hsp mais abundante após o choque térmico, a Hsp62, apresenta reação cruzada com o anticorpo produzido contra a proteína GroEL de *E. coli*, sendo homóloga a esta. A Hsp70 de *Caulobacter* também apresentou reação cruzada com o anticorpo contra DnaK de *E. coli* (Gomes *et al.*, 1986). Na tabela 1, estão listados os operons de proteínas de choque térmico de *C. crescentus* estudados até o momento.

O operon *groESL* de *Caulobacter crescentus* apresenta um promotor regulado por σ^{32} e uma sequência repetida invertida denominada CIRCE, provável sítio de ligação da proteína repressora HrcA (Avedissian & Gomes, 1996; Roberts *et al.*, 1996). A expressão do operon *groESL*, além de ser induzida em condições de choque térmico, apresenta regulação temporal, sendo sua transcrição praticamente inexistente na célula talo. A regulação temporal é perdida em linhagens mutantes para *hrcA* e em fusões de transcrição da região regulatória de *groESL* contendo mutações no elemento CIRCE com um gene repórter (Baldini *et al.*, 1998; este trabalho). 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 & Schumman, 1994). Mais recentemente, demonstrou-se que o sistema

CIRCE/HrcA em *Caulobacter crescentus* é responsável pela regulação da expressão de *groESL* no ciclo celular, sendo a indução por choque térmico controlada por σ^{32} (Baldini *et al.*, 1998; este trabalho).

Tabela 1. Operons de choque térmico de *Caulobacter crescentus*.

Operon	Função	Promotor	Regulação Temporal	Referência
<i>dnaKJ</i>	cicerones moleculares	P1 $\rightarrow \sigma^{32}$ P2 $\rightarrow \sigma^{70}$	maior expressão na célula talo	Gomes <i>et al.</i> , 1990; Avedissian <i>et al.</i> , 1995
<i>groESL</i>	chaperonina e co-chaperonina	σ^{32} CIRCE	maior expressão na célula pré-divisional	Avedissian & Gomes, 1996
<i>hrcA-grpE</i>	repressor de <i>groESL</i> (HrcA) chaperone molecular (GrpE)	σ^{32}	constitutiva	Roberts <i>et al.</i> , 1996
<i>rpoH</i>	fator σ^{32} da RNA polimerase	σ^{32}	constitutiva	Reisenauer <i>et al.</i> , 1996
<i>ftsH</i>	protease	?	?	U. Jenal, comunicação pessoal
<i>lon</i>	protease	?	constitutiva (?)	Wright <i>et al.</i> , 1996

O operon *dnaKJ* de *C. crescentus* apresenta dois promotores, P1 e P2. P1 é similar ao consenso de promotores de choque térmico de *E. coli*, sendo o mRNA resultante de sua transcrição o mais abundante nesta condição. O outro, P2, similar aos promotores regulados por σ^{70} de *E. coli*, é ativo apenas em condições normais de temperatura e apresenta controle temporal, sendo que a transcrição a partir dele ocorre durante a transição de célula móvel para célula talo e imediatamente antes do início da replicação do DNA pela célula talo da progênie (Gomes *et al.*, 1990). A proteína DnaK sintetizada na célula pré-divisional é segregada especificamente para a célula talo da progênie

(Reuter & Shapiro, 1987), o que sugere seu envolvimento na replicação do DNA de *Caulobacter*, assim como acontece em outros organismos. Foi demonstrada também a existência de uma sequência líder nos transcritos originados dos dois promotores, cuja deleção resulta no aumento da taxa de expressão de fusões de transcrição e tradução da região regulatória de *dnaKJ* com um gene repórter, sem afetar a regulação temporal do operon. A formação de estruturas secundárias na sequência líder pode ser um mecanismo de modulação de *dnaK* e *dnaJ* em condições de choque térmico (Avedissian *et al.*, 1995).

Recentemente o gene *rpoH*, que codifica para a proteína σ^{32} , foi isolado de *C. crescentus* por dois grupos, trabalhando independentemente (Reisenauer & Shapiro, 1996 e Wu & Newton, 1996). A proteína apresenta 42% de identidade com σ^{32} de *E. coli*, 40% com *Pseudomonas aeruginosa* e 38% com *Citrobacter freundii*, além de ser reconhecida por anticorpos contra σ^{32} de *E. coli*. A proteína purificada permite a transcrição *in vitro* a partir do promotor P1 de *dnaKJ*, mas não a partir de P2, P1 mutagenizado ou promotores reconhecidos por σ^{70} , na presença do "core" da RNA polimerase (Wu & Newton, 1996).

Em *C. crescentus*, a regulação de *rpoH* parece ser diferente da estabelecida para *E. coli*. Foram encontrados dois inícios de transcrição para o gene *rpoH* de *Caulobacter crescentus*, que definiram dois promotores, P1 e P2. P1 apresenta sequências similares ao consenso de promotores σ^{70} , e P2, aos de σ^{32} , sugerindo uma auto-regulação positiva. Os transcritos a partir de P2 são 8-10 vezes mais abundantes que os de P1 a 30°C, e quase 100 vezes mais, após 5 minutos a 42°C (Reisenauer *et al.*, 1996 e Wu & Newton, 1996). Os níveis da proteína, porém, aumentam apenas duas vezes no choque térmico, retornando rapidamente (após cerca de 10 minutos) aos níveis presentes a 30°C. Tanto a transcrição quanto os níveis da proteína não são regulados durante o ciclo celular. Tentativas de interromper o gene *rpoH* não tiveram sucesso, o que indica que seu produto é essencial à célula, mesmo em temperaturas normais.

O gene *hrcA* de *C. crescentus*, que codifica o provável repressor que se liga a CIRCE, é o primeiro gene de um operon com *grpE* (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*. Ambos são levemente induzidos por choque térmico, transitoriamente. Na linhagem LS2293 de *C. crescentus*, na qual o gene *hrcA* foi

interrompido, os níveis do transcrito de *groESL* estão aumentados em condições normais de temperatura e fusões de transcrição da região regulatória de *groEL* com o gene repórter *lacZ* também apresentam atividade aumentada a temperaturas normais, sendo ainda observado um aumento com o choque térmico. Mutações sítio-dirigidas no elemento CIRCE também elevaram a atividade de β -galactosidase na linhagem selvagem (Roberts *et al.*, 1996, Baldini *et al.*, 1998), além de ocasionarem a perda da regulação temporal do operon *groESL* e afetarem a transitoriedade da resposta ao choque térmico (Avedissian, 1996; este trabalho). De todos os genes que possuem o elemento CIRCE descritos na literatura, apenas o operon *groESL* de *Bordetella pertussis* apresenta também um promotor com consenso para σ^{32} (Fernandez & Weiss, 1995), baseado na análise da sequência da região 5' não-codificadora. Nenhum estudo de regulação da expressão de *groESL* foi realizado nesta bactéria, restando ainda a confirmação de que o promotor seja realmente transcrito por $E\sigma^{32}$.

Estes resultados sugerem que, o elemento CIRCE de *C. crescentus*, mais do que regular a indução por choque térmico, está envolvido com a regulação da transcrição durante o ciclo celular. Isso torna *C. crescentus* um modelo interessssante do estudo da regulação do choque térmico, já que tanto a regulação de *groESL* e *rpoH* apresentam características marcadamente distintas das estabelecidas para *E. coli* ou *B. subtilis*. A maior síntese de GroEL na fase do ciclo celular onde proteínas estão sendo endereçadas para os pólos específicos da célula pré-divisional e várias estruturas multiméricas estão sendo montadas apontam para um possível papel de GroEL nestes eventos.

3.4. Outras bactérias.

Das bactérias púrpuras do subgrupo α , *Agrobacterium tumefaciens*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Rhizobium meliloti* e *Rhizobium leguminosarum* são as espécies nas quais a regulação do choque térmico tem sido mais estudada. Em *A. tumefaciens*, o elemento CIRCE está presente apenas no operon *groESL*, e sua deleção diminui a meia-vida do transcrito deste operon em temperaturas normais, havendo ainda indução por choque térmico. Esse resultado indica que o promotor deve ser transcrito por

um fator de choque térmico ainda não determinado. Além disso, a clivagem do transcrito policistrônico em condições de choque térmico estabiliza o mRNA para *groEL* (Segal & Ron, 1993; Segal & Ron, 1996a). O operon *dnaKJ* apresenta um promotor diferente dos promotores ativados por σ^{70} ou σ^{32} de *E. coli* e o transcrito também é clivado entre *dnaK* e *dnaJ* (Segal & Ron, 1995).

Bradyrhizobium japonicum apresenta uma organização bastante complexa dos genes de choque térmico. Existem três genes que codificam proteínas homólogas a σ^{32} (Narberhaus *et al.*, 1997) e cinco operons *groESL*, dos quais três são induzidos por choque térmico. *groESL2*, *groESL4* e *groESL5* são expressos em todas as condições de crescimento analisadas. A expressão de *groESL1* só foi detectada em condições de choque térmico e sua transcrição ocorre a partir de um promotor reconhecido por σ^{32} (Babst *et al.*, 1996). O operon *groESL3* é induzido apenas em baixa concentração de oxigênio, em condições semelhantes ao crescimento de culturas microaerofílicas ou nos bacteróides que vivem nas células das raízes de plantas infectadas, sendo regulado pela proteína NifA em conjunto com $E\sigma^{54}$ (Fischer *et al.*, 1993). *groESL4* e *groESL5* apresentam o elemento CIRCE na região regulatória, sendo também induzidos por choque térmico. Dos genes codificando os diferentes fatores σ^{32} , apenas *rpoH2* é essencial, e sua maior expressão ocorre em temperaturas normais de crescimento, acreditando-se que a sua principal função seja manter os níveis de transcrição de *dnaKJ* nessas condições. Este alelo é transcrito por $E\sigma^{70}$ em condições normais, mas também apresenta um promotor semelhante aos reconhecidos por σ^E que é ativo a temperaturas extremas (48°C). O gene *rpoH1* é o segundo gene de um operon com *hspA*, sendo fortemente induzido por choque térmico e apresentando um promotor tipo σ^{70} e um elemento *cis* que funciona como regulador negativo em condições normais de crescimento (Narberhaus *et al.*, 1997). Este elemento, que consiste de cerca de 100 bp, foi denominado ROSE e também se encontra à frente do operon *hspBCdegP*, sendo considerado o provável sítio de ligação para uma proteína repressora (Narberhaus *et al.*, 1998). O terceiro gene faz parte do operon *ragABrpoH3* e sua região regulatória apresenta um consenso para promotores reconhecidos por σ^{32} . O gene *hrcA* também apresenta um

promotor tipo σ^{32} e mutantes para HrcA têm níveis elevados de expressão de *groESL₄* e *groESL₅* (Minder *et al.*, 1998).

Três genes homólogos a *groEL* foram identificados em *Rhizobium leguminosarum* e são denominados *cpn60-1*, *cpn60-2* e *cpn60-3*, sendo que dois deles formam operons com *cpn10* (*groES*). Todos apresentam elementos CIRCE e todos se mostraram essenciais, apesar de não se conhecerem as condições em que *cpn60-2* seria expresso. *cpn60-1* é o principal gene, e *cpn60-3* só é transcrito em condições microaerofílicas (Wallington & Lund, 1994; Maguire *et al.*, 1998). *Rhizobium meliloti* também apresenta múltiplos genes *groEL* (Rusanganwa & Gupta, 1993) e um deles, *groEL_C*, está envolvido com a nodulação e outro, *groEL_A*, está localizado no megaplasmídeo pSyma (Ogawa & Long, 1995).

A regulação dos operons *groE* e *dnaK* nos actinomicetos do gênero *Streptomyces* estudados é feita por dois repressores diferentes. Enquanto os operons *groES-groEL₁* e *groEL₂* de *S. coelicolor* apresentam o elemento CIRCE na região regulatória (Duchêne *et al.*, 1994), o operon *dnaK-grpE-dnaJ-hspR* é controlado negativamente pelo produto do gene *hspR*, que se liga à motivos repetidos na região a 5' de *dnaK* (Bucca *et al.*, 1995; Bucca *et al.*, 1997). A mesma organização é encontrada em *S. albus*, onde o gene *hrcA* forma um operon com uma segunda cópia de *dnaJ* e sua interrupção, apesar de aumentar os níveis de GroEL, não causa alterações na formação do micélio ou na esporulação (Granvalet *et al.*, 1998). A expressão da protease ClpP também está sob o controle de HspR em *S. albus* (Granvalet *et al.*, 1999).

Na bactéria Gram-positiva *Lactococcus lactis*, três operons apresentam o elemento CIRCE: *hrcA-grpE-dnaK*, *groESL* e *dnaJ*. Deleções na região C-terminal de DnaK elevam a expressão dos operons contendo CIRCE, mas não os níveis do mRNA da protease HflB, envolvida na regulação do choque térmico, cujo gene, *hflB*, não apresenta CIRCE (Koch *et al.*, 1998). Estes resultados indicam um sistema de regulação do sistema CIRCE/HrcA diferente do demonstrado para *B. subtilis*, onde apenas GroEL parece interferir na atividade de HrcA.

OBJETIVOS

O principal objetivo deste trabalho foi entender como a regulação do operon *groESL* se processa em *Caulobacter crescentus*, já que nesta bactéria dois sistemas distintos de controle de choque térmico foram encontrados pela primeira vez num mesmo promotor. A partir de introdução de mutações sítio-dirigidas na região regulatória, análise da expressão do operon quando há elevação do nível do fator σ^{32} na célula e na ausência da proteína HrcA, foi possível determinar o papel destes sistemas em diferentes condições de crescimento ou em diversas fases do ciclo celular.

A expressão diferencial do operon *groESL* em tipos celulares distintos nos leva a várias perguntas. Por que este operon apresenta regulação em condições normais de crescimento? Que características da célula pré-divisional requerem maior expressão de *groESL*? Finalmente, quais proteínas essenciais de *Caulobacter crescentus* são estritamente dependentes de GroES/GroEL para que possam atingir seu estado funcional? Na tentativa de começar a responder a estas perguntas, mutações no gene *groEL* foram obtidas, assim como se construiu uma linhagem onde se pode silenciar a expressão do operon *groESL*, a fim de se estudar os efeitos da ausência das duas proteínas codificadas por ele, GroES e GroEL.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Linhagens, fagos e plasmídeos.

As linhagens de *C. crescentus* e *E. coli* utilizadas estão listadas na Tabela 1 e os plasmídeos, na Tabela 2. Os fagos utilizados para sequenciamento ou mutagênese sítio-dirigida foram o M13mp18 e o M13mp19 (Messing, 1983).

TABELA 1. Linhagens utilizadas.

Linhagens	Características	Fonte ou referência
<i>Caulobacter crescentus</i>		
NA1000	sincronizável, derivada da CB15	Evinger & Agabian, 1977.
LS2293	NA1000 cujo locus <i>hrcA</i> (anteriormente <i>orfA</i>) foi rompido por recombinação homóloga de um plasmídeo contendo parte deste locus	Roberts <i>et al.</i> , 1996.
SG001 e SG009	NA1000 com duas cópias do operon <i>groESL</i> no cromossomo, sendo uma delas interrompida por um gene de resistência à espectinomicina	este trabalho
SG300	mutante condicional de <i>groESL</i>	este trabalho
<i>Escherichia coli</i>		
TG-1	<i>supE hsdΔ5 thi Δ(lac-proAB) F' [traD36 proAB⁺ lacI^q lacZΔM15]</i>	Gibson, 1984.
TG-2	<i>supE hsdΔ5 thi Δ(lac-proAB) Δ(srl-recA)306::Tn10(tet^r) F' [traD36 proAB⁺ lacI^q lacZΔM15]</i>	M. Biggin
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 pCJ195 (Cm^r)</i>	Kunkel <i>et al.</i> , 1987

TABELA 2. Plasmídeos utilizados.

Plasmídeo	Características	Fonte ou referência
Vetores de clonagem		
pUC19	replicon ColE1, Ap ^r	Stratagene
pBluescript KS	replicon ColE1, fagemido, Ap ^r	Stratagene
pUCBM21	replicon ColE1, Ap ^r	Böehringer Mannheim
pMR20	replicon IncP1, Tc ^r , mob ⁺ (~10 kb)	Roberts <i>et al.</i> , 1996
pRK290	replicon IncP1, Tc ^r , mob ⁺ (~23 kb)	Ditta <i>et al.</i> , 1980
Vetores de expressão em <i>E. coli</i>		
pPROEX-1	Vetor de expressão que adiciona 6 resíduos de histidina à extremidade N-terminal da proteína cuja sequência codificadora foi clonada	Gibco-BRL
pTrcHis-B	Vetor de expressão que adiciona 6 resíduos de histidina à extremidade N-terminal da proteína cuja sequência codificadora foi clonada	Invitrogen
Vetores de expressão em <i>C. crescentus</i>		
pAS21/pAS22	derivados do pBBR1, Cm ^r , com o promotor <i>xylX</i> de <i>C. crescentus</i> à frente de um sítio de clonagem múltipla, oriT	U. Jenal
Plasmídeos com genes repórteres		
placZ290	vetor de fusão de transcrição <i>lacZ</i> , Tc ^r , replicon IncP1, oriT	Gober & Shapiro, 1992
pJBZ280-1	vetor de fusão de tradução <i>lacZ</i> , replicon ColE1, Km ^r	

continuação da TABELA 2. Plasmídeos utilizados.

Plasmídeo	Características	Fonte ou referência
Outros plasmídeos		
pNPTS138	replicon ColE1, oriT, <i>npt</i> (Km ^r), <i>sacB</i>	D. Alley
pHP45Ω	derivado do pBR322, Ap ^r , cassete Ω (Sm ^r /Sp ^r)	Prentki & Krisch, 1984
pRR312-1	gene <i>hrcA</i> e parte de <i>grpE</i> de <i>C. crescentus</i> clonado no pMR20	Roberts <i>et al.</i> , 1996
pMA11	região regulatória de <i>groESL</i> de <i>C. crescentus</i> clonada no <i>placZ290</i>	Avedissian & Gomes, 1996.
pGR24	gene <i>dnaK</i> e parte de <i>dnaJ</i> de <i>C. crescentus</i> clonados no pBR322	Gomes <i>et al.</i> , 1990
pCS225	região regulatória de <i>xylX</i> de <i>C. crescentus</i> clonada no <i>placZ290</i>	Meisenzhals <i>et al.</i> , 1997
pUCgroESL	fragmento de 3 kb <i>XbaI</i> / <i>Bgl</i> III contendo todo o operon <i>groESL</i> e sua região regulatória clonado no pUCBM21 <i>XbaI</i> / <i>Bam</i> HI	este trabalho
pASrpoH	<i>rpoH</i> de <i>C. crescentus</i> clonado no pAS21, sob controle de seu próprio promotor	este trabalho

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). As linhagens TG-1 e TG-2 foram mantidas em placas com meio mínimo M9 (Na₂HPO₄ 6g/l; KH₂PO₄ 3g/l; NaCl 0,5 g/l; NH₄Cl 9 mM; ágar 1,5%; MgSO₄ 2 mM; CaCl₂ 100 mM; glicose 0,2 % e tiamina 10 ml/l). Para indução da expressão da proteína recombinante GroEL-His, foi utilizado meio TB (triptona 12 g/l; extrato de levedura 24 g/l; glicerol 0,4 %). Quando necessário, ampicilina (100 µg/ml), tetraciclina (12,5 µg/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 2 g/l; extrato de levedura 1 g/l; MgSO₄ 7H₂O 0,2 g/l; CaCl₂ 0,5 mM), acrescido ou não de

tetraciclina (2 µg/ml), ácido nalidíxico (20 µg/ml), espectinomicina (5 µg/ml), cloranfenicol (1 µg/ml) e/ou canamicina (25 µg/ml quando o gene de resistência era plasmidial, ou 5µg/ml quando localizado no cromossomo). Para experimentos de marcação de proteínas *in vivo* com ³⁵S - metionina, as culturas foram feitas em meio mínimo M2 (Na₂HPO₄ 18 mM; KH₂PO₄ 8mM; NH₄Cl 9 mM; FeSO₄ 10 µM; MgSO₄ 2 mM; CaCl₂ 0,5 mM; glicose 0,2 %) (Johnson & Ely, 1977), acrescido ou não de tetraciclina (2 µg/ml). Quando necessário, xilose 0,3 % foi adicionada (meio M2GX) ou foi utilizada em substituição à glicose (meio M2X).

Os meios sólidos continham 1,5% de ágar, o LB "soft" 0,7% e o PYE semi-sólido, 0,3%.

3. Oligonucleotídeos.

Os oligonucleotídeos foram sintetizados pela Gibco-BRL, Promicro ou utilizando-se o aparelho Oligo 1000 DNA Synthetizer (Beckman) e estão listados na Tabela 3.

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

Plasmídeos e formas replicativas dos fagos foram extraídos pelo método de lise alcalina (Birboim & Doly, 1979), segundo as modificações de Sambroock *et al.* (1989). A extração de DNA de fita simples para o sequenciamento também foi realizada de acordo com os métodos apresentados em Sambroock *et al.* (1989). O DNA total de *Caulobacter crescentus* foi extraído segundo o método descrito por Chen & Kuo (1993).

As enzimas de restrição utilizadas foram obtidas de New England Biolabs, Amersham e Boehringer-Mannheim, sendo utilizadas com os tampões fornecidos pelos fabricantes. A desfosforilação foi realizada com fosfatase alcalina de camarão, obtida de United States Biochemical (USB), assim como seu tampão.

Os fragmentos resultantes de digestão foram analisados por eletroforese em géis de agarose em tampão TBE (Tris 89 mM; ácido bórico 89 mM; EDTA 2mM pH 8) ou TAE (Tris-acetato 40 mM; EDTA 2 mM), 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% e as bandas foram cortadas e o DNA eletroeluído, conforme descrito em Sambroock *et al.* (1989). As ligações foram realizadas a 19°C, com T4 DNA ligase e tampão da New England

Tabela 3. Oligonucleotídeos utilizados no trabalho.

nome	sequência (5'→3')*	finalidade
ML3	CCAGCGTCGTTGTTCTCGAATGGAGC	mutagênese sítio-dirigida em CIRCE (pRB19)
LRC	GAATGGAGCGACAAATAACAGTCCCGC	mutagênese sítio-dirigida em CIRCE (pRB20)
LDR	GAATGGAGCGACAACAGTCCCGC	mutagênese sítio-dirigida em CIRCE (pRB22)
MH10	CGAGGGCCGGCGGGGACTCACCAGCG	mutagênese sítio-dirigida na região -10 de P2 de <i>groESL</i> (pRB23)
GP135	GAAGCGCTCCCCGCGAGCGCCCGAAAA	mutagênese sítio-dirigida na região -35 de P1 de <i>groESL</i> (pRB35)
GP136	GAAGCGCTCCCCGCGCCGCGCCCGAA	mutagênese sítio-dirigida na região -35 de P1 de <i>groESL</i> (pRB36)
PEgro	CATGATCTTCTCCGTCGG	ensaios de extensão de oligonucleotídeo
DG-54	TATGAATTTCGCGCGCGTCCTTGACT	introdução de sítio <i>Hind</i> III na região regulatória de <i>groESL</i> (deleção de P1)
BamHI	CTCGGCGCGCAGAGGATCCGCGAAGTC	introdução de um sítio <i>Bam</i> HI por mutagênese sítio-dirigida em <i>groEL</i>
G173	GTCGGCAACGAAGACGTCATCACCGTC	mutação Gly → Asp no resíduo 173 de GroEL
G191	CTCGACGTCGTCGGCGGCATGCAGTTC	mutação Glu → Gly no resíduo 191 de GroEL
G201	CGCGGCTACCTGTTCCCGTACTTCATC	mutação Ser → Phe no resíduo 201 de GroEL
G337	GTGGACGGCGTGGACGAGAAGGCCGAC	mutação Gly → Asp no resíduo 337 de GroEL
R1	TCGGCCAACGGCGACAAG	sequenciamento das mutações na região codificadora de <i>groEL</i>
groBam5'	AACGGATCCGACGGAGGAG	introdução de um sítio <i>Bam</i> HI a 5' de <i>groES</i> por PCR
groApa3'	TTGGGGCCCAGGGTCACC	amplificação de <i>groES</i> e ~500bp de <i>groEL</i> , em conjunto com groBam5'

* As bases em negrito correspondem aos nucleotídeos substituídos ou acrescentados por mutação ou PCR.

Biolabs, contendo 1 mM de ATP.

As reações de sequenciamento foram realizadas pelo método de incorporação de didesóxi-ribonucleotídeos (Sanger *et al.*, 1977), utilizando-se os kits "Sequenase Version 2.0 Sequencing Kit" (Amersham) e "Delta Taq Cycle Sequencing Kit" (Amersham).

5. Transformação.

As transformações foram realizadas de acordo com o procedimento de Mandel & Higa (1970) ou de Nishimura *et al.* (1990), tanto para formas replicativas dos fagos quanto para plasmídeos. Nas transformações de fagos M13 ou de sistemas de ligação com os plasmídeos pUC19, pUCBM21, pBluescriptKS, pMR20 ou pNPTS138, foram adicionados às placas de meio LB ou ao LB "soft" IPTG (30 µl de uma solução 100 mM) e X-gal (30 µl de uma solução 2 % em dimetilformamida).

6. Conjugação.

Os plasmídeos foram introduzidos na linhagem doadora S17-1 por transformação. A cepas receptora (diferentes linhagens de *C. crescentus*) e a doadora (S17-1 portadora de plasmídeo 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 tempo, 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 era codificada pelo plasmídeo (canamicina, tetraciclina ou cloranfenicol).

7. Sincronização de culturas *Caulobacter crescentus*.

O método utilizado foi o de Evinger & Agabian (1977), modificado por Dingwall *et al.* (1990). Células a partir de 500 ml de cultura ($DO_{600} = 0,9$) em meio M2 de *C. crescentus* NA1000 ou LS2293 foram centrifugadas a 7800 g por 10 minutos a 4°C e ressuspensas em cerca de 140 ml de sais M2 (Na_2HPO_4 18 mM, KH_2PO_4 8 mM, NH_4Cl 9 mM) e misturadas a 70 ml de Ludox LS (Aldrich). Após centrifugação em tubos Corex de 30 ml por 30 minutos a 10000g, a banda formada próxima ao fundo do tubo, composta por células móveis, foi retirada com uma pipeta Pasteur, transferida para outro tubo e lavada 4 vezes com sais M2 (centrifugações a 6000g, 5 minutos, 4°C). O precipitado final foi ressuspenso em meio M2, para uma $DO_{600} \sim 0,3$, mantido a temperatura ambiente por

alguns minutos para se evitar o choque térmico. A seguir, as células móveis foram incubadas a 30°C sob agitação, para o prosseguimento do ciclo celular. A cada 30 minutos, 1 ml de cultura foi transferido para um tubo de ensaio, adicionando-se ^{35}S -metionina (10-15 $\mu\text{Ci/ml}$) e incubando-se por 5 minutos, ao final dos quais a cultura foi transferida para um tubo de microcentrífuga contendo 10 μl de L-metionina 10 mM e centrifugada por 5 minutos a 4°C. Os precipitados de células foram congelados em gelo seco e mantidos a -20°C.

Células de cada ponto obtido foram lisadas e as proteínas marcadas foram imunoprecipitadas com os anticorpos apropriados para cada experimento, conforme descrito no item 10.

8. Obtenção de anticorpos.

8.1. GroEL.

O plasmídio recombinante pTrcHis-GroEL apresenta um fragmento de cerca de 1,7 kb, que compreende ~1 kb da região 3' codificadora do gene *groEL* e seu sinal de terminação. A clonagem foi realizada de maneira que a orientação e a fase de leitura fossem respeitadas. Assim, em condições de indução, a proteína expressa apresentaria cerca de 43 kb e resíduos de histidina na porção amino-terminal, que facilitariam sua posterior purificação por cromatografia de afinidade.

Para experimentos-piloto de purificação da proteína de fusão, 50 ml de meio TB foram inoculados com 4 ml uma cultura saturada (DO_{600} inicial = 0,1) e IPTG foi adicionado quando a DO_{600} atingiu 0,5 - 0,6 para uma concentração final de 1 mM. Após 3 horas de indução, a purificação foi realizada. Para a purificação da proteína em escala maior, 500 ml de cultura foram utilizados. Ao atingir a DO_{600} desejada, a cultura foi esfriada até cerca de 25°C, o IPTG foi adicionado e a incubação prosseguiu a 25°C, para se evitar a proteólise da proteína de fusão.

A metodologia de purificação foi baseada em Chataway & Barrit (1995). As células de 500 ml de cultura foram suspensas em 5 ml de tampão de lise (Tris-HCl 10 mM pH 7; NaCl 100 mM; imidazol 10 mM; PMSF 0,5 mM) e lisadas por sonicação. Foram aplicados 4 pulsos de 10 segundos, na potência 3 do sonicador Branson Sonifier 250. Os debris celulares foram descartados após centrifugação e o sobrenadante foi incubado por 1 hora sob agitação a 4°C com 1 ml de resina Ni-NTA (Gibco-BRL), previamente equilibrada em 30 volumes de tampão de lise sem PMSF. A suspensão foi centrifugada por 1 minuto e o sobrenadante foi descartado. A resina foi lavada 5 vezes com 7,5 ml de tampão de lise, por suspensão e centrifugação. Para se eluir a proteína

ligada à resina, esta foi incubada por 15 minutos, em gelo, com 1,5 ml de tampões contendo 25, 50, 75 e 100 mM de imidazol, além de Tris-HCl 10 mM pH 7, NaCl 100 mM e PMSF 0,5 mM. As frações foram analisadas por SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante em sistema descontínuo de pH; Laemli, 1970).

As frações eluídas com 50, 75 e 100 mM de imidazol foram misturadas e dializadas contra 1 litro de PBS (NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; Na₂HPO₄·7H₂O 4,3 mM; KH₂HPO₄ 1,4 mM) contendo PMSF por 4 horas a 4°C. O tampão foi trocado e a diálise foi repetida por cerca de 16 horas. Após esse tempo, a membrana de diálise foi envolvida em PEG 8000, para que o volume da solução em seu interior fosse diminuído. Uma posterior concentração foi realizada em Centricon 10, por centrifugação a 1 000 g por 1 hora, a 4°C.

A proteína GroEL-His obtida foi utilizada para imunizar um coelho fêmea de cerca de dois meses de idade. Dez dias antes da imunização, 6 ml de sangue foram retirados pela veia marginal da orelha, incubado a 37°C por 30 minutos e centrifugado 10 minutos a 2 500 rpm numa centrífuga de mesa, para a separação do coágulo. O soro pré-imune foi recolhido e congelado em alíquotas a -20°C.

A primeira injeção foi feita com cerca de 400 µg de proteína em 0,5 ml de tampão PBS adicionado de 0,5 ml de adjuvante de Freund completo (Sigma), subcutaneamente, nos gânglios linfáticos inguinais e em três pontos no dorso do animal. Após 20 dias, a imunização foi repetida nas mesmas condições, exceto pelo uso do adjuvante de Freund incompleto (Sigma). Cerca de 10 ml de sangue foram retirados após uma semana e tratados como descrito para o pré-imune. O soro obtido foi utilizado em ensaios de "Western blot" nas diluições 1:100, 1:200, 1:1000 contra extratos totais de *C. crescentus* NA1000 e *E. coli* portadora do plasmídeo pTrcHis B contendo parte do gene *groEL* (esta última apenas na diluição 1:100). Depois de passados doze dias, nova retirada de sangue foi realizada, obtendo-se cerca de 30 ml de soro, que foi testado nas diluições 1:1000, 1:2000 e 1:5000, contra extratos de *C. crescentus* NA1000, obtidos de culturas a 30 e 42°C. A capacidade deste soro imunoprecipitar a proteína GroEL de *C. crescentus* também foi analisada. Em todos os testes, o soro pré-imune foi utilizado na menor diluição, como controle. A diluição 1:5000 foi padronizada para uso em todos os experimentos subsequentes de "Western blot" e imunoprecipitação.

Para se obter uma maior quantidade do soro, uma nova injeção foi feita um mês após a segunda retirada de soro, apenas subcutaneamente, no dorso do coelho, sendo retirados cerca de 30 ml de sangue após duas semanas.

8.2. DnaK

Foi isolado um fragmento *XhoI/ClaI* de 2 kb do plasmídeo pGR24 (Gomes *et al.*, 1990) contendo cerca de 1800 bp do gene *dnaK*, correspondente à porção C-terminal de DnaK, clonado no vetor pBluescriptKS e reisolado como um fragmento *XhoI/HindIII*, clonado no vetor pPROEX-1 digerido com as mesmas enzimas. A partir de um clone obtido na linhagem TG-1, a expressão da proteína de fusão foi induzida pela adição de 0,6 mM de IPTG numa cultura em fase exponencial, sendo retiradas alíquotas de 1 ml em intervalos de 1, 2 e 3 horas de incubação a 37°C, sob agitação. Essas alíquotas foram centrifugadas, os precipitados suspensos em solução O (Laemli, 1970) e amostras aplicadas em SDS-PAGE, a fim de se confirmar a indução.

A purificação da proteína de fusão DnaK-His foi baseada em Chataway & Barrit (1995), com algumas modificações, a partir de uma cultura em 500 ml de meio LB. Após 2 horas da indução com 0,6 mM de IPTG, as células foram lisadas por sonicação, em 10 ml tampão de lise (Tris-HCl 10 mM pH 7, NaCl 100 mM, imidazol 10 mM) contendo benzamidina 25 mM e PMSF 1 mM. Foram aplicados 4-6 pulsos de 10 segundos, na potência 3 do sonicador Branson Sonifier 250. Para a remoção dos debris celulares, a suspensão foi centrifugada a 12000 g por 10 minutos.

O sobrenadante foi incubado com 1 ml de resina Ni-NTA (Gibco-BRL) previamente equilibrada em tampão de lise, por cerca de 1 hora, com agitação suave, a 4°C. Após a incubação, a resina foi lavada 5 vezes com 7,5 ml de tampão de lise contendo PMSF, com sucessivas centrifugações a 2000 g por 2 minutos, a 4°C. As eluições foram feitas com 25, 75, 100, 150 e 200 mM de imidazol, em 2 ml de tampão Tris-HCl 10 mM pH 6,5/ NaCl 100 mM/ PMSF 1 mM, sendo que a resina foi incubada com cada solução por 15 minutos, no gelo. Após análise em SDS-PAGE, as frações foram reunidas (exceto a de 25 mM de imidazol) e dializadas contra tampão fosfato-salina (PBS, NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; Na₂HPO₄·7H₂O 4,3 mM; KH₂HPO₄ 1,4 mM) contendo PMSF. Em seguida à diálise, a proteína foi concentrada em Centriprep10 até cerca de 1 ml, dosada pelo método de Bradford e analisada por SDS-PAGE.

A proteína DnaK-His, obtida segundo descrição acima, foi utilizada para imunizar um coelho fêmea de cerca de dois meses de idade. Três dias antes da imunização, 13 ml de sangue foram retirados pela veia marginal da orelha, incubado a 37°C por 30 minutos e centrifugado 10 minutos a 2 500 rpm numa centrífuga de mesa, para a separação do coágulo. O soro pré-imune foi recolhido e congelado em alíquotas a -20°C.

A primeira injeção foi feita com cerca de 500 µg de proteína em 0,5 ml de tampão PBS adicionado de 0,5 ml de adjuvante de Freund completo (Sigma), subcutaneamente, em quatro pontos no dorso do animal. Após 18 dias, a imunização foi repetida nas

mesmas condições, exceto pelo uso do adjuvante de Freund incompleto (Sigma). Cerca de 13 ml de sangue foram retirados após uma semana e tratados como descrito para o pré-imune. O soro obtido foi utilizado em ensaios de "Western blot" na diluição 1:8000, contra extratos totais de *C. crescentus* e em imunoprecipitações de extratos marcados com ^{35}S -metionina na diluição 1:2500.

8.3. HrcA.

O fragmento *Xba*I-*Sma*I (~1,3 kb) do pRR312-3 foi isolado e ligado ao pUCBM21 digerido com as enzimas *Xba*I e *Eco*RV. Esse fragmento continha 254 bp da região 3' não codificadora e 1123 bp do gene *hrcA*, sendo perdidos apenas os 9 últimos códons. O clone resultante foi digerido com as enzimas *Xho*I e *Hind*III. O sítio para a primeira encontra-se na região 3' codificadora de *hrcA*, e o sítio *Hind*III no sítio de clonagem múltipla do vetor. O fragmento resultante, agora com mais 30 códons deletados, foi ligado ao vetor de expressão pPROEX-1, de maneira que a fase de leitura fosse respeitada. A ligação foi utilizada para se transformar células de TG-1 competentes. Vários clones resistentes à ampicilina foram obtidos, sendo os plasmídios de 24 deles extraídos, digeridos com *Xho*I e *Hind*III e analisados por eletroforese em gel de agarose. Dezoito clones apresentaram o fragmento do tamanho esperado e três deles foram escolhidos para se testar a expressão da proteína recombinante.

Como a maior parte da proteína recombinante encontrava-se em corpos de inclusão, a purificação foi baseada em metodologia descrita por Marshak *et al.* (1996). A indução foi feita a 37°C com 0,6 mM de IPTG em 50 ml de LB. As células foram recolhidas por centrifugação e suspensas em 2 ml de tampão A (Tris-HCl 50 mM pH 8; EDTA 0,5 mM; NaCl 50 mM; glicerol 5%) contendo 150 µg/ml de PMSF e lisadas por sonicação, adicionando-se deoxicolato (DOC) a 2 % e mantendo-se a temperatura ambiente por 10 minutos. A suspensão foi centrifugada a 12000g por 15 minutos a 4°C, o sobrenadante foi recolhido e o precipitado novamente suspenso em tampão A + DOC, e o procedimento repetido. Aliquotas de 50 µl da suspensão foram separadas em 7 tubos de microcentrifuga, sendo centrifugados por 1 minuto. O sobrenadante foi descartado e os precipitados dissolvidos em tampão A com diferentes concentrações de sal de sódio N-lauril sarcosil (SKL, 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 e 0,6 %), mantendo-se os tubos a temperatura ambiente por 10 minutos, centrifugando-se novamente por 1 minuto. O precipitado foi descartado e, ao sobrenadante, foi adicionado igual volume de solução O 2x concentrada. As amostras foram analisadas por SDS-PAGE.

Depois de se determinar a melhor concentração de SKL para solubilizar a proteína de interesse, nova purificação foi realizada. Ao final, a preparação em tampão A + SKL

0,3 % foi diluída 10 vezes em tampão A, dializada 2 vezes contra 10 volumes de solução A a 4°C e concentrada até cerca de 2 ml em Centriprep 30 (Amicon). Os passos de diluição e diálise foram realizados com o objetivo de obter uma renaturação parcial da proteína com a retirada do SKL, objetivando-se um soro que reconhecesse a proteína HrcA em experimentos de imunoprecipitação.

A proteína recombinante HrcA-His foi inoculada no dorso de um coelho fêmea de 3 meses de idade, misturada ao mesmo volume de adjuvante de Freund completo (Sigma). Após um mês, novo inóculo foi realizado, com a proteína HrcA-His misturada ao adjuvante de Freund incompleto (Sigma). Amostras de sangue foram recolhidas uma semana antes do primeiro inóculo e após 11 e 25 dias do segundo, incubadas a 37°C e centrifugadas para a retirada do coágulo. O soro resultante foi testado em "Western blot" e imunoprecipitação, com extratos de *C. crescentus* NA1000 e LS2293, esta última como controle negativo, já que não apresenta o gene *hrcA* funcional.

Para a purificação do soro, o seguinte procedimento foi realizado: 20 ml de uma cultura da linhagem LS2293 ($DO_{600} = 1,1$) foram centrifugados a 7800 g por 10 minutos, a 4°C, o precipitado foi suspenso em 2 ml de TBS e as células foram lisadas por sonicação, com 8 pulsos de 10 segundos (Branson Sonifier 450, potência 3). O volume foi completado para 15 ml de TBS-T (Tris-HCl 10 mM pH 7,5; NaCl 150 mM, Tween 20 0,05 %) e a suspensão novamente centrifugada. Quatro filtros de nitrocelulose de 10 x 5 cm foram incubados dois a dois, sob agitação suave, com 7,5 ml do lisado por 30 minutos a temperatura ambiente e lavados 3 x 10 minutos com TBS-T. Os filtros foram incubados a seguir com TBS-leite 5% e lavados 3 x 10 minutos em TBS-T e secos sobre papel de filtro. Um dos filtros foi incubado durante a noite a 4°C com 10 ml do soro diluído 1:5 em TBS-T, retirado, e o soro incubado sequencialmente com os outros filtros, 30 minutos cada um, à temperatura ambiente sob agitação suave. O soro assim purificado foi aliquoteado e estocado a -20°C. Este soro foi utilizado na diluição 1:100 em experimentos de "Western blot" e imunoprecipitação.

9. Extração de proteínas, eletroforese e "Western blots".

Extratos protéicos de *C. crescentus* foram obtidos de 1 ml de cultura, acrescentando-se ácido tricloroacético para uma concentração final de 12,5 % e incubando-se os tubos no gelo por no mínimo 30 minutos. Após esse tempo, os tubos foram centrifugados a 12 000 g por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado lavado 2 vezes com 1 ml de acetona gelada, secos à vácuo e solubilizados em solução O (Laemli, 1970). Quando necessário, a concentração dos extratos foram

igualadas levando-se em conta o número de células da cultura inicial, inferido pela leitura da absorbância a 600 nm das culturas (DO_{600}).

A separação das proteínas por eletroforese foi realizada em géis de poliacrilamida desnaturantes em sistema descontínuo de pH (SDS-PAGE, Laemli, 1970) e a transferência para membranas de nitrocelulose foi realizada no sistema Novablot (Pharmacia). Após a transferência, as proteínas na membrana foram coradas com Ponceau S 0,1 % em ácido acético 10 % e descorado em água destilada. O filtro foi bloqueado por 20 - 30 minutos em TBS (Tris-HCl 10mM pH 8,0; NaCl 150 mM) contendo 5% de leite desnatado. A solução foi trocada e os anticorpos adicionados nas concentrações adequadas, sendo a membrana incubada por 1-2 horas à temperatura ambiente com agitação suave. Nos experimentos realizados com o anticorpo anti-HrcA, este foi adicionado à uma solução TBS-TT (Tris-HCl 10mM pH 8,0; NaCl 150 mM, Tween 20 0,03%, Triton X-100 0,02%), sem adição de leite. Após a incubação, as membranas foram lavadas por 5 minutos duas vezes em TBS-T (TBS contendo Tween 20 0,05%) e uma vez em TBS, procedendo-se então à incubação com o anticorpo secundário, conjugado com fosfatase alcalina ou peroxidase, seguida de nova lavagem como descrito acima. Quando os experimentos exigiam comparação entre diferentes géis, as membranas correspondentes foram processadas em conjunto.

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 10mM pH 9,0; NaCl 100 mM e $MgCl_2$ 5 mM. A revelação para o conjugado com peroxidase foi realizada por quimioluminescência, utilizando-se o kit ECL (Amersham), de acordo com as instruções do fabricante.

10. Imunoprecipitação de proteínas de *Caulobacter crescentus*.

Precipitados de células de *C. crescentus* marcadas *in vivo* com ^{35}S -metionina obtidos a partir de 1 ml de cultura foram suspensos com auxílio de um vórtex em 50 μ l de TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8) contendo 10 mg/ml de lisozima. A lise foi completada em 500 μ l de tampão de lavagem (Tris-HCl 50 mM; NaCl 450 mM; Triton X-100 0,5%) por 30 minutos em gelo. O DNA e restos não solubilizados foram descartados por centrifugação a 4°C por 30 minutos.

A fim de se contar a incorporação da ^{35}S -metionina em cada um dos tratamentos, 5 μ l de cada um foram aplicados em quadrados de papel Whatman 3MM, secos ao ar e precipitados por três lavagens de 10 minutos em TCA 10% no gelo, seguido por uma

lavagem em etanol 100%. Depois de secos, foram colocados em 1 ml de líquido de cintilação e contados no cintilador, num programa para ^{35}S .

Ao sobrenadante obtido, foram adicionados 50 μl de células de *Staphylococcus aureus* fixadas (Immuno-Precipitin, Gibco-BRL) e este foi incubado pelo menos 30 minutos a 4°C, sob agitação. Após esse tempo, os tubos foram centrifugados a 4°C por 15 minutos e volumes do sobrenadante correspondentes ao mesmo número de contagens por minuto (cpm) foram aliquoteados, completando-se o volume para 0,5 ml com tampão de lavagem.

Os anticorpos foram adicionados e os tubos incubados durante a noite a 4°C, sob agitação suave. O anticorpo policlonal anti-GroEL foi utilizado na diluição 1:5000, o anti-DnaK, 1:2500; o anti-HrcA 1:100; o anti-flagelinas (cedido por L. Shapiro), 1:1000 e o anti- β -galactosidase (Sigma), 1:1000. Para se recolher os complexos proteína-anticorpo formados, realizou-se nova incubação com Staph A. Após centrifugação, os precipitados foram lavados três vezes em tampão de lavagem. Finalmente, os precipitados foram suspensos em solução O, fervidos por 3 minutos, centrifugados a temperatura ambiente por 5 minutos, acrescidos de 1 μl de DTT 1M e o sobrenadante foi aplicado num gel de poliacrilamida desnaturante.

Terminada a eletroforese, o gel foi fixado por 30 minutos em solução contendo 30% de etanol e 7% de ácido acético e incubado por mais 30 minutos em Amplify (Amersham). O gel foi colocado sobre papel de filtro e seco sob vácuo a 70°C por 1 hora. Após exposição a um filme de raio-X a -70°C com tela intensificadora, as bandas foram reveladas.

11. Eletroforese bidimensional de proteínas.

Culturas a 30°C ou após 10 minutos a 42°C das linhagem NA1000 e LS2293 foram incubadas com ^{35}S -metionina (10 $\mu\text{Ci/ml}$) por 5 minutos, para que as proteínas sintetizadas fossem marcadas radioativamente. As proteínas foram extraídas como descrito no item 5, porém foram diluídas em solução de amostra (uréia 9 M; 2-mercaptoetanol 280 mM; Pharmalyte 3-10 0,2 %; Triton X-100 0,5% e azul de bromofenol em 25 ml de solução).

Foram utilizados géis pré-montados (Immobiline DryStrip 3-10 e ExcelGel SDS 8-18 %, Pharmacia Biotech). Os géis de primeira dimensão foram reidratados durante a noite em solução de reidratação (uréia 8M; Pharmalyte 3-10 0,2 %; Triton X-100 0,5%; DTT 2 mg/ml). Cada amostra (5×10^6 cpm) foi aplicada em um gel DryStrip e a eletroforese foi realizada no sistema Multiphor com o kit Immobililine DryStrip e fonte

EPS3500XL (Pharmacia Biotech), a 20°C, no modo de programação “gradiente”, em quatro fases (Tabela 4).

TABELA 4. Condições de eletroforese para a primeira dimensão (eletrofocalização).

Fase	Voltagem	Corrente (mA)	Potência (W)	Tempo (h)	Vh
1	300	1	5	0,01	1
2	300	1	5	4,5	1350
3	2000	1	5	5	5750
4	2000	1	5	6,5	13000
Total				16	20100

Após a corrida, o sistema foi desmontado e os géis equilibrados por 10 minutos em solução de equilíbrio I (Tris-HCl 50 mM pH 6,8; uréia 6 M, glicerol 0,3 %; SDS 0,2%, DTT 5 mg/ml) e 10 minutos em solução de equilíbrio II (Tris-HCl 50 mM pH 6,8; uréia 6 M, glicerol 0,3 %; SDS 0,2%, iodoacetamida 45 mg/ml). Foi montada então a corrida de segunda dimensão, colocando-se dois géis de primeira dimensão sobre um gel ExcelGel SDS 8-18 %, utilizando-se como marcador de peso molecular proteínas marcadas com ^{14}C (Amersham) num quadrado de papel de filtro. A eletroforese foi iniciada a 15°C, com 600V, 20 mA, 30 W por 25 minutos e os géis de primeira dimensão foram retirados. A seguir, foram aplicados 600 V, 50 mA e 30 W por 4 minutos, o “buffer strip” foi movido e a eletroforese foi continuada nas mesmas condições, por cerca de 1 hora e 10 minutos.

O gel foi incubado por 30 minutos em fixador (ácido acético 10%, etanol 40%), 30 minutos em Amplify (Amersham), e 20 minutos em glicerol 10%, seco sob vácuo, a 80°C por 30 minutos e exposto a filme de raio-X a -70°C com tela intensificadora.

12. Mutagênese sítio-dirigida.

A construção dos mutantes do promotor do operon *groESL* foi baseada na metodologia de Kunkel *et al.* (1987). Foi utilizado como fita-molde o DNA fita simples do fago M13mp19, no qual havia sido previamente clonado um fragmento contendo 324 pb a 5' do início de tradução do operon *groESL* de *C. crescentus*, denominado M13-MA11 (Avedissian & Gomes, 1996). As mutações na região codificadora de *groEL* foram realizadas num fragmento de cerca de 1,5 kb *Apal/EcoRI* contendo a porção 3' do operon, clonado no M13mp18.

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 M13 contendo o fragmento a ser mutagenizado foi centrifugada a 27 000 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 20% / acetato de amônio 3,5 M, sendo mantido em gelo por, no mínimo, 30 minutos. Os fagos precipitados foram recolhidos por centrifugação a 37 000 g por 30 minutos, sendo o precipitado diluído em 300 µl 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 µl foi utilizado para infectar 50 ml de uma cultura da linhagem CJ236 (DO₆₀₀ entre 0,2 e 0,3). Após 8 horas de crescimento em meio LB acrescido de 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 precipitado com 2,5 volumes de etanol 100% 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 em vácuo e dissolvido em 100 µl de TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM). Foram utilizados 5 µl para cada reação de mutagênese. Alternativamente à este protocolo, foi seguido o descrito em Sambrook *et al* (1989).

Os oligonucleotídeos utilizados, sintetizados por 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 anelamento (Tris-HCl 20 mM pH 8,0; MgCl₂ 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; MgCl₂ 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. O sistema foi incubado a 37°C por pelo menos 90 minutos. Após este tempo, foram adicionados 90 µl de TE e de 2 a 10 µl foram utilizados para transformar bactérias TG-1 ou TG-2 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. De 3 a 18 clones foram sequenciados para cada mutação.

Mutações duplas foram realizadas isolando-se o DNA de fita simples de um clone de M13 cujo inserto já continha uma mutação e realizando-se nova reação de mutagenese com outro "primer".

13. Construção das fusões de transcrição e tradução.

Os fragmentos de DNA correspondentes às mutações na região regulatória de *groESL* foram isolados da forma replicativa do fago M13mp19 por digestão com as enzimas *EcoRI* e *HindIII* e ligados a um vetor de clonagem ou diretamente ao *placZ290*. Neste plasmídeo, o fragmento clonado funciona como promotor para o gene repórter *lacZ*. Para a obtenção da região regulatória com o promotor P1 deletado e mutações em P2 ou CIRCE, os fragmentos com as mutações pontuais no vetor de clonagem pUC19 foram utilizados como molde para reações de PCR, utilizando-se como iniciadores os oligonucleotídeos DG-54 e o "primer" universal reverso, que hibrida com sequências do vetor. A reação de PCR foi feita com a enzima Taq polimerase (Cenbiot) em tampão obtido da Perkin-Elmer, na presença de $MgCl_2$ 4 mM e 0,2 mM de cada dNTP. As condições foram: 94°C/ 3 minutos; 35 ciclos de 94°C/ 1 min, 55°C/ 3 min e 72°C/ 1 min, ao final dos quais a reação foi mantida a 72°C/ 6 minutos. O produto foi isolado de gel de poliacrilamida 8%, eletroeluído, purificado, digerido com *EcoRI* e *HindIII* e ligado ao pUC19 ou pBluescriptKS digeridos com as mesmas enzimas. Os fragmentos obtidos foram clonados no *placZ290*.

O plasmídeo pJBZ280 foi utilizado para a construção das fusões de tradução com os promotores do operon *groESL* mutagenizados. Este plasmídeo contém um sítio de clonagem múltipla à frente do gene repórter *lacZ* sem promotor e sem sequências de ligação ao ribossomo. Portanto, tanto a transcrição quanto a tradução deste gene serão regidas pelo fragmento clonado, diferentemente do *placZ290*, que apresenta sítio de ligação ao ribossomo.

Os fragmentos da região regulatória contendo as mutações pontuais com extremidades *EcoRI* / *HindIII* foram ligados ao pJBZ280 digerido com as mesmas enzimas e os sistemas de ligação foram utilizados para se transformar *E. coli* TG-1 competentes. Após seleção em meio contendo tetraciclina, as colônias obtidas foram transferidas para filtros de nitrocelulose. A presença dos fragmentos clonados foi confirmada através da hibridação.

Como o pJBZ280 não se mantém em *C. crescentus*, os plasmídios obtidos foram digeridos com *EcoRI* e ligados ao pRK290 digerido com a mesma enzima e desfosforilado. A seleção dos transformantes em *E. coli* S17-1 foi feita em meio contendo tetraciclina e canamicina. As colônias resistentes aos dois antibióticos foram utilizadas em conjugações com as linhagens NA1000 e LS2293. A atividade de β -galactosidase foi medida a 30 e 40°C, conforme descrito abaixo.

Para se realizar o ensaio de atividade da enzima β -galactosidase, culturas saturadas de *C. crescentus* foram diluídas até $DO_{600} = 0,1$ e incubadas sob agitação a 30°C por 4-5 horas. Ao final desse tempo, as culturas foram divididas em duas, sendo incubadas a 40°C e 30°C por mais uma hora. O ensaio foi realizado com 50 μ l de cultura por 5 minutos, segundo Miller (1972). Os resultados foram expressos em unidades de atividade de β -galactosidase (unidades Miller), sendo corrigidos pela DO_{600} das culturas pela fórmula:

$$\text{Atividade} = \frac{1000 \times DO_{420}}{V \times t \times DO_{600}}$$

onde DO_{420} = leitura da absorbância a 420 nm do ensaio

DO_{600} = leitura da absorbância a 600 nm da cultura

V = volume de cultura utilizado (ml)

t = tempo de incubação com o substrato (minutos)

Foram realizados pelo menos dois ensaios para cada construção.

14. Marcação de sondas e hibridação.

Como alguns dos plasmídeos utilizados neste trabalho não possuem um sistema direto de seleção de clones contendo inserto, as colônias obtidas das transformações foram transferidas para membranas e seu DNA hibridado com sondas apropriadas. Os clones obtidos das transformações foram inoculados em filtros de náilon colocados sobre placas contendo meio LB sólido com os antibióticos necessários e incubados por 5-16 horas a 37°C. Os filtros foram tratados com SDS 10 % por 3 minutos, solução de desnaturação (NaOH 0,5 M; NaCl 1,5 M) por 5 minutos, solução de neutralização (Tris-HCl 1M pH 7,5; NaCl 1,5 M) por 5 minutos e SSC 2x (NaCl 0,3 M; citrato trissódico 0,03 M) por 2 minutos. O DNA foi fixado no filtro por exposição à luz ultravioleta (UV) por 6 minutos.

Para a transferência de DNA de géis de agarose para membranas de náilon, estes foram tratados por 15 minutos em solução de depurinação (HCl 0,15 N), 30 minutos em solução de desnaturação e 30 minutos em solução de neutralização, sendo a transferência realizada com SSC 10x (citrato de sódio 0,15 M; NaCl 1,5 M) por 1 hora no sistema Posiblot (Stratagene). Após a transferência, as membranas foram lavadas brevemente em SSC 2x, secas ao ar e o DNA fixado por exposição à UV.

A pré-hibridação das membranas foi realizada em solução contendo SSC 5 x, EDTA 100 mM, tampão fosfato de potássio 60 mM pH 6,2, formamida 30 % e leite desnatado 5 %, a 37°C-42°C por, no mínimo, 1 hora. A hibridação foi feita na mesma solução, contendo a sonda, por 14-16 horas, a 37°C-42°C. As membranas foram lavadas a 37°C em 2 x SSC; 0,1x SDS/ 15 minutos; 1 x SSC; 0,1x SDS/ 15 minutos e 0,1 x SSC; 0,1 %/ 30 minutos. Em alguns experimentos, essas soluções foram substituídas pela QuickHyb (Stratagene), que permitiu diminuir o tempo de hibridação para cerca de 1 hora a 50-60°C. A temperatura de lavagem também foi aumentada.

Para a obtenção de sondas radioativas, cerca de 50 ng dos fragmentos de DNA foram marcados por "random priming". Cerca de 10 ng do hexanucleotídeo pd(N)₆ foi adicionado ao fragmento e a mistura foi colocada em banho fervente por 2 minutos, sendo rapidamente esfriada em gelo. A reação de marcação foi feita em 30 µl de tampão NT (Tris-HCl 50 mM pH 7, 2; MgCl₂ 100 mM; DTT 1 mM), contendo dGTP 25 µM, dTTP 25 µM, [α -³²P] dCTP 50µCi, [α -³²P] dATP 50µCi, BSA acetilada 0,3 mg/ml e 1 unidade da enzima Klenow, por 3 horas a 37°C. A reação foi parada com 90 µl de STE, 2 µl de SDS 10% e 2 µl de EDTA 0,25 M. Os nucleotídeos não incorporados foram retirados por filtração em gel, numa coluna com 0,9 ml de Sephadex G-50, previamente equilibrada com TE. 1 µl da solução foi aplicada em papel 3MM e seca ao ar, sendo utilizada para se determinar a incorporação dos nucleotídeos radioativos num contador de cintilação, pelo método Cerenkov.

15. Ensaios de extensão de oligonucleotídeo.

15.1. Obtenção do mRNA de *Caulobacter crescentus*.

Para a obtenção do RNA total de *C. crescentus*, 10 a 12 ml de culturas em meio PYE com DO₆₀₀ entre 0,7 e 1 foram centrifugadas a 7800 g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células congeladas em banho de gelo seco/etanol e armazenadas a -70°C ou lisadas imediatamente em 1 ml de acetato de sódio 20 mM, EDTA 1 mM e SDS 0,4 % (a solução foi previamente tratada com dietilpirocarbonato 0,01% e autoclavada). Foi adicionado 1 ml de fenol equilibrado em acetato de sódio 20

mM, EDTA 1 mM a 65°C e as células foram suspensas e lisadas com o auxílio de um vórtex, incubando-se à mesma temperatura por 15 minutos. A fase aquosa foi separada por centrifugação a 7800 g e dividida em dois tubos de microcentrífuga. A cada tubo, o mesmo volume do fenol a 65°C foi acrescentado, a mistura agitada e incubada novamente por 15 minutos a 65°C. Os tubos foram centrifugados a 12000 g por 5 minutos, repetindo-se a operação. Finalmente, a fase aquosa foi extraída com o mesmo volume de clorofórmio, acrescentou-se 0,1 volume de acetato de sódio 3M pH 5,4 tratado com DEPC (dietilpirocarbonato) e dois volumes de etanol 100%. Após incubação por 15 minutos em gelo seco, ou a -20°C durante a noite, os tubos foram centrifugados a 12000 g por 15 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado em etanol 70%, seco e armazenado a -70°C ou solubilizado em 30-50 µl de água milli-Q tratada com DEPC. O rendimento foi de cerca de 100 µg de RNA para cada 12 ml de cultura.

A concentração do RNA foi estimada por medida da absorbância a 260 nm e sua integridade foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão MOPS 20 mM pH 7,0; acetato de sódio 5 mM; EDTA 0,1 mM contendo 3,5 % de formaldeído. Antes de serem aplicadas no gel, as amostras de RNA foram misturadas a 3 volumes de tampão contendo MOPS 20 mM pH 7,0; acetato de sódio 5 mM; EDTA 0,1 mM, formamida 50%, formaldeído 3,5%, brometo de etídeo 1 mg/ml e azul de bromofenol.

15.2. Reação de extensão e análise dos produtos.

Para a reação de extensão, o oligonucleotídeo PEgro foi marcado na extremidade 5' com [³²P] γ-ATP, na presença da enzima T4 polinucleotídeo quinase. Cerca de 1-1,6 x 10⁶ cpm do oligonucleotídeo foi adicionado a 50 µg de RNA, sendo a mistura precipitada com 0,1 volume (v) de acetato de sódio 3M pH 5,4 e 2 v de etanol. O precipitado obtido foi solubilizado em 250 µl de tampão de hibridação (Pipes 8 mM pH 6,4; EDTA 0,2 mM; NaCl 80 mM; formamida 80%), submetido a fervura por 10 minutos e incubado a 40°C durante a noite, para promover o anelamento. Após a incubação, as amostras foram novamente precipitadas pela adição de etanol, e solubilizadas em H₂O. A fita de cDNA foi sintetizada pela transcriptase reversa de MMLV (USB), em tampão fornecido pelo fabricante contendo 1 mM de cada dNTP e 40u de inibidor de ribonucleases (RNasin, Promega), a 37°C por 90 minutos. A reação foi inibida pela adição de 2 mM de EDTA e o RNA foi degradado por incubação com 23 µg/ml de RNase A, a 37°C por 30 minutos. O cDNA foi purificado por uma extração com volume igual de fenol:clorofórmio, precipitado com acetato de sódio/etanol, solubilizado em 2 µl de água e acrescido de 4 µl de formamida contendo 1mM de EDTA, 0,1% de azul de bromofenol e 0,1% de xileno cianol. As amostras foram fervidas por 3 minutos em banho-maria e aplicadas em gel de

policrilamida-uréia, assim como uma reação de sequência obtida com DNA com a sequência da região 3' do operon *groESL* e o oligonucleotídeo PEgro.

16. Construção de linhagens de *Caulobacter crescentus* com o gene *groEL* interrompido.

A estratégia utilizada baseou-se na substituição do gene *groEL* cromossômico por uma cópia interrompida por um fragmento de DNA codificando para resistência a antibiótico, para que a seleção fosse possível. Tratando-se de um gene potencialmente essencial, a célula somente seria viável se contivesse pelo menos uma cópia funcional do gene em questão, sendo a substituição do gene cromossômico realizada em duas fases. Para tanto, foram necessários dois eventos de recombinação: no primeiro, um plasmídio incapaz de se manter autonomamente na célula e contendo todo o operon *groESL*, com o gene de resistência a espectinomicina interrompendo *groEL* foi transferido por conjugação à linhagem NA1000, selecionando-se a recombinação homóloga. O vetor utilizado também contém o gene *sacB*, cujo produto converte a sacarose do meio num produto tóxico para a célula. Portanto, as células que sofressem o segundo evento de recombinação seriam selecionadas pela resistência à sacarose. Assim, restaria no cromossomo apenas a cópia interrompida, sendo expulsas também as sequências plasmidiais. Porém se o gene se mostrasse essencial, a célula seria inviável, necessitando a complementação por uma cópia presente em outro plasmídio, com replicação autônoma, transferido para a célula entre os dois eventos de recombinação. Um esquema do esperado encontra-se nas Figuras 15 e 16. A seguir, estão descritos os detalhes para a obtenção das construções.

16.1. Clonagem de um gene de resistência a espectinomicina interrompendo a região codificadora de *groEL* num plasmídio.

Para a interrupção do gene *groEL* pelo fragmento contendo o gene de resistência a espectinomicina foi necessária a criação de um sítio *Bam*HI em seu interior, por mutagênese sítio dirigida, de acordo com a metodologia de Kunkel *et al.* (1987), descrita no item 12. Um fragmento de 3 kb contendo os genes *groES*, *groEL* e cerca de 1 kb da região 5' não codificadora foi clonado no M13mp18. A linhagem CJ236 foi infectada com fagos contendo essa construção, isolando-se DNA de fita simples contendo uracilas, que foi utilizado como molde para a T4 polimerase, tendo como "primer" o oligonucleotídeo *Bam*HI (Tabela 3). Após transformação de TG-2, os fagos isolados das placas de lise tiveram seu rfdNA extraído, digerido com *Bam*HI e analisados por eletroforese em gel de agarose.

Um clone contendo a mutação de interesse (sítio *Bam*HI) foi digerido com *Eco*RI e *Hind*III, o fragmento foi isolado e ligado ao pNPTS138. O plasmídeo obtido foi linearizado com *Bam*HI e o cassete Ω , isolado do pHP45 Ω , foi ligado, interrompendo a região codificadora de *groEL*, originando o pNPT*groEL::Sp*, que foi transferido para a linhagem de *E. coli* S17-1.

16.2. Obtenção das linhagens *groEL::Sp*^r.

O plasmídeo pNPT*groEL::Sp* foi transferido por conjugação para a linhagem NA1000. Para mapear o local de integração, DNAs genômicos de 10 clones Km^r foram isolados, digeridos separadamente com *Eco*RI e *Eco*RV e analisados por Southern blot, utilizando-se como sondas um fragmento de 600 bp de *groEL* ou o pNPTS138 marcados radioativamente. Dois clones que apresentaram o padrão esperado, denominados SG001 e SG009, foram escolhidos para dar continuidade ao trabalho, sendo conjugados com uma linhagem de S17-1 portadora do plasmídeo pGro. Este plasmídeo foi obtido da ligação de um fragmento contendo todo o operon *groESL* e sua região regulatória ao vetor pMR20 (Tc^r), funcional em *C. crescentus*. Nas etapas de clonagem, o sítio *Bgl*III a 3' do operon foi perdido.

As linhagens SG001, SG001/pGro, SG009 e SG009/pGro foram inoculadas em meio PYE líquido sem qualquer antibiótico e foram incubadas durante a noite, a 30°C, para favorecer um segundo evento de recombinação homóloga. Aliquotas de 50 μ l foram retiradas e plaqueadas em meio PYE contendo sacarose 3% e espectinomicina. Das colônias obtidas, cerca de 50 foram repicadas em meio contendo sacarose e espectinomicina, ou sacarose, espectinomicina e canamicina. Doze clones Sp^r, Km^s e *sacB*^r tiveram seu DNA genômico extraído, digerido com *Bgl*III e *Xba*I e analisados por Southern blot, utilizando-se como sonda um fragmento de 1,5 kb do gene *groEL*, o pNPTS138 ou um fragmento contendo o cassete Ω (Sp^r) marcados radioativamente.

17. Construção da linhagem com *groEL* sob controle do promotor P_{xyLX}.

17.1. Construção do plasmídeo pRB55.

Novamente, o pNPTS138 foi utilizado como vetor para introduzir sequências de DNA no cromossomo de *Caulobacter*, por eventos de recombinação homóloga. Foi utilizado parte do operon *groELS* com sua região regulatória substituída pelo promotor P_{xyLX} flanqueado por um gene de resistência à espectinomocina como marca de seleção. Vários passos de clonagem foram necessários, descritos a seguir. Um esquema da construção obtida, denominada pRB55, está representado na Figura 17 de Resultados.

Inicialmente, o gene *groES* e parte de *groEL* foram clonados à frente do promotor P_{xyIX} no plasmídeo pAS21 (Meisenzahal *et al.*, 1997). Para tanto, foi necessária a introdução de um sítio *Bam*HI à frente de *groES* por reação de PCR, deletando-se assim a região regulatória. Os oligonucleotídeos utilizados foram *groBam*HI 5' e *groApa*I 3' (Tabela 3), este último contendo um sítio de *Apa*I presente na região codificadora de *groEL*. A reação foi feita tendo como molde o pUC*groESL* linearizado com *Xba*I, com 30 ciclos de 94°C/1 min, 42°C/2 min e 72°C/3min, concluindo-se com incubação a 72°C por 7 minutos. O produto obtido, um fragmento de cerca de 0,5 kb, contendo todo o gene *groES* e uma porção 3' de *groEL*, foi isolado de gel de agarose, digerido com *Bam*HI e *Apa*I e ligado ao pBluescriptKS, originando o pRB50.

O fragmento foi novamente isolado por digestão com as mesmas enzimas e ligado ao pAS21 digerido com *Bam*HI e *Eco*RI, juntamente com um fragmento *Apa*I/*Eco*RI contendo a porção 3' de *groEL*. Assim, obteve-se um plasmídeo contendo toda a região codificadora de *groES* e *groEL*, que seria usado em experimentos posteriores de superexpressão desses genes, denominado pAS*groESL*. Este plasmídeo foi digerido com *Nco*I, liberando um fragmento de 1,3 kb que consistia do promotor P_{xyIX} e cerca de 0,9 kb de *groESL*. O fragmento foi ligado ao pUCBM20 digerido com *Nco*I, resultando no pRB51.

A região a 5' da região regulatória de *groESL* foi isolada do pUC*groESL* como um fragmento *Xba*I/*Sma*I de 0,7 kb e ligada ao pBluescript SK digerido com as mesmas enzimas. O plasmídeo resultante, pRB52, foi linearizado com *Hind*III a 3' do inserto, onde foi ligado o cassete Ω do pHP45 Ω contendo o gene de resistência à espectinomicina, originando o pRB53. Um fragmento de cerca de 1 kb *Eco*RV/*Apa*I (P_{xyIX} e cerca de 0,5 kb de *groESL*) do pRB51 foi ligado ao pRB53 digerido com *Hinc*II/*Apa*I, originando o pRB54. Finalmente, este plasmídeo continha clonada toda a região que seria substituída do cromossomo de *C. crescentus*: um fragmento a 5' da região regulatória de *groESL* para um dos eventos de recombinação homóloga, uma marca de seleção (Sp^r), o promotor P_{xyIX} e a região a 3' da região regulatória de *groESL*, para o outro evento de recombinação. Bastava agora transferi-lo para o vetor pNPTS138, o que foi feito com as enzimas *Eag*I/*Apa*I, resultando no pRB55 (Figura 17).

17.2. Obtenção da linhagem SG300 por recombinação homóloga.

O pRB55 foi transferido por conjugação para a linhagem NA1000, selecionando-se os recombinantes em meio PYE com ácido nalidíxico, canamicina e espectinomicina. As 22 colônias obtidas foram inoculadas em meio M2X com canamicina. Este meio foi utilizado pois os clones que pudessem ter sofrido recombinação entre o P_{xyIX} do pRB55 e

do cromossomo não seriam capazes de utilizar xilose como única fonte de carbono e seriam contra-selecionados. Todos os clones cresceram e tiveram o DNA genômico extraído, digerido com *SphI* e analisado por Southern blot tendo como sonda o pNPTS138 e um fragmento contendo o P_{xyLX} . Todos os clones apresentaram o mesmo perfil, e dois deles também tiveram seu DNA digerido separadamente com *ApaI* ou *SacI* e analisados por Southern blot, confirmando-se que o primeiro evento de recombinação homóloga ocorreu entre as regiões correspondentes ao fragmento *XbaI/SmaI* a 5' da região regulatória de *groESL* do pRB55 e o operon cromossômico.

Dois clones foram incubados a 30°C em PYE líquido com xilose 0,3 % e espectinomicina por 3 dias, para favorecer o segundo evento de recombinação, que espulsaria as sequências do pNPTS138 e a região regulatória de *groESL*, substituindo-a pelo promotor P_{xyLX} e pela marca de resistência à espectinomicina. Aliquotas foram semeadas em placas de meio PYE contendo 3% de sacarose, 0,3% de xilose e espectinomicina. Após três dias, cerca de 100 colônias de cada clone foram repicadas em placas de PYE com xilose e espectinomicina e em duplicata, em PYE com canamicina, xilose e espectinomicina. Doze colônias resistentes à sacarose e sensíveis à canamicina foram inoculadas em M2X e tiveram seu DNA extraído, digerido com *SacII* e analisado por Southern blot com sonda correspondente a *groES* e parte de *groEL*. Dois clones apresentaram uma banda de cerca de 4 kb, que seria esperada de um segundo evento de recombinação, e foram denominados SG300-8 e SG300-10. Por serem idênticos, serão referidos apenas como SG300.

17.3. Análise do fenótipo das linhagens SG300-8 e SG-300-10.

As duas linhagens foram incubadas em 10 ml de meio PYE contendo xilose a 30°C durante a noite, as culturas foram centrifugadas a 7800 g, as células lavadas em 20 ml de sais M2 (Na_2HPO_4 18 mM; KH_2PO_4 8mM; NH_4Cl 9 mM), centrifugadas novamente e suspensas em 10 ml de sais M2. A suspensão foi utilizada para se inocular 50 ml de meio M2X ou M2, a uma $\text{DO} = 0,02$. As culturas foram então incubadas a 30°C sob agitação por 30 horas. A intervalos de tempo, foram retiradas amostras para a medida da absorbância a 600 nm, para a extração de proteínas e para observação em microscopia de contraste de fase. Além disso, amostras foram diluídas e plaqueadas em duplicata em meio PYE com xilose. Células foram fixadas em lâminas de microscopia por calor e coradas com safranina 1%, para visualização da morfologia.

A curva de crescimento também foi realizada de maneira análoga em meio rico PYE, acrescido ou não de xilose.

17.4. Análise da atividade do promotor de *groESL* na linhagem SG300.

Os plasmídeos pMA11 e pRB21, correspondentes às fusões de transcrição da região regulatória de *groESL* com o gene repórter *lacZ* (Figura 3) foram transferidos para a linhagem SG300-10 por conjugação.

Cuturas em fase estacionária em meio M2X e tetraciclina foram lavadas em sais M2 e as células foram suspensas em meio M2X ou M2 com glicose e incubadas a 30°C. Em intervalos de uma hora, uma alíquota de 1 ml de cada cultura foi incubada por 5 minutos com ³⁵S-metionina e as células foram recolhidas por centrifugação e congeladas. Os extratos protéicos dessas células foram imunoprecipitados com soros anti-β-galactosidase e anti-GroEL e analisados por SDS-PAGE e fluorografia.

18. Introdução de mutações na região codificadora de *groEL*.

Inicialmente, foi utilizado como molde para as reações de mutagênese sítio-dirigida o M13mp18 no qual foi clonado um fragmento de 3 kb contendo todo o operon *groESL* e cerca de 1 kb da região 5' não-codificadora, porém várias dificuldades foram encontradas, provavelmente devido ao tamanho do fragmento clonado. Portanto, outro clone contendo apenas a porção 3' de *groEL* (fragmento *ApaI/BglIII* de 1,5 kb) foi utilizado.

Os oligonucleotídeos utilizados e as mutações esperadas estão relacionados na Tabela 3. Esses sítios foram escolhidos pois são mutações já descritas para *E. coli*, resultando em termossensibilidade, além de outras características fenotípicas (Zeilstra-Ryalls *et al.*, 1993).

A obtenção do molde de DNA contendo uracilas e as reações de mutagênese foram feitas pelo método de Kunkel *et al.* (1987), como descrito em Sambroock *et al.* (1989). O DNA fita simples isolado das placas de lise foi sequenciado utilizando-se o "primer" R1 (Tabela 3) complementar a uma região cerca de 40 bases a 5' da mutação correspondente ao aminoácido 173.

Os fagos com as mutações de interesse tiveram seu rfdNA extraído e digerido com *ApaI* e *EcoRI*, correspondendo a região 3' de *groEL*. O fragmento isolado foi ligado simultaneamente ao pMR20 digerido com *EcoRI* e *HindIII* e ao fragmento *HindIII/ApaI* correspondente à região 5' do operon *groESL*. As colônias brancas obtidas da transformação tiveram seu DNA plasmidial extraído e analisado por digestão com as três enzimas mencionadas. Os plasmídios que apresentaram o padrão correto foram

transferidos por conjugação para a linhagem SG300 de *Caulobacter crescentus*, cuja construção foi descrita no item acima e onde o operon *groESL* do cromossomo pode ser silenciado em meio sem xilose.

As linhagens obtidas foram repicadas em placas de meio PYE contendo xilose ou glicose e incubadas a 19, 30, 37 e 42°C. Outro ensaio foi realizado em placas contendo ou não ácido nalidíxico, a 30 e 37°C. Também foram efetuadas curvas de crescimento em meio PYE sem xilose, e a morfologia das células foi visualizada por microscopia de contraste de fase.

RESULTADOS

1. Ensaio de atividade de β -galactosidase das fusões de transcrição e tradução da região regulatória de *groESL* com o gene repórter *lacZ*.

A fim de se investigar o papel dos elementos da região regulatória do operon *groESL* de *Caulobacter crescentus* descritos em Avedissian & Gomes (1996), mutações pontuais foram introduzidas em fragmentos de DNA contendo essa região, que foram posteriormente ligados ao gene repórter *lacZ*. Desse modo, a atividade da enzima β -galactosidase determinada em cada caso indica a atividade do promotor presente.

Na linhagem NA1000, selvagem, a atividade de β -galactosidase da construção pMA11 (Avedissian & Gomes, 1996) medida em culturas mantidas a 30°C foi de cerca de 1900 unidades Miller, havendo um aumento de aproximadamente 2 vezes e meia após incubação das culturas por uma hora a 40°C (Figura 3), indicando forte indução por choque térmico. Mutações pontuais em um dos braços da repetição invertida CIRCE (pRB19 e pRB20) elevaram a atividade medida em culturas a 30°C para valores entre 2500 e 2900 unidades Miller. Apesar deste valor estar mais elevado a 30°C em relação ao controle (50%), ainda há indução por choque térmico de cerca de 20-25%. Mutações nos dois braços de CIRCE (pRB21) restabelecendo a complementaridade da sequência resultaram em um aumento ainda maior da atividade de β -galactosidase (4600 u), mantendo a indução por choque térmico. A deleção de quatro bases em um dos braços de CIRCE (pRB22) apresentou efeitos semelhantes aos obtidos com pRB19 e pRB20. Este conjunto de dados parece indicar que CIRCE tem um efeito negativo na transcrição de *groESL*, mas não é o único elemento responsável pela indução da resposta ao choque térmico deste operon, pois, apesar da atividade elevada a 30°C, os mutantes em CIRCE continuam apresentando indução por choque térmico, diferentemente do observado em *Bacillus subtilis* (Zuber & Schumman, 1994).

Mutações na região -35 do promotor P1 (pRB35 e pRB36) não diminuíram a atividade de β -galactosidase observada (Figura 3), indicando que este elemento não tem papel importante na transcrição do operon *groESL*. Apesar de P1 ter sido descrito como um possível promotor, correspondente a um aparente início de transcrição na posição -119 (Avedissian & Gomes, 1996), este dado parece ter sido originado de um artefato, como se discute no item 4. Em contraste, mutações na região -10 de P2 (pRB23), descrito como um promotor provavelmente regulado por σ^{32} , ocasionaram uma drástica diminuição da atividade de β -galactosidase, mantendo-se os mesmos valores tanto a 30°C quanto

A. GTTGGCACTCGAATGGAGCGACTGCTAAC

B.		Atividade β -gal (unidades Miller)		
		30°C	40°C	razão 40°C/30°C
pMA11	<p>Diagram of pMA11 construct. It shows two promoters, P1 and P2, with arrows indicating transcription direction. P1 has a -35 box and a -10 box. P2 has a -35 box and a -10 box. The lacZ gene is located downstream of P2. The construct is flanked by (-318) and (+3) markers.</p>	1890 ± 260	4620 ± 300	2.44
pRB19	<p>Diagram of pRB19 construct. It shows two promoters, P1 and P2, with arrows indicating transcription direction. P1 has a -35 box and a -10 box. P2 has a -35 box and a -10 box. The lacZ gene is located downstream of P2. The construct is flanked by (-318) and (+3) markers. A GCA TTT mutation is indicated at the P2 -10 box.</p>	2890 ± 230	3500 ± 280	1.21
pRB20	<p>Diagram of pRB20 construct. It shows two promoters, P1 and P2, with arrows indicating transcription direction. P1 has a -35 box and a -10 box. P2 has a -35 box and a -10 box. The lacZ gene is located downstream of P2. The construct is flanked by (-318) and (+3) markers. A TGC AAA mutation is indicated at the P2 -10 box.</p>	2530 ± 300	3160 ± 350	1.25
pRB21	<p>Diagram of pRB21 construct. It shows two promoters, P1 and P2, with arrows indicating transcription direction. P1 has a -35 box and a -10 box. P2 has a -35 box and a -10 box. The lacZ gene is located downstream of P2. The construct is flanked by (-318) and (+3) markers. GCA TTT and TGC AAA mutations are indicated at the P2 -10 box.</p>	4600 ± 210	6060 ± 400	1.32
pRB22	<p>Diagram of pRB22 construct. It shows two promoters, P1 and P2, with arrows indicating transcription direction. P1 has a -35 box and a -10 box. P2 has a -35 box and a -10 box. The lacZ gene is located downstream of P2. The construct is flanked by (-318) and (+3) markers. A TGCT mutation is indicated at the P2 -10 box.</p>	3270 ± 160	5350 ± 100	1.64
pRB23	<p>Diagram of pRB23 construct. It shows two promoters, P1 and P2, with arrows indicating transcription direction. P1 has a -35 box and a -10 box. P2 has a -35 box and a -10 box. The lacZ gene is located downstream of P2. The construct is flanked by (-318) and (+3) markers. A CCTA GGGG mutation is indicated at the P2 -10 box.</p>	320 ± 50	300 ± 60	0.94
pRB35	<p>Diagram of pRB35 construct. It shows two promoters, P1 and P2, with arrows indicating transcription direction. P1 has a -35 box and a -10 box. P2 has a -35 box and a -10 box. The lacZ gene is located downstream of P2. The construct is flanked by (-318) and (+3) markers. TTAACC GCGA mutations are indicated at the P2 -10 box.</p>	2400 ± 300	5180 ± 180	2.16
pRB36	<p>Diagram of pRB36 construct. It shows two promoters, P1 and P2, with arrows indicating transcription direction. P1 has a -35 box and a -10 box. P2 has a -35 box and a -10 box. The lacZ gene is located downstream of P2. The construct is flanked by (-318) and (+3) markers. TTAA GCG mutations are indicated at the P2 -10 box.</p>	2130 ± 160	4600 ± 280	2.16
pCS225		2980 ± 60	2720 ± 80	0.91
p/lacZ/290		110 ± 60	120 ± 60	1.09

FIGURA 3. *Legenda na página seguinte.*

FIGURA 3. Mudanças na atividade de transcrição da região regulatória de *groESL* devido a mutações em seus elementos. **A.** Sequência de nucleotídeos da repetição invertida CIRCE. **B.** Esquema dos fragmentos clonados no vetor repórter de transcrição *placZ/290* e valor da atividade de β -galactosidase (β -gal) para cada construção, na linhagem NA1000. Os números -318 e +3 correspondem às posições relativas ao início de tradução de *groESL*. Os prováveis promotores P1 e P2 têm suas regiões -10 e -35 representadas por retângulos e os inícios de transcrição pelas setas curvadas sobre os esquemas; as setas pequenas abaixo do esquema representam o elemento CIRCE; os triângulos pretos indicam as substituições de bases e o símbolo Δ a deleção das bases indicadas. Como controle, estão representados o *placZ/290* e o pCS225, que apresenta o promotor do gene *xyiX* clonado no *placZ/290*. Os valores representam a média de pelo menos três ensaios independentes.

a 40°C. Isso indica que o operon *groESL* pode ser regulado por σ^{32} , como foi confirmado por experimentos descritos mais adiante.

A atividade de β -galactosidase das fusões de transcrição pMA11, pRB19, pRB20 e pRB21 foram também analisadas na linhagem LS2293, que não possui a proteína HrcA, provável repressor de *groESL* com ligação em CIRCE. A construção pMA11, com a região regulatória selvagem, apresentou atividade 50% mais alta que na linhagem NA1000 (*hrcA*⁺), havendo ainda indução por choque térmico (Roberts *et al.*, 1996). A construção pRB20 apresentou valores semelhantes nas linhagens NA1000 e LS2293, como esperado. Surpreendentemente, porém, as construções com mutações no braço esquerdo de CIRCE tiveram atividade menor na LS2293 do que na NA1000. Os valores de atividade de β -galactosidase da LS2293 com o pRB19, por exemplo, foram praticamente iguais ao pMA11 na NA1000 e, no caso do pRB21, ainda menores (Tabela 5). Este fato pode indicar a existência de outros mecanismos de regulação. Na ausência de HrcA, por exemplo, o elemento CIRCE pode ter papel na estabilização do mRNA, sendo esse efeito mascarado na linhagem selvagem.

Tabela 5. Atividade de β -galactosidase das fusões de transcrição na linhagem LS2293, em valores relativos ao pMA11 na linhagem NA1000 (1 = 1890 unidades Miller).

Plasmídeo	Atividade de β -galactosidase (valores relativos)	
	30°C	40°C
pMA11	1,54	2,28
pRB19	1,03	1,21
pRB20	1,46	2,15
pRB21	0,82	0,94
pRB23	0,24	0,69

Para confirmar que o provável promotor P1 não interfere na regulação da transcrição do operon *groESL*, as mutações em CIRCE e P2 também foram efetuadas em um fragmento de cerca de 150 pares de base a 5' do início de tradução, estando deletadas as regiões correspondentes a P1 (pMA18, Avedissian & Gomes, 1996). As taxas de indução entre as construções correspondentes são as mesmas encontradas quando se utilizou o fragmento contendo 318 pares de base da região regulatória de *groESL*. Portanto, as sequências entre -183 e -318 bp de *groESL* parecem não ter efeito em sua regulação.

No plasmídeo *placZ/290* utilizado como vetor nas fusões de transcrição, a tradução do gene *lacZ* é dirigida por sequências presentes no plasmídeo, e não no fragmento clonado. Para se verificar o possível efeito das mutações sítio-dirigidas na região regulatória de *groESL* na tradução do gene repórter, os fragmentos contendo estas mutações foram clonados no pJBZ280. Neste vetor, o ATG inicial de *lacZ* é fundido com o do fragmento clonado, sendo a região de ligação ao ribossomo fornecida por este fragmento. As taxas entre as atividades de β -galactosidase das construções se assemelhou ao encontrado nas fusões de transcrição na linhagem NA1000, demonstrando que os elementos onde as mutações foram introduzidas não têm efeito na tradução de *groESL* nesta linhagem (Tabela 6). Na linhagem LS2293, não foi observada a discrepância de resultados em relação à NA1000, como nas fusões de transcrição, ou seja, os valores de β -galactosidase se mostraram elevados para todas as construções (Tabela 6). Isto pode indicar que, nas fusões de transcrição, a extremidade 5' transcrita a partir do plasmídeo repórter *placZ/290* (entre o fragmento de DNA clonado e o ATG de *lacZ*) provavelmente apresenta um efeito de desestabilização na ausência de um elemento CIRCE intacto na linhagem LS2293. Este efeito não ocorre nas fusões de tradução, em que a região 5' não traduzida do mRNA reflete mais fielmente a encontrada no mRNA de *groESL*.

Tabela 6. Atividade de β -galactosidase das fusões de tradução nas linhagens NA1000 e LS2293 a 30°C. Os valores se referem à média de dois experimentos.

Plasmídeo	Atividade de β -galactosidase	
	NA1000	LS2293
pMA11-trad	2756	4708
pRB19-trad	7040	5327
pRB20-trad	3801	3839
pRB21-trad	5370	5057

2. Efeito de mutações no elemento CIRCE sobre a indução da resposta ao choque térmico no operon *groESL*.

Para confirmar a indução por choque térmico das fusões de transcrição da região regulatória de *groESL* contendo mutações em CIRCE com o gene repórter *lacZ*, a síntese de β -galactosidase foi analisada no decorrer do choque térmico. Culturas em fase logarítmica da linhagem NA1000 contendo as diferentes construções crescendo a 30°C

FIGURA 4. Indução da síntese de β-galactosidase das fusões de transcrição *groESL-lacZ* após diferentes tempos de choque térmico. A. A linhagem NA1000 portadoras dos plasmídeos pMA11, pRB19 e pRB22 foram submetidas ao choque térmico a 40°C e alíquotas foram marcadas com pulsos de ³⁵S-metionina por 2 minutos nos tempos indicados. Os extratos foram imunoprecipitados com anti-β-galactosidase e analisados por SDS-PAGE. **B.** Taxas relativas de síntese de β-galactosidase determinadas pela densitometria dos filmes.

tiveram uma amostra incubada com ^{35}S -metionina por 2 minutos. As culturas foram incubadas a 40°C por duas horas, com alíquotas marcadas com um pulso de ^{35}S -metionina por 2 minutos, após diferentes tempos de incubação. Os extratos celulares marcados foram imunoprecipitados com anticorpo anti- β -galactosidase e analisados por SDS-PAGE. Na Figura 4A, estão mostrados as auto-radiografias dos géis obtidos da imunoprecipitação de extratos das linhagens portadoras dos plasmídeos pMA11, pRB19 ou pRB22. Os resultados obtidos com as linhagens portadoras do pRB20 e pRB21 foram muito semelhantes aos do pRB19.

A síntese de β -galactosidase a 30°C nas construções mutantes é cerca de 2 vezes maior que na linhagem carregando o pMA11. Em todas as construções, há um pico na síntese de β -galactosidase após cerca de 15 minutos de choque térmico, alcançando 13 vezes o valor a 30°C para o pMA11 e cerca de 3,5 vezes para o pRB19 (Figura 4B). A menor indução por choque térmico nas construções pRB19, pRB20 e pRB21 pode ocorrer devido a um declínio na meia-vida do mRNA, o que também pode explicar a queda mais rápida da síntese de β -galactosidase no decorrer do choque térmico. A construção pRB22, que apresenta uma deleção de 4 bases em CIRCE, apresentou um perfil de indução e desligamento da resposta ao choque térmico semelhante ao pMA11, exceto pela síntese de β -galactosidase mais elevada a 30°C.

3. Efeito da superexpressão de σ^{32} na expressão de *groESL*.

Para a superexpressão de σ^{32} , o gene *rpoH* de *C. crescentus*, incluindo sua região regulatória, foi clonado no plasmídeo pAS21 (os sítios utilizados na clonagem resultaram na perda do P_{xylX} do vetor, sendo que a expressão de *rpoH* é regulada por seu próprio promotor). O plasmídeo resultante, denominado pAS*rpoH*, foi transferido por conjugação para a linhagem NA1000. Os níveis de σ^{32} na linhagem portadora do pAS*rpoH* aumentaram oito vezes a 30°C e duas vezes após 15 minutos de choque térmico, em relação aos níveis da cepa selvagem NA1000. Em tempos mais longos de choque térmico, porém, esses níveis se igualam ou mesmo diminuem mais rapidamente na cepa NA1000/pAS*rpoH* (Figura 5).

Também pode ser observado aumentos de cinco ou seis vezes na quantidade das proteínas DnaK e GroEL nesta linhagem a 30°C. Durante o choque térmico, essas proteínas são acumuladas até 30 minutos, sendo que em tempos mais longos (90-120 minutos) suas quantidades ficam menores que na linhagem NA1000. Os padrões das curvas, diferentes para as duas linhagens, refletem o observado para σ^{32} (Figura 5C). Isso demonstra a influência de σ^{32} na expressão de GroEL e confirma dados da literatura para

FIGURA 5. A superexpressão de σ^{32} ocasiona um aumento nos níveis das proteínas GroEL e DnaK. "Western blots" de extratos da linhagem NA1000 portadora (A) ou não (B) do plasmídio pASrpoH. Os números sobre as figuras se referem ao tempo de incubação a 42°C. A densitometria das autoradiografias está representada em C. As curvas em vermelho correspondem à linhagem NA1000/pASrpoH e as azuis, à NA1000.

FIGURA 6. Os níveis do mRNA para *groESL* estão aumentados numa linhagem superexpressando σ^{32} . RNA total foi extraído das linhagens NA1000 (canaletas 1 e 3) e NA1000/pASrpoH (2 e 4) cultivadas a 30°C (1 e 2) ou após incubação a 42°C por 15 minutos (3 e 4) e hibridado com o oligonucleotídeo PEgro marcado radioativamente. O produto da extensão com a transcriptase reversa foi analisado em gel desnaturante, tendo como padrão uma reação de sequência da região regulatória de *groESL* e utilizando-se o mesmo oligonucleotídeo como iniciador.

a expressão de DnaK (Wu & Newton, 1996; Reisenauer *et al.*, 1996).

Para confirmar se o aumento da quantidade da proteína GroEL na linhagem superexpressando σ^{32} era devido ao aumento da transcrição a partir de P2 do gene, os níveis de mRNA para *groESL* foram estimados por experimentos de "primer extension", utilizando-se RNA total extraído das cepas NA1000 e NA1000/pASrpoH obtidas de culturas a 30°C e submetidas a choque térmico de 42°C por 15 minutos. O oligonucleotídeo PEgro (Tabela 3) marcado com ^{32}P na extremidade 5' (Figura 6) foi utilizados nestes experimentos. O transcrito para *groESL* a partir do promotor com consenso para σ^{32} apresentou-se em quantidade 10 vezes maior na linhagem superexpressando σ^{32} a 30°C e cerca de 7 vezes maior a 42°C, em relação à linhagem selvagem NA1000, como determinado pela densitometria da auto-radiografia apresentada na Figura 6.

4. Determinação dos inícios de transcrição das construções P*groESL*/*lacZ*.

Foram realizados experimentos de "primer extension" com os RNAs obtidos de células da linhagem NA1000 contendo os plasmídios pMA11, pRB19, pRB20 e pRB21, crescidas a 30°C e submetidas a choque térmico de 42°C por 15 minutos, para se verificar se as mutações sítio-dirigidas alteraram a posição do início de transcrição. O oligonucleotídeo utilizado hibrida com a extremidade 3' da região regulatória do operon *groESL*, incluindo o ATG da metionina iniciadora (Figura 7B). Portanto, o produto de extensão observado é resultado tanto da transcrição reversa do mRNA sintetizado a partir do operon *groESL* do cromossomo da linhagem, como do mRNA da fusão P*groESL*/*lacZ*. Era esperado que todas as canaletas apresentassem uma (ou mais de uma) banda em comum, resultante do mRNA *groESL* e, se houvesse mudanças no início de transcrição das construções com mutações em CIRCE, bandas adicionais, inexistentes no controle pMA11, seriam observadas.

Os resultados obtidos concordaram com o descrito anteriormente para o início de transcrição P2 (Avedissian & Gomes, 1996), mas a banda correspondente ao início a partir de P1 não foi detectada em nenhuma das canaletas (Figura 7A). Isso confirma os dados de mutagênese sítio-dirigida, quando as mutações da região -35 do suposto promotor P1 não diminuíram a atividade de β -galactosidase a partir das construções pRB35 e pRB36, em relação ao pMA11. Assim, pode-se concluir que o operon *groESL* é transcrito apenas a partir de P2.

FIGURA 7. Determinação dos inícios de transcrição em mutantes de CIRCE e *hrcA* por ensaios de “primer extension”. (A) Um oligonucleotídeo complementar às bases -15 a +3 (PEgro) foi marcado radioativamente na extremidade 5', hibridado com RNAs extraídos de culturas da linhagem NA1000 contendo os plasmídeos pMA11 (canaletas 1 e 5), pRB19 (2 e 6), pRB20 (3 e 7) e pRB21 (4 e 8), crescidas a 30°C ou expostas a 42°C por 15 minutos. Os híbridos foram estendidos utilizando-se transcriptase reversa, e os produtos de extensão foram analisados em gel de poliacrilamida-uréia e auto-radiografia. (B) O mesmo procedimento foi realizado com as linhagens NA1000 (canaletas 1 e 3) e LS2293 (2 e 4). O padrão à esquerda representa a reação de sequência de um fragmento de DNA correspondente ao pRB19, utilizando-se o mesmo oligonucleotídeo PEGro. (C) Sequência da região regulatória de *groESL*, onde estão sublinhadas as sequências -10 e -35 de P2; em negrito, o ATG inicial. A seta vertical indica o início de transcrição detectado no experimento. As setas horizontais mostram o elemento CIRCE e o duplo sublinhado, a região complementar ao oligonucleotídeo PEGro.

Não foram observadas bandas diferentes do controle para as construções contendo as mutações em CIRCE, ou seja, mesmo com as alterações na sequência, o início de transcrição não se modifica (posição -88 a partir do ATG inicial), tanto em condições normais quanto de choque térmico. Porém, a 30°C, a intensidade das bandas foi maior em relação ao controle, novamente concordando com os ensaios de atividade de β -galactosidase, mostrando que a transcrição é aumentada quando a sequência CIRCE é alterada, na mesma razão desses ensaios (semelhante para pRB19 e pRB20 e ainda maior para pRB21). Em condições de choque térmico, também não se observou diferenças no início de transcrição (Figura 7A).

5. Papel de HrcA na regulação temporal de *groESL*.

A síntese da proteína GroEL é regulada durante o ciclo celular na linhagem selvagem NA1000, sendo sua expressão aumentada nas células móveis e pré-divisionais e quase nula nas células talo (Figura 8A). O aumento da síntese na célula móvel parece ser devido ao choque térmico que ocorre durante o processo de sincronização das células, como mostrado por Avedissian & Gomes (1996).

Na linhagem LS2293 (*hrcA*⁻), entretanto, não se observa o mesmo padrão (Figura 8B), pois há síntese constitutiva de GroEL durante todo o ciclo celular, sugerindo que a proteína HrcA está envolvida na regulação temporal do operon *groESL* durante o ciclo celular, a temperaturas normais de crescimento.

No experimento realizado, a progressão durante o ciclo celular das linhagens foi acompanhado por microscopia ótica, confirmando-se a sincronia da população. Foram também imunoprecipitadas as flagelinas, cuja síntese é regulada durante o ciclo celular, não se observando diferenças entre as linhagens (Figura 8).

Para analisar se a perda da regulação temporal da síntese de GroEL na ausência de HrcA se dá em nível de transcrição, o plasmídeo pMA11 foi transferido para a linhagem LS2293 e a síntese de β -galactosidase foi investigada no decorrer do ciclo. Conforme o esperado, a expressão do gene repórter *lacZ* sob o controle da região regulatória de *groESL* foi constitutiva (não mostrado). A fim de verificar se a síntese da proteína HrcA é regulada durante o ciclo celular, experimentos de sincronização de culturas de NA1000 e imunoprecipitação da proteína HrcA marcada foram realizados (Figura 9). Aparentemente, não há regulação temporal na síntese de HrcA, concordando com os dados de transcrição (Roberts *et al.*, 1996). O aumento aparente da síntese nos dois primeiros pontos do ciclo podem ser devido ao choque térmico produzido quando da sincronização da cultura, já que as células passam de 4°C (temperatura aproximada da

FIGURA 8. HrcA é essencial para a síntese regulada de GroEL durante o ciclo celular. Culturas sincronizadas das linhagens NA1000 (A) e LS2293 (*hrcA*⁻, B) foram marcadas com pulsos de ³⁵S-metionina nos tempos indicados do ciclo celular. Os extratos celulares foram imunoprecipitados com soros anti-GroEL e anti-flagelinas (como controle). Acima da figura está uma representação do ciclo, observado em microscopia de contraste de fase.

FIGURA 9. Síntese da proteína HrcA durante o ciclo celular de *C. crescentus*. Nos tempos indicados, amostras de uma cultura sincronizada da linhagem NA1000 foram marcadas com pulsos de ^{35}S -metionina e os extratos celulares obtidos foram imunoprecipitados com soros anti-HrcA e anti-GroEL (como controle).

manipulação durante os passos de isolamento da células móveis) para a incubação a 30°C, como mencionado acima, para o caso de GroEL. Entretanto, o ponto de 30 minutos permanece alto para hrcA e já diminuído para GroEL, quando comparado ao tempo zero, no experimento mostrado na Figura 8. Foi também analisada uma possível variação em massa da proteína HrcA durante o ciclo celular, utilizando-se “Western blots” e não se verificou variações significativas na concentração da proteína durante o ciclo (não mostrado). Assim, variações nos níveis de HrcA não parecem ser responsáveis pelo controle da expressão de *groESL*. Possivelmente o controle da atividade de HrcA nas diferentes fases do ciclo celular de *C. crescentus* é responsável pela repressão do operon *groESL* na fase de célula talo. Isso se assemelha ao descrito em *Bacillus subtilis*, onde foi demonstrado que a atividade HrcA é de alguma maneira regulada pela função de chaperonina de GroEL (Mogk et al, 1997).

6. Efeito de HrcA na indução de GroEL e DnaK no choque térmico.

Para confirmar que a indução da expressão do operon *groESL* de *C. crescentus* durante o choque térmico não é dependente de HrcA, os níveis de mRNA e da síntese de GroEL foram analisados no mutante *hrcA*⁻, bem como a quantidade relativa da proteína GroEL. Um aumento de 9 vezes da transcrição de *groESL* na linhagem LS2293 (*hrcA*⁻) já havia sido observado anteriormente por experimentos de Northern blot (Roberts *et al.*, 1996; Avedissian, 1996). RNA total de culturas das linhagens NA1000 e LS2293 incubadas a 30°C ou submetidas a choque térmico de 42°C por 15 minutos foram extraídos e hibridados com o oligonucleotídeo PEgro (Tabela 3) marcado radioativamente. Após extensão deste oligonucleotídeo com a MMLV-transcriptase reversa, os produtos foram analisados em gel desnaturante (Figura 7B, página 54). O mesmo início de transcrição foi observado nas duas linhagens, e pode se notar um aumento da intensidade da banda correspondente à linhagem LS2293 em relação à NA1000 a 30°C, bem como uma forte indução por choque térmico nas duas linhagens.

Concordando com esses dados, a síntese de GroEL aumenta no choque térmico de maneira semelhante à linhagem selvagem (cerca de sete vezes mais que a 30°C) e no mutante *hrcA*⁻ (cerca de 5 vezes) (Figura 10). A 30°C, a síntese de GroEL apresenta-se levemente aumentada no mutante *hrcA*⁻. Como controle da indução da resposta ao choque térmico, os mesmos extratos protéicos marcados com ³⁵S-metionina foram imunoprecipitados com soro anti-DnaK, não havendo variação entre as duas linhagens.

FIGURA 10. Efeito de HrcA na síntese de GroEL e DnaK. **A.** Culturas das linhagens NA1000 ou LS2293 (*hrcA*⁻) a 30°C foram submetidas a choque térmico a 40°C e amostras foram marcadas com ³⁵S-metionina por 2 minutos, nos tempos indicados. Os extratos protéicos foram imunoprecipitados com soro anti-DnaK ou anti-GroEL. **B.** As taxas relativas de síntese de DnaK e GroEL foram determinadas por densitometria das fluorografias. NA1000, *hrcA*⁺ (○) ; LS2293, *hrcA*⁻ (■).

A. **B.**

FIGURA 11. Efeito de HrcA nos níveis de GroEL e DnaK. Culturas das linhagens NA1000 ou LS2293 (*hrcA*⁻) a 30°C foram submetidas a choque térmico a 42°C pelos tempos indicados. **A.** Os extratos protéicos foram resolvidos por SDS-PAGE, transferidos pra membrana de nitrocelulose e incubados com soros anti-GroEL ou anti-DnaK, e os filtros foram revelados por ECL. **B.** Os níveis relativos de DnaK e GroEL foram determinados por densitometria dos filmes. NA1000, *hrcA*⁺ (○); LS2293, *hrcA*⁻ (■).

Os níveis da proteína GroEL encontram-se bastante elevados na linhagem LS2293 a 30°C (aproximadamente 4,5 vezes mais altos que na NA1000), como pode ser observado nos “Western blots” da Figura 11. Esses níveis já elevados aumentam ainda mais quando as células são expostas a 42°C, indicando mais uma vez que a proteína HrcA não é necessária para a indução do operon *groESL* durante o choque térmico. Como controle, os níveis de DnaK nas duas linhagens foram também determinados, tanto na temperatura normal de crescimento quanto durante o choque térmico, não sendo encontradas diferenças entre as linhagens.

7. Variação nos níveis e na síntese de HrcA no choque térmico.

Roberts *et al.* (1996) mostraram que o operon *hrcA-grpE* de *C. crescentus* apresenta promotor com consenso para σ^{32} e uma pequena indução da transcrição após 5 minutos de choque térmico. Conforme esperado, a figura 12 A mostra que a síntese de HrcA aumenta durante o choque térmico a 42°C na linhagem NA1000. Os resultados foram obtidos por imunoprecipitação de extratos de células marcadas com ^{35}S -metionina a 30°C ou a diferentes tempos de exposição a 42°C, mostrando um máximo de síntese por volta de 10 minutos de exposição ao choque térmico (Figura 12A). A diminuição aparente nos pontos de 15 e 30 minutos ocorreram devido a variação experimental, mas o padrão de aumento da síntese foi confirmado em outros ensaios.

Os níveis da proteína HrcA também foram analisados. Extratos protéicos de culturas das linhagens NA1000 e NA1000 superexpressando σ^{32} (NA1000/pASrpoH) incubadas a 30°C e após diferentes tempos de choque térmico foram resolvidos por SDS-PAGE e analisados por “Western blot”. Na Figura 12B, observa-se a elevação dos níveis de HrcA nas duas linhagens em condições de choque térmico, com o máximo aos 45 minutos a 42°C. Na linhagem superexpressando σ^{32} há um aumento de HrcA a 30°C, em relação à linhagem selvagem, o que confirma que a transcrição deste operon ocorre pela $E\sigma^{32}$.

O aumento dos níveis de HrcA no choque térmico demonstra que o aumento da transcrição de *groESL* a temperaturas elevadas é independente de HrcA, já que esta proteína repressora está presente em maior quantidade na condição em que a expressão do operon é induzida.

A. **B.**

FIGURA 12. Variação de HrcA no choque térmico. A. Culturas da linhagem NA1000 a 30°C foram incubadas a 42°C por diferentes períodos de tempo (indicados sobre a figura), amostras foram incubadas com ³⁵S-metionina por 2 minutos e os extratos imunoprecipitados com soro anti-HrcA. A seta indica a banda correspondente a HrcA, ausente na linhagem LS2293 (*hrcA*⁻). **B.** Extratos de proteína total da linhagem NA1000 e NA1000 superexpressando σ^{32} (NA1000/pASrpoH) incubada a 30°C ou por diferentes períodos a 42°C foram separados por SDS-PAGE, transferidos para membrana de nitrocelulose, incubados com soro anti-HrcA e revelados por quimioluminescência.

8. Perfil protéico da linhagem LS2293 (*hrcA*⁻).

Em várias espécies de bactérias, o elemento CIRCE está presente tanto à frente de operons contendo os genes *groESL* ou *dnaKJ* (Hecker *et al.*, 1996). Em *C. crescentus*, porém, ele foi encontrado apenas à frente do operon *groESL*, e a ausência do repressor HrcA ocasiona uma maior transcrição desse operon, refletindo-se numa síntese aumentada das proteínas codificadas por ele. A fim de se investigar se outras proteínas estariam aumentadas na linhagem LS2293 (*hrcA*⁻), proteínas marcadas radioativamente com ³⁵S-metionina dessa linhagem e da NA1000 foram extraídas de culturas submetidas a diferentes tempos de choque térmico e foram analisadas em SDS-PAGE (Figura 13). Nota-se uma síntese diferencial entre os diferentes tempos de choque térmico em cada linhagem, como observado anteriormente (Gomes *et al.*, 1986), mas apenas uma banda de cerca de 60 kDa mostrou-se aumentada na LS2293 a 30°C, em relação à NA1000, correspondendo a GroEL. Não foram observadas outras diferenças no perfil de proteínas induzidas por choque térmico.

Uma abordagem com maior resolução foi a realização de eletroforese em duas dimensões, com extratos protéicos marcados a 30°C e após 15 minutos a 42°C. Novamente, não foi possível observar proteínas cuja síntese variasse entre as duas linhagens (Figura 14), além de GroEL e GroES, cujas posições no gel puderam ser determinadas pela comparação com um padrão de peso molecular e pela forte indução por choque térmico. Mesmo a ausência da proteína HrcA na linhagem LS2293 não pode ser observada, provavelmente pela pequena quantidade dessa proteína regulatória na célula.

Com esse experimento, pode-se inferir que nenhuma outra proteína majoritária em *C. crescentus* está sob o controle de CIRCE/HrcA, nada se podendo concluir a respeito de proteínas presentes em pequenas quantidades.

FIGURA 13. Perfil da síntese de proteínas nas linhagens NA1000 e LS2293 a 30°C ou a diferentes tempos de choque térmico a 42°C. Extratos celulares de culturas incubadas por 2 minutos com ^{35}S -metionina nos diferentes tempos de choque térmico indicados foram analisados em SDS-PAGE (gradiente 8-18 %), fluorografados com Amplify e expostos a filme de raio-X. As setas indicam algumas das proteínas induzidas no choque térmico.

FIGURA 14. Eletroforese bidimensional de extratos protéicos das linhagens NA1000 e LS2293 submetidas ou não a choque térmico. Culturas das linhagens NA1000 (A e C) e LS2293 (B e D) crescendo a 30°C (A e B) ou expostas a 42°C por 15 minutos (C e D) foram incubadas com ^{35}S -metionina por 2 minutos e os extratos resolvidos em gel de primeira dimensão num gradiente de pH entre 3 e 10 e posteriormente por massa molecular, num gel de SDS-PAGE com gradiente de poliacrilamida de 8 a 18%. Os géis foram fluorografados e expostos a filmes de raio-X. Estão indicadas as proteínas GroES e GroEL.

9. Construção da linhagem *groEL::Sp^r*.

O fragmento correspondente a todo o operon *groESL*, contendo o sítio de *Bam*HI obtido por mutagênese sítio-dirigida foi clonado no vetor pNPTS138. O plasmídeo resultante foi isolado, linearizado com *Bam*HI, desfosforilado e ligado ao fragmento contendo o gene de resistência à espectinomicina, isolado do plasmídeo pHP45Ω, conforme descrito nos itens 16.1 e 16.2 de Material e Métodos. Após transformação, as colônias resistentes à espectinomicina e canamicina foram isoladas e tiveram seus plasmídios extraídos e analisados por digestão e eletroforese em gel de agarose. Um dos plasmídios que apresentavam o padrão esperado foi denominado pNPT*groEL::Sp* e transferido para a linhagem S17-1, a fim de se efetuar a conjugação com *C. crescentus* NA1000.

Várias colônias resistentes a canamicina e ácido nalidíxico foram isoladas, sendo que dez tiveram seu DNA genômico extraído e analisado por Southern blot para o mapeamento do local de integração (Figura 15). Foram obtidos dois padrões de bandas e os clones representativos de cada um foram denominados SG001 e SG009. No clone SG001, a recombinação homóloga ocorreu na porção “upstream” ao gene *Sp^r* e, no SG009, “downstream”. Ambos os clones contêm duas cópias do operon *groESL*, sendo uma delas tipo selvagem e a outra interrompida pelo gene *Sp^r*.

A fim de se verificar se o gene *groEL* é essencial à célula, um segundo evento de recombinação homóloga foi necessário, retirando-se a cópia selvagem de *groEL* e as sequências do plasmídeo pNPTS138, incluindo-se os genes *sacB* e *npt* (Km^r). Como controle, o plasmídeo pGro, contendo todo o operon *groESL* e uma origem de replicação funcional em *Caulobacter* foi transferido por conjugação para as cepas SG001 e SG009, proporcionando uma cópia em *trans* do operon, que complementaria a mutação cromossômica, necessária se *groEL* fosse essencial.

Para que a cópia selvagem fosse eliminada por um novo evento de recombinação homóloga, alíquotas de culturas das cepas SG001, SG001/pGro, SG009 e SG009/pGro crescendo em meio líquido sem seleção foram plaqueadas em PYE contendo sacarose e espectinomicina. Esperava-se que apenas os clones que houvessem perdido o gene *sacB*, e, conjuntamente, a cópia selvagem de *groEL* e o gene de resistência a canamicina crescessem em sacarose, já que o produto do gene *sacB* é tóxico para as células na presença deste açúcar (Figura 16). Muitas colônias foram obtidas em placas de meio contendo sacarose, de todas as cepas utilizadas. Porém, como observações não publicadas sugeriam uma alta frequência de inativação do gene *sacB*, verificou-se também se havia

FIGURA 15. Integração do plasmídeo pNPT*groEL*::*Sp* no cromossomo da linhagem NA1000 por recombinação homóloga. (A) A recombinação homóloga ocorreu tanto a 5' (à esquerda) ou a 3' (à direita) do gene de resistência a espectinomicina, representado em verde. As sequências do cromossomo estão em vermelho, o operon *groESL* clonado no pNPTS138 e interrompido está em azul, e, em preto, estão as demais sequências plasmidiais. As linhas abaixo dos esquemas representam os fragmentos *EcoRI* com homologia com as sondas indicadas. **(B)** “Southern blots” da linhagem NA1000 e de quatro dos recombinantes, hibridados com as sondas indicadas.

FIGURA 16. Esquema da estratégia para a obtenção das cepas com a cópia cromossômica de *groES* interrompida pelo gene de resistência à espectinomicina. Notar que os dois recombinantes, SG001 e SG009, após o segundo evento de recombinação homóloga, originam linhagens com o mesmo padrão de restrição. A descrição das cores está na legenda da Figura 15.

ocorrido a perda do gene de resistência a canamicina, repicando-se entre 40 e 50 colônias resistentes a sacarose de cada cepa em meio contendo espectinomicina e canamicina ou apenas espectinomicina. O número de colônias obtidas estão apresentados na Tabela 7.

TABELA 7. Resistência à canamicina das colônias resistentes a sacarose e espectinomicina.

Cepa	<i>Sp^r sacB⁻ Km^s</i>	<i>Sp^r sacB⁻ Km^r</i>	<i>Sp^r sacB⁻ (total)</i>
SG001	0	42	42
SG001/pGro	32	18	50
SG009	0	45	45
SG009/pGro	37	2	39

Apenas as cepas portadoras da cópia plasmidial de *groESL* perderam a resistência a canamicina, ou seja, se mantiveram viáveis após sofrerem o segundo evento de recombinação homóloga, expulsando a cópia selvagem de *groEL* e mantendo no cromossomo *groEL::Sp^r*. Seis clones SG001/pGro e seis SG009/pGro tiveram seu DNA total extraído, digerido e analisado por Southern blot, confirmando-se a perda de *groEL* e das sequências do pNPTS138 e a retenção de *groESL::Sp^r* e de pGro. A estratégia utilizada está esquematizada na Figura 16. Como nenhum clone sem a cópia em *trans* perdeu a capacidade de formar colônias em meio com canamicina, indicando que o segundo evento de recombinação tornava as células inviáveis, pode-se concluir que é necessária a presença de uma cópia não interrompida de *groEL* para a viabilidade da célula à temperatura normal de crescimento.

10. Construção e análise de um mutante *groESL* condicional.

As linhagens SG300-8 e SG300-10 foram obtidas pela substituição da região regulatória de *groESL* pelo promotor P_{xylX} (Meisenzahal *et al*, 1997) e um gene de resistência à espectinomicina (Figura 17). 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. Assim, estas linhagens passaram a ter a expressão de *groESL* condicionada à presença de xilose no meio de cultura e não mais

FIGURA 17. Construção da linhagem SG300, com o operon *groESL* sob o controle de *P_{xylX}*. Em vermelho, estão representadas as sequências do cromossomo de *C. crescentus*. O pRB55 foi construído a partir do vetor pNPTS138 (em preto), pela clonagem do *P_{xylX}* (em amarelo) ligado ao gene de resistência à espectinomicina (em verde) flanqueado por uma região a 5' da sequência regulatória do operon *groESL* (fragmento *XbaI/SmaI*, em azul) e pela região codificadora de *groES* e parte de *groEL* (também em azul). A primeira recombinação ocorreu entre os fragmentos *XbaI/SmaI* do pRB55 e o cromossomo da linhagem selvagem NA1000 e a segunda, conforme indicado na figura. Os sítios *SacI*, representados por asteriscos, foram utilizados nas análises por Southern blot.

regulada temporalmente ou por choque térmico, já que suas sequências regulatórias foram deletadas. Isso possibilitou a análise do fenótipo das células na ausência de GroES e GroEL, já que esta última se mostrou essencial, impedindo a construção de um mutante nulo (ver item anterior)

As curvas de crescimento dessas linhagens em meio mínimo ou complexo estão representadas nas figuras 18 e 20. Em meio mínimo, além da medida de turbidez no meio, que indica indiretamente a massa de células presentes, alíquotas foram diluídas e semeadas em meio PYE com xilose, para a determinação do número de células viáveis presentes. Até 9 horas de crescimento, as medidas da absorbância a 600 nm das culturas apresentavam-se muito próximas, tanto na presença como na ausência de xilose. Depois de doze horas de incubação, observa-se que a massa de células na cultura com xilose é duas vezes maior, porém o número de células viáveis é cerca de seis vezes maior e, depois de dezoito horas, o número de células viáveis é dez vezes maior, para uma diferença de massa de apenas três vezes (Figura 18). O aumento do volume das células em meio sem xilose foi confirmado pela observação das culturas ao microscópio: sem xilose, as células se alongam, tornando-se filamentosas, enquanto as células no meio com xilose apresentam morfologia normal (Figura 19). Células móveis estavam presentes nas duas condições e não foi observada a lise abrupta das células, ao contrário do relatado para *E. coli* (McLennan & Masters, 1998).

Em meio rico, o comportamento dos mutantes condicionais foi similar, sendo que, após 11 horas de crescimento, a absorbância a 600 nm apresentava-se cerca de três vezes maior em meio com xilose, comparando-se com o crescimento em meio com glicose (Figura 20A).

Foram obtidos extratos protéicos de células isoladas de diferentes pontos da da curva da Figura 20A, e realizados "Western blots" utilizando-se anticorpos anti-GroEL e anti-DnaK. Na presença de xilose, a quantidade de GroEL permanece praticamente constante durante o intervalo do experimento, e quase não se detecta DnaK. Já na ausência de xilose, observa-se um decréscimo marcante da quantidade de GroEL, que deixa de ser detectada após sete horas de incubação. Paralelamente, a quantidade de DnaK eleva-se gradualmente com o tempo (Figura 20B).

BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo

A.

B.

FIGURA 18. Curvas de crescimento da linhagem SG300 em condições permissivas (presença de xilose) ou restritivas (ausência de xilose) em meio definido. Células da linhagem SG300 foram inoculadas em meio M2 contendo xilose (círculos azuis) ou glicose (quadrados vermelhos) como fonte de carbono e incubadas a 30°C. A intervalos de tempo, a massa da células presentes foi estimada pela medida da densidade ótica a 600 nm (A) e alíquotas foram diluídas e semeadas em PYE-xilose, contando-se o número de colônias após incubação a 30°C por 48 horas, como indicação do número de células viáveis na cultura (B). Os valores de DO_{600} e ufc (unidades formadoras de colônia) representam a média de dois experimentos.

FIGURA 19. Morfologia das células da linhagem SG300 em condições permissivas ou restritivas. A linhagem SG300 foi inoculada em meio M2 contendo xilose ou glicose e alíquotas foram retiradas após os tempos indicados. As células foram fixadas em lâminas de vidro, coradas com safranina e visualizadas por microscopia ótica (aumento de 1000x).

Para se determinar se o aumento dos níveis de DnaK aconteceu por uma resposta semelhante à resposta ao choque térmico, "Western blots" foram realizados com os mesmos extratos e soro anti- σ^{32} de *E. coli*. Uma banda correspondente a σ^{32} foi observada na canaleta correspondente ao extrato de proteínas das células imediatamente antes da diluição nos meios com xilose ou glicose, representado pelo tempo zero na Figura 20. Provavelmente, este aumento de σ^{32} deve ter ocorrido devido ao choque térmico causado pela lavagem das células em temperatura de cerca de 15°C e posterior diluição em meio à temperatura ambiente. A partir de 9 horas de crescimento em meio com glicose, a mesma banda correspondente a σ^{32} é novamente detectada, e sua intensidade aumentou até 24 horas. Já na cultura crescendo em presença de xilose, a banda correspondente a σ^{32} só foi observada na canaleta correspondente à extratos de células após 24 horas de incubação (dados não mostrados). Este aumento de σ^{32} neste caso pode acontecer devido à adaptação das células à fase estacionária, que pode ser considerada como uma condição de estresse.

Um perfil semelhante de indução ocorreu com HrcA. "Western blots" foram realizados e a banda correspondente a esta proteína, cujo gene também possui um promotor com consenso para σ^{32} , estava aumentada no ponto correspondente ao tempo zero e com níveis crescentes entre 9 e 24 horas de incubação no meio com glicose. No meio com xilose, HrcA apresenta-se aumentada também nos pontos correspondentes aos tempos 9, 11 e 24 horas, porém em menor grau que no meio com glicose (dados não mostrados). Estes resultados indicam que a diminuição dos níveis da proteína GroEL acarreta uma resposta semelhante à ocorrida em condições de choque térmico, com aumento de σ^{32} e das proteínas cujos genes apresentam sequências promotoras reconhecidas por este fator.

FIGURA 20. Curvas de crescimento e níveis de GroEL e DnaK na linhagem SG300 em condições permissivas (presença de xilose) ou restritivas (ausência de xilose) em meio complexo. Células da linhagem SG300 foram inoculadas em PYE-xilose e incubadas a 30°C. A intervalos de tempo, a massa da células presentes foi estimada pela medida da densidade ótica a 600 nm (A) e alíquotas das culturas tiveram suas proteínas extraídas, resolvidas em SDS-PAGE, transferidas para nitrocelulose e incubadas com soro anti-GroEL e anti-DnaK (B). A revelação foi feita por quimioluminescência.

11. Atividade da região regulatória de *groESL* na linhagem mutante SG300.

Para se analisar a transcrição a partir da região regulatória de *groESL* no mutante condicional deste operon, os plasmídeos pMA11 e pRB21 foram transferidos para a linhagem SG300. Nas linhagens obtidas após a conjugação, o gene repórter *lacZ* encontrava-se sob o controle da região regulatória de *groESL* selvagem (pMA11) ou com mutações em CIRCE (pRB21), enquanto o promotor P_{xyIX} controlava a expressão de *groESL*. A síntese de β -galactosidase das linhagens foi analisada após incubação das culturas em condições restritivas ou permissivas, a 30°C e em meio definido.

Na presença de xilose, a expressão de *lacZ* apresentou-se constante durante as cinco horas de incubação, nas duas linhagens. A síntese de GroEL sofreu uma leve indução, provavelmente devido à retomada de crescimento após as lavagens e diluição das células (Figura 21A).

Já na ausência de xilose, onde o promotor P_{xyIX} é silenciado e não se observou a síntese de GroEL mesmo imediatamente após a diluição das células no meio de cultura. Por sua vez, a síntese de β -galactosidase aumentou com o decorrer do tempo, de forma mais acentuada quando sob o controle da região regulatória selvagem de *groESL* (linhagem portadora do pMA11), do que quando sob controle desta região contendo o elemento CIRCE mutado (pRB21) (Figura 21B). Este maior aumento na síntese de β -galactosidase pode ocorrer devido ao aumento dos níveis do fator σ^{32} , como descrito no item anterior, e pela inativação da proteína repressora HrcA na ausência de GroEL, a exemplo do que ocorre em *B. subtilis* (Mogk *et al.*, 1997). Na linhagem portadora do pRB21, onde CIRCE está mutado, existiria apenas o efeito de σ^{32} sobre a transcrição, e não de HrcA, pois seu sítio de ligação na região promotora está mutado (seis pares de bases foram trocados).

FIGURA 21. Síntese de β-galactosidase e GroEL na linhagem SG300 portadora das fusões de transcrição pMA11 ou pRB21 em condições permissivas (A) ou restritivas (B). Células da linhagem SG300 foram inoculadas em M2X e incubadas a 30°C. A intervalos de uma hora, alíquotas foram incubadas por 5 minutos com ³⁵S-metionina e os extratos protéicos das células foram imunoprecipitados com soros anti-GroEL e anti-β-galactosidase, resolvidos em SDS-PAGE e fluorografados. As regiões dos géis correspondentes às proteínas GroEL e β-galactosidase estão indicadas.

12. Efeitos de mutações pontuais em GroEL.

Em *E. coli*, algumas cepas mutantes para *groEL*, com fenótipo de termossensibilidade e/ou resistência à infecção por bacteriófagos foram analisadas por Zeilstra-Ryalls *et al.* (1993), que clonaram e sequenciaram cada um dos alelos de *groEL*, determinando os sítios de mutação. Com base neste trabalho, algumas mutações, resultando na troca de apenas um aminoácido – conservado entre as sequências de GroEL de *E. coli* e *C. crescentus* –, foram introduzidas na sequência de *groEL* de *C. crescentus*. As linhagens carregando os genes mutantes poderiam trazer informações sobre o papel de GroEL nesta bactéria, se fossem observadas características diferentes da linhagem com o alelo selvagem. Em *E. coli*, as substituições dos aminoácidos nas posições 173 (Gly→Asp), 191 (Glu→Gly) e 201 (Ser→Phe) resultaram em ausência de crescimento a 43°C, além da resistência à infecção pelos fagos T4 e/ou λ , observada também nas linhagens com as mutação na posição 337 (Gly→Asp).

As mutações na sequência codificadora de *groEL* de *C. crescentus* foram obtidas por mutagênese sítio-dirigida e o operon foi clonado no plasmídeo pMR20, conforme descrito no item 18 de Material e Métodos. As construções resultantes foram transferidas para a linhagem SG300, que apresenta o operon *groESL* sob controle de um promotor regulado pela presença de xilose no meio. Na ausência deste açúcar, apenas o operon *groESL* codificado pelo plasmídeo é transcrito, resultando que a maioria das moléculas de GroEL na célula conteriam a mutação correspondente à sequência plasmidial, já que o nível de GroEL codificado pelo cromossomo cai drasticamente após duas horas de crescimento em meio sem xilose (item 10, acima). Em todos os experimentos, foram utilizados como controle positivo a linhagem SG300 carregando o plasmídeo pGro (cópia selvagem de *groESL*) e, como controle negativo, a SG300 carregando apenas o vetor de clonagem pMR20.

No crescimento em placas contendo glicose ou xilose, não foram observadas diferenças de crescimento em nenhuma das linhagens a 19, 30 e 37°C. A 42°C, nenhuma linhagem apresentou formação de colônias, já que é uma temperatura muito elevada para *C. crescentus*, onde nem a linhagem selvagem NA1000 apresenta formação de colônias em meio sólido. Em meio PYE líquido sem xilose, culturas das linhagens contendo os diferentes plasmídeos apresentaram as mesmas taxas de crescimento, tanto a 30 quanto a 37°C, em relação ao controle com o pGro. A morfologia das células observadas ao microscópio ótico é semelhante, estando presentes células móveis em todos os casos. Também não foram observadas diferenças de motilidade em meio semi-sólido. Em placas de meio PYE contendo o antibiótico ácido nalidíxico, foi possível notar um menor

crescimento da linhagem contendo o plasmídeo com a mutação correspondente ao aminoácido 191, a 37°C em relação à mesma linhagem crescendo a 30°C ou a 37°C na ausência de ácido nalidíxico (não mostrado).

DISCUSSÃO

A resposta ao choque térmico foi descoberta por acaso, quando foram observados puffs de DNA nos cromossomos politênicos de glândulas salivares de *Drosophila* mantidas a temperaturas elevadas (Ritossa, 1962) e posteriormente se demonstrou que estas estruturas correspondiam à transcrição aumentada de genes que codificam as proteínas de choque térmico (Tissières *et al.*, 1974). Desde então, todos os organismos estudados apresentaram a síntese induzida de um conjunto de proteínas em condições de choque térmico, sendo que algumas delas apresentam sequências altamente conservadas, como a Hsp70 (DnaK em *E. coli*) e a Hsp60 (GroEL em *E. coli*). Estas proteínas são importantes não só em condições de estresse, mas se mostraram essenciais também em condições fisiológicas, pois catalizam o dobramento correto de peptídeos, fazendo com que estes possam atingir sua conformação nativa e funcional eficientemente.

Nos últimos anos, muito tem sido elucidado sobre a estrutura e os mecanismos de ação dessas duas famílias de proteínas, a das Hsp70 e a das chaperoninas ou Hsp60 (revisado em Bukau & Horwich, 1998). Entretanto, pouco se sabe a respeito de quais proteínas essenciais para as células dependem obrigatoriamente dessas chaperones moleculares para que possam atuar de maneira eficaz.

O sistema de *Caulobacter crescentus* pode trazer informações relevantes sobre este problema. Por ter a expressão das principais chaperones moleculares - DnaK e GroEL - reguladas temporalmente durante seu ciclo celular, existe a possibilidade de se confrontar os eventos das diferentes fases do ciclo de *C. crescentus* com a maior ou menor disponibilidade destas proteínas. Para tanto, é necessário inicialmente que se conheça detalhadamente os mecanismos que regulam a expressão destes genes, a fim de se obter um panorama de quais são os estímulos que ativam ou inibem esses genes e seus produtos.

O operon *groESL* de *C. crescentus* é o único descrito até o momento em que dois elementos regulatórios envolvidos com o choque térmico aparecem em conjunto. Quando a sequência repetida invertida (posteriormente denominada CIRCE) foi descrita nos operons *dnaK* e *groEL* de bactérias Gram-positivas, associada com promotores reconhecidos por fatores σ vegetativos, 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} (revisado em Segal & Ron, 1996b). Uma comparação das sequências de vários elementos CIRCE mostrou que esta é a sequência regulatória mais conservada em eubactérias. Em *C. crescentus*, apenas o operon *groESL* apresenta o elemento CIRCE. Outros operons que codificam proteínas de choque térmico, como *dnaKJ* (Avedissian *et al.*, 1995), *grpE-hrcA* (Roberts *et al.*, 1996) e *rpoH* (Reisenauer *et al.*, 1996; Wu & Newton, 1997), apresentam promotores regulados por σ^{32} , mas não contêm o elemento CIRCE.

Dois promotores foram inicialmente descritos na região regulatória de *groESL* de *C. crescentus*, denominados P1 e P2 (Avedissian & Gomes, 1996). As sequências -10 e -35 de P1 não apresentaram forte consenso com outros promotores de *C. crescentus* ou *E. coli* e o provável transcrito obtido a partir dele não apresentava indução em condições de choque térmico. Neste trabalho, o experimento de extensão de oligonucleotídeo marcado foi repetido em condições um pouco diferentes (oligonucleotídeo iniciador com sequência diferente e transcriptase reversa MMLV ao invés de AMV), não sendo observada a banda correspondente a P1. Confirmando este dado, uma mutação sítio-dirigida na região -35 de P1 foi obtida, e a fusão de transcrição com o gene repórter *lacZ* não demonstrou queda na atividade de β -galactosidase. Portanto, o promotor P2 é considerado o único do operon *groESL* de *C. crescentus*. Mutações sítio-dirigidas em sua região -10 praticamente aboliram a transcrição do gene repórter. Este promotor apresenta sequências -10 e -35 que seguem o consenso para promotores σ^{32} de *E. coli* e os descritos para *C. crescentus* e é fortemente induzido no choque térmico (Avedissian & Gomes, 1996). Neste trabalho, foi demonstrado que o promotor P2 é ativado por σ^{32} , já que numa linhagem com alto número de cópias do gene *rpoH*, que codifica este fator σ de *C. crescentus*, a transcrição de *groESL* aumenta a partir deste promotor. Em consequência, tanto a síntese quanto os níveis da proteína GroEL estão aumentados nesta linhagem. Como controle nestes experimentos em que o produto de *groEL* foi analisado, foi utilizado anticorpo contra a proteína DnaK, cuja expressão mostrou ser dependente de σ^{32} em experimentos de transcrição *in vitro* (Wu & Newton, 1996).

A fim de se determinar o papel do elemento CIRCE na regulação do operon *groESL*, foram realizadas mutações sítio-dirigidas em cada um dos braços da sequência

repetida invertida, sendo a região regulatória contendo estas diferentes mutações clonada à frente do gene repórter *lacZ*. As cepas carregando estas construções, contendo mutações em um ou outro braço de CIRCE, apresentaram-se com atividade de β -galactosidase cerca de 30 % mais elevadas a 30°C em relação à região regulatória selvagem, representada pela construção pMA11. A construção contendo mutações em ambos os braços, que restauraram a complementaridade da sequência das repetições, apresentou atividade de β -galactosidase ainda maior a 30°C (2,5 vezes a atividade obtida com o pMA11). Se o elemento CIRCE fosse responsável pela indução da transcrição durante o choque térmico, o esperado seria que os valores atingidos a 30°C não aumentassem em temperaturas elevadas nos mutantes em CIRCE. O que se observa, porém, é a indução da atividade do promotor a 42°C nas linhagens contendo as fusões com mutações em CIRCE. Portanto, este elemento não é o responsável pela indução por choque térmico de *groESL* em *C. crescentus*. Em *B. subtilis*, mutações em CIRCE fazem com que a atividade dos promotores dos operons *dnaK* e *groE* a temperaturas normais seja comparável àquela observada no choque térmico, sem haver maior indução nesta última condição (Zuber & Schumman, 1994).

Para confirmar a indução por choque térmico das fusões de transcrição contendo mutações em CIRCE, extratos de células marcadas com pulsos de metionina radioativa obtidos da linhagem NA1000 contendo os plasmídeos pMA11, pRB19, pRB20, pRB21 e pRB22 crescendo a 30°C e durante diferentes tempos de exposição a 40°C foram imunoprecipitados com soro anti- β -galactosidase. Em todos os casos, a síntese de β -galactosidase aumentou no choque térmico, em relação à síntese na temperatura normal de crescimento. A síntese de β -galactosidase da linhagem portadora do pMA11 aumentou aproximadamente treze vezes após 15 minutos a 40°C, em relação a 30°C e, após 120 minutos a 40°C, a síntese ainda estava bastante elevada. A linhagem contendo o pRB22 apresentou um perfil de indução semelhante, exceto pela síntese já aumentada em relação ao pMA11 a 30°C. As outras fusões de transcrição com mutações em CIRCE tiveram aumento da síntese de β -galactosidase no choque térmico, porém não tão acentuada (cerca de 3,5 vezes o valor a 30°C) e a queda após tempos longos de choque térmico foi mais rápida. Estes resultados podem sugerir uma meia-vida menor para os mensageiros codificando a β -galactosidase nos mutantes em CIRCE, já que este elemento é transcrito, estando presente no mRNA.

A atividade de β -galactosidase da linhagem LS2293 (*hrcA*⁻) portadora da fusão de transcrição pMA11 foi maior do que na NA1000 contendo o mesmo plasmídeo, e esse valor também foi aumentado no choque térmico, sugerindo um papel negativo da proteína HrcA na regulação de *groESL* em nível de transcrição. Os níveis da proteína GroEL são cerca de cinco vezes maiores a 30°C na LS2293 que na NA1000, refletindo o aumento observado na síntese. No choque térmico, a síntese de GroEL aumenta de maneira semelhante nas duas linhagens, o que vem mais uma vez confirmar que o sistema CIRCE/HrcA não é o responsável pela indução do operon *groESL* de *C. crescentus* durante o choque térmico.

Os resultados da atividade de β -galactosidase da linhagem LS2293 contendo as fusões de transcrição com mutações em CIRCE não apresentaram o resultado esperado. Já que esta linhagem não possui a proteína HrcA, acreditava-se que qualquer das construções com mutações em CIRCE tivessem o mesmo grau de desrepressão que o pMA11, em relação à linhagem NA1000. Células da linhagem LS2293 portando as fusões de transcrição com mutações no braço esquerdo de CIRCE apresentaram menor atividade de β -galactosidase que o obtido com esta linhagem portando a fusão selvagem. Essas observações podem sugerir mais uma vez a ocorrência de um outro nível de controle além do transcricional, possivelmente uma desestabilização do RNA mensageiro contendo estas mutações na linhagem LS2293, ou seja, na ausência de HrcA e na presença de níveis maiores de GroEL e provavelmente GroES. Este efeito não foi observado com as fusões de tradução, que representam melhor a sequência 5' não traduzida do operon *groESL*, podendo-se inferir que a provável desestabilização desses mRNAs foi ocasionada não só pelas mutações propriamente ditas, mas por um efeito conjunto das sequências presentes na porção não-traduzida do mRNA de *lacZ* presente no vetor *placZ/290*.

A expressão do operon *groESL* durante o ciclo celular passa a ser constitutiva quando a proteína HrcA está ausente, indicando um papel para esta proteína em condições normais de crescimento. A síntese constitutiva de β -galactosidase durante o ciclo celular a partir das fusões de transcrição com mutações em CIRCE já havia sido observada anteriormente (Avedissian, 1996; Baldini *et al.*, 1998), confirmando que o sistema CIRCE/HrcA age na transcrição do operon *groESL*. A regulação temporal de *groESL* não pode ser atribuída ao fator σ^{32} , pois os outros promotores regulados por este fator σ (*rpoH*,

hrcA-grpE) têm expressão constitutiva a temperaturas normais. O operon *dnaKJ* apresenta regulação temporal, com um perfil diferente de *groESL*, mas a partir do promotor regulado pelo fator sigma vegetativo, e não a partir de P1, regulado por σ^{32} (Avedissian *et al.*, 1995).

A transcrição de *hrcA* também é 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). A síntese de HrcA também parece ser constitutiva. A maior quantidade de HrcA imunoprecipitada no início do ciclo celular pode ser devido à resposta ao choque térmico que normalmente acontece quando as células são sincronizadas, pois as centrifugações para o isolamento das células móveis são feitas a 4°C, e a incubação para que estas retomem o crescimento e a marcação com ³⁵S-metionina são feitas a 30°C. O promotor de *hrcA* apresenta um consenso para σ^{32} , e sua transcrição pela RNA polimerase contendo este fator sigma pode ser inferida pelo aumento nos níveis de HrcA a 30°C numa linhagem superexpressando σ^{32} e pelo aumento da síntese e, consequentemente, nos níveis da proteína HrcA no choque térmico.

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 parece ser dependente dos níveis disponíveis de GroEL na célula (Mogk *et al.*, 1997), como já apresentado no item 3.2 da Introdução. Portanto, apenas a presença ou não de HrcA não é suficiente para reprimir a transcrição pela ligação em CIRCE. Ensaio de “gel shift” realizados com um fragmento de DNA contendo o elemento CIRCE e a proteína HrcA purificada de *B. subtilis* apresentaram uma banda mais acentuada correspondente ao complexo DNA-proteína quando GroEL foi adicionada (Mogk *et al.*, 1997). Em *Lactococcus lactis*, DnaK também parece ter efeito na atividade de HrcA (Koch *et al.*, 1998). Pela peculiaridade da região regulatória de *groESL* de *C. crescentus* conter tanto um promotor regulado por σ^{32} quanto o elemento CIRCE, o estudo de qual ciclerone molecular modula a atividade de HrcA torna-se mais complicado, devido à dificuldade de se separar os efeitos sobre HrcA e sobre σ^{32} . Se DnaK controla a disponibilidade do fator σ^{32} de *C. crescentus*, como acontece em *E. coli* e como já observado por experimentos preliminares neste laboratório (A.C.A. da Silva, comunicação pessoal), sua ação sobre HrcA não pode ser analisada *in vivo* em linhagens selvagens de *C.*

crescentus, pois o efeito sobre HrcA e, conseqüentemente, sobre a transcrição de *groESL*, poderia ser mascarado pelo efeito sobre σ^{32} .

A ausência de regulação de *groESL* durante o ciclo celular aparentemente não tem efeitos deletérios sobre a célula, pois nenhuma alteração de fenótipo pode ser atribuída ao mutante *hrcA*⁻. Para tentar verificar a existência de outras proteínas cuja expressão fosse controlada pelo sistema CIRCE/HrcA, extratos proteicos marcados com ³⁵S-metionina obtidos de culturas das linhagens NA1000 e LS2293 crescidas a 30°C ou submetidas a choque térmico foram analisados por eletroforese bidimensional. Apenas bandas correspondentes a GroEL e GroES apresentaram-se aumentadas na linhagem LS2293 (*hrcA*⁻). Aparentemente, nenhuma outra proteína capaz de ser detectada neste tipo de experimento encontra-se sob o controle de HrcA. Portanto, a regulação temporal de *groESL* deve ser importante para a célula, mesmo que por razões ainda pouco evidentes, já que um sistema de controle provavelmente exclusivo está sendo mantido nesta bactéria apenas para regular a síntese dos produtos desses genes.

Devido à função de chaperonina de GroEL/GroES, estas proteínas provaram ser essenciais em *E. coli* não apenas em condições de choque térmico, mas também em temperaturas normais de crescimento (Fayet *et al.*, 1989). Tentativas de se obter um mutante nulo de *groEL* em *C. crescentus* falharam, e uma linhagem com o gene cromossômico interrompido só pôde ser construída quando uma cópia selvagem foi fornecida *in trans*, concluindo-se assim que GroEL é uma proteína essencial também em *C. crescentus*, a temperaturas normais de crescimento.

Como a maior expressão do operon *groESL* acontece na célula pré-divisional, provavelmente é nesta célula que sua função é mais necessária. Neste ponto do ciclo celular de *C. crescentus*, as células estão se alongando, o cromossomo já está duplicado, ocorre transcrição diferencial nos dois pólos da célula, o flagelo é montado no pólo que dará origem à célula móvel e as fimbrias e a maquinaria quimiotática também estão sendo formadas. Um dos eventos mais marcantes é a montagem do flagelo, que requer a transcrição sequencial de vários genes, bem como o endereçamento de seus produtos para um sítio específico no envelope celular. Algumas proteínas são ancoradas na membrana interna, outras no espaço periplasmático e na membrana externa, sendo que o gancho e o filamento são exportados ao espaço extracelular (Gober & Marques, 1995). Uma estrutura

deste modo complexa provavelmente necessita de chaperones moleculares para o dobramento e localização corretos de suas subunidades.

No espiroqueta *Borrelia burgdorferi*, onde o filamento do flagelo se localiza no espaço periplasmático, DnaK (que os autores denominam Hsp70) liga flagelinas entre 33°C (temperatura normal) e 41°C e forma-se um complexo no qual também se inclui GroEL (Hsp60), de maneira independente de ATP (Scorpio *et al.*, 1994). Os autores deste trabalho sugerem que uma das principais funções das GroEL e DnaK seja o processamento da flagelina. Um experimento de co-imunoprecipitação de proteínas semelhante ao descrito em *B. burgdorferi* foi realizado com extratos de *C. crescentus*, porém muitas proteínas foram co-imunoprecipitadas em condições não desnaturantes com os soros policlonais anti-GroEL e anti-DnaK de *C. crescentus*, não se podendo afirmar com certeza se algumas delas seriam componentes do flagelo (dados não mostrados). A imunoprecipitação com o soro anti-flagelinas apresentou uma banda correspondente a uma proteína de cerca de 70 kDa, com migração em gel compatível à DnaK de *C. crescentus*, mas nenhuma banda comparável à GroEL foi observada. Esta banda de 70 kDa também pode representar a proteína do gancho do flagelo. Em *E. coli*, as proteínas DnaK e DnaJ são essenciais para a montagem do flagelo desta bactéria (Shi *et al.*, 1992), mas pouco se sabe sobre a função de GroEL neste mecanismo.

A linhagem SG300 de *C. crescentus*, obtida neste trabalho, é um mutante condicional do operon *groESL*. Em condições restritivas, ou seja, na ausência de xilose no meio, não ocorre a síntese de GroEL, devido ao silenciamento da transcrição do operon *groESL*. As culturas param de crescer mais cedo que em condições permissivas, as células tornam-se alongadas, diminuindo consideravelmente o número de células viáveis. A motilidade é mantida em parte da população, sugerindo que a montagem do flagelo é independente da presença de grandes quantidades de GroEL disponíveis na célula. Portanto, não se pode concluir que a maior síntese de GroEL na célula pré-divisional ocorra em função de uma demanda aumentada da chaperonina em função da montagem do flagelo.

Um mutante condicional de *groESL* de *E. coli* apresenta um comportamento diferente do observado em *C. crescentus*. Culturas desta linhagem de *E. coli* em condições restritivas apresentam crescimento exponencial em meio líquido por duas horas, o crescimento continua numa taxa decrescente por mais uma hora e meia (totalizando cerca

de 10 gerações) e as células lisam abruptamente após este período, devido a uma falha na síntese da parede celular (McLennan & Masters, 1998). Os autores demonstraram que esta falha se deve à ausência do ácido diaminopimérico (DAP), aminoácido presente no peptidoglicano da parede celular. Genes que codificam enzimas da via de biossíntese de DAP foram superexpressos antes da depleção de GroEL, e as culturas nas quais a enzima DapA (dihidropicolinato sintase) estava presente em excesso levaram várias horas a mais para que a lise celular ocorresse. Imediatamente antes da lise, o nível de DapA era reduzido a 16% do normal. Foi o primeiro relato de uma proteína essencial cujos níveis dependem de GroES e GroEL.

Apesar da falha na divisão celular, inferida pela presença de células alongadas, as culturas da linhagem SG300 de *C. crescentus* não apresentaram lise celular como observado em *E. coli*. O ácido diaminopimérico está presente no peptidoglicano da parede celular de *Caulobacter* (Poindexter, 1981) e uma sequência de nucleotídeos que traduzida apresenta alta similaridade com a proteína DapA de *E. coli* está presente em um contig sequenciado no projeto genoma de *C. crescentus* (www.tigr.org), ainda não finalizado. Se a biossíntese da parede celular de *C. crescentus* passar obrigatoriamente pela via onde a enzima DapA exerce sua função, esta não depende de altos níveis de GroEL, como demonstrado em *E. coli*. Por outro lado, a possibilidade de vias alternativas para a biossíntese de DAP não pode ser descartada, já que ainda não se encontram na literatura estudos sobre estas vias em *C. crescentus*. Outra possibilidade é que a camada S, uma estrutura paracristalina constituída da proteína RsaA que recobre externamente a parede celular de *C. crescentus* (Gilchrist *et al.*, 1992), proteja as células da lise.

Outra função de GroEL em *E. coli* é seu envolvimento com a translocação de peptídeos através da membrana desta bactéria (Kumamoto, 1991). Foi demonstrado que GroEL está associada à membrana de *E. coli* por meio de interação com a proteína SecA (Bochkareva *et al.*, 1998), que por sua vez interage com o complexo de membrana formado por SecYEG (Economou, 1998). A função postulada para GroEL é que ela facilitaria o retorno de SecA para o citossol após a entrega do peptídeo a ser transportado através do complexo de membrana (Bochkareva *et al.*, 1998).

Em *Caulobacter crescentus*, um mutante do gene *secA* foi isolado pela falha da bactéria em completar o ciclo celular a 37°C (Kang & Shapiro, 1994). A linhagem

termossensível apresenta um bloqueio na progressão do ciclo durante a transição de célula móvel para célula talo, o cromossomo inicia mas não termina a replicação e não há a síntese de flagelinas ou formação de talo. Após o retorno à temperatura permissível, porém, o ciclo se completa. Esta linhagem apresenta indução permanente das proteínas de choque térmico na temperatura restritiva, assim como outra linhagem termossensível, que apresenta o RNA 4.5S mutado (Winzeler *et al.*, 1997). Este RNA também pode interagir com peptídeos nascentes a serem translocados através da membrana. Winzeler *et al.* (1997) sugerem que um ponto de controle ("checkpoint") do ciclo celular impede a progressão no ciclo em resposta a níveis aumentados de proteínas desnaturadas ou de choque térmico. Comparações dessas duas linhagens termossensíveis com a linhagem SG300 podem trazer informações importantes sobre este provável ponto de controle sobre o ciclo celular.

Outra observação feita na linhagem SG300 em condições restritivas é o aumento nos níveis das proteínas de choque térmico DnaK, σ^{32} e HrcA no decorrer do tempo. Isto deve ocorrer devido ao aumento de proteínas desnaturadas na célula, pela ausência de GroES/GroEL, que a célula possivelmente interpreta como uma condição de estresse, ativando o regulon de σ^{32} numa tentativa de reequilibrar o ambiente intracelular.

A transcrição de um gene repórter controlado pela região regulatória de *groESL* na linhagem SG300 em condições restritivas pode trazer informações sobre a auto-regulação deste operon. Num experimento preliminar, a síntese de β -galactosidase no decorrer do tempo foi estimada na linhagem SG300 portadora das fusões de transcrição pMA11 ou pRB21. Em condições permissivas, a síntese de β -galactosidase, como um indicador da transcrição do gene repórter *lacZ* sob o controle da região regulatória de *groESL* selvagem ou com mutações em CIRCE, apresentou-se constante em cinco horas de crescimento a 30°C. Já em condições restritivas, onde não há síntese de GroES e GroEL, a síntese de β -galactosidase aumentou no decorrer do tempo, de forma mais acentuada na linhagem portadora do pMA11. Há dois possíveis mecanismos de controle: o primeiro reflete o aumento da síntese de σ^{32} , pois a célula privada de GroES e GroEL deve acumular proteínas desnaturadas e a resposta a isso seria a indução da resposta ao choque térmico, como indicado pelo aumento nos níveis de DnaK e do próprio fator σ^{32} . O segundo mecanismo, menos evidente, seria devido à indisponibilidade de GroEL para interagir com HrcA, fazendo com que esta proteína não atinja sua conformação ativa, não se ligando ao

elemento CIRCE e desreprimindo a transcrição do promotor de *groESL*. Com a fusão de transcrição que apresenta o elemento CIRCE mutado (pRB21), o efeito sobre HrcA não deveria ser notado, restando apenas a elevação da atividade do promotor por σ^{32} . O esperado, então, seria que as duas linhagens tivessem um comportamento diferente, o que foi confirmado. Este resultado sugere que a ausência de GroEL pode levar à inativação de HrcA, desreprimindo a transcrição do gene repórter *lacZ* na construção pMA11, indicando que, como em *B. subtilis*, a atividade de HrcA pode ser regulada positivamente pelos níveis de GroEL.

Não foi possível obter informações sobre as funções de GroEL a partir da análise do fenótipo das linhagens contendo diferentes alelos de *groEL* com mutações pontuais. Estas linhagens não se mostraram termossensíveis, a motilidade e a capacidade quimiotática se mantiveram tanto a 30°C quanto a 37°C e nenhuma alteração morfológica foi observada. Uma única alteração notada foi o crescimento de colônias menores e em menor número a 37°C da linhagem com o alelo mutado no aminoácido 191 em meio PYE sólido contendo o antibiótico ácido nalidíxico. Um dos fatores que podem influenciar a análise dessas linhagens é a presença de mais de uma cópia do operon *groESL* mutagenizado, pois estes foram fornecidos *in trans* em um plasmídeo com número de cópia entre 5 e 8 em *C. crescentus*. Isso pode resultar na superexpressão dos alelos mutantes e a maior quantidade de GroEL pode compensar sua atividade menos eficiente, mascarando um possível fenótipo. Outros estudos se fazem necessários para analisar o efeito destas mutações pontuais em GroEL de *C. crescentus*.

CONCLUSÕES

Este trabalho permitiu o maior entendimento da regulação do operon *groELS* de *Caulobacter crescentus* e criou a possibilidade de se analisar a função deste operon durante o ciclo celular desta bactéria. As conclusões obtidas estão listadas a seguir.

- A transcrição de *groESL*, induzida por choque térmico, ocorre a partir de apenas um promotor, reconhecido pela RNA polimerase contendo o fator σ^{32} .
- O sistema CIRCE/HrcA controla a expressão temporal do operon *groESL*, sem ter papel importante na indução por choque térmico.
- Mutações em CIRCE ou ausência de HrcA não alteram a posição do início de transcrição de *groESL*.
- A síntese e os níveis de HrcA aumentam no choque térmico, mas sua síntese não varia durante o ciclo celular, indicando uma provável regulação na atividade desta proteína por fatores ainda desconhecidos. Resultados preliminares sugerem que GroEL pode atuar positivamente sobre HrcA.
- A proteína HrcA aparentemente só está envolvida na regulação da expressão de GroES e GroEL em *C. crescentus*.
- GroEL é uma proteína essencial em *C. crescentus*, mesmo a temperaturas normais de crescimento.
- A ausência de GroEL provoca o bloqueio da progressão do ciclo celular e o acúmulo de DnaK, σ^{32} e HrcA a temperaturas normais de crescimento.
- Mutações pontuais nos códons correspondentes aos aminoácidos 173, 191, 201 e 337 de GroEL não ocasionaram alteração fenotípica detectável, exceto um crescimento mais lento da cepa contendo a mutação no aminoácido 191, na presença de ácido nalidíxico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEY, M.R.K.; GOMES, S.L.; ALEXANDER, W.; SHAPIRO, L. 1991. Genetic analysis of a temporally transcribed chemotaxis gene cluster in *Caulobacter crescentus*. *Genetics*, 129: 333-342.
- AVEDISSIAN, M. & GOMES, S.L. 1996. Expression of the *groESL* operon is cell cycle controlled in *Caulobacter crescentus*. *Mol. Microbiol.*, 19: 79-89.
- AVEDISSIAN, M. 1996. *Regulação dos genes groES e groEL em Caulobacter crescentus*. Tese de Doutorado, Instituto de Química, Universidade de São Paulo.
- AVEDISSIAN, M.; LESSING, D.; GOBER, J.W.; SHAPIRO, L. & GOMES, S.L. 1995. regulation of the *Caulobacter crescentus* *dnaKJ* operon. *J. Bacteriol.*, 177: 3479-3484.
- AZEM, A.; KESEL, M. & GOLOUBINOFF, P. 1994. Characterization of a functional GroEL₁₄ (GroES₇)₂ chaperonin hetero-oligomer. *Science*, 265: 653-656.
- BABST, M.; HENNECKE, H. & FISCHER, H. 1996. Two different mechanisms are involved in the heat-shock regulation of chaperonin gene expression in *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol. Microbiol.*, 19:827-839.
- BALDINI, R.L.; AVEDISSIAN, M. & GOMES, S.L. 1998. The CIRCE element and its putative repressor control cell cycle expression of the *Caulobacter crescentus* *groESL* operon. *J. Bacteriol.* 180:1632-1641.
- BIRBOIM, H.C. & DOLY, J.A. 1979. A rapid alcalyne extraction procedure to screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.*, 7: 1513-1523.
- BOCHKAREVA, E.S.; SOLOVIEVA, M.E. & GIRSHOVICH, A.S. 1998. Targeting of GroEL to SecA on the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Proc. natl. Acad. Sci. USA*, 95: 478-483.
- BRUN, Y.V.; MARCZYNSKI, G. & SHAPIRO, L. 1994. The expression of assymetry during *Caulobacter* cell differentiation. *Annu. Rev. Biochem.*, 63: 419-450.
- BUCCA, G.; FERINA, G.; PUGLIA, A.M. & SMITH, C.P. 1995. The *dnaK* operon of *Streptomyces coelicolor* encodes a novel feat-shock protein which binds to the promoter region of the operon. *Mol. Microbiol.*, 17:663-674.
- BUCCA, G.; HINDLE, Z. & SMITH, C.P. 1997. Regulation of the *dnaK* operon of *Streptomyces coelicolor* A3(2) is governed by HspR, an autoregulatory repressor protein. *J. Bacteriol.*, 179:5999-6004.
- BUKAU, B. & HORWICH, A.L. 1998. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell*, 92: 351-366.
- BRAIG, K. 1998. Chaperonins. *Curr. Opinion Structural Biol.*, 8: 159-165.

- BURNETT, B.P.; HORWICH, A.L. & LOW, K.B. 1994. A carboxi-terminal deletion impairs the assembly of GroEL and confers a pleiotropic phenotype in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.*, 176: 6980-6985.
- CHATAWAY, T.K. & BARRIT, G.J. 1995. Purification of histidine-tagged *ras* and its use in the detection of *ras* binding proteins. *Mol. Cell Biochem.*, 144: 167-173.
- CHEN, W. & KUO, T. 1993. A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA. *Nucleic Acids Res.*, 21: 2260.
- DANESE, P.N. & SILHAVY, T.J. 1997. The σ^E and Cpx signal transduction systems control the synthesis of periplasmic protein-folding enzymes. *Genes Dev.*, 11: 1183-1193.
- DE LAS PEÑAS, A.; CONNOLLY, L. & GROSS, C.A. 1997. SigmaE is an essential sigma factor in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 179: 6862-6824.
- DERRÉ, I.; RAPOPORT, G. & MSADEK, T. 1998. CtsR, a novel regulator of stress and heat shock response, controls *clp* and molecular chaperone gene expression in Gram-positive bacterium. *Mol. Microbiol.*, 31: 117-131.
- DINGWALL, A.; GOBER, J.W. & SHAPIRO, L. 1990. Identification of a *Caulobacter* basal body structural gene and a *cis*-acting site required for activation of transcription. *J. Bacteriol.*, 172: 6066-6076.
- DITTA, G.; STANFIELD, S.; CORBIN, D. & HELINSKY, D.R. 1980. Broad host range cloning system for Gram-negative bacteria: construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 77: 7347-7351.
- DUCHÊNE, A.M.; THOMPSON, C.J. & MAZODIER, P. 1994. Transcriptional analysis of *groEL* genes in *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Gen. Genet.*, 245: 61-68.
- ECONOMOU, A. 1998. Bacterial preprotein translocase: mechanism and conformational dynamics of a processive enzyme. *Mol. Microbiol.*, 27: 511-518.
- EVINGER, M. & AGABIAN, N. 1977. Envelope-associated nucleoid from *Caulobacter crescentus* stalked and swarmer cells.. *J. Bacteriol.*, 132: 294-301.
- EWALT, K.L.; HENDRICK, J.P.; HOURY, W.A. & HARTL, F.U. 1997. In vivo observation of polypeptide flux through the bacterial chaperonin system. *Cell*, 90: 491-500.
- FAYET, O.; ZIEGELHOFFER, T. & GEORGOPOULOS, C. 1989. The *groES* and *groEL* heat shock gene products of *Escherichia coli* are essential for growth at all temperatures. *J. Bacteriol.*, 171: 1379-1385.
- FERNANDEZ, R.C. & WEISS, A.A. 1995. Cloning and sequencing of the *Bordetella pertussis* *cpn10/cpn60* (*groESL*) homolog. *Gene*, 158: 151-152.
- FISCHER, H.M.; BABST, M.; KASPAR, T.; ACUÑA, G. ARIGONI, F. & HENNECKE, H. 1993. One member of a *groESL*-like chaperonin multigene family in *Bradyrhizobium japonicum* is co-regulated with symbiotic nitrogen fixation genes. *EMBO J.*, 12: 2901-2912.

- GEORGOPOULOS, C., LIBEREK, K.; ZYLICZ, M. & 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. & Georgopoulos, C. 1994. *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- GIBSON, T.J. 1984. *Studies on the Epstein-Barr virus genome*. PhD thesis, Cambridge University, England.
- GILCHRIST, A.; FISCHER, J.A. & SMIT, J. 1992. Nucleotide sequence analysis of the gene encoding the *Caulobacter crescentus* paracrystalline surface layer protein. *C.J. Microbiol.*, 38: 193-202.
- GOBER, J.W. & MARQUES, M.V. 1995. Regulation of cellular differentiation in *Caulobacter crescentus*. *Microbiol. Rev.*, 59: 31-47.
- GOBER, J.W. & 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.; GOBER, J.W. & SHAPIRO, L. 1990. Expression of the *Caulobacter* heat shock gene *dnaK* is developmentally controlled during growth at normal temperatures. *J. Bacteriol.*, 172: 3051-3059.
- GOMES, S.L.; JULIANI, M.H.; MAIA, J.C. & SILVA, A.M. 1986. Heat shock protein synthesis during development in *Caulobacter crescentus*. *J. Bacteriol.*, 168: 923-930.
- GRANDVALET, C.; DE CRECY-LAGARD, V. & MAZODIER, P. 1999. The ClpB ATPase of *Streptomyces albus* G belongs to the HspR heat shock regulon. *Mol. Microbiol.*, 31: 521-532.
- GRANDVALET, C.; RAPOPORT, G. & MAZODIER, P. 1998. *hrcA*, encoding the repressor of the *groEL* genes in *Streptomyces albus* G, is associated with a second *dnaJ* gene. *J. Bacteriol.*, 180: 5129-5134.
- HANAHAN, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.*, 166: 557.
- HECKER, M.; SCHUMANN, W. & VÖLKER, U. 1996. Heat-shock and general stress response in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.*, 19: 417-428.
- HOMUTH, G.; MASUDA, S.; MOGK, A.; KOBAYASHI, Y. & SCHUMANN, W. 1997. The *dnaK* operon of *Bacillus subtilis* is heptacistronic. *J. Bacteriol.*, 179: 1153-1164.
- HUANG, X.; FREDERICK, K.L. & HELMANN, J.D. 1999. Promoter recognition by *Bacillus subtilis* σ^W : autoregulation and partial overlap with the σ^X regulon. *J. Bacteriol.*, 180: 3765-3770.
- JENAL, U. & FUCHS, T. 1998. An essential protease involved in bacterial cell-cycle control. *EMBO J.*, 19: 5658-5669.
- JOHNSON, R.C. & ELY, B. 1977. Isolation of spontaneously derived mutants of *Caulobacter crescentus*. *Genetics*, 86: 25-32.

- KELLY, A.J.; SACKETT, M.J.; DIN, N.; QUARDOKUS, E. & BRUN, Y.V. 1998. Cell cycle-dependent transcriptional and proteolytic regulation of FtsZ in *Caulobacter*. *Genes Dev.*, 15:880-893.
- KOCH, B.; KILSTRUP, M.; VOGENSEN, F.K. & HAMMER, K. 1998. Induced levels of heat shock proteins in a *dnaK* mutant of *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.*, 180: 3873-3881.
- KUNG, P.J. & SHAPIRO, L. 1994. Cell cycle arrest of a *Caulobacter crescentus* *secA* mutant. *J. Bacteriol.*, 176: 4958-4965.
- KALLIPOLITIS, B.H. & VALENTIN-HANSEN, P. 1998. Transcription of *rpoH* encoding the *Escherichia coli* heat-shock regulator σ^{32} , is negatively controlled by the cAMP-CRP/CytR nucleoprotein complex. *Mol. Microbiol.*, 29: 1091-1099.
- KUNKEL, T.A.; ROBERTS, J.D. & ZAKOUR, R.A. 1987. Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Methods Enzymol.*, 154: 367-382.
- KUSUKAWA, N.; YURA, T.; UEGUCHI, C.; AKIYAMA, Y. & ITO, K. 1989. Effects of mutations in heat-shock genes *groES* and *groEL* on protein export in *Escherichia coli*. *The EMBO J.*, 8: 3517-3521.
- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 676 - 685.
- LAINE, P.S. & MEYER, R.R. Interaction of heat shock protein GroEL of *Escherichia coli* with single-stranded DNA-binding protein: suppression of *ssb-113* by *groEL46*. *J. Bacteriol.*, 174: 3204-3211.
- LINDQUIST, S. & CRAIG, E.A. 1988. The heat shock proteins. *Annu. Rev. Genet.*, 22: 631-677.
- MAGUIRE, M.; YERKO, V.N.; WALLINGTON, E.J. & LUND, P.A. 1998. Investigations into the differential regulation of the chaperonin genes of *Rhizobium leguminosarum*. Resumo apresentado no encontro *Molecular Chaperones and the Heat Shock Response*, Cold Spring Harbor Laboratory, 6-10 maio 1998, p.159.
- MANDEL, M. & HIGA, A. 1970. Calcium dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.*, 53:159.
- MARSHAK, D.R.; KADONAGA, J.T.; BURGESS, R.; KNUTH, M.W.; BRENNAN JR., W.A.; LIN, S. 1996. *Strategies for protein Purification and Characterization. A Laboratory Course manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- McLENNAN, N. & MASTERS, M. 1998. GroE is vital for cell-wall synthesis. *Nature*, 392: 139.
- MEISENZAHN, A.; SHAPIRO, L. & JENAL, U. 1997. Isolation and characterization of a xylose-dependent promoter from *Caulobacter crescentus*. *J. Bacteriol.*, 179: 592-600.
- MESSING, J. 1983. New M13 vectors for cloning. *Methods Enzymol.*, 101:20.
- MILLER, J.M. 1972. *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratories.

- MINDER, A.; NARBERHAUS, F.; FISCHER, H.M. & HENNECKE, H. 1998. The role of CIRCE and HrcA in the heat shock regulatory network of *Bradyrhizobium japonicum*. Resumo apresentado no encontro *Molecular Chaperones and the Heat Shock Response*, Cold Spring Harbor Raboratory, 6-10 maio 1998, p.177.
- MISSIAKAS, D. & RAINA, S. 1998. The extracytoplasmatic sigma factors: role and regulation. *Mol. Microbiol.*, 28: 1059-1066.
- MISSIAKAS, D.; MAYER, M.P.; LEMAIRE, M.; GEORGOPOULOS, C. & RAINA, S. 1997. Modulation of the *Escherichia coli* σ^E (RpoE) heat-shock transcription-factor activity by the RseA, RseB e RseC proteins. *Mol. Microbiol.*, 24: 355-371.
- MOGK, A.; HOMUTH, G.; SCHOLZ, C.; KIM, L.; SCHID, F.X. & 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.
- NARBERHAUS, F.; KASER, R., NOCKER, A. & HENNECKE, H. 1998. A novel DNA element that controls bacterial heat shock gene expression. *Mol. Microbiol.*, 28: 315-323.
- NARBERHAUS, F.; KRUMMENACHER, R.; FISCHER, H.M. & HENNECKE, H. 1997. Three disparately regulated genes for σ^{32} -like transcription factors in *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol. Microbiol.*, 24: 93-104.
- NISHIMURA, A.; MORITA, M.; NISHIMURA, Y. & SUGINO, Y. 1990. A rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells. *Nucleic Acids Res.*, 18: 6169.
- OGAWA, J. & LONG, S.R. 1995. The *Rhizobium meliloti* *groELc* locus is required for regulation of early *nod* genes by the transcription activator NodD. *Genes Dev.*, 9: 714-729.
- POINDEXTER, J.S. 1981. The caulobacters: ubiquitous unusual bacteria. *Microbiol. Rev.*, 45: 1223-179.
- PRENTKI, P. & KRISCH, H.M. 1984. In vitro insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. *Gene*, 29: 303-313.
- QUON, K.C.; MARCZYNSKY, G.T. & SHAPIRO, L. 1996. Cell cycle control by an essential bacterial two-component signal transduction protein. *Cell*, 84: 83-93.
- RAINA, S.; MISSIAKAS, D. & GEORGOPOULOS, C. 1995. The *rpoE* encoding the σ^E (σ^{24}) heat shock sigma factor of *Escherichia coli*. *EMBO J.*, 14: 1043-1055.
- REINSENAUER, A.; MOHR, C.D. & SHAPIRO, L. 1996. Regulation of a heat shock σ^{32} gene homolog in *Caulobacter crescentus*. *J. Bacteriol.*, 178: 1919-1927.
- REUTER, S.H. & SHAPIRO, L. 1987. Asymmetric segregation of heat-shock proteins upon cell division in *Caulobacter crescentus*. *J. Mol. Biol.*, 194: 653-622.
- RITOSSA, F. 1962. A new puffing pattern induced by heat shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia*, 18: 571-573.
- ROBERTS, R., TOOCHINDA, C.; AVEDISSIAN, M.; BALDINI, R.L.; GOMES, S.L. & SHAPIRO, L. 1996. Identification of a *Caulobacter crescentus* operon encoding

- hrcA*, involved in negatively regulating heat-inducible transcription, and the chaperone gene *grpE*. *J. Bacteriol.*, 178: 1829-1841.
- ROUVIÈRE, P.E.; DE LAS PEÑAS, A.; MECSAS, J.; LU, C.Z.; RUDD, K.E. & GROSS, C.A. 1995. *rpoE*, the gene encoding the second heat-shock sigma factor, σ^E , in *Escherichia coli*. *EMBO J.*, 14: 1032-1042.
- RUNSANGANWA, E. & GUPTA, R.S. 1993. Cloning and characterization of multiple *groEL* chaperonin-encoding genes in *Rhizobium meliloti*. *Gene*, 126: 67-75.
- SAMBROOK, J.; FRITCH, E.F.; MANIATIS, T. 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Segunda edição, Cold Spring Harbor Laboratory press.
- SANGER, F.; NICKLEN, S. & COULSON, A.R. 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74: 5463-5467.
- SCHULZ, A. & 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.
- SCORPION, A.; JOHNSON, P.; LAQUERRE, A. & NELSON, D.R. 1994. Subcellular localization and chaperone activities of *Borrelia burgdorferi* Hsp60 and Hsp70. *J. Bacteriol.*, 176: 6449-6456.
- SEGAL, G. & RON, E.Z. 1993. Heat-shock transcription of the *groESL* operon of *Agrobacterium tumefaciens* may involve a hairpin-loop structure. *J. Bacteriol.*, 175: 3083-3088.
- SEGAL, G. & RON, E.Z. 1995. The *dnaK* operon of *Agrobacterium tumefaciens*: transcriptional analysis and evidence for a new heat shock promoter. *J. Bacteriol.*, 177: 5952-5958.
- SEGAL, G. & RON, E.Z. 1996a. Heat shock activation of the *groESL* operon of *Agrobacterium tumefaciens* and the regulatory roles of the inverted repeat. *J. Bacteriol.*, 178: 3634-3640.
- SEGAL, G. & RON, E.Z. 1996b. Regulation and organization of the *groE* and *dnaK* operons in Eubacteria. *FEMS Microbiol. Lett.*, 138: 1-10.
- SHAPIRO, L. 1994. The control of timing and spatial organization during *Caulobacter* cell differentiation. *The Harvey Lectures Series*, 88: 23-48.
- SHI, W.; ZHOU, Y.; WILD, J.; ADLER, J. & GROSS, C. 1992. DnaK, DnaJ, and GrpE are required for flagellum synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 174: 6256-6263.
- SIMON, R.; PRIEFER, U. & PÜHLER, A. 1983. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Biotechnology*, 1: 784-790.
- TISSIÈRES, A.; MITCHEL, K.H. & TRACY, U.M. 1974. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*. Relation to chromosome puffs. *J. Mol. Biol.*, 84: 389-398.
- TODD, M.J.; VIITANEN, P.V. & LORIMER, G.H. 1994. Dynamics of the chaperonin ATPase cycle: implications for facilitated protein folding. *Science*, 265: 659-666.

- WALLINGTON, E.J. & LUND, P.A. 1994. *Rhizobium leguminosarum* contains multiple chaperonin (cpn60) genes. *Microbiology*, 140: 113-122.
- WINZELER, E; WHEELER, R. & SHAPIRO, L. 1997. Transcriptional analysis of the *Caulobacter* 4.5S RNA *ffs* gene and the physiological basis of an *ffs* mutant with a Ts phenotype. *J. Mol. Biol.*, 272: 665-676.
- WRIGHT, R.; STEPHENS, C.; ZWEIGER, G.; SHAPIRO, L. & ALLEY, M.R. 1996. *Caulobacter* Lon protease has a critical role in cell-cycle control of DNA methylation. *Genes Dev*, 10:1532-1542.
- WU, J. & NEWTON, A. 1996. Isolation, identification, and transcriptional specificity of the heat shock sigma factor σ^{32} from *Caulobacter crescentus*. *J. Bacteriol.*, 178: 2094-2101.
- WU, J.; OHTA, N. & NEWTON, A. 1998. An essential, multicomponent signal transduction pathway required for cell cycle regulation in *Caulobacter*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 1443-1448.
- YUAN, G. & 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* and *dnaK*. *J. Bacteriol.*, 177: 6462-6468.
- ZEILSTRA-RYALLS, J.; FAYET, O. & GEORGOPOULOS, C. 1991. The universally conserved GroE (Hsp60) chaperonins. *Annu. Rev. Microbiol.*, 45: 301-325.
- ZEILSTRA-RYALLS, J.; FAYET, O.; BAIRD, L. & GEORGOPOULOS, C. 1993. Sequence analysis and phenotypic characterization of *groEL* mutations that block λ and T4 bacteriophage growth. *J. Bacteriol.*, 175: 1134-1143.
- ZUBER, U. & 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.

CURRICULUM VITAE

Nome: Regina Lúcia Baldini

Local e data de nascimento: Campinas (SP), 17/09/1969

Educação:

Instituto Educacional Imaculada, 1976-1984

Escola Técnica Estadual “Conselheiro Antonio Prado”, modalidade Bioquímica, 1985-1987

Bacharelado e Licenciatura em Ciências Biológicas, modalidade Biológica

Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 1988 - 1991/1992

Mestrado em Biologia, área Genética

Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 1992 - 1995

Bolsas recebidas:

Iniciação Científica: CNPq, 03/1990 - 02/1992

Mestrado: FAPESP, 03/1992 - 08/1994

Doutorado: CNPq, 03/1995 - 07/1996

FAPESP, 08/1996 - 02/1999

Publicações:

BALDINI, R.L.; AVEDISSIAN, M. & GOMES, S.L. 1998. The CIRCE element and its putative repressor control cell cycle expression of the *Caulobacter crescentus* *groESL* operon. *J. Bacteriol.* 180:1632-1641.

ROBERTS, R., TOOCHINDA, C.; AVEDISSIAN, M.; BALDINI, R.L.; GOMES, S.L. & SHAPIRO, L. 1996. Identification of a *Caulobacter crescentus* operon encoding *hrcA*, involved in negatively regulating heat-inducible transcription, and the chaperone gene *grpE*. *J. Bacteriol.*, 178: 1829-1841.

BALDINI, R.L.; TAHARA, S.T. & ROSATO, Y.B. 1999. A rolling-circle miniplasmid of *Xanthomonas campestris* pv. *glycines*: the nucleotide sequence and its use as a cloning vector. *Plasmid*, no prelo.

FERREIRA, H., BARRIENTOS, F. J. A., BALDINI, R. L. & ROSATO, Y. B. 1994. Electrotransformation in three patovars of *Xanthomonas campestris*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 43: 651-655.