SUELY LOPES GOMES

EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL DURANTE O DESENVOLVIMENTO EM
CAULOBACTER CRESCENTUS

Tese de Livre-Docência Apresentada
ao Departamento de Bioquímica,
Instituto de Química,
Universidade de São Paulo

SÃO PAULO

1986

Agradecimentos

O trabalho apresentado nesta tese foi em grande parte desenvolvido quando da minha estada no laboratório da Dra. Lucille Shapiro, no Albert Einstein College of Medicine, onde tive a oportunidade de colaborar entre outros com William Alexander, Ruth Bryan, Robert Champer e Karen Hahnenberger, além de Peter Nathan, este último pertencente ao laboratório do Dr. Austin Newton, da Princeton University. Gostaria portanto de agradecer o ambiente estimulante e acolhedor que me foi proporcionado durante esse período.

Gostaria ainda de agradecer aos Drs. Maria Helena Juliani e José Carlos da Costa Maia pelo incentivo e colaboração oferecidos após minha volta ao Brasil, proporcionando a continuação do trabalho com Caulobacter, assim como pela leitura do manuscrito desta tese. Agradeço também aos demais integrantes do laboratório pelo apoio constante, em especial a Aline Maria da Silva pela valiosa ajuda com os géis bidimensionais, e a Marli Cunha da Silva e Maria Alves dos Santos pelo imprescindível auxílio técnico.

Os anticorpos utilizados neste trabalho foram gentilmente cedidos pelos Drs. D. E. Koshland, J. Stock, A. Russo (anti-Tar e anti-metilesterase) e C. Georgopoulos (anti-dnaK e anti-groEL).

Este trabalho contou com o auxílio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), do Fogarty International Center (NIH), da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e da Financiadora de Estudos e Projetos (Finep).

Abreviaturas

BSA - albumina bovina sérica

[¹⁴C]aa - mistura de aminoácidos marcados com ¹⁴C

cAMP - adenosina 3',5'-monofosfato

cGMP - guanosina 3',5'-monofosfato

cpm - contagens por minuto

EDTA - ácido etilenodiaminotetraacético

EGTA - ácido etilenoglicol-bis (β-amino etil éter) N,N'
tetraacético

hsp - proteína de choque térmico

Ig G - imunoglobulina G

kb - quilobases

kdal - quilodaltons

MCP - proteína quimiotática metilada

Mr - peso molecular aparente

SDS - dodecil sulfato de sódio

TCA - ácido tricloroacético

Tris - tris-(hidroximetil-aminometano)

Índice

pág

I. Introdução	1
1. Biogênese do flagelo em <u>C. crescentus</u>	3
2. Quimiotaxia - função do flagelo	7
2.1. Receptores do sistema quimiotático	9
2.2. Modificação covalente das proteínas integrais de membrana	11
2.3. Proteínas envolvidas na metilação quimiotática em <u>Caulobacter</u>	15
3. Resposta ao choque térmico	17
3.1. Controle da resposta ao choque térmico	18
3.2. A proteína hsp70 de <u>E.coli</u>	20
3.3. A proteína <u>groEL</u>	21
3.4. Outras hsps de <u>E.coli</u>	22
3.5. Regulação dependente do desenvolvimento das proteínas de choque térmico	23
3.6. Proteínas de choque térmico em <u>C. crescentus</u>	24
II. Materiais e Métodos	26
1. Cepas bacterianas e meios	26
2. Plasmídeos	26
3. Ensaio de complementação	27
4. Ensaio de metilação <u>in vivo</u>	28
5. Atividade de metiltransferase	28
6. Identificação do resíduo de aminoácido metilado	30
7. Atividade de metilesterase	30
8. Ensaio de imunoprecipitação	31

9. Obtenção de vesículas membranares e purificação por imunoafinidade após metilação <u>in vivo</u>	32
10. Metilação <u>in vitro</u> de vesículas membranares flageladas e não flageladas	33
11. Marcação de células com [³⁵ S] -metionina	34
12. Eletroforese em gel	34
13. Materiais	35
III. Resultados	36
1. A maquinaria de metilação envolvida no processo quimiotático de <u>C. crescentus</u>	36
1.1. Mutantes de <u>C. crescentus</u> deficientes em quimiotaxia	36
1.2. Metilação de proteínas nas células selvagens e mutantes	39
1.3. Identificação do defeito do mutante <u>cheR</u>	41
1.4. Identificação do defeito do mutante <u>cheB</u>	45
1.5. Determinação do resíduo de aminoácido metilado	50
1.6. Reação de metilação como função do ciclo celular de <u>Caulobacter</u>	50
1.7. Atividade de metiltransferase, de metilesterase	53
1.8. Síntese das proteínas quimiotáticas metiladas durante o ciclo celular de <u>C. crescentus</u>	56
1.9. Distribuição das proteínas quimiotáticas aceptoras de grupo metila em vesículas flageladas e não flageladas de células do tipo móvel	61
1.9.1. Metilação <u>in vitro</u> das vesículas membranares	

obtidas da célula móvel	61
1.9.2. Metilação <u>in vivo</u> das vesículas membranares da célula móvel	63
1.10. Distribuição das proteínas quimiotáticas aceptoras de grupo metila em vesículas flageladas e não flageladas de células pré-divisionais	66
1.11. Síntese diferencial da proteína com atividade de metilesterase	69
2. Regulação dos genes das flagelinas e da maquinaria de metilação quimiotática	71
2.1. Mutações em <u>flaY</u> e <u>flaE</u> são pleiotrópicas	71
2.1.1. Complementação de mutantes com plasmídeo contendo a região <u>flaYE</u>	71
2.1.2. Síntese das flagelinas	75
2.1.3. Metilação das proteínas quimiotáticas	77
2.2. Estudo da extensão dos genes <u>flaY</u> e <u>flaE</u>	81
2.3. Controle temporal dos genes das flagelinas e dos genes quimiotáticos nas cepas mutantes <u>flaY</u> e <u>flaE</u>	84
3. Expressão das proteínas de choque térmico durante o ciclo celular de <u>Caulobacter</u>	87
3.1. A resposta ao choque térmico em <u>C. crescentus</u> é transitória	87
3.2. Cinética inicial de indução das proteínas de choque térmico	89
3.3. Identificação da hsp62 e da hsp70 de <u>C. crescentus</u> utilizando anticorpos contra as proteínas <u>groEL</u> e	

<u>dnaK</u> de <u>E. coli</u>	89
3.4. Padrão de síntese das proteínas de choque térmico em géis bidimensionais	92
3.5. Resposta ao choque térmico durante o ciclo celular de <u>C. crescentus</u>	92
3.6. Síntese de quatro proteínas de choque térmico a temperaturas normais	97
IV. Discussão	101
V. Resumo	112
VI. Bibliografia	115

I. INTRODUÇÃO

O aparecimento de assimetria numa única célula está entre os eventos mais precoces de um programa de desenvolvimento. O estabelecimento da polaridade celular inclui a expressão diferencial de conjuntos de genes em tempos específicos do ciclo celular e o posicionamento direcionado de seus produtos proteicos na célula. Os mecanismos regulatórios que estão envolvidos neste controle temporal e espacial têm sido estudados na bactéria gram-negativa Caulobacter crescentus. Como esse organismo se presta tanto a uma análise genética quanto bioquímica, torna-se possível definir as bases moleculares de seu processo de diferenciação celular.

O ciclo celular de Caulobacter é caracterizado por uma série de eventos morfogenéticos estágio-específicos como mostra esquematicamente a Figura 1. Durante parte do ciclo esta bactéria apresenta um flagelo polar, vários pili, e é móvel. A célula móvel libera o seu flagelo (Poindexter et al., 1967; Shapiro e Maizel, 1973) e perde seus pili (Shapiro e Agabian-Keshishian, 1970; Smit & Agabian, 1982a) após um período de tempo equivalente a 1/3 do ciclo celular. Um talo é então formado por síntese localizada do envelope celular no sítio previamente ocupado pelo flagelo (Schmidt & Stanier, 1966; Smit & Agabian, 1982b). A célula móvel é incapaz de replicar seu cromossomo, mas quando se inicia a formação do talo a replicação do DNA também é iniciada (Degnan & Newton, 1972). Uma vez terminada a replicação do DNA, um novo flagelo e vários pili são montados no polo celular oposto ao talo na célula pré-divisional. Assim, a célula pré-divisional

Figura 1 - Diagrama do ciclo celular de *Caulobacter crescentus* mostrando o intervalo de síntese, nos blocos, da proteína dos pili (pilin) (Smit & Agabian, 1982), das flagelinas A e B (Agabian et al., 1979) e da proteína do gancho (Osley et al., 1977).

é formada pela distribuição localizada de proteínas estruturais dando origem a uma célula com polos marcadamente diferentes. A divisão celular produz uma célula móvel e uma célula talo. A célula filha do tipo talo inicia imediatamente a replicação do seu DNA, enquanto a célula filha do tipo móvel não pode replicar seu DNA até que tenha perdido o seu flagelo e se transformado numa célula talo, mais adiante no ciclo celular.

Um dos principais eventos de diferenciação neste ciclo celular é a biogênese localizada do flagelo. Os mecanismos que permitem a formação do flagelo e sua subsequente liberação têm sido estudados analisando-se a estrutura do flagelo, identificando-se seus componentes proteicos e mapeando-se e isolando-se os genes que codificam estas proteínas.

1. Biogênese do flagelo em C.crescentus

O flagelo de C.crescentus é composto do corpúsculo basal, do gancho e do filamento do flagelo propriamente dito (Shapiro & Maizel, 1973; Johnson & Ely, 1979; Wagenknecht et al., 1981). Tanto o gancho como o filamento se encontram fora da célula, enquanto o corpúsculo basal está ancorado no envelope celular, atravessando a membrana externa, a camada peptídeo-glicano e a membrana interna ou citoplasmática.

A estrutura do gancho se origina da polimerização de uma única proteína de 70 kdal. Reconstituição tridimensional a partir de micrografias eletrônicas de preparações purificadas do gancho mostrou que ele é uma hélice à direita (Wagenknecht et al., 1982).

Em Caulobacter, o filamento do flagelo foi mostrado ser composto de dois tipos de flagelinas; um segmento pequeno próximo do gancho contem monômeros da flagelina B, de 27,5 kdal, seguido por um segmento mais longo contendo monômeros da flagelina A, de 25 kdal (Fukuda et al., 1978; Koyasu et al., 1981; Sheffery & Newton, 1977; Weissborn et al., 1982). A análise de mutantes de mobilidade mostrou que ambas as flagelinas são necessárias para a formação de um filamento funcional (Fukuda et al., 1981; Johnson et al., 1983a; Weissborn et al., 1982). Uma terceira flagelina de 29 kdal, minoritária, que foi detectada intracelularmente em células do tipo selvagem, parece atuar no processo normal de montagem no flagelo (Weissborn et al., 1982; Gil & Agabian, 1983). As flagelinas de Caulobacter formam uma família de proteínas com composição similar de aminoácidos e reatividade imunológica cruzada (Fukuda et al., 1978; Lagenaur & Agabian, 1976; Lagenaur & Agabian, 1978; Osley et al., 1977; Weissborn et al., 1982). A análise de sequências peptídicas comparáveis das flagelinas A e B (Gil & Agabian, 1982; Weissborn et al., 1982) e a sequência de aminoácidos derivada da sequência de DNA do gene codificando para a flagelina de 29 kdal (Gil & Agabian, 1983), sugerem que estes genes evoluíram de um gene ancestral comum.

Os vários componentes do flagelo são sintetizados durante períodos específicos do ciclo celular (Fig. 1). A síntese da flagelina A, da flagelina B e da proteína do gancho se inicia pouco antes da formação do flagelo na célula pré-divisional (Agabian et al., 1979; Lagenaur & Agabian, 1978; Osley & Newton, 1980; Shapiro & Maizel, 1973; Sheffery & Newton, 1981). A síntese

do componente principal do filamento, a flagelina A, continua na célula móvel, após divisão celular, enquanto a síntese da flagelina B e da proteína do gancho termina na célula pré-divisional (Osley et al., 1977; Lagenauer & Agabian, 1978). A organização dos monômeros de flagelina no filamento do flagelo, com a flagelina B compreendendo uma região curta próxima ao gancho, parece refletir o fato de que a síntese da flagelina A continua por bastante tempo após o término da síntese da flagelina B.

Para analisar os mecanismos genéticos que regulam a síntese e a montagem do flagelo, mutantes defectivos em mobilidade foram obtidos quer por enriquecimento de células incapazes de nadar (Johnson & Ely, 1979), quer por mutagênese com o transposon Tn5 (Ely & Croft, 1982). Os fenótipos destes mutantes foram agrupados em duas categorias: mutantes fla, que não possuíam flagelo, e mutantes mot, que possuíam flagelo mas eram incapazes de nadar. Mapeamento destes mutantes indicou a existência de pelo menos 27 genes fla (flagelares) e 3 genes mot (mobilidade) arranjados no genoma em três grandes grupos, além de vários genes isolados (Johnson & Ely, 1979; Ely et al., 1984; Fig. 2). Este arranjo gênico indica um maior espalhamento dos genes fla e mot em Caulobacter do que tem sido observado em outras bactérias. Em E.coli e Salmonella typhimurium, por exemplo, os genes fla e mot estão agrupados em três regiões com apenas um ou dois genes fla localizados isoladamente no cromossomo (Silverman & Simon, 1977).

Para determinar os sinais moleculares que promovem a expressão de proteínas específicas e sua localização na célula, os genes que codificam algumas proteínas flagelares foram isola-

Figura 2 - Mapa genético parcial de *C. crescentus* mostrando a localização dos genes para formação do flagelo (*fla*), quimiotaxia (*che*) e mobilidade (*mot*). (Ely et al., 1984; Ely, comunicação pessoal).

dos. Os genes estruturais da proteína do gancho, flaK, (Ohta et al., 1982, 1984) e da flagelina de 29 kdal (Milhausen et al., 1982; Purucker et al. 1982) foram identificados, clonados e estão sendo analisados. Agabian e colaboradores (dados não publicados) encontraram que as sequências que codificam a flagelina A de 25 kdal e a flagelina B de 27,5 kdal estão ligadas ao gene da flagelina de 29 kdal e adjacentes à região flaYE do genoma, mas a organização de suas unidades de transcrição ainda não foi descrita.

2. Quimiotaxia - função do flagelo

As bactérias móveis são capazes de responder a uma variedade de estímulos do meio ambiente, tais como oxigênio, luz, calor e quimioefetores. O comportamento bacteriano que tem sido mais intensamente investigado é a resposta quimiotática nas bactérias entéricas E.coli e Salmonella, que trata da atração destas bactérias por aminoácidos e açúcares, e da repulsão das mesmas por compostos como acetato e fenol ou íons de cobalto e níquel.

Num ambiente químico uniforme, estas bactérias nadam executando um passeio aleatório tridimensional, que é produzido por períodos de nado suave interrompidos por episódios de tombo que reorientam a célula numa nova direção, escolhida ao acaso (Berg & Brown, 1972). Na presença de um gradiente espacial de uma substância atrativa ou repelente, a célula muda seu passeio aleatório para conseguir uma migração resultante na direção que lhe é favorável (Berg & Brown, 1972; Dahlquist et al., 1972).

Para fazer isto o organismo examina as concentrações de diferentes substâncias no seu meio ambiente e altera a probabilidade de tombo sempre que uma mudança na concentração, ao longo do tempo, é observada (Berg & Brown, 1972; Macnab & Koshland, 1972). Mudanças favoráveis (aumento em atraentes, decréscimo em repelentes) inibem o comportamento de tombo, e mudanças desfavoráveis estimulam o tombo. Assim os movimentos quimiotáticos são realizados pelo aumento efetivo dos intervalos de nado nas direções favoráveis e um decréscimo do tempo gasto em direção a regiões desfavoráveis.

O nado suave e o tombo são produzidos por movimentos do flagelo bacteriano (E.coli e Salmonella são bactérias multiflageladas). Rotação dos flagelos no sentido anti-horário resulta na formação de um feixe dos vários flagelos que empurra a célula produzindo o nado suave (Macnab, 1977). Rotação no sentido horário resulta na deformação dos filamentos e quebra do feixe, produzindo o tombo (Macnab & Ornston, 1977). Assim, o comportamento de nado ou de tombo reflete uma alternância entre a rotação horária e anti-horária do flagelo. A rotação do flagelo é devida a uma força proton-motora e não a hidrólise de ATP (Larsen et al., 1974a)

A resposta da bactéria a uma mudança no seu ambiente químico é transitória e ocorre em dois estágios, denominados excitação e adaptação. A excitação ocorre quando da detecção de uma variação na concentração de um composto ativo e resulta numa mudança no equilíbrio entre a rotação no sentido horário e anti-horário do flagelo (Larsen et al., 1974b). Assim a adição de um

atraente à suspensão de células móveis leva a uma imediata interrupção do comportamento de tombo em resposta ao gradiente temporal (Macnab & Koshland, 1972; Segall et al., 1982). No entanto, após um intervalo que pode ir de segundos a vários minutos, dependendo do atraente e da magnitude do gradiente, as células voltam ao seu padrão original de nado suave e tombo, muito embora a substância atrativa ainda esteja presente (Spudich & Koshland, 1975). A adaptação é definida como o restabelecimento do padrão original de rotação do flagelo após um estímulo temporal. Assim, as bactérias, como muitas células sensoriais de organismos superiores, se adaptam à presença contínua de um estímulo.

2.1 Receptores do sistema quimiotático

A maquinaria central do processo quimiotático, parece ser bastante similar em E. coli e S. typhimurium. Nove loci che foram identificados em ambos os organismos e a correspondência entre as funções che nas duas espécies foi estabelecida por estudos de complementação, nos quais fatores F carregando os genes che de E. coli foram utilizados para corrigir defeitos em mutantes che de Salmonella (De Franco et al., 1979). Evidência direta foi obtida para a correspondência entre sete funções che nestes organismos, e uma nomenclatura uniforme para estes sete loci foi adotada.

Dois tipos de receptores foram até o momento caracterizados no sistema quimiotático de E. coli e Salmonella. Uma das espécies de receptor são proteínas solúveis presentes no espaço periplasmático e de peso molecular em torno de 30 kdal. O segundo tipo de receptor são proteínas integrais da membrana interna

da célula e de peso molecular 60 kdal.

Os três receptores periplasmáticos que foram identificados e purificados, o receptor de galactose (Hazelbauer & Adler, 1971), o receptor de ribose (Aksamit & Koshland, 1974) e o receptor de maltose (Hazelbauer, 1975), são proteínas com dupla função. Além de serem receptores quimiotáticos, eles são componentes do sistema de transporte que levam estes açúcares do periplasma para o citoplasma. Embora os sistemas de transporte e quimiotático usem um receptor inicial comum, o restante dos sistemas é distinto, como demonstrado por mutações que eliminam o transporte sem afetar a resposta quimiotática e vice-versa (Adler, 1969).

Uma combinação de estudos de competição e técnicas genéticas mostrou que a ligação do efector causa uma mudança conformacional no receptor periplasmático permitindo que ele se ligue a uma das proteínas integrais de membrana de 60 kdal. Para os receptores de ribose e galactose esta proteína é a proteína Trg (Kondoh et al., 1979); enquanto o receptor de maltose se liga à proteína integral de membrana denominada Tar (Koiwai & Hayashi, 1979). A ligação do complexo receptor-efector às proteínas Trg ou Tar altera suas propriedades de modo que um sinal é transmitido para o interior da célula e posteriormente para o flagelo. Ao mesmo tempo, a nova conformação das proteínas integrais de membrana, expõe seus resíduos de glutamato para a metilação por enzimas no citoplasma, como veremos a seguir (Kleene et al., 1977; Van der Werf & Koshland, 1977). A proteína Tar e uma outra proteína integral de membrana, a proteína Tsr, atuam também como

receptores quimiotáticos para aspartato e serina respectivamente. Assim, a ocupação de sítios de ligação de serina ou aspartato nestas proteínas deve causar uma mudança conformacional, que produz algum tipo de sinal excitativo que afeta a rotação do flagelo iniciando uma resposta natatória apropriada. Redução na concentração do ligante, leva à perda do ligante das proteínas integrais de membrana, e a uma provável mudança de conformação que produz um sinal excitativo de polaridade oposta àquela gerada pelo estímulo positivo.

Não há informação sobre o caráter da alteração excitativa sofrida pelas proteínas integrais de membrana, nem se conhece a natureza do sinal excitativo entre estas proteínas e o flagelo. Um bom candidato para o sinal excitativo seria uma molécula pequena cuja concentração intracelular seria controlada pelas proteínas integrais de membrana; várias observações sugerem que este composto seria relacionado metabolicamente ou estruturalmente a nucleosídeos fosforilados (Aswad & Koshland, 1974; Springer et al., 1975; Galloway & Taylor, 1980; Springer et al., 1982; Hazelbauer & Harayama, 1983).

2.2 Modificação covalente das proteínas integrais de membrana

A adaptação ao estímulo, que é processado através das proteínas integrais de membrana, Tsr, Tar ou Trg, está associada a uma mudança no número de grupos metila ligados à proteína de membrana envolvida na resposta excitativa (Kort et al., 1975; Springer et al., 1977a,b). Adaptação a um estímulo positivo (aumento de substância atrativa, decréscimo de substância repelente)

está ligada a um aumento na metilação, enquanto a adaptação a um estímulo negativo está associada à desmetilação (Goy et al., 1977; Springer et al., 1979). Assim, tudo indica que a resposta excitativa induzida pela ligação do ligante ou o complexo ligante-receptor às proteínas integrais de membrana é eficientemente eliminada pela adição ou remoção de grupos metila a estas moléculas. Devido à presença dos grupos metila, estas proteínas integrais de membrana são também denominadas proteínas quimiotáticas metiladas (MCPs).

Os genes das MCPs de E.coli foram completamente sequenciados (Boyd et al., 1983; Krikos et al., 1983; Bollinger et al., 1984), assim como o de uma das MCPs de Salmonella (Russo & Koshland, 1983). Cada uma destas proteínas contém dois trechos ricos em aminoácidos apolares, provavelmente na região que atravessa a membrana da célula. Uma dessas regiões é próxima à extremidade amino-terminal e parece ser uma sequência sinal. A outra região se encontra no meio da proteína e parece dividir a molécula em um domínio amino-terminal periplasmático e um domínio carboxila-terminal citoplasmático. Os domínios citoplasmáticos, que contêm os sítios de metilação, são altamente conservados, nestas proteínas, enquanto os domínios periplasmáticos, envolvidos na ligação dos vários ligantes, divergem bastante.

Os grupos metila são ligados às MCPs pela ação de uma metiltransferase específica codificada pelo gene cher (Springer & Koshland, 1977). Esta enzima cataliza a transferência de um grupo metila do doador S-adenosil-metionina ao grupo carboxila de vários resíduos de ácido glutâmico das MCPs. Uma metil-

esterase específica, codificada pelo gene cheB (Stock & Koshland, 1978) cataliza a retirada dos grupos metila, produzindo metanol (Toews & Adler, 1979) e regenerando os resíduos de glutamato. Mutações em cheR ou cheB, ou ainda carência de metionina ou S-adenosil-metionina, levam a defeitos na adaptação (Aswad & Koshland, 1975; Springer et al., 1975; Goy et al., 1978; Parkinson & Revello, 1978).

Visto que as mudanças no estado de metilação somente ocorrem nas moléculas de MCP que estão envolvidas na resposta quimiotática, parece provável que a excitação altere as propriedades de substrato das MCPs, ou expondo ou escondendo sítios potenciais de metilação ou desmetilação. Além disso, os estímulos quimiotáticos parecem exercer algum controle sobre a própria atividade das enzimas. Por exemplo, a desmetilação de todas as MCPs cessa quando da adição de substância atrativa às células e somente reaparece quando a adaptação terminou (Toews & Adler, 1979). Evidências genéticas através de estudos de complementação com diferentes mutantes quimiotáticos, parecem indicar que a proteína codificada pelo gene cheY modula a atividade de metiltransferase (cheR) e que a proteína codificada pelo gene cheZ modula a atividade de metilesterase (Parkinson, 1978; Stock & Koshland, 1978; De Franco et al., 1979). Estas interações permitem à célula controlar a atividade de metilação-desmetilação em função da direção de rotação do flagelo, visto que as proteínas cheY e cheZ também interagem com o flagelo (Parkinson, 1981).

Embora os efeitos da metilação-desmetilação das MCPs na

transmissão do sinal quimiotático ainda não tenham sido compreendidos em termos moleculares, estudos tanto fisiológicos como genéticos indicaram que a adição de grupos metila favorece a rotação do flagelo no sentido horário, enquanto que a remoção dos grupos metila favorece a rotação anti-horária do flagelo.

Recentemente foi descoberta uma reação de modificação dependente da proteína cheB que parece mimetizar tanto bioquímica como funcionalmente as consequências da reação de desmetilação das MCPs (Rollins & Dahlquist, 1981; Sherris & Parkinson, 1981). Esta modificação das MCPs provavelmente envolve a desamidação de resíduos de glutamina e resulta na criação de novos sítios aceptores de grupo metila (Kehry et al., 1985). Mutantes de deleção que não apresentam nem cheR nem cheB apresentam um equilíbrio normal entre os episódios de rotação horária e anti-horária, enquanto mutantes cheR, que são capazes de executar a modificação dependente de cheB, apresentam um comportamento rotatório marcadamente no sentido anti-horário. Assim, a modificação dependente de cheB, como a desmetilação, produz sítios carregados nas moléculas de MCP e favorece a rotação do flagelo no sentido ant-horário. O papel fisiológico da modificação dependente de cheB é desconhecido, mas sua semelhança com o papel da desmetilação sugere que a desamidação dependente de cheB, possa ter servido como um mecanismo de adaptação rudimentar anterior ao aparecimento do ciclo de metilação-desmetilação (Kehry et al., 1985).

2.3 Proteínas envolvidas na metilação quimiotática em Caulobacter

C.crescentus, como mencionado anteriormente, sintetiza e monta um único flagelo num intervalo definido do ciclo celular e depois libera este flagelo no meio, num ponto programado do ciclo, comportando-se como um mutante condicional de flagelo. Isto permite que a maquinaria quimiotática de Caulobacter possa ser estudada em função da habilidade estrutural da célula em responder a um estímulo quimiotático.

Esta tese descreve a metilação das proteínas quimiotáticas de membrana como função do ciclo celular, metilação esta que verificamos ser expressa periodicamente durante o ciclo de vida de Caulobacter, coincidente com a biogênese do flagelo (Shaw et al., 1983; Gomes & Shapiro, 1984).

Oito loci genéticos envolvidos em quimiotaxia foram identificados em Caulobacter (B. Ely, comunicação pessoal, Fig. 2). Demonstramos que mutação em um destes genes (cheR) resulta na perda da atividade de metiltransferase enquanto que mutação em outro gene (cheB), resulta na ausência de atividade de metilesterase (Gomes & Shapiro, 1984).

As proteínas quimiotáticas metiladas (MCPs), a metiltransferase e a metilesterase apresentaram altos níveis de atividade na célula móvel, mas as três atividades eram perdidas quando a célula móvel liberava seu flagelo e se transformava numa célula talo (Gomes & Shapiro, 1984).

As MCPs identificadas em C.crescentus foram reconhecidas por anticorpos específicos obtidos contra uma das MCPs purifica-

da de Salmonella, a proteína Tar. Utilizando-se o anticorpo anti-Tar demonstrou-se que as MCPs de Caulobacter são sintetizadas durante o mesmo período do ciclo celular em que são sintetizadas a proteína do gancho e a flagelina B (Gomes & Shapiro, 1984).

Similarmente o anticorpo obtido contra a metilesterase de Salmonella foi utilizado para estudar a síntese da metilesterase de Caulobacter, que foi reconhecida por este anticorpo. Assim como as MCPs de Caulobacter, a metilesterase mostrou ser sintetizada num intervalo discreto do ciclo celular (Gomes & Shapiro, 1984).

As MCPs sintetizadas nas células pré-divisionais são encontradas somente na célula filha do tipo móvel e não na célula filha do tipo talo. A localização preferencial das MCPs na porção flagelada da célula pré-divisional foi demonstrada analisando-se a presença das MCPs metiladas em vesículas membranares flageladas e não flageladas (Nathan et al., 1986).

Como já mencionado, os genes envolvidos na biogênese do flagelo e na maquinaria quimiotática são regulados temporalmente durante o ciclo celular de C.crescentus. Além disso, sequências nucleotídicas dos genes flaY e flaE, que estão localizadas a 3'de um conjunto de genes para as flagelinas no cromossomo de C.crescentus, foram demonstradas atuarem em trans, regulando a expressão dos genes das flagelinas e dos genes quimiotáticos cheR e cheB, localizados numa outra região do cromossomo (Bryan et al., 1984).

Mutantes em flaY e flaE são incapazes de montar um flagelo completo e pequenas quantidades das flagelinas e dos

produtos dos genes cheR e cheB são sintetizados. Entretanto, o baixo nível de síntese foi demonstrado ocorrer no período correto de ciclo celular. Além disso, complementação por plasmídeo contendo os genes flaY e flaE intactos resultou na síntese de níveis normais das flagelinas e dos produtos dos genes cheR e cheB, mantendo o controle temporal do ciclo celular. Estes resultados demonstraram que a regulação temporal dos genes fla e che pode ser separada da regulação em trans que modula a quantidade dos produtos sintetizados (Bryan et al., 1986).

3. Resposta ao choque térmico

A exposição de células, as mais diversas, a um aumento brusco de temperatura resulta na indução ou aceleração da síntese de várias proteínas, que tem sido denominadas de proteínas de choque térmico (heat shock proteins-hsps). Este fenômeno é conhecido como a resposta ao choque térmico. No entanto a exposição das células a vários outros agentes agressores como etanol, inibidores da fosforilação oxidativa, vírus, luz UV, dentre outros, levam à indução da síntese de várias destas proteínas. Trata-se de uma resposta universal das células, tendo sido observada em todas as espécies examinadas, desde bactéria até o homem (Schlesinger et al., 1982).

Este fenômeno tem sido bastante estudado, principalmente em Drosophila, onde foi primeiramente observado há mais de vinte anos por Ritossa (1962). A observação ao microscópio dos cromossomos politênicos de glândulas salivares após uma mudança de

temperatura de 20 para 37°C ou tratamento com dinitrofenol, demonstrou o aparecimento de vários novos pufes. A indução de um conjunto de proteínas após choque térmico foi demonstrada somente dez anos mais tarde (Tissieres et al., 1974) e durante os anos que se seguiram foi ficando claro que os pufes eram sítios onde ocorria vigorosa transcrição de RNA e que vários destes RNAs eram traduzidos nas proteínas de choque térmico.

A resposta ao choque térmico na bactéria Escherichia coli chamou a atenção dos pesquisadores somente por volta de 1980. No entanto, já se conhece bastante sobre o fenômeno nesta bactéria, principalmente devido à facilidade no isolamento de mutantes.

Em E.coli, 17 proteínas foram identificadas como hsps. Seus pesos moleculares aparentes variam de 10 a 94 kdal. Algumas estão entre as mais abundantes proteínas da célula, enquanto que outras só são detectadas após choque térmico (Neidhardt et al., 1984). O aumento na síntese destas proteínas é da ordem de 5 a 20 vezes, dependendo da proteína; o pico de síntese ocorre 5 a 10 min após a mudança de temperatura e o aumento reflete a síntese de novos mRNAs.

3.1 Controle da resposta ao choque térmico

Foi identificado em E.coli um gene cujo produto é necessário para a indução das 17 proteínas de choque térmico. Uma mutação com perda de sentido (nonsense) numa cepa (K165) carregando um tRNA que suprime mutações amber a baixa temperatura (28 °C) mas não a alta (42°C) temperatura, elimina a resposta dos

genes que são induzidos após choque térmico (Neidhardt & VanBogelen, 1981; Yamamori e Yura, 1982). Células carregando a mutação, denominada htpR, são, não só incapazes de induzir as 17 hsps, como também lisam após lh a 42°C. Este gene codifica uma proteína de 32 kdal que apresenta boa homologia com o fator sigma de E.coli (Landick et al., 1984). Consistente com a homologia encontrada, evidências foram apresentadas de que a proteína htpR é um fator sigma para promotores de choque térmico (Grossman et al., 1984).

O controle da resposta de choque térmico em E. coli através de um fator sigma minoritário (sigma 32), assim como outros exemplos recentes de fatores sigma alternativos envolvidos na infecção do fago T₄ (Kassavetis & Geiduschek, 1984) e na expressão de genes regulados por nitrogênio em bactérias entéricas (Hirschman et al., 1985; Hunt & Magasanik, 1985), trazem de volta a noção de que a reprogramação da RNA polimerase possa estar envolvida no controle da expressão gênica em outras bactérias gram-negativas, já que apenas em Bacillus subtilis, bactéria gram-positiva, fatores sigma alternativos haviam sido descritos (Johnson et al., 1983; Losick & Pero, 1981). Durante o ciclo celular de C.crescentus, por exemplo, não foi possível associar até o momento, expressão gênica diferencial com reprogramação da RNA polimerase, já que uma única forma de holoenzima foi encontrada (Amemiya et al., 1977; Bendis & Shapiro, 1973).

Além do controle positivo na resposta ao choque térmico de E.coli, mediado pelo fator sigma 32, uma proteína de choque térmico denominada dnaK, a segunda mais abundante hsp de

E.coli, parece atuar como modulador negativo da resposta, sendo necessária para a repressão da síntese das hsps. Células carregando a mutação dnaK 756, uma mutação sensível à temperatura, continuam a sintetizar as hsps por várias horas após a mudança de 30 para 43°C enquanto nas células selvagens a repressão da síntese das hsps começa alguns minutos após a mudança de temperatura (Tilly et al., 1983). Cepas que produzem grandes quantidades da proteína dnaK, devido à presença do gene dnaK num plasmídeo superprodutor, não apresentam uma resposta ao choque térmico completa a 43°C, consistente com a tese de que a proteína dnaK é um modulador negativo da síntese das hsps. Evidências genéticas sugerem que a proteína dnaK interfere direta ou indiretamente com a atividade da proteína htpR (Tilly et al., 1983).

3.2 A proteína hsp70 de E.coli

O produto do gene dnaK foi recentemente demonstrado ser 48% idêntico à proteína hsp70 de Drosophila e levedura (Bardwell e Craig, 1984), por comparação das respectivas sequências de DNA. Há indicações de que ela deve ser encontrada em todas as células e que deve ser a proteína mais conservada na natureza (Kelley & Schlesinger, 1982). A proteína dnaK foi purificada à quase homogeneidade e a proteína purificada apresenta uma fraca de atividade ATPase (Zylicz et al., 1983). A proteína dnaK purificada é fosforilada, em resíduos de treonina, in vitro na presença de [γ -³²P] ATP. Esta fosforilação é bastante específica; fosforilação de outras proteínas não

ocorre quando elas são adicionadas à proteína dnaK purificada. Além disso a fosforilação ocorre em precipitados formados entre a proteína purificada e anticorpo contra a proteína dnaK. Estes dois últimos resultados sugerem um mecanismo de autofosforilação da proteína dnaK.

Desde o isolamento dos primeiros mutantes dnaK (Georgopoulos & Herskowitz, 1971; Georgopoulos, 1977; Saito & Uchida, 1977) foi reconhecido que a proteína dnaK é necessária para a replicação do DNA do fago lambda. O papel da proteína dnaK nas funções bacterianas normais não está porém esclarecido. O gene foi denominado dnaK devido à inibição da síntese de DNA após a mudança de temperatura de um mutante termo-sensível (dnaK 756) para a temperatura não permissível (Saito & Uchida, 1977). No entanto, uma análise da síntese de ácidos nucleicos após o aumento de temperatura no mutante dnaK 756 e outro mutante dnaK 7, mostrou que a síntese de RNA era inibida mais rapidamente do que a síntese de DNA (Itikawa & Ryu, 1979). Ainda, 50% de inibição da síntese de DNA só é alcançada 1h após a mudança para a temperatura não permissível, contrariamente ao que ocorre nos mutantes de vários outros genes dna. Portanto, mutações em dnaK parecem afetar tanto a síntese de RNA como de DNA, e se desconhece se o efeito primário é na síntese de DNA.

3.3 A proteína groEL

A proteína groEL de E.coli é a mais abundante das hsp's. Esta proteína de peso molecular aparente 63 kdal interage com outra proteína de choque térmico, a proteína groES de

11 kdal, visto que mutações em groEL podem parcialmente suprimir mutações em groES (Tilly e Georgopoulos, 1982; Tilly et al., 1981). A proteína groEL foi purificada e apresenta fraca atividade de ATPase (Hendrix, 1979).

As proteínas groES e groEL são essenciais para a morfogenese de vários fagos (Neidhardt et al., 1981). Embora os detalhes difiram de vírus para vírus, um efeito no processamento normal das proteínas da partícula viral é uma característica comum aos mutantes groES e groEL infectados.

A função das proteínas groES e groEL em células não infectadas é desconhecida, mas acredita-se que elas sejam essenciais ao crescimento, porque alguns mutantes selecionados por sua incapacidade em suportar o crescimento de fagos possuem também um fenótipo termo-sensível para o crescimento. Alguns mutantes apresentam permeabilidade e fragilidade anormais (Takano & Kafefuda, 1972), outros apresentam defeito na divisão celular (Georgopoulos & Eisen, 1974) e na síntese de RNA e DNA à temperatura não permissível (Wada & Itikawa, 1974).

3.4 Outras hsps de E.coli

Além das proteínas dnaK e groEL, quatro outras proteínas foram identificadas. Uma delas é o produto do gene dnaJ (Saito & Uchida, 1978), uma proteína de 26,5 kdal que, como a proteína dnaK, é necessária para a replicação do DNA de fagos. Ela parece essencial para o crescimento da célula não infectada, mas a única informação disponível é que a síntese de RNA e DNA pára nos mutantes quando à temperatura não permissível

(Saito & Uchida, 1978).

Outra hsp de E.coli é o fator sigma (sigma 70), subunidade da RNA polimerase que programa a enzima para reconhecer promotores normais (Chamberlin, 1974).

Foi ainda identificada como hsp uma lisil-tRNA sintetase cujo gene é silencioso sob a maior parte das condições de crescimento, sendo porém induzido sob certas condições nutricionais (Hirshfield et al., 1981).

A mais recente hsp identificada é a protease lon, proteína de 94 kdal (Phillips et al., 1984). Há evidências de que esta enzima, dependente de ATP, inicia a rota principal de degradação de proteínas anormais em E.coli.

Em resumo, as proteínas de choque térmico identificadas até agora em E.coli parecem estar envolvidas nos processos macromoleculares da célula: replicação do DNA (dnaK e J), síntese de RNA (fator sigma), síntese proteica (lisil-tRNA sintetase), processamento de proteína ou montagem (groES e groEL), e degradação de proteína (lon).

3.5 Regulação dependente do desenvolvimento das proteínas de choque térmico

Além da ativação transitória dos genes de choque térmico, após uma elevação brusca de temperatura, foi demonstrada em vários sistemas biológicos uma regulação dependente do desenvolvimento. Assim, existem certos estágios de desenvolvimento ou certos tipos celulares, nos quais um sub-conjunto de genes de choque térmico é induzido em condições fisiológicas normais e

outros estágios nos quais um sub-conjunto de genes de choque térmico não é induzido, mesmo em resposta ao choque térmico. Assim, demonstrou-se em Saccharomyces que duas proteínas de choque térmico, hsp26 e hsp84, são fortemente induzidas durante a esporulação, enquanto que a proteína hsp70, a proteína mais conservada de choque térmico, não é induzida mesmo após choque térmico (Kurtz et al., 1986). Durante o desenvolvimento normal em Drosophila, mRNAs para as proteínas hsp83, hsp28 e hsp26 acumulam no ovário adulto e são abundantes nos embriões até blastoderma (Zimmerman et al., 1983). Já em ovócito de Xenopus mostrou-se que a hsp70 é induzida em condições normais (Bienz e Gurdon, 1982) e que a indução é bloqueada após a fertilização (Bienz, 1984). Em Blastocladiella resultados recentes (Bonato et al., 1986) também mostraram a indução da hsp70 em condições normais de esporulação do fungo.

A presença das hsps durante o crescimento normal ou durante o desenvolvimento indica que estas proteínas não atuam somente sob condições de estresse, mas que devem ter um papel no crescimento normal e durante o desenvolvimento.

3.6 Proteínas de choque térmico em C.crescentus

Os mecanismos utilizados no controle da diferenciação celular em Caulobacter tem sido investigados principalmente através da caracterização de proteínas expressas diferencialmente durante o seu ciclo celular e da identificação e isolamento de seus respectivos genes.

O fenômeno de choque térmico constitui-se, pelo que

vimos anteriormente, num bom sistema modelo para o estudo da regulação da expressão gênica tanto em procariotos como eucariotos.

Neste sentido, esta tese descreve a resposta ao choque térmico durante o desenvolvimento em Caulobacter. Células de C.crescentus respondem a um aumento brusco na temperatura induzindo transitoriamente a síntese de vários polipeptídeos, sendo que a indução ocorre ao nível da transcrição. Duas das proteínas induzidas, hsp62 e hsp70, foram demonstradas ser análogas às proteínas de choque térmico de E.coli, groEL e dnaK, respectivamente, por reatividade imunológica cruzada com anticorpos obtidos contra as proteínas de E.coli.

Resolução dos extratos celulares em géis bidimensionais levaram à identificação de 20 hsps distintas, que são expressas coordenadamente, em resposta ao choque térmico, nos vários estágios do ciclo celular de Caulobacter. Entretanto, sob condições normais de temperatura, encontrou-se que quatro proteínas de choque térmico são induzidas e sua síntese mostrou estar sob controle do ciclo celular (Gomes et al., 1986).

II. MATERIAIS e MÉTODOS

1. Cepas bacterianas e meios.

As cepas selvagens de C. crescentus CB15, as cepas selvagens sincronizáveis CB13 e CB15F, assim como as cepas mutantes fla e che foram crescidas a 30 °C em PYE ou meio mínimo M2 (Johnson & Ely, 1977). E. coli K12 foi crescida a 30°C em LB (Miller, 1972) ou meio mínimo M2. Sincronização das células foi feita através de centrifugação em gradiente de Ludox (Evinger & Agabian, 1977) ou Percoll (Huguenel & Newton, 1984a).

Os mutantes SC274, SC512, SC520, SC1062, SC1133 e SC1121 contêm mutações na região flaYE (Fig. 2), que resultam na ausência do flagelo. SC274 é um mutante temperatura-sensível que apresenta uma estrutura flagelar parcial. SC512 e SC520 são mutantes que carregam deleções, enquanto que os demais carregam o transposon Tn5 inserido no gene que foi inativado. SC2008, SC1998 e SC1997 foram obtidos por transdução mediada pelo fago ϕ Cr30 dos mutantes SC1062, SC1133 e SC1121, respectivamente, na cepa CB15F sincronizável. Os mutantes cheR, SC1130, SC1063 e SC1064; os mutantes cheB, SC1040, SC1057 e SC1163; o mutante cheH, SC1035 e o mutante cheE, SC1046, são mutantes não quimiotáticos obtidos por inserção do transposon Tn5 no gene que foi inativado (Fig. 2). Todos os mutantes utilizados foram obtidos e mapeados por B. Ely e colaboradores.

2. Plasmídeos

DNA plasmidiano foi isolado pelo método de lise com SDS

(Maniatis et al., 1982). Os plasmídeos pRK290, pRK292 e seus derivados foram mobilizados para C.crescentus pelo plasmídeo pRK2013 (Ditta et al., 1980) usando a técnica de conjugação em filtro de Millipore descrita por Ely (1979). pRB1 é um derivado do plasmídeo pRK290 contendo fragmento Eco RI homólogo à região flaYE da cepa selvagem CB15, isolado de um banco de genes da cepa selvagem CB13, de C.crescentus. pRB2 contém o fragmento flaE ::Tn5 Eco RI isolado da cepa SC1062 (ou SC2008) inserido em pRK290. O plasmídeo pRB3 é um derivado de pRB2 que perdeu o transposon Tn5. pRB4 e pRB5 foram obtidos por digestão de pRB3 com Xho I e Hind III, respectivamente, seguida por religação. pRB6 foi construído por digestão do pRK290 e pSP2(pBR325 contendo fragmento Bam₂ e Bam₃; Fig. 19) com Eco RI e ligando-se os dois plasmídeos juntos.

3. Ensaio de complementação

Para mostrar que a capacidade dos mutantes de nadar e responder quimiotaticamente era devido à presença de um plasmídeo intacto e não devido a recombinação ou reversão, bactérias capazes de nadar e quimiotaticamente competentes, resistentes a tetraciclina (codificada por pRK290 e derivados) foram crescidas em ausência de seleção para tetraciclina. Colônias foram isoladas e testadas quanto à presença de células móveis, a capacidade de quimiotaxia e a resistência a tetraciclina. A capacidade de nadar e de responder quimiotaticamente foi sempre correlacionada com a presença de resistência a tetraciclina. Cepas sensíveis a tetraciclina eram incapazes de nadar e quimiotaticamente incompeten-

tes. A capacidade natatória era analisada por observação em microscópio de contraste de fase. A capacidade quimiotática era analisada pela formação de anéis de crescimento em placas de agar semi-sólido (0,3 % de agar).

4. Ensaio de metilação in vivo

As proteínas celulares foram metiladas em ausência de síntese proteica, como descrito por Kort et al. (1975). Culturas crescidas em meio mínimo M2 foram tratadas com cloranfenicol (50 µg/ml) por 5 min e então incubadas por 20 min a 30°C na presença de [³H-metil]metionina (75 µCi/ml). As amostras foram então misturadas com 10 vol. de acetona fria. O precipitado resultante foi lavado com acetona 50% (V/V), ressuspensão em tampão de amostra (Laemmli, 1970) e submetido a eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS.

5. Atividade de metiltransferase

O ensaio foi realizado segundo Springer & Koshland (1977) com modificações. Os extratos celulares foram obtidos por atrito das células com igual volume de alumina. Após a adição de dois volumes de tampão A (tampão fosfato de sódio, pH 7, contendo EDTA 1mM e EGTA 0,1 mM) a suspensão foi centrifugada a 6000xg por 10 min. O sobrenadante obtido após 3 lavagens foi centrifugado a 105.000xg por 45 min e o sobrenadante resultante foi denominado de fração solúvel. O precipitado foi suspenso em 3ml de tampão A e centrifugado novamente por 30 min a 105.000xg. O precipitado final, suspenso em tampão A foi denominado de

fração de membrana. A atividade de metiltransferase foi determinada incubando-se a fração de membrana (100 μ g) com a fração solúvel (100 μ g) e 400 pmoles de S-adenosil [3 H-metil] metionina (4×10^3 cpm/pmol), num volume final de 80 μ l a 30°C por 30 min. As amostras foram rapidamente congeladas em gelo seco/acetona e reservadas para eletroforese ou alíquotas de 20 μ l foram adicionadas a quadrados de 1 cm de papel Whatman 3MM. Os papéis de filtro foram lavados em ácido tricloroacético 10%; a seguir metanol e então secos. Os quadrados de papel foram depois colocados em tubos Eppendorf contendo 100 μ l de Na_2CO_3 1M. Os tubos foram colocados em frascos de cintilação contendo Hydrofluor e incubados a 37°C por 12 h. O metanol tritiado produzido por hidrólise dos grupos metila, foi absorvido pelo líquido de cintilação e a quantidade de radioatividade foi então determinada em um contador de cintilação. As amostras reservadas para eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS adicionou-se 20 μ l tampão de amostra 5 vezes concentrado (Laemmli, 1970) e após eletroforese o gel foi seco e a região correspondente ao peso molecular de 70-92 kdal foi cortada em pedaços de 0,5 cm, colocada em frascos de cintilação contendo 50 μ l de água e incubados por 10 min. Econofluor contendo Protosol 3% foi adicionado, os frascos foram agitados suavemente por 12 h a 37°C e a radioatividade determinada. A quantidade de radioatividade recuperada por ambos os métodos foi comparável. A reação de metiltransferase foi linear com o tempo de incubação até 40 min e com quantidades crescentes de fração solúvel até 200 μ g de proteína.

6. Identificação do resíduo de aminoácido metilado

Proteínas de membrana metiladas foram obtidas misturando-se 4 mg da fração de membrana com 3mg da fração solúvel e 60 μ Ci de S-adenosil³H-metil] metionina num volume final de 0,5 ml. A incubação foi por 60 min a 30°C. A reação foi interrompida pela adição de um volume igual de tampão de amostra (2 vezes concentrado) e o produto da reação foi fracionado por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS. A região contendo as MCPs foi cortada do gel, macerada, e as proteínas eluídas e digeridas com proteases, como descrito por Ullah e Ordal (1981). O produto da digestão das MCPs metiladas foi submetido a cromatografia descendente em papel com n-butanol/acido acético/agua (12V:3V:5V) como solvente. Um único componente radioativo foi obtido que co-migrou com 5-metil-glutamato. O extrato metanólico do produto da digestão das MCPs metiladas foi também cromatografado em papel com n-butanol/piridina/agua (1V:1V:1V) como solvente. Neste sistema também um único pico de radioatividade foi detectado que co-cromatografou com 5-metil-glutamato.

7. Atividade de metilesterase

Membranas metiladas in vivo foram usadas como substrato para determinar a atividade de metilesterase em extratos celulares. Células móveis de C.crescentus foram marcadas in vivo com [³H-metil] metionina, rompidas por sonicação e então centrifugadas a 105.000 xg por 45 min. O precipitado foi suspenso em tampão fosfato 0,1M, pH 7, e mantido congelado em alíquotas. A mistura

da reação continha 10 μ l das membranas marcadas com metila tritiada e 100 μ g da fração solúvel num volume final de 60 μ l. Após incubação a 30°C a reação foi interrompida por congelamento em gelo seco/acetona e 14 μ l de tampão de amostra (5 vezes concentrado) foram adicionados. As amostras foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS, os géis corados, tratados com Enhance e secos. Autorradiogramas dos géis foram submetidos a densitometria para monitorar a perda do grupo metila tritiado das MCPs.

8. Ensaio de imunoprecipitação

Culturas de C.crescentus CB13 ou CB15F (2×10^9 células) crescendo em meio mínimo M2 foram marcadas com pulsos de [3 H - metil]metionina (15 μ Ci por 20min a 30°C), aminoácidos marcados com 14 C (15 μ Ci por 20min a 30°C) ou [35 S]metionina (15 μ Ci por 10min a 30°C ou 10min após transferência para 40°C). As células marcadas foram coletadas por centrifugação, lavadas duas vezes com meio mínimo e os precipitados obtidos congelados. As células foram lisadas por suspensão em tampão de lavagem (Tris-HCl 50 mM, pH 8,3, contendo NaCl 0,45 M, 2% de Triton X-100 e lisozima (2mg/ml) e incubação por 30 min no gelo. As amostras foram então submetidas a 10 passagens através de uma pipeta Pasteur e centrifugadas a 15,000 xg por 30 min. O sobrenadante foi reservado e 25 μ l de células "Staph A" (células de Staphylococcus aureus fixadas com formol) suspensas em tampão de lavagem contendo BSA (1mg/ml), foram adicionados às amostras. Após 30 min de incubação no gelo, procedeu-se centrifugação para

remover material particulado e absorvido inespecificamente. Quantidades apropriadas de diferentes antisoros foram adicionadas aos sobrenadantes e a mistura mantida em gelo por 2h-12h para permitir formação do complexo. Então 25 µl de células Staph A foram adicionadas para ligar a imunoglobulina G. Após 30 min de incubação no gelo o complexo ligado a Staph A foi coletado por centrifugação. As células foram lavadas 3 vezes com tampão de lavagem e coletadas por centrifugação. O precipitado foi suspenso em tampão de amostra para eletroforese, fervido por 2 min, a suspensão foi centrifugada e o sobrenadante submetido a eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS. O gel foi fixado, corado, tratado com Enhance ou Amplify e submetido a fluorografia.

9. Obtenção de vesículas membranares e purificação por imunofinidade após metilação in vivo

Vesículas membranares flageladas e não flageladas foram obtidas de células móveis ou células pré-divisionais que haviam sido incubadas com [³H-metil]metionina (15 µCi/ml) por 12 min após pré-tratamento com cloranfenicol (50 µg/ml) por 5 min. Após incubação as células foram centrifugadas e ressuspensas em 1,0 ml de tampão de lise (Tris-HCl 100 mM e lisozima 50 µg/ml), de acordo com Huguenel e Newton (1984a). O lisado foi incubado com um excesso de IgG anti-flagelina por 30 min a 4 °C e então aplicado a uma coluna de 1,5 ml de proteína A-Sepharose previamente equilibrada em solução salina tamponada (PBS : tampão fosfato de sódio 40 mM, pH 7,2, contendo NaCl 150 mM ; Huguenel & Newton, 1984b). As vesículas flageladas que reagem com

a IgG anti-flagelina são adsorvidas à coluna de proteína A-Sepharose. As vesículas não flageladas não são adsorvidas à coluna e são lavadas com quatro vezes o volume da coluna em PBS e coletadas numa única fração. A coluna foi ainda lavada com mais duas vezes o volume da coluna em PBS para assegurar a remoção total das vesículas não adsorvidas. As vesículas flageladas foram eluídas da coluna por três ressuspensões sucessivas das partículas de proteína A-Sepharose em 1,5 ml de tampão de eluição (glicil-tirosina 100 ml, pH 7,0, contendo NaCl 2%) conforme descrito por Huguenel & Newton (1984b). As vesículas membranares foram coletadas por centrifugação a 105.000 xg por 45 min a 4°C, ressuspensas em tampão de amostra (Laemmli, 1970) e as proteínas separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS.

10. Metilação in vitro de vesículas membranares flageladas e não flageladas

Células móveis separadas em gradiente de Percoll foram lisadas por ressuspensão em 3,5 ml de tampão de lise contendo 75 µg/ml de lisozima. O lisado foi misturado com IgG anti-flagelina e então aplicado a uma coluna de 3,5 ml de proteína A-Sepharose para fracionamento em vesículas flageladas e não flageladas, como descrito acima. Uma parte do lisado celular foi guardada como controle não fracionado. As vesículas membranares foram então metiladas utilizando-se a fração solúvel de uma população mista de células como fonte de metiltransferase e S-adenosil[³H-metil] metionina como doador do grupo metila, conforme descrito no item 5.

11. Marcação de células com [³⁵S] -metionina

As bactérias crescendo exponencialmente a 30°C em meio mínimo M2, a uma densidade ótica a 660 nm de 0,5 - 0,6 foram incubadas nas temperaturas indicadas com 10 µCi/ml de [³⁵S] -metionina por 10 min. Após centrifugação a 10.000 xg por 10 min a 4°C, o precipitado obtido foi lavado com 1 ml de acetona fria, seco e ressuspenso em tampão de amostra (Laemmli, 1970) para gel unidimensional, ou em tampão de amostra para gel bidimensional (uréia 9,5 M, nonidet P-40 (2%), ditiotreitól 10 mM e anfolitos pH 5-8 (2%)). A quantidade de metionina radioativa incorporada em proteína foi determinada por precipitação com ácido tricloroacético em filtro de papel Whatman 3MM e contagem em contador de cintilação.

12. Eletroforese em gel

Eletroforese unidimensional em gel de 10% poliacrilamida-SDS foi realizada de acordo com Laemmli (1970). Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida foi realizada de acordo com o método de focalizamento isoelétrico (IEF) de O'Farrell (1975). A combinação de anfolitos forneceu um intervalo de pH de 5-8 (3,5-10 e 5-8 numa razão de 1:4, respectivamente). A segunda dimensão foi realizada em gel de 10 % poliacrilamida-SDS. Após eletroforese os géis foram corados com a azul de Coomassie, descorados, fluorografados utilizando Amplify e expostos a filme de raios-X.

13. Materiais

As enzimas de restrição e a DNA ligase foram obtidas da Boehringer Mannheim. A mistura de aminoácidos marcados com C (1,78 mCi/mg da mistura) foi obtida da Schwarz/Mann. [³⁵S] - metionina (1,4 Ci/mmole), S-adenosil [³H-metil] metionina (1,4 Ci/mmole) e Amplify foram obtidos da Amersham. [³H-metil] metionina (75-80 Ci/mmole), Econofluor, Protosol e Enhance foram obtidos da New England Nuclear. Staph A foi da Bethesda Research Laboratories. Ludox foi gentilmente cedido pela Dupont. Percoll e proteína A-Sepharose foram obtidos da Pharmacia. Hydrofluor foi da National Diagnostic.

III. RESULTADOS

1. A maquinaria de metilação envolvida no processo quimiotático de C. crescentus.

1.1 Mutantes de C. crescentus deficientes em quimiotaxia.

Mutantes não quimiotáticos de C. crescentus CBl5, incapazes de formar anéis de crescimento em placas de agar semi-sólido (Fig. 3) mas possuidores de flagelo funcional (observação em microscópio de contraste de fase), foram isolados após mutagênese com o transposon Tn5 conforme Ely & Croft (1982) e mapeados em 8 sítios diferentes no cromossomo da bactéria, como mostra a Figura 2.

Para começar a designar uma função a cada locus identificado, o comportamento natatório de cada classe de mutantes foi examinado.

C. crescentus, com um único flagelo polar, nada ou para frente ou para trás, dependendo do sentido de rotação do flagelo. O nado longo para frente é comparável ao nado suave, exibido por bactérias multiflageladas e o nado curto para trás é comparado ao comportamento de tombo, que leva a uma mudança na direção do nado. O comportamento natatório de Caulobacter, observado ao microscópio de contraste de fase, sugere que durante o nado longo a célula pré-divisional nada com a extremidade do talo para frente (Shapiro et al., 1985; Tabela 1). Dois grupos de mutantes não quimiotáticos, cheB e cheR só se mostraram capazes de nadar numa direção, incapazes portanto de reversão (Tabela 1). Os

Figura 3 - Comportamento da cepa selvagem, de mutantes fla e mutantes não quimiotáticos (cheB, D, E, J, N e R) de C.crescentus em placa de agar semi-sólido (meio PYE contendo agar 0,3 %).

Tabela 1. Comportamento natatório da cepa selvagem e de mutantes quimiotáticos.

Cepa	genótipo	fenótipo	direção de natação
		<p>longo para frente</p>	
CB15	selvagem	<p>curto para trás</p>	reverte a direção de natação
SC1130	<u>cheR</u>	atividade de metiltransferase ausente	<p>incapaz de reverter a direção</p>
SC1040	<u>cheB</u>	atividade de metilesterase ausente	<p>incapaz de reverter a direção</p>

demais mutantes observados apresentaram um comportamento natatório indistinguível do da cepa selvagem.

Quando um mutante auxotrófo para metionina, AE5536, foi observado ao microscópio, encontrou-se que na ausência de metionina, as células só eram capazes de nadar na direção para frente, sugerindo que, como no caso de outras bactérias (Adler, 1969; Aswad & Koshland, 1975), metionina mediaría a mudança no sentido de rotação do flagelo. Com base neste requerimento aparente por metionina, para mediação da mudança no sentido de rotação do flagelo, nós analisamos o padrão de metilação de proteínas nas células selvagens e mutantes.

1.2 Metilação de proteínas nas células selvagens e mutantes.

Células intactas de duas cepas selvagens de C. crescentus, CB13 ou CB15, foram incubadas com [³H-metil] metionina, na presença de cloranfenicol, inibidor de síntese proteica, solubilizadas em tampão contendo SDS e as proteínas foram separadas em géis de poliacrilamida-SDS (Fig. 4). Autorradiograma destes géis mostrou várias bandas entre 70 -92 kdal (Fig. 4A,1). Quando o gel era tratado com soda 0,1N (Fig.4A,2), a radioatividade correspondente ao grupo metila tritiado era perdida, indicando que os grupos metila estavam ligados às proteínas na forma de esteres lábeis a álcali, análogos àqueles observados nas MCPs de E.coli (Springer et al., 1979) e Salmonella (Springer & Koshland, 1977). Evidência de que as proteínas marcadas in vivo se encontravam na membrana celular foi obtida incubando-se a fração contendo membrana com a fração solúvel de um extrato celular de

Figura 4 - Metilação in vivo e in vitro da cepa selvagem CB13. Autorradiograma das proteínas quimiotáticas aceptoras de grupo metila (MCPs) metiladas in vivo com [^3H -metil] metionina (A) antes (1) e após (2) tratamento do gel com soda 0,1 N por 30 min; ou metiladas in vitro (B) com S-adenosil [^3H -metil] metionina; (1) fração solúvel presente; (2) fração de membrana presente; (3) fração de membrana e fração solúvel presentes. Mr é mostrado em kdal.

C.crescentus CB13 na presença de S-adenosil [³H-metil] metionina. As proteínas de membranas marcadas in vitro foram separadas em géis de poliacrilamida-SDS e encontrou-se que elas co-migravam com as proteínas marcadas in vivo (Fig. 4B,3) e eram também lábeis a álcali. Incubação somente da fração de membrana mostrou baixos níveis de incorporação nas MCPs (Fig. 4B,2), que estavam totalmente ausentes quando a fração solúvel sozinha foi incubada com S-adenosil [³H-metil] metionina (Fig.4B,1). Estes resultados indicaram que as MCPs se encontram na fração de membrana e a atividade responsável pela metilação, na fração solúvel.

A metilação in vivo dos mutantes deficientes em quimiotaxia, mostrou que uma classe de mutantes, mutantes cheR, era incapaz de metilar as proteínas de membrana MCPs (Fig. 5,3). Os mutantes cheR também haviam apresentado comportamento natatório anômalo, quando observados ao microscópio. Diferentes quantidades de metilação foram encontradas, no entanto, nos demais mutantes não quimiotáticos (Fig. 5).

1.3 Identificação do defeito do mutante cheR.

Porque a metilação de um conjunto específico de proteínas de membrana pode ser observada em C.crescentus e esta metilação não ocorre em uma classe de mutantes não quimiotáticos, as proteínas metiladas parecem ser análogas às MCPs de E.coli (Springer et al 1979) e Salmonella (Springer & Koshland, 1977). A reação de metilação das MCPs nestas bactérias é catalizada por uma enzima específica denominada metiltransferase, que é codificada pelo gene cheR (Springer & Koshland, 1977). Mutan-

Figura 5 - Padrão de metilação in vivo de mutantes deficientes em quimiotaxia. A cepa selvagem e vários mutantes quimiotáticos foram incubados in vivo com [3 H-metil]metionina, na ausência de síntese proteica, e as proteínas metiladas separadas por eletroforese em gel de 10% poliacrilamida-SDS e posterior autorradiografia. (1) cepa selvagem; (2) mutante cheB; (3) mutante cheR; (4) mutante cheH. Mr é mostrado em kdal.

tes no gene cheR foram demonstrados não possuírem atividade de metiltransferase, in vitro, e serem totalmente incapazes de metilar as MCPs in vivo (Springer & Koshland, 1977). Dosagem da atividade de metiltransferase de C.crescentus, in vitro, foi realizada utilizando a fração de membrana da cepa selvagem CB13, como aceptora dos grupos metila, e a fração solúvel da cepa selvagem ou dos mutantes, como fonte de enzima. A metilação dependente de S-adenosil-metionina das MCPs na membrana da cepa selvagem requer a fração solúvel indicando que a metiltransferase se encontra nesta fração (Fig. 4).

Baixos níveis de metiltransferase foram observados no mutante cheR que é incapaz de metilar as proteínas de membrana in vivo, enquanto que mutantes do tipo cheB, cheE e cheH, apesar de não apresentarem os mesmos níveis de atividade encontrados na cepa selvagem, apresentaram níveis intermediários de atividade de metiltransferase (Tabela 2). Estes resultados sugerem que o mutante cheR (SC1130) é deficiente na atividade de metiltransferase.

Foi ainda determinada nestas várias cepas a atividade de acceptor de grupo metila, incubando-se a fração de membrana dos extratos celulares das diferentes cepas com a fração solúvel da cepa selvagem, na presença de S-adenosil [³H-metil] metionina. Com exceção do mutante cheR, os demais mutantes apresentaram níveis bastante próximos dos níveis da cepa selvagem, para a atividade acceptora de grupos metila (Tabela 2). A incapacidade de metilar, in vitro, a membrana de um mutante deficiente em metiltransferase, foi também observada no mutante cheX de E.coli

Tabela 2. Atividade das proteínas envolvidas na metilação mediada por quimiotaxia de diferentes mutantes quimiotáticos

Cepa	*		*
	metiltransferase pmoles/mg.30min	metilesterase % da cepa selvagem	MCP pmoles/mg.30min
CB15 (w.t.)	56	100	56
SC1130 (<u>cheR</u>)	3	30	10
SC1040 (<u>cheB</u>)	36	10	47
SC1046 (<u>cheE</u>)	38	100	50
SC1035 (<u>cheH</u>)	34	100	44

* A incorporação de 1 pmol do grupo metila tritiado a partir de S - adenosil [³H-metil] metionina (4×10^3 cpm/pmol) é expressa por mg da fração solúvel e por mg da fração de membrana.

(Minoshima & Hayashi, 1980).

1.4 Identificação do defeito do mutante cheB .

A atividade de metilesterase, responsável pela desmetilação das MCPs liberando os grupos metila na forma de metanol, como a metiltransferase é encontrada na fração solúvel de extratos celulares. A atividade de metilesterase foi medida *in vitro*, incubando-se a fração solúvel de extratos celulares com membranas marcadas *in vivo*, como substrato. O produto da reação foi analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS. Densitometria dos autorradiogramas destes géis foi utilizada para determinar a perda da marcação nas MCPs, que reflete a atividade de metilesterase (Fig. 6).

Quando a cepa selvagem de C. crescentus CB15 foi utilizada como fonte de metilesterase, após 120 minutos de incubação a 30°C, a maior parte da marcação com trítio na região do gel correspondendo às MCPs foi perdida (Fig. 6). Entretanto quando o mutante cheB (SC1040) foi usado como fonte de enzima, a maior parte da marcação com trítio estava ainda presente, na região das MCPs, após 120 minutos de incubação, indicando baixos níveis de atividade de metilesterase nesta cepa (Fig. 6). As cepas mutantes cheE e cheH foram também analisadas e apresentaram níveis máximos de atividade (Tabela 2). Assim o mutante cheB (SC1040) foi o que apresentou níveis mais baixos de atividade de metilesterase, 10% da atividade observada na cepa selvagem, seguido do mutante cheR, que apresentou 30% da atividade máxima determinada. Estes resultados indicam que o mutante cheB é

Figura 6 - Atividade de metilesterase na cepa selvagem CB15 e do mutante *cheB* (SC1040). A figura mostra o traçado densitométrico de autorradiogramas das proteínas quimiotáticas metiladas separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS. Membranas de *C. crescentus* CB13 (50 µg) marcadas *in vivo* com [^3H -metil] metionina foram incubadas a 30°C na presença de 100 µg da fração solúvel da cepa selvagem CB15 ou do mutante SC1040. Nos tempos indicados (em min) a reação foi parada e as proteínas fracionadas por eletroforese. As setas indicam as bandas proteicas carregando grupos metila tritiados lábeis a álcali. A direção de migração no gel foi da esquerda para a direita.

deficiente na atividade de metilesterase, enquanto que o efeito da mutação em cheR sobre a atividade de metilesterase, parece ser resultado de um efeito polar, como veremos a seguir.

Os genes cheR e cheB foram mapeados e se encontram adjacentes no cromossomo de Caulobacter (B. Ely, comunicação pessoal; Fig. 2). Vários mutantes nestes dois genes, obtidos por inserção do Tn5, foram também analisados quanto à posição do Tn5 nestes mutantes. Utilizando-se Tn5 como sonda em Southernns, onde o DNA total dos diferentes mutantes foi digerido ou com Eco RI, que não corta o Tn5, ou com Bam HI, que corta o Tn5 num único sítio, foi possível determinar o tamanho dos fragmentos contendo o Tn5, fazer um mapa, onde agora a posição do Tn5 foi determinada para os vários mutantes nos genes cheR e cheB (W. Alexander, comunicação pessoal; Fig. 7). Estes mutantes já haviam sido analisados quanto à sua atividade de metiltransferase, de metilesterase e atividade de aceptor de grupo metila (Tabela 3). A comparação dos níveis de atividade de metilesterase e de metiltransferase, obtidos para estes mutantes, com a posição do Tn5 dentro de cada gene para os mesmos mutantes, sugere que os genes cheR e cheB fazem parte de uma unidade de transcrição, que ocorre de cheR para cheB e que a presença do Tn5 no gene cheR, responsável pela atividade de metiltransferase, afeta a expressão da metilesterase, provavelmente codificada pelo gene cheB. Mutantes em cheB, assim como mutantes em cheR, apresentaram comportamento natatório anômalo, mostrando-se incapazes de reverter sua direção de natação.

Figura 7 - Mapa indicando a posição do transposon Tn5 nos vários mutantes quimiotáticos mapeados em *cheR* e *cheB*. Utilizando-se o tamanho dos fragmentos contendo o Tn5, obtidos após a digestão do DNA dos vários mutantes *cheB* e *cheR*, com enzimas de restrição Eco RI e Bam HI, construiu-se o mapa mostrado acima. Os fragmentos foram visualizados em Southernns onde se utilizou como sonda radioativa λ Tn5 (W. Alexander, comunicação pessoal).

Tabela 3. Atividade das proteínas envolvidas na metilação mediada por quimiotaxia dos vários mutantes cheR e cheB

Cepa	*		*
	metiltransferase pmoles/mg.30min	metilesterase % da cepa selvagem	MCP pmoles/mg.30min
CB15 (w.t.)	56	100	56
SC1130 (<u>cheR</u>)	3	30	11
SC1063 (<u>cheR</u>)	11	25	55
SC1064 (<u>cheR</u>)	20	20	56
SC1040 (<u>cheB</u>)	36	10	50
SC1057 (<u>cheB</u>)	64	10	54
SC1163 (<u>cheB</u>)	56	60	54

* A incorporação de 1 pmol do grupo metila tritiado a partir de S - adenosil [³H-metil] metionina (4×10^3 cpm/pmol) é expressa por mg de fração solúvel e por mg da fração de membrana.

1.5 Determinação do resíduo de aminoácido metilado

Como os grupos metila tritiados ligados às MCPs de Caulobacter se mostraram lábeis, em condições que reconhecidamente causam clivagem da ligação ester (tratamento com soda 0,1N), restava identificar o aminoácido esterificado. Digestão com proteases, das proteínas eluídas da região do gel de poliacrilamida-SDS contendo as MCPs metiladas in vitro, seguida de cromatografia descendente em papel, em dois sistemas de solventes distintos, demonstrou a presença de um único componente radioativo, que co-migrou com 5-metil-glutamato autêntico, indicando que, como em Salmonella (Van der Werf & Koshland, 1977), o aminoácido esterificado é o ácido glutâmico (Fig. 8).

1.6 Reação de metilação como função do ciclo celular de Caulobacter

Quando se observa o ciclo celular de C.crescentus verifica-se que durante parte do ciclo esta bactéria se apresenta como um mutante sem flagelo. Para analisar se a metilação das MCPs varia durante o ciclo de vida da bactéria, culturas foram sincronizadas, isolando-se as células do tipo móvel por centrifugação em gradiente de Ludox, que então prosseguiram sincronicamente através do ciclo celular. Nos intervalos de tempo indicados, alíquotas de células foram marcadas por 15 min com [³H-metil] metionina, em ausência de síntese proteica, e as proteínas metiladas separadas em gel de poliacrilamida-SDS (Fig. 9). A metilação in vivo das MCPs diminui drasticamente quando a

Figura 8 - Identificação do resíduo de aminoácido metilado. A fração de membrana contendo as MCPs foi marcada *in vitro* usando S-adenosil [^3H -metil] metionina como doador de grupo metila, fracionada por eletroforese em gel de 10% poliacrilamida-SDS e digerida com protease. O digesto enzimático foi submetido a cromatografia descendente em papel onde o solvente foi butanol/ ácido acético/ água (12:3:5). As setas indicam a migração de vários padrões de aminoácidos separados no mesmo sistema cromatográfico.

Figura 9 - Incorporação in vivo de grupos ^3H -metila, lábeis a álcali, nas proteínas de C.crescentus, nos vários estágios do ciclo celular. Culturas de C.crescentus CB13 foram sincronizadas e alíquotas de células das diferentes fases foram incubadas com pulsos de 15 min de [^3H -metil] metionina. As proteínas metiladas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS e visualizadas por autorradiografia. Os números de 0 - 1,0 indicam frações do ciclo celular.

célula móvel perde seu flagelo e se transforma na célula talo. O ressurgimento de uma célula flagelada, no fim do ciclo celular, é acompanhado pelo aumento nos níveis de metilação, sendo que a célula móvel purificada é o tipo celular que apresenta a maior quantidade de metilação.

Não só a célula talo que se origina da diferenciação da célula móvel é inativa quanto à reação de metilação, mas também a célula talo proveniente da divisão celular. É o que se verifica na Figura 10. Células pré-divisionais foram isoladas e após divisão celular as células móveis e as células talo separadas por centrifugação em gradiente de densidade de Ludox. Cada um dos três tipos celulares foi incubado com [^3H -metil] metionina e as proteínas metiladas separadas por eletroforese em gel de poli-acrilamida-SDS. A célula pré-divisional e a célula móvel mas não a célula talo, apresentaram as bandas proteicas de 70- 92 kdal.

1.7 Atividade de metiltransferase, de metilesterase e de acceptor de grupo metila nos diferentes estágios do ciclo celular de C.crescentus.

Para determinar porque as células talo são incapazes de metilar as proteínas de membrana in vivo, as três atividades envolvidas na metilação e desmetilação das MCPs foram determinadas in vitro. A Figura 11 mostra que a liberação do flagelo da célula móvel e a subsequente biogênese do talo é acompanhada pela perda da metilação das MCPs, também quando a reação é ensaiada in vitro. Membranas da célula móvel apresentaram altos níveis de atividade acceptora do grupo metila enquanto as membra-

Figura 10 - Ausência de metilação in vivo das MCPs da célula talo proveniente da divisão celular. Células pré-divisionais foram isoladas e após divisão celular as células filhas talo e móvel foram separadas em gradiente de Ludox. Cada um dos três tipos celulares foi marcado com [^3H -metil] metionina in vivo. As proteínas marcadas separadas em gel de poliacrilamida-SDS são mostradas para as células pré-divisionais (1), células talo (2) e células móveis (3). Mr em kdal é mostrado à direita.

Figura 11 - Autorradiograma das MCPs de diferentes tipos celulares de *C.crescentus* marcadas in vitro e separadas por eletroforese em gel de 10% poliacrilamida-SDS. As frações de membrana de uma população mista de células (1), de células talo provenientes de diferenciação (2), e de células móveis (3), foram incubadas in vitro com S-adenosil [3H-metil] metionina, como doador do grupo metila e com a fração solúvel de extratos de uma população mista de células, como fonte de metiltransferase.

nas da célula talo não apresentaram atividade detectável (Fig. 11 compare 2 e 3). Os níveis das três atividades da maquinaria de metilação, nos diferentes tipos celulares, são mostrados na Tabela 4. As atividades de metiltransferase, de metilesterase e de acceptor de grupo metila se apresentaram máximas na célula móvel, caindo para níveis mínimos na célula talo proveniente tanto da diferenciação da célula móvel, como da divisão celular. Extratos de célula talo não inibem as atividades de metiltransferase ou metilesterase determinadas nas células móveis (resultados não mostrados), descartando a possibilidade de existência de um inibidor destas atividades nas células talo.

1.8 Síntese das proteínas quimiotáticas metiladas durante o ciclo celular de Caulobacter.

A atividade de acceptor de grupo metila quase nula nas células talo, poderia indicar a ausência das MCPs nestas células, ou a presença das MCPs, porém bloqueadas para a reação de metilação. Para discriminar entre estas duas possibilidades, a presença das MCPs na célula pré-divisional e nas duas células filhas, foi determinada usando-se anticorpos contra a proteína Tar, uma das MCPs de Salmonella (Wang & Koshland, 1980).

O anticorpo anti-Tar imunoprecipitou especificamente as bandas proteicas metiladas correspondentes às MCPs de C.crescentus (Fig.12). As proteínas imunoprecipitadas, marcadas in vivo com [³H-metil] metionina, possuíam grupos metila tritiados sensíveis a álcali e co-migraram em géis de poliacrilamida-SDS com as MCPs marcadas tanto in vitro como in vivo. Quando as células

Figura 12 - Imunoprecipitação das proteínas de *C. crescentus* CB13 marcadas *in vivo* com [^3H -metil] metionina (A) ou com aminoácidos contendo ^{14}C (B), utilizando-se anticorpo contra a proteína Tar, uma das MCPs de *Salmonella*. As proteínas imunoprecipitadas foram separadas por eletroforese em gel de 10% poliacrilamida-SDS e visualizadas por autorradiografia. A presença ou ausência do anticorpo específico no imunoensaio é indicada por (+) ou (-), respectivamente. Mr em kdal é mostrado à direita.

foram incubadas com aminoácidos marcados com ^{14}C , duas bandas, correspondendo em peso molecular às bandas superiores marcadas com [^3H -metil] metionina, foram imunoprecipitadas (Fig.12). Nos experimentos descritos a seguir, a terceira banda correspondente às MCPs pôde também ser detectada (Fig. 13).

A síntese das proteínas quimiotáticas metiladas foi determinada como função do ciclo celular de C. crescentus, usando este anticorpo (Fig.13). Células móveis de C. crescentus foram isoladas e a cultura prosseguiu sincronicamente através do ciclo celular. Nos estágios celulares indicados na Figura 13, alíquotas foram retiradas e incubadas com pulsos de aminoácidos marcados com ^{14}C e então as proteínas dos extratos celulares foram imunoprecipitadas com anticorpo anti-Tar. Síntese máxima das MCPs ocorreu antes da divisão celular; pouca ou nenhuma síntese pôde ser detectada na célula móvel ou célula talo. Como havíamos mostrado que a célula móvel apresenta alta atividade aceptora de grupo metila e que a célula talo não apresenta esta atividade, as MCPs sintetizadas na célula pré-divisional parecem ser preferencialmente depositadas na porção flagelada desta célula, antes da divisão celular. Assim seria de se esperar que os grupos metila marcados com trítio, incorporados nas MCPs recém-sintetizadas na célula pré-divisional, pudessem ser caçados especificamente na célula filha móvel. Quando células pré-divisionais foram incubadas com aminoácidos marcados com ^{14}C , e as células móveis e as células talo resultantes da divisão celular foram analisadas quanto à presença de MCPs marcadas, por imunoprecipitação com anticorpo anti-Tar, foi possível demonstrar que somente as

Figura 13 - Síntese diferencial das MCPs durante o ciclo celular de *C.crescentus*. Células móveis de *C.crescentus* CB13 foram isoladas e a cultura prosseguiu sincronicamente através do ciclo celular. Nos pontos indicados do ciclo celular, alíquotas foram marcadas com aminoácidos contendo ^{14}C . Extratos dessas células foram imunoprecipitados com anticorpo anti-Tar, submetidos a eletroforese em gel de 10% poliacrilamida-SDS e autorradiografia. A seta aponta para o autorradiograma de um experimento de pulso e caça onde células pré-divisionais foram marcadas e após divisão celular, os extratos das células filhas talo (st) e móvel (sw) foram imunoprecipitados com anticorpo anti-Tar.

células do tipo móvel apresentavam MCPs marcadas com ^{14}C (Fig. 13), indicando que a segregação específica destas proteínas para as células móveis havia ocorrido. A localização diferencial das proteínas quimiotáticas metiladas na célula pré-divisional foi demonstrada examinando-se vesículas flageladas e não flageladas isoladas destas células, como veremos mais adiante.

1.9 Distribuição das proteínas quimiotáticas aceptoras de grupo metila em vesículas flageladas e não flageladas de células do tipo móvel.

1.9.1. Metilação in vitro das vesículas membranares obtidas da célula móvel.

A distribuição das MCPs na fração total de membrana obtida de células pré-divisionais, de células do tipo móvel e do tipo talo foi determinada in vitro usando a fração solúvel de extratos celulares como fonte de metiltransferase e S-adenosil [^3H -metil] metionina como doador do grupo metila. A atividade aceptora de grupo metila foi detectada nas células pré-divisionais e nas células filhas móveis mas não nas células filhas do tipo talo (Tabela 5A); fato confirmado com o uso de anticorpo anti-Tar, que mostrou a completa ausência de MCPs nas células talo (Fig.13)

Para determinar se as MCPs estão homogeneamente distribuídas sobre a superfície da célula móvel, ou se elas estão localizadas somente no pólo da célula que contem o flagelo, vesículas flageladas e não flageladas foram preparadas a partir de células do tipo móvel. Após lise celular suave, vesículas obtidas do pólo

Tabela 5. Atividade de aceptor de grupo metila na fração de membrana total e em vesículas membranares.

Fonte de aceptor de metila	Incorporação de metila * tritiada em MCPs
A. Membrana celular	(pmoles/mg.30min)
População mista de células	25
Célula pré-divisional	15
Célula filha móvel	4
Célula filha talo	30
B. Vesículas membranares da célula móvel	
Vesículas totais	22 (18) ⁺
Vesículas flageladas	22 (21)
Vesículas não flageladas	21 (15)

* A incorporação de 1 pmol do grupo metila tritiado a partir de S-adenosil [³H-metil] metionina (4×10^3 cpm/pmol) por mg da fração solúvel (metiltransferase) é, em cada caso, expressa por mg de proteína da fração de membrana.

+ Os números entre parêntesis foram obtidos em outro experimento idêntico.

celular contendo o flagelo foram separadas de vesículas membranares obtidas do restante da célula. Esta separação se baseou na adsorção específica das vesículas flageladas a uma coluna de proteína A-Sepharose, após tratamento da fração total de membrana com Ig G anti-flagelina (Huguenel & Newton, 1984b). As vesículas que tinham aproximadamente 1/10 do tamanho da célula, foram analisadas quanto à atividade de acceptor de grupo metila (Tabela 5B). Ambas as frações de vesícula incorporaram o grupo metila tritiado nas MCPs in vitro e a migração destas MCPs marcadas, examinada em géis de poliacrilamida-SDS (Fig. 14) foi consistente com os dados da Tabela 5A, MCPs marcadas com metila tritiada foram encontradas tanto nas vesículas carregando o flagelo como nas vesículas sem flagelo.

1.9.2. Metilação in vivo das vesículas membranares da célula móvel.

A distribuição das MCPs nas células do tipo móvel, marcadas com [3 H-metil] metionina antes do preparo das vesículas, também foi determinada. Células móveis foram isoladas e incubadas in vivo com [3 H-metil] metionina por 12 min. As vesículas foram então preparadas e separadas em vesículas flageladas e não flageladas, e as proteínas de cada fração de vesícula separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (Fig.15).

Como já vimos anteriormente, as MCPs de C. crescentus migram em géis de poliacrilamida-SDS, como bandas distintas na região de 70-92 kdal. Bandas marcadas 1,2 e 3 nesta região (Fig.15) são as proteínas quimiotáticas carboximetiladas majori-

Figura 14 - Autorradiograma de gel de poliacrilamida-SDS das proteínas metiladas in vitro de vesículas membranares flageladas (1), vesículas membranares não flageladas (2), e vesículas membranares totais (3) preparadas de células móveis. A reação de metilação in vitro utilizou S-adenosil [^3H -metil] metionina como doador do grupo metila e a fração solúvel de extratos da cepa selvagem CB13, como fonte de metiltransferase.

Figura 15 - Autorradiograma das proteínas de vesículas flageladas e não flageladas obtidas da lise de células móveis metiladas in vivo com [^3H -metil] metionina. O painel II mostra o traçado densitométrico das MCPs marcadas com ^3H -metila presentes no extrato celular total (A), nas vesículas não flageladas (B) e nas vesículas flageladas (C) após separação por eletroforese em gel de 10% poliacrilamida-SDS, como mostrado no painel I.

tárias. Outras regiões do gel, que apresentam o grupo metilado, representam proteínas não envolvidas na maquinaria quimiotática, como o fator de elongação Tu, que migra na região de 43 kdal, e a flagelina de C. crescentus (Fig. 15, painel I). Tanto as vesículas não flageladas como as vesículas flageladas preparadas de células do tipo móvel, apresentaram MCPs marcadas com metila tritiada. De acordo com os resultados obtidos após a metilação in vitro, das vesículas membranares da célula móvel (Fig.14), o experimento in vivo também mostrou que as MCPs das células móveis estão distribuídas sobre a célula inteira, ao invés de estarem agrupadas no pólo celular contendo o flagelo. No entanto, densitometria dos autorradiogramas mostrou que existe uma atividade de MCP levemente mais alta nas vesículas flageladas (Fig 15, painel II). Este pequeno enriquecimento das proteínas quimiotáticas nas vesículas carregando o flagelo não é devido à associação destas proteínas com o corpúsculo basal flagelar, já que o corpúsculo basal purificado, a partir de células metiladas in vivo, não contem proteínas quimiotáticas metiladas correspondentes às MCPs (dados não mostrados).

1.10 Distribuição das proteínas quimiotáticas aceptoras de grupo metila em vesículas flageladas e não flageladas de células pré-divisionais.

Vesículas pequenas, representando cerca de 5% do volume da célula pré-divisional, foram preparadas a partir de células pré-divisionais que tinham sido incubadas na presença de [³H-metil] metionina. As vesículas flageladas foram separadas

das vesículas não flageladas, e as proteínas de cada fração foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (Fig.16). Como no caso das vesículas das células do tipo móvel, as MCPs metiladas foram observadas em todas as frações de vesícula. No entanto, um nível mais alto de MCPs foi observado nas vesículas flageladas do que nas vesículas não flageladas (Fig. 16). Esta diferença parece ser significativa porque amostras contendo a mesma quantidade de radioatividade, determinada por precipitação com TCA, foram aplicadas nos géis e aproximadamente os mesmos níveis de outra proteína metilada de 64 kdal, que não apresenta grupos metila sensíveis a álcali, estavam presentes nas duas frações (dados não mostrados). Este aparente enriquecimento das MCPs no pólo da célula pré-divisional contendo o flagelo sugere que estas proteínas não estão uniformemente distribuídas na célula pré-divisional. Entretanto, como as vesículas não flageladas foram obtidas tanto da porção móvel como da porção talo destas células, não foi possível concluir se as MCPs estão localizadas somente na porção móvel da célula pré-divisional ou, alternativamente, em ambas as porções da célula com maior quantidade na porção móvel. Para responder a esta questão, analisou-se o conteúdo de MCPs em vesículas de tamanho maior.

Células móveis lisadas pelo procedimento de Huguenel & Newton (1984b) produzem vesículas que representam de 5-10% do volume celular (vesículas pequenas). Este procedimento de lise foi modificado para obter vesículas que contivessem uma fração maior da porção da célula móvel ou da porção da célula talo. Encontrou-se que com a introdução de tampão fosfato 0,1M no

Figura 16 - Autorradiograma de eletroforetograma das proteínas das vesículas pequenas flageladas e não flageladas preparadas a partir de células pré-divisionais metiladas *in vivo* com $[^3\text{H-metil}]$ metionina é mostrado no painel II. A porção móvel da célula pré-divisional está hachuriada (painel I). O painel III mostra o traçado densitométrico dos autorradiogramas mostrados no painel II. Os picos numerados no painel III correspondem às bandas das MCPs indicadas no painel II: (A) extrato celular total; (B) vesículas não flageladas; (C) vesículas flageladas.

tampão de lise obtinham-se vesículas que possuíam 50-70 % do volume da célula do tipo móvel (vesículas grandes).

Vesículas foram preparadas, pelo procedimento acima, a partir de células pré-divisionais marcadas in vivo com [³H-metil] metionina e então fracionadas em vesículas flageladas e não flageladas. A análise da distribuição das MCPs nas vesículas grandes mostrou que estas proteínas estavam localizadas quase que exclusivamente na fração flagelada das vesículas (Fig. 17). Este resultado parece ser significativo, porque novamente a proteína de 64 kdal estava presente em todas as frações, e aplicando-se nos géis amostras de vesículas não flageladas contendo até 14 vezes mais radioatividade, precipitável por TCA, não foi possível detectar as MCPs (resultados não apresentados). Assim parece existir uma preferência de localização das MCPs na porção flagelada da célula pré-divisional.

1.11 Síntese diferencial da proteína com atividade de metilesterase.

Como mostrado anteriormente (Tabela 4), as atividades envolvidas na maquinaria de metilação quimiotática em C.crescentus: a metiltransferase, a metilesterase e as proteínas aceptoras de grupo metila, estão sob controle do ciclo celular. Para determinar se a variação nos níveis destas atividades era devido à síntese diferencial das proteínas envolvidas, anticorpo contra a proteína Tar de Salmonella foi utilizado, demonstrando que as MCPs de Caulobacter apresentam uma síntese diferencial durante o ciclo celular, que é máxima na célula pré-divisional (Fig. 13).

I

II

Figura 17 - Autorradiograma das proteínas metiladas do extrato celular total (A); das vesículas grandes flageladas (C); e não flageladas (B), separadas por eletroforese em gel de 10% poliacrilamida-SDS é mostrado no painel II. O painel I mostra um diagrama do fracionamento das vesículas sendo que as regiões de membrana provenientes da porção móvel da célula pré-divisional apresentam-se hachuriadas.

No caso da metilesterase, foi também possível analisar sua síntese durante o ciclo de Caulobacter, visto que anticorpo anti-metilesterase de Salmonella, imunoprecipitou de extratos celulares da cepa selvagem CB15, uma banda proteica, que apresentou em géis de poliacrimida-SDS, um peso molecular aparente de 36 kdal, ausente no mutante cheB (SC1040), deficiente na atividade de metilesterase (Fig. 18A). Esta banda de 36 kdal foi encontrada nos imunoprecipitados de todos os demais mutantes quimiotáticos, com níveis normais de metilesterase.

O anticorpo anti-metilesterase foi então utilizado para imunoprecipitar as proteínas, marcadas com aminoácidos contendo ^{14}C , de populações de células sincronizadas, dos diferentes estágios do ciclo celular (Fig. 18B). Pudemos então observar que a proteína de 36 kdal é sintetizada num intervalo discreto do ciclo celular, que coincide com o período de síntese das MCPs e das proteínas componentes do flagelo.

2. Regulação dos genes das flagelinas e da maquinaria de metilação quimiotática

2.1. Mutações em flaY e flaE são pleiotrópicas

2.1.1. Complementação de mutantes com plasmídeo contendo a região flaYE

Os genes flaY e flaE fazem parte de um agrupamento de genes fla que inclui os genes estruturais da flagelina de 29 kdal (Gil & Agabian, 1983; Fig. 2) e das flagelinas de 25 kdal e 27.5 kdal (Agabian, comunicação pessoal).

Figura 18 - Identificação da proteína responsável pela atividade de metilesterase em extratos celulares e sua síntese diferencial durante o ciclo celular. (A) Extratos de células da cepa selvagem CB15 e da cepa mutante SC1040 (*cheB*) ou (B) de diferentes estágios do ciclo celular, marcadas com pulsos de aminoácidos radioativos, foram imunoprecipitados com anticorpo anti-metilesterase e as proteínas precipitadas analisadas por eletroforese de gel de 10% poliacrilamida-SDS e autorradiografia. Mr é mostrado em kdal.

Mutações em flaY e flaE mostraram-se pleiotrópicas, afetando dois aspectos diferentes da mobilidade de C. crescentus: a biogênese do flagelo e as funções quimiotáticas. Ambos os genes são necessários para a expressão de níveis normais das flagelinas e da maquinaria de metilação quimiotática. Cepas carregando mutações em flaY formam um corpúsculo basal com um filamento flagelar curto e não funcional (Johnson & Ely, 1979) enquanto que mutantes em flaE não formam flagelo visível (Johnson et al., 1983).

A capacidade do plasmídeo pRB1 (Fig. 19), um derivado do plasmídeo pRK290 que contem a região da cepa selvagem CB13, homóloga aos genes flaY e flaE, de complementar mutantes nestes genes, foi testada por observação ao microscópio de contraste de fase (Tabela 6) e investigando-se a formação de anéis de crescimento em placas de agar semi-sólido, característicos de células quimiotaticamente competentes. Mutantes com deleções em flaE : SC512 e SC520; inserções de Tn5 em flaE : SC1133, SC1062 e em flaY : SC1121, além de mutação sensível à temperatura em flaY : SC274, foram todos complementados por pRB1. Porém, nenhum dos mutantes foi complementado por plasmídeos pRB1 contendo deleções obtidas por digestão do plasmídeo com a enzima Xho I ou com a enzima Bam HI (Fig. 19).

A cepa selvagem carregando pRB1 ou pRB1 contendo deleções se apresentou móvel e quimiotaticamente competente. Estes resultados sugerem que a presença de cópias extras da região flaYE são bem toleradas e que as deleções construídas na região flaY do plasmídeo são recessivas.

Figura 19 - (A) Mapa da região *flaY**E* mostrando a localização das inserções de Tn5 (▲) nas cepas mutantes SC1997 (SC1121), SC1998 (SC1062) e SC2008 (SC1133) e as deleções (mostradas como barras hachuradas) nos mutantes SC512 e SC520. Sítios de restrição relevantes são indicados: R = Eco RI; S = Sal I; X = Xho I; H = Hind III; B = Bam HI. A região codificadora e a direção de transcrição da flagelina de 29 kdal está indicada pela seta. (B) Clones utilizados para a análise de complementação. O plasmídeo pRB1 contém o fragmento Eco RI homólogo da cepa CB13, enquanto os demais contêm a região correspondente da cepa CB15. O triângulo em pRB2 representa o Tn5 do mutante SC2008. Os retângulos abertos em pRB4 e pRB5 representam regiões deletadas. Complementação foi medida como descrito em Materiais e Métodos.

2.1.2. Síntese das flagelinas

Várias mutações na região flaYE (Fig. 19), resultam em baixos níveis de síntese das flagelinas de 25 kdal, 27,5 kdal e 29 kdal (Purucker et al., 1982). Para determinar se a síntese destas diferentes espécies de flagelinas, que apresentam reação imunológica cruzada, é aumentada aos níveis da cepa selvagem nos mutantes contendo o plasmídeo pRB1, imunoprecipitação dos extratos celulares marcados com [14 C] aa, foi feita com anticorpo anti-flagelina (Fig. 20). Autorradiografia dos imunoprecipitados separados em géis de poliacrilamida-SDS mostra o padrão de flagelinas da cepa selvagem CB15. A presença de pRB1 carregando deleções, pRB1 Δ Xho e pRB1 Δ Bam, tiveram pouco efeito neste padrão, indicando mais uma vez que as mutações de deleções eram recessivas com relação ao tipo selvagem. No mutante SC512 carregando pRK290 (pRB1 sem a região flaYE), as flagelinas não foram detectadas, mas ambas as proteínas de 25 e 27,5 kdal foram sintetizadas na presença de pRB1. Resultados semelhantes foram obtidos com SC520 carregando pRB1 (Fig. 20). O plasmídeo pRB1 com deleções Δ Xho ou Δ Bam levou à produção aumentada das flagelinas de 27,5 e 25 kdal, mas a magnitude do incremento foi bem menor no caso da flagelina de 25 kdal. Estes plasmídeos com deleções não levam à formação de flagelo normal ou mobilidade. Resultados semelhantes foram obtidos com SC1062, SC1121 e SC1133. Estes resultados sugerem que a região correspondente a flaY deletada nos plasmídeos pRB1 Δ Xho e pRB1 Δ Bam é necessária para a expressão das flagelinas e para a

Figura 20 - Proteínas imunoprecipitadas com anticorpo anti-flagelina (Shapiro et al., 1982), de extratos celulares marcados com uma mistura de aminoácidos contendo ^{14}C , da cepa selvagem e mutantes, na presença de vários plasmídeos. As proteínas (mostradas em kdal) foram separadas por eletroforese em gel de 12% poliacrilamida-SDS e visualizadas por autorradiografia. A cepa selvagem CB15, as deleções em *flaE*, SC512 e SC520, e o mutante em *flaY*, sensível a temperatura, SC274 estão indicados, assim como a presença do vetor pRK290 (-), pRB1 (+), pRB1 Δ Bam (Δ B), ou pRB1 Δ Xho (Δ X).

mobilidade da célula.

O mutante flaY, SC274, sensível a temperatura, produziu níveis reduzidos das flagelinas de 25 e 27,5 kdal e níveis elevados da flagelina de 29 kdal, quando a alta temperatura (35 °C), porém apresentou níveis normais das flagelinas quando na temperatura permissível (Fig. 20). A presença de pRB1 restaurou a mobilidade a alta temperatura e levou a um aumento na quantidade da flagelina de 25 kdal e a um decréscimo na produção de flagelina de 29 kdal (Fig. 18). A presença de pRB1 também levou a uma diminuição na proteína de 29 kdal detectada nos mutantes SC1062, SC1121 e SC1133 (dados não mostrados), sugerindo que as proporções relativas das três espécies de flagelinas são controladas e devem ser necessárias para a formação normal do filamento do flagelo.

2.1.3 Metilação das proteínas quimiotáticas.

Como demonstrado nos itens 1.3 e 1.4, a metilação das proteínas integrais de membrana, MCPs, de C.crescentus é catalizada por uma metiltransferase específica associada ao gene cheR de Caulobacter. Este gene encontra-se bastante distante da região flaY; no entanto encontrou-se que as mutações presentes nas cepas SC274, SC512, SC520 e SC1062 apresentam níveis reduzidos de atividade de metiltransferase (Tabela 6). A atividade de metiltransferase foi entretanto restabelecida nestes mutantes quando o plasmídeo pRB1 foi introduzido. As membranas destas cepas foram isoladas e a atividade aceptora de grupo metila foi também determinada, usando como fonte de metiltransfe-

Tabela 6. Atividade de metiltransferase e de acceptor de grupo metila na cepa selvagem e nas cepas mutantes fla contendo plasmídeos.

Cepa	* metiltransferase pmoles/mg.30min	** MCP % da cepa selvagem	Anel em agar 0,3%	Metilação in vivo
CB15 (wt)	20	100	+	+
SC274,pRK290	8	30	-	-
SC274,pRB1	13	50	+	+
SC512,pRK290	8	10	-	-
SC512,pRB1	15	50	+	+
SC520,pRK290	10	10	-	-
SC520,pRB1	18	50	+	+
SC1062,pRK290	9	20	-	-
SC1062,pRB1	21	75	+	+

* As membranas da cepa selvagem (CB13) foram utilizadas como fonte de MCP.

** A atividade de acceptor de grupo metila foi determinada após eletroforese em géis de poliacrilamida.

rase a fração solúvel da cepa selvagem (Tabela 6). As membranas isoladas das cepas SC274, SC512, SC520 e SC1062 contendo o vetor pRK290 apresentaram baixos níveis de atividade aceptora de grupo metila, que foi parcialmente restaurada pela presença de pRB1.

A metilação das MCPs nas cepas mutantes e complementadas com o plasmídeo pRB1 também foi determinada in vivo (Fig. 21, Tabela 6). Culturas foram incubadas com [³H-metil] metionina, e as proteínas separadas em géis de poliacrilamida-SDS. A cepa selvagem CB15 exibiu várias bandas metiladas correspondendo às MCPs (Fig. 21A). Os mutantes SC512, SC1062 (Fig. 19A), e SC520 (Fig. 21B) contendo o vetor pRK290 mostraram pouca ou nenhuma metilação das MCPs. Na presença de pRB1, o nível de metilação aumentou significativamente, confirmando os resultados de metilação in vitro descritos acima. O mutante flaY (SC274) também apresentou metilação reduzida in vivo que foi restaurada aos níveis da cepa selvagem na presença de pRB1 (resultados não mostrados). A metilação in vivo foi também analisada no mutante SC520 contendo os plasmídeos com deleção, pRB1 Δ Xho ou pRB1 Δ Bam (Fig. 21B). Os plasmídeos contendo deleções só restauraram parcialmente a capacidade de metilar as MCPs in vivo.

Estes resultados mostraram que sequências nucleotídicas na região dos genes flaY e flaE que estão localizados a 3' dos genes das flagelinas no cromossomo de C. crescentus, funcionam em trans regulando a expressão dos genes das flagelinas e dos genes quimiotáticos cheR e cheB, que estão localizados num locus distante, no cromossomo da bactéria.

Figura 21 - Metilação in vivo das proteínas de membrana envolvidas em quimiotaxia. Proteínas metiladas, na ausência de síntese proteica, com [^3H -metil] metionina, foram separadas por eletroforese em gel de 10% poliacrilamida-SDS. (A) Cepa selvagem CB15 e mutantes SC1062 e SC512 carregando ou pRB1 (+) ou pK290 (-) como indicado. (B) SC520 contendo os plasmídeos pRB1 Δ Xho (Δ X), pRB1 Δ Bam (Δ B), pRB1 (+), e pRK290 (-), como indicado.

2.2. Estudo da extensão dos genes flaY e flaE

Para definir a extensão dos genes flaY e flaE, os mutantes por inserção de Tn5 mostrados na Figura 19, foram complementados com plasmídeos contendo parte da região flaYE. O plasmídeo pRB5, que apresenta uma deleção do fragmento Hind III₁-Hind III₂ (Fig. 19A,B), foi capaz de complementar todos os mutantes flaY e flaE. A presença de pRB5 nestas cepas permitiu ao mutante nadar e tornar-se quimiotaticamente competente. Complementação de SC2008 com pRB5 permitiu a expressão quase normal das proteínas quimiotáticas metiladas (Tabela 7). Extratos celulares de SC2008 contendo pRB5 apresentaram 43% da atividade de metiltransferase e 62% da atividade de metilesterase presente na cepa selvagem (Tabela 7). Análise da síntese das flagelinas mostrou que SC2008 carregando pRB5 produz níveis normais das flagelinas (Fig. 22). Outro plasmídeo carregando uma deleção, pRB4, no qual um fragmento interno Xho I₁-Xho I₃ foi deletado (Fig. 19B), é incapaz de complementar qualquer dos mutantes por inserção de Tn5 em flaY ou flaE. Os níveis das flagelinas permaneceram baixos e extratos celulares de SC2008 contendo pRB4 apresentaram níveis basais de metiltransferase e 5% da atividade de metilesterase presente na cepa selvagem (Tabela 7). Portanto parece que a extremidade esquerda do gene flaY se encontra entre os sítios de restrição Hind III₂ e Xho I₃ (Fig. 19A). Estes resultados não eliminam porém, a possibilidade de que a região entre os sítios Xho I₁ e Hind III₁ codifique alguma função essencial.

Tabela 7. Atividade de aceptor de grupo metila (MCP), de metiltransferase e metilesterase em extratos celulares da cepa selvagem (CB15) e da cepa mutante complementada por plasmídeo.

	Fonte de MCP	Fonte de metil-transferase	Fonte de metil-esterase	+ pmol/mg por 30 min
I Atividade de MCP	CB15	CB15	-	41,5
	2008/pRB4	CB15	-	2,0
	2008/pRB5	CB15	-	37,5
II Atividade de metil-transferase	CB15	CB15	-	41,5
	CB15	2008/pRB4	-	3,0
	CB15	2008/pRB5	-	17,9
				%*
III Atividade de metil-esterase	CB15	-	CB15	100
	CB15	-	2008/pRB4	5
	CB15	-	2008/pRB5	62

* A atividade de metilesterase é dada como porcentagem da atividade presente nas células do tipo selvagem.

+ A incorporação de 1 pmol do grupo metila tritiado a partir de s-adenosil [³H-metil] metionina (4x10³ cpm/pmol) por mg da fração solúvel (metiltransferase), é em cada caso expressa por mg de proteína da fração da membrana.

Um sítio promotor foi tentativamente associado à região entre os sítios de restrição Sal I₃ e Bam HI₃ (Fig. 19), com base na expressão de uma sonda de transcrição que contém um gene que confere resistência a neomicina (neo), cujo promotor foi retirado (Champer et al., 1985), além de análise da sequência de DNA da junção flaY - flaE (Bryan & Champer, comunicação pessoal). Para expressar o gene neo, cujo promotor está ausente, o promotor do gene flaY seria utilizado, a transcrição ocorrendo na mesma direção em que ocorre no gene da flagelina de 29 kdal.

Parece que a expressão de flaY e flaE é de alguma forma interdependente porque a complementação de ambos os genes é necessária para se obter a complementação de cada um deles. pRB6 carrega o fragmento Bam HI₁ - Bam HI₃ no qual o gene flaY deve estar contido. Entretanto, nem mutantes flaY nem mutantes flaE foram complementados por pRB6 (Fig. 19). Além disso, pRB4, plasmídeo no qual parte de flaY está ausente devido à deleção, é incapaz de complementar mutantes em flaY ou flaE (Fig. 19).

2.3 Controle temporal dos genes das flagelinas e dos genes quimiotáticos nas cepas mutantes flaY e flaE

A síntese das flagelinas e a expressão das proteínas da maquinaria de metilação quimiotática foi medida em culturas sincronizadas dos mutantes flaY e flaE para determinar se os baixos níveis de expressão das flagelinas e das proteínas de metilação quimiotáticas nestes mutantes era devido a uma síntese constante ou regulada temporalmente. Para examinar a síntese das

flagelinas, populações de células do tipo móvel de SC1997 (flaY) e SC2008 (flaE) carregando um plasmídeo incapaz de complementação, pRB4, foram isoladas e permitidas prosseguir através do ciclo celular. As células foram marcadas com pulsos de aminoácidos contendo ¹⁴C e imunoprecipitadas com anticorpo anti-flagelina. O baixo nível de síntese da flagelina nestes mutantes foi demonstrado estar sob controle do ciclo celular (Fig. 22). Da mesma forma, o nível de metilação das MCPs in vivo foi medido em SC2008 (Fig. 23), nos mesmos intervalos de tempo do ciclo celular. O baixo nível de metilação das MCPs foi também observado ocorrer sob controle do ciclo celular (Fig. 23).

Várias outras cepas mutantes, incluindo SC1998 (flaE) e aquelas contendo mutações em flaK (que codifica a proteína do gancho), flaT, flaF, e flaS foram sincronizadas e o nível de síntese de flagelina determinado por imunoprecipitação. Em cada caso o nível de síntese das flagelinas foi baixo, e o baixo nível de expressão permaneceu sob controle do ciclo celular (dados não apresentados).

O plasmídeo pRB1 contendo a região da cepa CB13 que é homóloga a região flaYE, como mostrado anteriormente (item 2.1.1.) atua em trans para restabelecer a capacidade de natação e de quimiotaxia, assim como níveis normais de síntese de flagelina, metilação das MCPs e atividade de metiltransferase de vários mutantes flaY e flaE. Como mostra a Figura 22, nas cepas complementadas pelos plasmídeos, a síntese da flagelina permaneceu sob controle do ciclo celular. Da mesma forma, a Figura 23 demonstra que o plasmídeo restabelece os níveis de metilação e

Figura 23 - Autorradiograma das proteínas aceptoras de grupo metila (MCPs) metiladas in vivo com [^3H -metil] metionina durante as várias fases do ciclo celular em cepa mutante (SC2008) e complementada por plasmídeo (SC2008/pRB1). Culturas foram sincronizadas e alíquotas de células de diferentes estágios foram incubadas com [^3H -metil] metionina e os extratos marcados foram submetidos a eletroforese em gel de 10% poliacrilamida-SDS.

preserva o controle temporal de sua expressão. Assim os produtos gênicos codificados pelo plasmídeo permitem o nível correto de expressão de vários genes.

3. Expressão das proteínas de choque térmico durante o ciclo celular de Caulobacter.

3.1 A resposta ao choque térmico em C.crescentus é transitória.

Quando culturas de C.crescentus em fase log, crescendo à temperatura de 30 °C foram subitamente transferidas para a temperatura de 40 °C, as células responderam sintetizando, de forma transitória, um conjunto de proteínas (Fig. 24), denominadas proteínas de choque térmico (hsp). Quatro proteínas majoritárias, com peso molecular aparente de 83, 70, 62 e 28 kdal, além de outras bandas proteicas minoritárias, puderam ser detectadas em géis de poliacrilamida-SDS de extratos de células expostas a alta temperatura (40 °C) por 5 ou 10 min antes da marcação das células com [³⁵S] - metionina por 10 min (Fig. 24). Quando as células foram expostas a alta temperatura por períodos mais longos, antes do pulso de [³⁵S] - metionina, a síntese de várias hsps decresceu, e após 30 min de pré-incubação a alta temperatura, somente a proteína de 62 kdal era ainda sintetizada a uma velocidade relativamente alta.

Figura 24 - Síntese das proteínas induzidas por choque térmico. Células de *C. crescentus* CB15F foram transferidas de 30 para 40°C, e marcadas por 10 min com [³⁵S] -metionina após vários tempos e analisadas por eletroforese em gel de 10% poliacrilamida-SDS. Marcação a 30°C (1); marcação 5 min (2), 10 min (3), 15 min (4), 20 min (5), ou 30 min (6) após a mudança de temperatura. As pontas de seta indicam os marcadores de peso molecular em ordem decrescente. (67,55,45,25 e 18 kdal).

3.2 Cinética inicial de indução das proteínas de choque térmico

A indução das proteínas de choque térmico após a mudança para alta temperatura é um processo rápido e dependente da síntese de RNA. Rifampicina, um inibidor de transcrição, só bloqueia totalmente a indução das hsps, se adicionado às células quando da mudança de temperatura (Fig. 25A); se adicionado 1 min após a mudança, a inibição da síntese das hsps já não é total (Fig. 25A). Ainda na Figura 25, a comparação das quantidades relativas e dos pesos moleculares aparentes das hsps majoritárias de C.crescentus e E.coli sugere que a hsp70 e a hsp62 de C.crescentus são análogas às hsps de E.coli, dnaK (polipeptídeo de 72 kdal) e groEL (polipeptídeo de 64 kdal), respectivamente. Uma melhor caracterização das hsps de Caulobacter é mostrada a seguir.

3.3. Identificação da hsp62 e da hsp70 de C.crescentus utilizando-se anticorpos contra as proteínas groEL e dnaK de E.coli.

Quando extratos de células marcadas com [³⁵S] - metionina tanto a 30°C como 5 min após transferência para 40°C, foram imunoprecipitados com anticorpo contra a proteína groEL de E.coli, uma banda proteica de 62 kdal, cuja síntese é acelerada após o aumento na temperatura de incubação das células, foi visualizada em fluorogramas de géis de poliacrilamida-SDS (Fig. 26B). Esta proteína co-migrou com a proteína groEL de

Figura 25 - Cinética inicial da síntese das proteínas de choque térmico. (A) Células de *C. crescentus* CB15F foram transferidas de 30 para 40°C, marcadas com pulsos de 10 min de [³⁵S] -metionina e as proteínas analisadas por eletroforese em gel de 10% poliacrilamida-SDS. Vários tempos após a mudança de temperatura, rifampicina (50 µg/ml) foi adicionada para inibir a síntese de RNA. Rifampicina foi adicionada no (1) tempo 0, (2) 1 min, (3) 2 min, (4) 4 min, (5) 6 min, (6) 10 min após a mudança para 40°C. (B) Células de *E. coli* K12 foram transferidas de 30 para 42°C e marcadas com pulsos de 7 min de [³⁵S] - metionina a 30°C (1) ou 5 min (2) após a mudança de temperatura.

Figura 26 - Imunoprecipitação com anticorpo anti-dnaK ou anti-groEL. Extratos de células marcadas com [^{35}S]-metionina a 30°C (1,3) ou 5 min após a mudança de temperatura (2,4) foram imunoprecipitados com anticorpo anti-groEL (1,2) ou anti-dnaK (3,4) e as proteínas precipitadas foram analisadas por eletroforese em gel de 10% poliacrilamida-SDS. O painel A corresponde aos imunoprecipitados de E.coli e o painel B aos de C.crescentus.

E.coli, imunoprecipitada com o mesmo anticorpo (Fig. 26A). Assim a hsp62 de Caulobacter é análoga à proteína groEL de E.coli.

Por outro lado, quando extratos de células marcadas com [³⁵S] - metionina foram imunoprecipitados com anticorpo anti-dnaK, uma banda proteica de 70 kdal, cuja síntese também era estimulada pelo aumento na temperatura de incubação, foi visualizada no fluorograma mostrado na Figura 26B. Esta banda proteica co-migrou com a proteína dnaK de E.coli imunoprecipitada com o mesmo anticorpo (Fig. 26A). Portanto, a hsp70 de Caulobacter é análoga à proteína dnaK de E.coli.

3.4 Padrão de síntese das proteínas de choque térmico em géis bidimensionais

Para melhor caracterizar a resposta ao choque térmico de C.crescentus, a alta resolução da eletroforese em géis bidimensionais foi utilizada. A Figura 27 mostra o padrão de síntese proteica de uma população mista de células de C.crescentus em fase log, crescendo à temperatura de 30°C (painel A) ou 5 min (painel B), 15 min (painel C) e 30 min (painel D) após transferência para 40°C, marcadas por 10 min com [³⁵S] -metionina.

A análise deste conjunto de fluorogramas deu origem à Tabela 8, que descreve um total de 20 polipeptídeos induzidos após o choque térmico em C.crescentus.

3.5 Resposta ao choque térmico durante o ciclo celular de C.crescentus

Alem da ativação transitória dos genes de choque térmico

Figura 27 - Eletroforese bidimensional das proteínas de choque térmico. Células de CB15F foram marcadas com pulsos de 10 min com [^{35}S]- metionina a 30°C (painel A) ou 5 min (painel B), 15 min (painel C) e 30 min (painel D) após a transferência das células para 40°C. Extratos celulares foram submetidos a focalização isoeletrica (primeira dimensão) usando um intervalo de pH de 5-8, e então eletroforese em gel de 10% poliacrilamida-SDS (segunda dimensão). Setas indicam os marcadores de peso molecular em ordem decrescente (67,55,45 e 25 kdal).

Tabela 8. As proteínas de choque térmico de C.crescentus.

hsp (kda1)	intervalo de pH	velocidade de síntese tempo após troca de temperatura		
		5-15min	15-25min	30-40min

83	5,5-5,7	+++	-	-
70	5,1-5,7	+++	+	-
68	5,2-5,4	++	+	-
62	5,1-5,3	+++++	+++++	++++
54	5,2-5,4	++	+++	++
48	6,8-7,0	+	+	-
46	6,6-6,8	+	+	-
41	5,2-5,4	++	++	+
34	5,8-6,0	++	+	-
28a	5,2-5,4	++	++	-
28b	5,4-5,6	+	+	-
24a	5,0-5,2	+++	++	-
24b	5,6-5,8	+++	++	-
23a	5,6-5,8	++	+	-
23b	6,6-6,8	+	++	++
23c	7,4-7,6	+	+	+
21	5,5-5,7	+	-	-
20	5,8-6,0	++	++	-
15	5,4-5,6	++++	-	-
13	5,2-5,4	++++	++(*)	++

 (*) Considerada presente neste intervalo de tempo visto estar sendo sintetizada entre 30-40 min após a mudança de temperatura.

após uma elevação brusca de temperatura, uma regulação dependente do desenvolvimento foi demonstrada em vários organismos (Bienz, 1984; Kurtz & Lindquist, 1984; Zimmermann et al., 1983).

Para investigar um possível controle a nível do ciclo celular na resposta ao choque térmico em Caulobacter, células do tipo móvel foram isoladas e a cultura prosseguiu sincronicamente através do ciclo celular. Nos diferentes estágios do ciclo de vida da bactéria amostras foram retiradas e marcadas com pulsos de [^{35}S] -metionina a 30 °C ou 10 min após a transferência das células para 40 °C.

Eletroforese em géis bidimensionais de extratos de células, marcadas a 30 °C, nos vários estágios do ciclo celular mostrou um padrão proteico que era característico para cada tipo celular (Fig. 28). Assim, embora várias proteínas fossem sintetizadas durante todo o ciclo celular, algumas proteínas mostraram uma maior velocidade de síntese, num determinado estágio do ciclo. Por exemplo, proteínas 3, 8, 9 e 16 mostraram velocidade máxima de síntese no estágio de célula móvel (tempo 0); proteínas 5, 12, 19 e 20, no estágio de célula talo (45 min); proteínas 1, 13 e 18, no estágio da célula talo alongada (90 min); proteína 4, no estágio de célula pré-divisional (135 min). Outras proteínas, entretanto, pareceram ser sintetizadas somente em estágios específicos. Assim, proteínas 7, 10 e 17 foram sintetizadas somente no estágio de célula pré-divisional. Por outro lado, proteínas de 2 e 14 foram sintetizadas durante todo o ciclo exceto, pelos estágios de célula móvel e célula talo.

Apesar da variação observada no padrão de síntese pro-

Figura 28 - Padrão de síntese proteica durante o ciclo celular de *Caulobacter*. Células móveis foram isoladas e a cultura prosseguiu sincronicamente através do ciclo celular. Células nos diferentes estágios do ciclo, foram marcadas a 30°C com pulsos de 10 min de [³⁵S] -metionina e os extratos celulares foram submetidos a eletroforese bidimensional em gel de 10% poliacrilamida-SDS e fluorografia.

teica durante o ciclo de vida de Caulobacter a 30°C, a resposta ao choque térmico induzida nos diferentes estágios celulares foi a mesma (Fig. 29). Neste conjunto de fluorografias pode-se notar que a hsp70 de Caulobacter se apresentou numa posição de pH nos géis que variou de um pH mais básico nas células móveis a um pH mais ácido nas células pré-divisionais. Nas células talo ambas as formas estavam presentes, o mesmo ocorrendo na Figura 25, painéis B e C. Uma possível modificação pós-tradução pode ser responsável por esta variação.

3.6 Síntese de quatro proteínas de choque térmico a temperaturas normais

Entre as proteínas sintetizadas a 30°C algumas foram identificadas, devido a migração idêntica em géis bidimensionais, como proteínas de choque térmico: hsp70, hsp62, hsp24b e hsp23a. Hsp70 e hsp24b corresponderam as proteínas 3 e 16, que apresentaram velocidade máxima de síntese no estágio de célula móvel. Hsp62 correspondendo à proteína 6, que foi sintetizada durante todo o ciclo celular, com níveis mínimos no estágio de célula talo. Hsp23a corresponde a proteína 17, que pareceu ser sintetizada somente na fase de célula móvel (compare as Figuras 28 e 29).

Para confirmar a síntese diferencial, durante o ciclo celular de Caulobacter, das proteínas hsp70 e hsp62, utilizou-se a imunoprecipitação de extratos de células dos diferentes estágios com anticorpos anti-dnaK e anti-groEL, respectivamente. A Figura 30 mostra estes resultados, com a hsp62 apresentando

Figura 29 - Resposta ao choque térmico durante o ciclo celular de *Caulobacter*. Células nos diferentes estágios do ciclo de vida de *C. crescentus* foram marcadas com pulsos de [^{35}S]-metionina, 10 min após mudança das células para 40°C e os extratos celulares foram submetidos a eletroforese bidimensional e fluorografia.

Figura 30 - Síntese das proteínas hsp70 e hsp62 como função do ciclo celular de *Caulobacter*. Células móveis foram isoladas e prosseguiram sincronicamente através do ciclo celular, a 30°C. Em cada ponto indicado, alíquotas foram retiradas e marcadas com pulsos de [³⁵S] -metionina. Os extratos celulares foram imunoprecipitados com anticorpo anti-dnaK (A) ou anticorpo anti-groEL (B).

níveis máximos de síntese no estágio de célula pré-divisional e a hsp70 sendo sintetizada a níveis máximos na fase de célula móvel.

IV. DISCUSSÃO

C.crescentus apresenta um pequeno conjunto de mudanças morfológicas durante seu ciclo de divisão celular. Um desses eventos, a biogênese de um flagelo polar, foi demonstrado ser o resultado da ativação de um conjunto de genes estruturais (Figura 1). Esses produtos gênicos flagelares formam então uma estrutura, em um sítio determinado da célula. Como esta bactéria, agora móvel, pode responder a estímulos quimiotáticos, resolveu-se investigar se as proteínas envolvidas na resposta quimiotática eram expressas diferencialmente, em concerto com as proteínas flagelares.

Um conjunto de proteínas, envolvidas na resposta quimiotática, foi identificado em Caulobacter: as proteínas quimiotáticas metiladas (MCPs), a metiltransferase e a metilesterase, as quais estão sob controle do ciclo celular. O aparecimento das três atividades coincidiu com a presença do flagelo; quando da transição célula móvel-célula talo, com a liberação do flagelo, as três atividades de metilação quimiotática desapareceram. Para determinar se as atividades ciclo-específicas eram devidas à síntese diferencial das respectivas proteínas, foram utilizados antisoro contra uma das MCPs de Salmonella, a proteína Tar (Wang e Koshland, 1980) e antisoro contra a metilesterase de Salmonella (Snyder et al., 1984), antisoros estes que imonoprecipitam as proteínas análogas presentes em Caulobacter. Utilizando-se populações de células sincronizadas e marcação in vivo, encontrou-se que tanto as MCPs como a metilesterase são sintetizadas na célula pré-divisional, coincidente com o período de

síntese da proteína do gancho e da flagelina B, proteínas componentes do flagelo. Assim, a regulação temporal das proteínas flagelares e dos componentes da metilação quimiotática parece ser coordenada.

Mostramos ainda que estes componentes também parecem ser regulados espacialmente, porque além do flagelo, as MCPs, a metiltransferase e a metilesterase são preferencialmente localizadas na célula móvel, após divisão celular. As atividades de MCP, de metiltransferase e de metilesterase estão presentes na célula filha móvel mas não na célula filha talo, após a divisão celular. Além disso as MCPs marcadas radioativamente na célula pré-divisional são encontradas somente na célula filha do tipo móvel.

Esta localização preferencial das MCPs, na porção flagelada da célula pré-divisional, não é devida a uma associação dessas proteínas com a membrana na vizinhança do flagelo. Vesículas membranares flageladas e não flageladas, obtidas tanto de células móveis como de células pré-divisionais, apresentam as MCPs. No entanto, em vesículas flageladas obtidas de células pré-divisionais e de células móveis (em menor escala) foi encontrado um conteúdo mais elevado de MCP do que em vesículas não flageladas. Quando o método de lise das células pré-divisionais foi tal que as vesículas obtidas eram grandes (50-70% do volume correspondente à célula móvel), estas proteínas foram localizadas quase que exclusivamente na fração de vesículas flageladas. Engstrom & Hazelbauer (1982) haviam mostrado anteriormente que as MCPs em E.coli não estão concentradas na fração de membrana em

torno do flagelo. O enriquecimento encontrado em vesículas flageladas de C.crescentus, pode ser uma consequência do mecanismo de partição das MCPs na célula pré-divisional. Não podemos porém descartar a possibilidade de que o enriquecimento tenha a ver com a maneira através da qual o sinal quimiosensor é transmitido das MCPs para o flagelo.

Dos oito genes quimiotáticos identificados e mapeados por B. Ely e colaboradores, um deles demonstramos estar associado à atividade de metiltransferase (cheR) e o outro (cheB) à atividade de metilesterase. A comparação dos níveis de atividade de metilesterase e de metiltransferase, de vários mutantes nos genes cheR e cheB, com a posição do transposon Tn5 dentro de cada um desses genes, sugeriu que tais genes fazem parte de uma mesma unidade de transcrição, que ocorre na direção de cheR para cheB, já que mutações em cheR são polares. Em E.coli os genes que codificam a metiltransferase e a metilesterase fazem parte de um operon que contém ainda o gene para uma das MCPs, a proteína Tar e dois outros genes che (cheY e cheZ). Um sexto gene foi mapeado nesta região, localizado entre o locus tar e o locus cheR, e foi denominado tap, pois especifica a produção de uma MCP de 65 kdal. No entanto, mutantes na função tap não apresentam defeito óbvio na sua capacidade quimiotática (Slocum & Parkinson, 1983). A ordem determinada dos genes no operon foi tar, tap, cheR, cheB, cheY e cheZ. Em Caulobacter os genes para as MCPs não foram ainda mapeados, porém por analogia com este operon de E.coli, estamos sugerindo a presença de um gene para MCP adjacente aos genes

cheR e cheB (Fig. 2).

Em Caulobacter existem pelo menos três conjuntos de sinais regulatórios que devem atuar sobre os genes fla e che. Aqueles que controlam a ativação temporal destes genes, aqueles que controlam a distribuição espacial dos produtos gênicos e aqueles que controlam o processo de montagem do flagelo e da maquinaria quimiotática. A expressão coordenada dos vários genes fla e che pode ser controlada por um fator ativador comum, que funciona simultaneamente, porém separadamente, sobre estes genes que estão dispersos no cromossomo da bactéria (Fig. 2). É também possível que estes genes sejam controlados por um mecanismo de cascata, no qual o produto de um gene no topo da hierarquia funciona em trans, permitindo a expressão ordenada de outros genes fla e che. Este tipo de relação hierarquica ordena a expressão dos genes flagelares e quimiotáticos em E.coli (Komeda, 1982).

Em C.crescentus, encontramos que os produtos dos genes flaY e flaE são necessários para a expressão de outros genes fla e che. Inicialmente observou-se que mutantes por inserção de Tn5, nos genes flaY e flaE, que estão localizados próximo a extremidade 3' do gene da flagelina de 29 kdal, resultam na perda de mobilidade destas cepas (Fig. 19). A análise de mutantes nestes genes obtidos por inserção de Tn5 e de um mutante flaY, temperatura-sensível, mostrou que os níveis de síntese das três flagelinas, assim como os níveis de atividade de MCP, metiltransferase e metilesterase eram bastante baixos. A única diferença fenotípica conhecida entre flaY e flaE é que os mutantes

flaY são capazes de formar um filamento flagelar curto, enquanto que mutantes flaE são incapazes de formar um flagelo. Complementação destes mutantes com os plasmídeos pRB1 ou pRB3, que carregam fragmentos de DNA contendo os genes flaY e flaE intactos, leva à produção de níveis normais de síntese das flagelinas e a níveis normais das atividades das proteínas da maquinaria de metilação quimiotática. Estes resultados sugerem que os produtos dos genes flaY e flaE atuam em trans regulando a expressão dos genes proximais das flagelinas e dos genes quimiotáticos distais.

Evidências de que flaY e flaE são genes distintos foram obtidos com base na expressão de uma sonda de transcrição que contem um gene que confere resistência a neomicina (neo) e cujo promotor foi retirado (Champer et al., 1985), além de análise da sequência de DNA da junção flaY-flaE (Bryan & Champer, comunicação pessoal). Para expressar o gene neo, o promotor do gene flaY seria utilizado, a transcrição ocorrendo na mesma direção em que ocorre a transcrição do gene da flagelina de 29 kdal. Apesar de parecerem ser genes distintos, a expressão de flaY e flaE é de alguma forma interdependente visto que pRB4, que possui parte do gene flaY deletado, mas certamente contem todo o gene flaE, não complementa mutantes flaY e nem mutantes flaE. O plasmídeo pRB6 que deve conter todo o gene flaY, também não complementa flaY nem flaE. Estes resultados sugerem que os dois genes devem atuar em cis.

A natureza dos produtos dos genes flaY e flaE é

desconhecida. Eles podem fazer parte da estrutura do flagelo, podem atuar no processo de montagem do flagelo ou podem ter apenas um papel regulatório. Dos outros genes fla, que afetam os níveis das flagelinas, somente flaK que codifica a proteína do gancho, tem seu produto gênico identificado. A existência de vários mutantes fla, capazes de inibir a síntese das flagelinas, é consistente com a regulação hierárquica encontrada por Komeda, em E.coli. Ele encontrou que os genes das flagelinas e os genes quimiotáticos estão na base da hierarquia, e que a transcrição destes genes é reprimida em mutantes nos genes que estão mais altos na hierarquia.

Os baixos níveis de expressão das flagelinas e das proteínas da maquinaria de metilação quimiotática nos mutantes flaY e flaE, ocorrem no período correto do ciclo celular. A complementação com plasmídeos contendo os genes flaY e flaE intactos resulta na síntese de níveis normais das flagelinas e dos produtos dos genes quimiotáticos, enquanto o controle temporal é mantido. Estes resultados demonstram que a regulação temporal dos genes fla e che pode ser separada da regulação em trans que modula as quantidades dos produtos gênicos sintetizados. Se os dois mecanismos de regulação são realmente independentes, deve ser possível isolar mutantes nos quais o controle do ciclo celular sobre a síntese das flagelinas e as proteínas quimiotáticas está obliterado. Tanto os genes fla como os genes che seriam expressos durante todo o ciclo celular nestes mutantes, ou estes genes nunca seriam ativados. Uma classe de mutantes foi isolada nos quais os genes fla estão completamente

bloqueados; estes são os mutantes bloqueados na replicação do DNA (Osley et al., 1977). A ativação de pelo menos dois conjuntos de genes, os genes das flagelinas e o gene da proteína do gancho, está bloqueados nestes mutantes (Osley et al., 1977; Sheffery & Newton, 1981).

Além do bloqueio da replicação do DNA, deve haver outra maneira de alterar a ativação, controlada pelo ciclo celular, dos genes das flagelinas e dos genes quimiotáticos. Como estes genes não estão agrupados no cromossomo da bactéria, a existência de um mensageiro solúvel, que pode interagir com todos estes genes, é uma hipótese plausível. Mutações que alteram a disponibilidade deste mensageiro podem impedir a regulação temporal destes genes. Candidatos para este tipo de mensageiro são os nucleotídeos cíclicos, cAMP e cGMP. Em E.coli, é conhecido que glicose reprime a formação do flagelo e que cAMP exógeno previne esta repressão (Yokota e Goetz, 1970). Além disso, a expressão do gene flaI de E.coli, que é um gene regulatório no topo da hierarquia dos genes flagelares, é controlado por repressão catabólica e necessita tanto de cAMP como da proteína CAP (proteína ativadora do catabolismo) para sua expressão (Komeda, 1982).

Em Caulobacter foram também obtidas evidências implicando os nucleotídeos cíclicos no controle do ciclo celular. Quando células de C.crescentus são transferidas de glicose para lactose elas sofrem um bloqueio temporário, parando no estágio do ciclo celular, logo antes da síntese das flagelinas; este bloqueio porém, pode ser revertido por adição de derivados de cAMP (Shapiro et al., 1972). Demonstrou-se ainda, que derivados de

cGMP impedem a síntese das flagelinas e a adição de derivados de cAMP neutralizam este bloqueio (Kurn & Shapiro, 1976).

Tentativas preliminares de alterar o período de síntese das flagelinas pela adição de dibutiril-cAMP, não tiveram sucesso. Talvez seja necessário analisar a expressão gênica regulada pelo ciclo celular em cepas onde o metabolismo de nucleotídeos cíclicos esteja alterado.

C.crescentus responde a uma brusca elevação de temperatura induzindo transitoriamente um conjunto de 20 proteínas, que são coordenadamente expressas após a mudança de temperatura, cada uma apresentando um aumento característico na sua velocidade de síntese. A proteína mais abundantemente sintetizada após choque térmico é uma proteína de 62 kdal que também é aquela, cuja velocidade de síntese, permanece alta por um período mais longo, após a mudança de temperatura. Esta proteína foi identificada por reatividade imunológica cruzada com anticorpo anti-groEL, como análoga à proteína groEL, a proteína de choque térmico mais abundante em E.coli (Neidhardt et al., 1984).

Outra hsp majoritária de Caulobacter, uma proteína de 70 kdal, foi identificada como análoga à proteína dnaK de E.coli, visto que anticorpo anti-dnaK imunoprecipitou especificamente a hsp70 de Caulobacter. A reatividade imunológica cruzada encontrada entre a proteína dnaK de E.coli e a hsp70 de Caulobacter era de certa forma esperada, pois o sequenciamento do gene dnaK mostrou 50% de homologia, a nível da sequência de aminoácidos deduzida a partir do DNA, com a proteína de choque térmico, hsp70, de Drosophila (Bardwell & Craig, 1984). Além disso, a

hsp70 induzida em células de galinha, mostrou antigenicidade cruzada com a hsp70 induzida nos mais diversos organismos eucarióticos, desde levedura até células humanas (Kelley & Schlesinger, 1982). No caso da proteína groEL, uma proteína similar, reconhecida pelo anticorpo anti-groEL, cuja síntese foi associada à infecção pelo fago ϕ 29, foi descrita em B. subtilis (Carrascosa et al., 1982). As proteínas de choque térmico provavelmente exercem funções similares na proteção de todos organismos, contra vários estresses do meio ambiente, e esta deve ser a razão porque elas são bastante conservadas.

A proteína dnaK tem um papel na transcrição e na replicação bacteriana (Itikawa & Ryu, 1979) além de ser um modulador negativo da resposta de choque térmico (Tilly et al., 1983). A hsp70 de Drosophila, por outro lado, também foi implicada como um inibidor da resposta de choque térmico. Outras possíveis analogias de função entre as hsp70 em procariotos e eucariotos restam ser determinadas; o fato de que, tanto em E. coli como em Dictyostelium, esta proteína foi encontrada fosforilada, fortalece a possibilidade de que haja outras semelhanças (Loomis et al., 1982; Zylicz et al., 1983).

Superposta à ativação transitória dos genes de choque térmico após um aumento de temperatura, uma regulação destes genes a nível do desenvolvimento, foi demonstrada em vários organismos (Bienz, 1984; Kurt & Lindquist, 1984; Kurtz et al., 1986; Zimmerman et al., 1983). Existem estágios de desenvolvimento ou tipos celulares nos quais um sub-conjunto de genes de choque térmico é induzido em condições fisiológicas normais e outros nos

quais um sub-conjunto de genes de choque térmico não é induzido mesmo durante o choque térmico. Como Caulobacter apresenta um ciclo de desenvolvimento, foi investigado um possível controle a nível do ciclo celular da resposta de choque térmico.

Quando células de C.crescentus, nos diferentes estágios do ciclo celular, foram submetidas a choque térmico, o mesmo padrão de indução das hsps foi encontrado em géis bidimensionais. No entanto, quatro proteínas de choque térmico (hsp70, hsp62, hsp24b e hsp23a) são aparentemente sintetizadas em culturas crescendo a temperatura normal e sua síntese varia durante o ciclo celular. A hsp70 e a hsp24b apresentam um máximo de síntese no estágio de célula móvel; a hsp62 é sintetizada durante todo o ciclo, mais a níveis mínimos no estágio de célula talo, enquanto que a hsp23a é sintetizada somente no estágio de célula móvel.

Assim um controle a nível do ciclo celular não parece ocorrer durante a resposta ao choque térmico em Caulobacter. Entretanto, em condições normais de temperatura, algumas das proteínas de choque térmico são sintetizadas e sua síntese está sob controle do ciclo celular. Portanto a indução da síntese das proteínas de choque térmico é coordenada durante o choque térmico e não coordenada durante o desenvolvimento em Caulobacter.

Para investigar os sinais moleculares que determinam a ativação da síntese de proteínas específicas, em tempos determinados do ciclo celular, os genes codificando estas proteínas devem ser identificados e isolados. No caso particular da hsp70, seu gene em Caulobacter deve ser facilmente isolado utilizando sua provável homologia com os genes da proteína dnaK de E.coli

e da hsp70 de Drosophila. Resultados preliminares mostraram a hibridização de um fragmento de restrição com BamHI, do DNA de Caulobacter, de 3,3 kb, utilizando-se como sonda o gene da hsp70 de Drosophila.

No caso dos genes envolvidos em quimiotaxia, a estratégia de clonagem que tem sido utilizada depende unicamente de se ter o transposon Tn5 inserido no gene de interesse, técnica usada com sucesso para a clonagem da região flaYE (Purucker et al., 1982). A inativação de um gene por Tn5 implica que este elemento está inserido dentro ou muito próximo ao gene estrutural ou região de controle do gene. O DNA, digerido com enzimas de restrição, de um mutante contendo Tn5 inserido no seu genoma, é recuperado em transformantes de E.coli, resistentes a canamicina (codificada pelo transposon). Este método permite o isolamento de maneira relativamente simples, de qualquer sequência de DNA que esteja ligada ao transposon. Usando-se o fragmento de DNA contendo o Tn5 pode-se obter de um banco de clones genômicos a sequência selvagem (não interrompida pelo Tn5), do gene de interesse. Plasmídeos, contendo o gene em estudo, devem ser capazes de complementar os defeitos de mutantes neste gene particular, para que se confirme a presença do gene intacto e completo.

V. RESUMO

Caulobacter crescentus apresenta um flagelo e é móvel somente durante um período limitado do seu ciclo celular. Este fato permite estudar a maquinaria quimiotática de Caulobacter em função da habilidade estrutural da célula em responder a um estímulo quimiotático.

As proteínas envolvidas nas reações de metilação quimiotática foram identificadas em Caulobacter crescentus. As proteínas quimiotáticas metiladas (MCPs), a metiltransferase e a metilesterase apresentaram altos níveis de atividade na célula móvel, mas as três atividades eram perdidas quando esta célula liberava seu flagelo e se transformava numa célula talo.

Utilizando-se anticorpo contra uma das MCPs de Salmonella foi possível demonstrar que as proteínas quimiotáticas metiladas eram sintetizadas antes da divisão celular, no mesmo período do ciclo onde ocorre a síntese dos componentes do flagelo. Similarmente, um anticorpo obtido contra a metilesterase de Salmonella foi utilizado para estudar a síntese da proteína análoga em Caulobacter, a qual também era sintetizada durante um período discreto do ciclo celular, coincidente com a síntese das MCPs.

Mutantes quimiotáticos de Caulobacter foram analisados quanto à sua capacidade de metilar ou desmetilar as MCPs e encontrou-se que mutantes no gene cheR não apresentam atividade de metiltransferase e mutantes no cheB não apresentam atividade de metilesterase.

Como tanto o flagelo como as MCPs são direcionados somente para uma das células filhas (a célula móvel), após a divisão celular, analisamos a distribuição das MCPs na membrana das células móveis e das células pré-divisionais. Vesículas flageladas e não flageladas foram preparadas a partir dessas células e separadas por cromatografia de imunoafinidade. O nível das MCPs, que haviam sido marcadas com metila tritiada, quer in vitro quer in vivo, foi determinado nestas vesículas. Vesículas membranares pequenas, isoladas de células móveis, continham as MCPs metiladas tanto na fração flagelada como na não flagelada, indicando que as MCPs não estão especificamente localizadas na vizinhança imediata do flagelo. A distribuição das MCPs foi também examinada nas vesículas flageladas e não flageladas isoladas de células pré-divisionais. A análise de vesículas pequenas mostrou um certo enriquecimento das MCPs nas vesículas flageladas, enquanto o estudo de vesículas grandes mostrou que as MCPs são preferencialmente localizadas na porção da célula pré-divisional que vai dar origem à célula móvel.

Os genes envolvidos na maquinaria quimiotática, assim como os genes responsáveis pela biogênese do flagelo são regulados temporalmente durante o ciclo celular de Caulobacter. Mutantes em flaY e flaE, incapazes de montar um flagelo completo, sintetizam pequenas quantidades das flagelinas e dos produtos dos genes cheR e cheB. Esses genes fla, estão localizados a 3' de um conjunto de genes das flagelinas (Fig. 2) e distantes dos genes che mencionados. Entretanto, os genes flaY e flaE atuaram em trans, regulando a expressão dos genes das fla-

gelinas e dos genes quimiotáticos cheR e cheB.

Os baixos níveis das flagelinas e dos produtos dos genes quimiotáticos encontrados nos mutantes flaY e flaE ocorrem no período correto do ciclo celular. Complementação destes mutantes com plasmídeos contendo a região flaYE intacta resultou na síntese de níveis normais das flagelinas e dos produtos dos genes quimiotáticos, mantendo o controle temporal destes genes durante o ciclo celular. Estes resultados demonstraram que o controle temporal dos genes fla e che pode ser separado da regulação em trans que modula a quantidade sintetizada dos produtos desses genes.

O fenômeno de choque térmico, que é a resposta universal das células a um aumento brusco de temperatura, tem sido utilizado como modelo para estudo do controle da expressão gênica, tanto em procariotos como eucariotos.

A resposta de choque térmico foi analisada em Caulobacter crescentus e 20 polipeptídeos, induzidos transitoriamente, foram identificados em géis bidimensionais. Duas das proteínas induzidas, hsp62 e hsp70, foram identificadas, utilizando anticorpos específicos, como análogas a duas proteínas de choque térmico de E.coli, groEL e dnaK, respectivamente.

As hsps de Caulobacter foram expressas coordenadamente, em resposta ao aumento de temperatura, durante os vários estágios do seu ciclo celular. No entanto, em condições normais de temperatura, quatro hsps (hsp70, hsp62, hsp24b e hsp23a) foram sintetizadas e sua síntese mostrou estar sob controle do ciclo celular.

VI. BIBLIOGRAFIA

Adler, J. 1969. Chemoreceptors in bacteria. Science 166, 1588 - 1597.

Agabian, N., Evinger, M. & Parker, E. 1979. Generation of asymmetry during development. J. Cell Biol. 81, 123 - 136.

Aksamit, R. & Koshland, D. E., Jr. 1974. Identification of the ribose binding protein as the receptor for ribose chemotaxis in Salmonella typhimurium. Biochemistry 13, 4473 - 4478.

Amemiya, K., Wu, C. W. & Shapiro, L. 1977. Caulobacter crescentus RNA polymerase: purification and characterization of holoenzyme and core polymerase. J. Biol. Chem. 252, 4157 - 4165.

Aswad, D. & Koshland, D. E., Jr. 1974. Role of methionine in bacterial chemotaxis. J. Bacteriol. 118, 640 - 645.

Aswad, D. & Koshland, D. E., Jr. 1975. Evidence for an S-adenosylmethionine requirement in the chemotactic behaviour of Salmonella typhimurium. J. Mol. Biol. 97, 207 - 223.

Bardwell, J. C. A. & Craig E. A. 1984. Major heat shock gene of Drosophila and the Escherichia coli inducible dnaK gene are homologous. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 848 - 852.

Bendis, I. K. & Shapiro, L. 1973. DNA-dependent RNA polymerase of Caulobacter crescentus. J. Bacteriol. 115, 848 - 857.

Berg, H. C. & Brown, D. A. 1972. Chemotaxis in Escherichia coli analysed by three-dimensional tracking. Nature 239, 500 - 504.

Bienz M. 1984. Developmental control of the heat shock response in Xenopus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 3138 - 3142.

Bienz, M. & Gurdon, J. B. 1982. The heat shock response in Xenopus oocytes is controlled at the translational level. Cell 29, 811 - 819.

Bollinger, J., Park, C., Harayama, S. & Hazelbauer, G. L. 1984. Structure of the Trg protein: Homologies with and differences from other sensory transducers of Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 3287 - 3291.

Bonato, M. C. M., Silva, A. M., Gomes, S.L., Maia, J. C. C. & Juliani, M. H. 1986. HSP70 is induced during sporulation in Blastocladiella emersonii. Submetido à publicação.

Boyd, A., Kendall, K. & Simon, M. I. 1983. Structure of the serine chemoreceptor in Escherichia coli. Nature 301, 623 - 626.

Bryan, R., Champer, R., Gomes, S. L., Ely, B. & Shapiro, L. Separation of temporal control and trans-acting modulation of

flagellin and chemotaxis genes in Caulobacter. Submetido à publicação.

Bryan, R., Purucker, M., Gomes, S. L., Alexander, W. & Shapiro, L. 1984. Analysis of the pleiotropic regulation of flagellar and chemotaxis gene expression in Caulobacter crescentus by using plasmid complementation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 1341 - 1345.

Carrascosa, J. L., Garcia, J. A. & Salas M. 1982. A protein similar to Escherichia coli groEL is present in Bacillus subtilis. J. Mol. Biol. 158, 731 - 737.

Chamberlin, M. 1974. The selectivity of transcription. Ann. Rev. Biochem. 43, 721 - 775.

Champer, R., Bryan R., Gomes S. L., Purucker, M. L. & Shapiro, L. 1985. Temporal and spatial control of flagellar and chemotaxis gene expression during Caulobacter cell differentiation. In: The Molecular Biology of Development. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50, 831-840.

Dahlquist, F. W., Lovely, P. & Koshland, D. E., Jr. 1972. Quantitative analysis of bacterial migration in chemotaxis. Nat. New Biol. 236, 120 - 123.

De Franco, A. L., Parkinson, J. S. & Koshland, D. E., Jr. 1979. Functional homology of chemotaxis genes in Escherichia coli and Salmonella typhimurium. J. Bacteriol. 139, 107 - 114.

Degnan, S. T. & Newton, A. 1972. Chromosome replication during development in Caulobacter crescentus. J. Mol. Biol. 64, 671 - 680.

Ditta, G., Stanfield, S., Corbin, D. & Helinski, D. R. 1980. Broad host range DNA cloning system for gram-negative bacteria: Construction of a gene bank of Rhizobium meliloti. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 7347 - 7351.

Ely B. 1979. Transfer of drug resistance factors to the dimorphic bacterium Caulobacter crescentus. Genetics 91, 371 - 380.

Ely, B. & Croft, R. H. 1982. Transposition mutagenesis in Caulobacter crescentus. J. Bacteriol. 149, 620 - 625.

Ely, B., Croft, R. H. & Gerardot, C. J. 1984. Genetic mapping of genes required for motility in Caulobacter crescentus. Genetics 108, 523 - 532.

Engstrom, P. & Hazelbauer, G. L. 1982. Methyl-accepting chemotaxis proteins are distributed in the membrane independently from basal ends of bacterial flagella. Biochem. Biophys. Acta 686, 19 - 26.

Evinger, M. & Agabian, N. 1977. Envelope-associated nucleoid from Caulobacter crescentus stalked and swarmer cells. J. Bacteriol. 157, 727 - 732.

Fukuda, A., Asada, M., Koyasu, S., Yoshida, H., Yaginuma, K. & Okada, Y. 1981. Regulation of polar morphogenesis in Caulobacter crescentus. J. Bacteriol. 145, 559 - 572.

Fukuda, A., Koyasu, S. & Okada, Y. 1978. Characterization of two flagella-related proteins from Caulobacter crescentus. FEBS Lett. 95, 70 - 75.

Galloway, R. J. & Taylor, B. L. 1980. Histidine starvation and adenosine 5'-triphosphate depletion in chemotaxis of Salmonella typhimurium. J. Bacteriol. 144, 1068 - 1075.

Georgopoulos, C. P. 1977. A new bacterial gene (groPC) which affects lambda DNA replication. Mol. Gen. Genet. 151, 35 - 39.

Georgopoulos, C. P. & Eisen, H. 1974. Bacterial mutants which block phage assembly. J. Supramol. Struct. 2, 349 - 359.

Georgopoulos, C. P. & Herskowitz I. 1971. Escherichia coli mutants blocked in lambda DNA synthesis. In: The Bacteriophage Lambda (Hershey, D., ed.) pp. 553 - 554. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, N. Y.

Gil, P. R. & Agabian, N. 1982. A comparative structural analysis of the flagellin monomers of Caulobacter crescentus indicates that these proteins are encoded by two genes. J. Bacteriol. 150, 925 - 933.

Gil, P. R. & Agabian, N. 1983. The nucleotide sequence of the Mr = 28,500 flagellin gene of Caulobacter crescentus. J. Biol. Chem. 258, 7395 - 7401.

Gomes, S. L. & Shapiro, L. Differential expression and positioning of chemotaxis methylation proteins in Caulobacter. J. Mol. Biol. 178, 551 - 558.

Gomes, S. L., Juliani, M. H., Maia, J. C. C. & Silva, A. M. 1986. Heat-shock protein synthesis during development in Caulobacter. J. Bacteriol., in press.

Goy, M. F., Springer, M.S. & Adler, J. 1977. Sensory transduction in Escherichia coli. Role of a protein methylation reaction in sensory adaptation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 4964 - 4968.

Goy M. F., Springer M.S. & Adler, J. 1978. Failure of sensory adaptation in bacterial mutants that are defective in a protein methylation reaction. Cell 15, 1231 - 1240.

Grossman, A. D., Erickson, J. W. & Gross, C. A. 1984. The htpR gene product of E. coli is a sigma factor for heat-shock promoters. Cell 38, 383 - 390.

Hazelbauer, G. L. 1975. The maltose chemoreceptor of Escherichia coli. J. Bacteriol. 122, 206 - 214.

Hazelbauer, G. L. & Adler J. 1971. Role of the galactose binding protein in chemotaxis of Escherichia coli toward galactose. Nat. New Biol. 230, 101 - 104.

Hazelbauer, G. L. & Harayama, S. 1983. Sensory transduction in bacterial chemotaxis. Int. Rev. Cytol. 81, 33 - 70.

Hendrix, R. W. 1979. Purification and properties of groE, a host protein involved in bacteriophage assembly. J. Mol. Biol. 129, 375 - 392.

Hirschman, J., Wong, P. K., Sei, K. Keener, J. & Kustu, S. 1985. Products of nitrogen regulatory genes ntr A and ntr C of enteric bacteria activate gln A transcription in vitro: Evidence that ntrA product is a σ factor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 7525 - 7529.

Hirshfield, I. N., Bloch, P. L., VanBogelen, R. A. & Neidhardt, F. C. 1981. Multiple forms of lysyl-transfer ribonucleic acid synthetase in Escherichia coli. J. Bacteriol. 146, 341 - 351.

Huguenel, E. D. & Newton, A. 1984a. Evidence that subnuclear flagellin pool in Caulobacter crescentus are precursors in flagellum assembly. J. Bacteriol. 157, 727 - 732.

Huguenel, E. D. & Newton, A. 1984b. Isolation of flagellated membrane vesicles from C. crescentus cells: Evidence for functional differentiation of polar membrane domains. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 3409 - 3413.

Hunt, T.P. & Magasanik, B. 1985. Transcription of glnA by purified Escherichia Coli components: Core RNA polymerase and the products of glnF, glnC, and glnL. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 8453-8457.

Itikawa, H & Ryu, J. I. 1979. Isolation and characterization of a temperature-sensitive dnaK mutant of Escherichia coli B. J. Bacteriol. 138, 339 - 344.

Johnson, R. C. & Ely B. 1977. Isolation of spontaneously-derived mutants of Caulobacter crescentus. Genetics 86, 25 - 32.

Johnson, R. C. & Ely, B. 1979. Analysis of non-motile mutants of the dimorphic bacterium Caulobacter crescentus. J. Bacteriol. 137, 627 - 634.

Johnson, R. C., Ferber, D. M. & Ely, B. 1983a. Synthesis and assembly of flagellar components by Caulobacter crescentus motility mutants. J. Bacteriol. 154, 1137 - 1344.

Johnson, W. C., Moran, C.P. & Losick, R. 1983b. Two RNA polymerase sigma factors from Bacillus subtilis discriminate between overlapping promoters for a developmentally regulated gene. Nature 302, 800 - 804.

Kassavetis, G. A. & Geiduschek, E. P. 1984. Defining a bacteriophage T4 late promoter: Bacteriophage T4 gene 55 protein suffices for directing late promoter recognition. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 5101 - 5105.

Kehry, M. R., Doak, T. G. & Dahlquist, F. W. 1985. Sensory adaptation in bacterial chemotaxis: regulation of demethylation. J. Bacteriol. 163, 983 - 999.

Kelley, P. M. & Schlesinger, M. J. 1982. Antibodies to two major chicken heat shock proteins cross-react with similar proteins in widely divergent species. Mol. Cell Biol. 2, 267 - 274.

Kleene, S. J., Toews, M. L., Adler, J. 1977. Isolation of glutamic acid methyl ester from an Escherichia coli membrane protein involved in chemotaxis. J. Biol. Chem. 252, 3214 - 3218.

Koiwai, O. & Hayashi H. 1979. Studies on bacterial chemotaxis. IV. Interaction of maltose receptor with a membrane-bound chemosensing component. J. Biochem. 86, 27 - 34.

Komeda, Y. 1982. Fusions of flagellar operons to lactose genes on a Mu lac bacteriophage. J. Bacteriol. 150, 16 - 26.

Kondoh, H., Ball, C. B. & Adler J. 1979. Identification of a methyl-accepting chemotaxis protein for the ribose and galactose chemoreceptors of Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 260 - 264.

Kort, E. N., Goy, M. F., Larsen, S. H. & Adler, J. 1975. Methylation of a protein involved in bacterial chemotaxis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 3939 - 3943.

Koyasu, S., Asada, M., Fukuda, A. & Okada, Y. 1981. Sequential polymerization of flagellin A and flagellin B into Caulobacter flagella. J. Mol. Biol. 153, 471 - 475.

Krikos, A., Mutoh, N., Boyd, A. & Simon, M. I. 1983. Sensory transducers of E. coli are composed of discrete structural and functional domains. Cell 33, 615 - 622.

Kurn N. & Shapiro L. 1976. Effect of 3':5' - cyclic GMP derivatives on the formation of Caulobacter surface structures. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 3303 - 3307.

Kurtz, S., Rossi, J., Petko, L. & Lindquist, S. 1986. An ancient developmental induction: Heat-shock proteins induced in sporulation and oogenesis. *Science* 231, 1154-1157.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature* 226, 680 - 685.

Lagenaur, C. & Agabian, N. 1976. Physical characterization of Caulobacter crescentus flagella. *J. Bacteriol.* 128, 435 - 444.

Lagenaur, C. & Agabian, N. 1978. Caulobacter flagellar organelle: synthesis, compartmentation and assembly. *J. Bacteriol.* 135, 1062 - 1069.

Landick, R., Vaughan V., Lan, E. I., VanBogelen, R. A. Erickson, J. W. & Neidhardt, F. C. 1984. Nucleotide sequence of the heat shock regulatory gene of E. coli suggests its protein product may be a transcriptional factor. *Cell* 37, 175 - 182.

Larsen, S. H., Adler, J., Gargus, J. J. & Hogg, R. W. 1974a. Chemomechanical coupling without ATP: The source of energy for mobility and chemotaxis in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71, 1239 - 1243.

Larsen, S. H., Reader, R. W., Kort, E. N., Tso, W. W. & Adler J. 1974b. Change in direction of flagellar rotation is the basis of the chemotatic response in Escherichia coli. *Nature* 249, 74 - 77.

Loomis, W. F., Wheeler, S. A. & Schmidt, J. 1982. Phosphorylation of the major heat shock protein of Dictyostelium discoideum. Mol. Cell. Biol. 2, 484 - 489.

Losick, R., & Pero J. 1981. Cascade of sigma factors. Cell 25, 582-584.

Macnab, R. M. 1977. Bacterial flagella rotating in bundles: A study in helical geometry. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 221 - 225.

Macnab, R. M. & Koshland, D. E., Jr. 1972. The gradient-sensing mechanism in bacterial chemotaxis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 2509 - 2512.

Macnab, R. M. & Ornston, M. K. 1977. Normal-to-curly flagellar transitions and their role in bacterial tumbling. Stabilization of an alternative quaternary structure by mechanical force. J. Mol. Biol. 112, 1 - 30.

Maniatis, T., Fritsch, E. F. & Sambrook, J. 1982. Molecular Cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York.

Milhausen, H., Gil, P. R., Parker G. & Agabian N. 1982. Cloning of developmentally-regulated flagellin genes from Caulobacter

crescentus via immunoprecipitation of polyribosomes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 6847 - 6851.

Miller, J. 1972. Experiments on molecular genetics. Cold Spring Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

Minoshima, S. & Hayashi, H. 1980. Studies on bacterial chemotaxis VI. Effect of the cheX mutation on the methylation of methyl-accepting chemotaxis protein of Escherichia coli. J. Biochem. 87, 1371 - 1377.

Nathan, P., Gomes, S. L., Hahnenberger, K., Newton, A. & Shapiro, L. 1986. Differential localization of membrane receptor chemotaxis proteins in the Caulobacter predivisinal cell. J. Mol. Biol., in press.

Neidhardt, F. C., & VanBogelen, R. A. 1981. Positive regulatory gene for temperature-controlled proteins in Escherichia coli. Biochem. Biophys. Res. Commun. 100, 894 - 900.

Neidhardt, F. C., VanBogelen, R. A. & Vaughn V. 1984. The genetics and regulation of heat-shock proteins. Ann. Rev. Genet. 18, 295 - 329.

Neidhardt, F.C., Phillips, T. A., VanBogelen, R. A., Smith, M. W. & Georgalis Y. 1981. Identity of the B56.5 protein, the

A-protein, and the groE gene product of Escherichia coli. J. Bacteriol. 145, 513 - 520.

O'Farrell, P.H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J. Biol. Chem. 250, 4007 - 4021.

Ohta, N., Chen, L.-S. & Newton, A. 1982. Isolation and expression of cloned hook protein gene from Caulobacter crescentus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 4863 - 4867.

Ohta, N., Swanson, E., Ely, B. & Newton, A. 1984. Physical mapping and complementation analysis of Tn5 mutations in Caulobacter crescentus: organization of transcriptional units in the hook cluster. J. Bacteriol. 158, 897 - 904.

Osley, M. A. & Newton, A. 1980. Temporal control and the cell cycle in Caulobacter crescentus: Roles of DNA chain elongation and completion. J. Mol. Biol. 138, 109 - 128.

Osley, M. A., Sheffery, M. & Newton, A. 1977. Regulation of flagellin synthesis in the cell cycle of Caulobacter. Dependence on DNA replication. Cell 12: 393 - 400.

Parkinson, J. S. 1978. Complementation analysis and deletion mapping of Escherichia coli mutants defective in chemotaxis. J. Bacteriol. 135, 45 - 53.

Parkinson, J. S. 1981. Genetics of bacterial chemotaxis. Symp. Soc. Gen. Microbiol. 37, 265 - 290.

Parkinson, J. S. & Revello, P.T. 1978. Sensory adaptation mutants of E.coli. Cell 15, 1221 - 1230.

Phillips, T. A., VanBogelen, R. A. & Neidhardt, F. C. 1984. The lon (capR) gene product of Escherichia coli is a heat-shock protein. J. Bacteriol. 159, 237 - 287.

Poindexter J. S., Hornack, P. R. & Armstrong, P.A. 1967. Intracellular development of a large DNA bacteriophage lytic for Caulobacter crescentus. Arch. Mikrobiol. 59, 237 - 246.

Purucker, M., Bryan, R., Amemiya, K., Ely, B. & Shapiro, L. 1982. Isolation of a Caulobacter gene cluster specifying flagellum production by using non-motile Tn5 insertion mutants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 6797 - 6801.

Ritossa, F. 1962. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in Drosophila. Experientia 18, 571 - 573.

Rollius, C. & Dahlquist, F. W. 1981. The methyl-accepting chemotaxis proteins of E. coli: A repellent- stimulated, covalent modification, distinct from methylation. Cell 25, 333 - 340.

Russo, A. F. & Koshland, D. E., Jr. 1983. Separation of signal transduction and adaptation functions of the aspartate receptor in bacterial sensing. *Science* 220, 1016 - 1020.

Saito, H. & Uchida H. 1977. Initiation of the DNA replication of bacteriophage lambda in Escherichia coli K-12. *J. Mol. Biol.* 113, 1 - 25.

Saito, H. & Uchida, H. 1978. Organization and expression of the dnaJ and dnaK genes of Escherichia coli K-12. *Mol. Gen. Genet.* 164, 1 - 8.

Schlesinger, M. J., Ashburner, M. & Tissieres A. 1982. Heat shock from bacteria to man. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York.

Schmidt, J. M. & Stanier, R. Y. 1966. The development of cellular stalks in bacteria. *J. Cell Biol.* 28, 423 - 436.

Segall, J. E., Manson, M. D. & Berg H. C. 1982. Signal processing times in bacterial chemotaxis. *Nature* 296, 855 - 857.

Shapiro, L., & Agabian - Keshishian, N. 1970. Specific assay for differentiation in the stalked bacterium Caulobacter crescentus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 67. 200 - 203.

Shapiro, L., Alexander L., Bryan, R., Champer, R., Frederikse, P., Gomes, S. L., Hahnenberger, K. & Ely, B. 1985. Biogenesis of a polar flagellum and a chemosensory system during Caulobacter cell differentiation. In: Sensing and response in microorganisms (Eisenback, M. & Balaban M., eds). Elsevier Publishers. pp. 93 - 106.

Shapiro, L., Maizel, J. V., Jr. 1973. Synthesis and structure of Caulobacter crescentus flagella. J. Bacteriol. 113. 478 - 485.

Shapiro, L., Mansour, J., Shaw, P. & Henry, S. 1982. Synthesis of specific membrane proteins is a function of DNA replication and phospholipid synthesis in Caulobacter crescentus. J. Mol. Biol. 159: 303 - 322.

Shaw, P., Gomes, S. L., Sweeney, K., Ely, B. & Shapiro, L. 1983. Methylation involved in chemotaxis is regulated during Caulobacter differentiation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 5261 - 5265.

Sheffery, M. & Newton, A. 1977. Reconstitution and purification of flagellar filaments from Caulobacter crescentus. J. Bacteriol. 132, 1027 - 1030.

Sheffery, M. & Newton, A. 1981. Regulation of periodic protein synthesis in the cell cycle: Control of initiation and termination of flagellar gene expression. Cell 24, 49 -57.

Sherris, D. & Parkinson, J. S. 1981. Post translational processing of methyl-accepting chemotaxis proteins in Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 6051 - 6055.

Silverman, P. M. & Simon, M. I. 1977. Chemotaxis in Escherichia coli: methylation of the che gene products. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 3317 - 3321.

Slocum, M. K. & Parkinson, J. S. 1983. Genetics of methyl-accepting chemotaxis proteins in Escherichia coli: Organization of the Tar region. J. Bacteriol. 155, 565 - 577.

Smit, J. & Agabian, N. 1982a. Caulobacter crescentus pili: Analysis of production during development. Dev. Biol. 89, 237 - 247.

Smit, J. & Agabian, N. 1982b. Surface patterning and morphogenesis: Biogenesis of a periodic surface array during Caulobacter development. J. Cell Biol. 95, 41 -49.

Snyder M. A., Stock, J. B. & Koshland, D. E., Jr. 1984. Carboxymethyl esterase of bacterial chemotaxis. Methods in Enzymology 106, 321 - 330.

Springer, M. S., Goy, M. F. & Adler, J. 1977a. Sensory transduction in Escherichia coli: A requirement for methionine in sensory adaptation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 183 - 187.

Springer, M. S., Goy, M. F. & Adler, J. 1977b. Sensory transduction in Escherichia coli: Two complementary pathways of information processing that involve methylated proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 3312 - 3316.

Springer, M. S., Goy, M. F., Adler, J. 1979. Protein methylation in behavioural control mechanisms and in signal transduction. Nature 280, 279 - 284.

Springer, M. S., Kort, E. N., Larsen, S. H., Ordal, G. O., Reader, R. W. & Adler J. 1975. Role of methionine in bacterial chemotaxis: Requirement for tumbling and involvement in information processing. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 4640 - 4644.

Springer, M. S., Zenolari, B. & Pierzchala, P.A. 1982. Ordered methylation of the methyl-accepting chemotaxis proteins of Escherichia coli. J. Biol.Chem. 257, 6861 - 6866.

Springer, W. R. & Koshland, D. E., Jr. 1977. Identification of a protein methyltransferase as the cheR gene product in the bacterial sensing system. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 3659 - 3663.

Spudich, J. L. & Koshland, D. E., Jr. 1975. Quantitation of the sensory response in bacterial chemotaxis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 710 - 713.

Takano, R. & Kafefuda, T. 1972. Involvement of a bacterial factor in morphogenesis of bacteriophage capsids. *Nature New Biol.* 239, 34 - 37.

Tilly, K. & Georgopoulos, C. 1982. Evidence that the two Escherichia coli groE morphogenetic gene products interact in vivo. *J. Bacteriol.* 149, 1082 - 1088.

Tilly, K., Mckittrick, N., Zylicz, M. & Georgopoulos, C. 1983. The dnaK protein modulates the heat-shock response of Escherichia coli. *Cell* 34, 641 - 646.

Tilly, K., Murialdo, H. & Georgopoulos, C. 1981. Identification of a second Escherichia coli groE gene whose product is necessary for bacteriophage morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 1629 - 1633.

Tissieres, A., Mitchell, H. K. & Tracy, U. M. 1974. Protein synthesis in salivary glands of Drosophila melanogaster: Relation to chromossome puffs. *J. Mol. Biol.* 84, 389 - 398.

Toews, M. L. & Adler, J. 1979. Methanol formation in vivo from methylated chemotaxis proteins in Escherichia coli. *J. Biol. Chem.* 254, 1761 - 1764.

Ullah, A. J. H. & Ordal, G. W. 1981. Purification and characterization of methyl-accepting chemotaxis protein

methyltransferase I in Bacillus subtilis. Biochem. J. 199, 795 - 805.

Van der Werf, P. & Koshland, D. E., Jr. 1977. Identification of a γ - glutamyl methyl ester in a bacterial membrane protein involved in chemotaxis. J. Biol. Chem. 252, 2793 - 2795.

Wada, M. & Itikawa, H. 1984. Participation of Escherichia coli K-12 groE gene products in the synthesis of cellular DNA and RNA. J. Bacteriol. 157, 694 - 696.

Wagenknecht, T., DeRosier, D. J., Aizawa, S. I. & Macnab, R. M. 1982. Flagellar hook structures of Caulobacter and Salmonella and their relationship to filament structure. J. Mol. Biol. 162, 69 -

Wagenknecht, T., DeRosier, D. J., Shapiro, L. & Weissborn, A. 1981. Three-dimensional reconstruction of the flagellar hook from Caulobacter crescentus. J. Mol. Biol. 151, 439 - 465.

Wang, E.A. & D. E. Koshland, Jr. 1980. Receptor structure in the bacterial sensing system. Proc. Natl. Acad. Sci. 77: 7157 - 7161.

Weissborn, A., Steinman, H. M., & Shapiro, L. 1982. Characterization of the proteins of the Caulobacter crescentus flagellar filament: peptide analysis and filament organization. J. Biol. Chem. 257, 2066 - 2074.

Yamamori, T. & Yura, T. 1982. Genetic control of heat shock protein synthesis and its bearing on growth and thermal resistance in Escherichia coli K-12. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 860 - 864.

Yokota, T. & Goetz, J. S. 1970. Requirement of adenosine 3',5'-cyclic phosphate for flagella formation in Escherichia coli and Salmonella typhimurium. J. Bacteriol. 103, 513 -516

Zimmerman, J. L., Petri, W. & Meselson, M. 1983. Accumulation of a specific subset of D. melanogaster heat shock mRNAs in normal development without heat shock. Cell 32, 1161

Zylicz, M., LeBowitz, J. H., McMaken, R. & Georgopoulos, C. 1983. The dnaK protein of Escherichia coli possesses an ATPase and autophosphorylating activity and is essential in an in vitro DNA replication system. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 6431 - 6435.